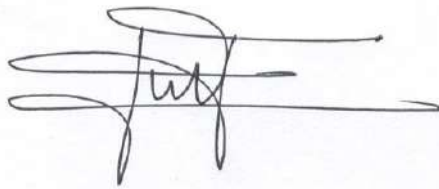


Santiago, 26 de marzo de 2019

Señora/Señorita  
Claudia Cortés Flores  
Profesional Área Recursos Naturales y Biodiversidad  
SEREMI del Medio Ambiente de la Región Metropolitana  
Presente

Junto con saludar, por medio del presente se envía las correcciones del informe final del proyecto “**Desarrollo de investigación aplicada y actividades de difusión para la conservación para la Rana chilena (*Calyptocephalella gayi*) en la Region Metropolitana de Santiago**”.

Sin otro particular, se despide atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Torres', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a prominent horizontal stroke across the middle.

**Marco Antonio Méndez Torres**  
**Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias**  
**Universidad de Chile**

**INFORME FINAL PROYECTO (CORRECCIONES):**

**“DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN APLICADA Y ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN  
PARA LA CONSERVACIÓN DE LA RANA CHILENA (CALYPTOCEPHELELLA  
GAYI) EN LA REGIÓN METROPOLITANA DE SANTIAGO”**

**26-03-2019**

**Informe elaborado por:**

**Jefe de Proyecto:**

- Dr. Marco Méndez Torres

**Profesionales del área ciencias ambientales:**

- MV Mg. Cs. Paola Sáez González
- MV Mg. Cs. Franco Cruz Jofré
- Lic. Cs. Mg. Pablo Fibla López
- Lic. Cs. José Serrano Serrano
- Lic. Cs. Alejandra Fabres Contreras

## Tabla de contenidos

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción.....</b>                                                                   | <b>1</b>  |
| <b>2. Metodología.....</b>                                                                    | <b>2</b>  |
| 2.1 Objetivo específico nº 1: Ampliar las prospecciones.....                                  | 2         |
| 2.2 Objetivo específico nº 2: Desarrollar estudios ecológicos y biológicos.....               | 5         |
| 2.3 Objetivo específico nº 3: Generar estudios genéticos de las poblaciones.....              | 8         |
| 2.4 Objetivo específico nº 4: Obtener datos sobre enfermedades emergentes.....                | 9         |
| 2.5 Objetivo específico nº 5: Desarrollar actividades de educación y difusión.....            | 10        |
| <b>3. Resultados y Discusión.....</b>                                                         | <b>13</b> |
| 3.1 Objetivo específico nº 1: Ampliar las prospecciones.....                                  | 13        |
| 3.2 Objetivo específico nº 2: Desarrollar estudios ecológicos y biológicos de la especie..... | 18        |
| 3.3 Objetivo específico nº 3: Generar estudios genéticos de las poblaciones.....              | 36        |
| 3.4 Objetivo específico nº 4: Obtener datos sobre enfermedades emergentes.....                | 40        |
| 3.5 Objetivo específico nº 5: Desarrollar actividades de educación y difusión.....            | 43        |
| <b>4. Conclusiones.....</b>                                                                   | <b>48</b> |
| <b>5. Referencias.....</b>                                                                    | <b>51</b> |
| <b>6. Anexo Fotográfico.....</b>                                                              | <b>55</b> |

## 1. Introducción y Objetivos

La rana chilena, *Calyptocephalella gayi* es una especie endémica de la zona centro sur de Chile, y una de las nueve especies de anuro que se distribuye en la Región Metropolitana. De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés), y al Reglamento de Clasificación de Especies de Chile (RCE, DS N° 50/2008 del MINSEGPRES), el estado de conservación de *C. gayi* es “Vulnerable”. Dentro de las amenazas más importantes para la especie se han señalado: la destrucción del hábitat, ya que se distribuye en la zona con mayor población del país, y el sobreconsumo, ya que debido a su gran tamaño es cosechada de manera ilegal, pese a estar protegida por la Ley de Caza y haber sido incluida en el Apéndice III de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, CITES, en el año 2011 (Vélez & Acuña 2012). Lo anterior motivó el desarrollo de investigación orientada a promover la conservación de esta especie. En este sentido, la Seremi del Medio Ambiente de la Región Metropolitana desarrolló en 2015 el proyecto “Acciones de Conservación para la Rana chilena (*Calyptocephalella gayi*)”, cuyos resultados produjeron el desarrollo de un nuevo proyecto, orientado principalmente en ampliar los resultados obtenidos en 2015. Es así como surge el presente proyecto, cuyo objetivo general es desarrollar investigación aplicada para la conservación de la rana chilena (*Calyptocephalella gayi*) y realizar actividades de difusión en la Región Metropolitana de Santiago. Como objetivos específicos se busca:

- 1) Ampliar las prospecciones realizadas durante el año 2015.
- 2) Desarrollar estudios ecológicos y biológicos de la especie de manera de estimar abundancia de las poblaciones, caracterizar el hábitat y determinar las especies que habitan en simpatria con *C. gayi*.
- 3) Generar estudios genéticos de las poblaciones de *C. gayi* encontradas en la región.
- 4) Obtener datos sobre enfermedades emergentes que pudieran estar afectando a *C. gayi*.
- 5) Desarrollar actividades de educación y difusión en todos los lugares con presencia de la especie, tanto a la comunidad como a las escuelas existentes en la zona de influencia, entre otros.

## 2. Metodología

### 2.1 Objetivo específico n°1: ampliar las prospecciones realizadas durante el año 2015

La elección de los sitios prospectados durante la realización de este proyecto se basó en el modelo de distribución potencial de *Calyptocephalella gayi* en la Región Metropolitana, elaborado en 2015 por el Proyecto “Acciones de Conservación para la rana chilena” (Seremi del Medio Ambiente, Región Metropolitana y Laboratorio de Genética y Evolución, Universidad de Chile) (**Figura 1**). De acuerdo con este modelo, *C. gayi* se encontraría asociada a los cursos de agua, en sectores de baja altura. Por lo tanto, las prospecciones se concentraron en los sistemas hidrológicos asociados a las diferentes sub-cuencas de la cuenca del río Maipo en la Región Metropolitana, bajo los 1.000 msnm.

Las prospecciones se realizaron durante la época reproductiva, es decir, desde el mes de septiembre hasta el mes de enero de cada año. Lo anterior permite registrar, además de los individuos adultos, los huevos y los diferentes estadios de metamorfosis de *C. gayi*. La realización de las prospecciones durante la época reproductiva se debe también a que la probabilidad de registrar a la especie durante el periodo de otoño e invierno es baja producto de la disminución de la actividad diaria de los anfibios que habitan en la región centro y centro-sur de Chile.

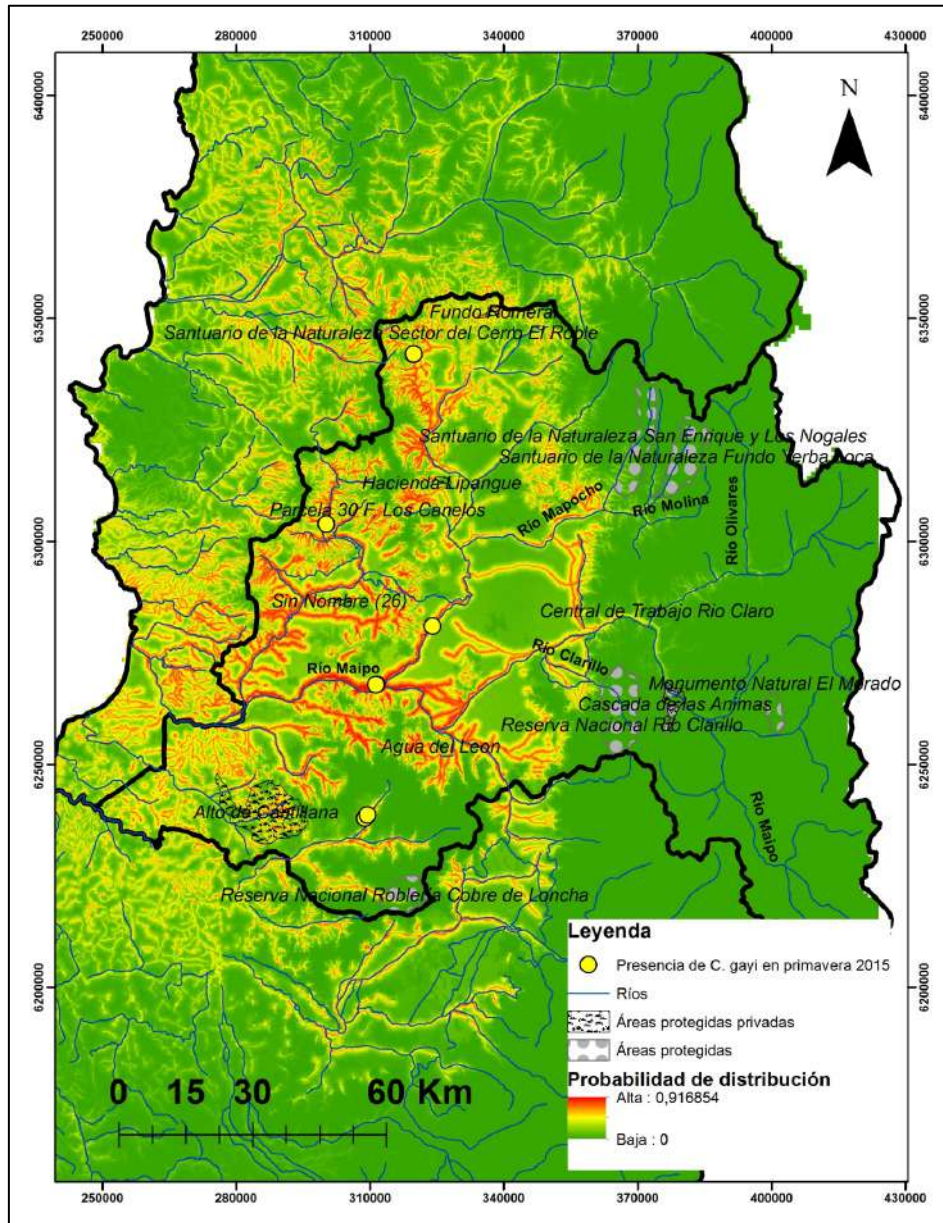
El reconocimiento de la especie se realizó mediante registro visual y auditivo. En cada prospección participaron al menos tres profesionales del equipo consultor. La búsqueda de la rana chilena se concentró dentro de los cuerpos de agua y en los bordes de la vegetación, para lo cual se utilizó una red de pesca. En el caso de las prospecciones nocturnas, se utilizó la reproducción de audio (*playback*) para estimular los cantos de los machos, y así aumentar la probabilidad de registro de la especie mediante el reconocimiento auditivo. Las prospecciones diurnas se realizaron a partir de las 10:00 hrs, y las nocturnas a partir de las 19:00 hrs., aproximadamente. El tiempo de la prospección en cada lugar fue variable (2-4 horas), dependiendo de la extensión del sistema.

Para extender la red de búsqueda de nuevos registros de *C. gayi*, durante este proyecto se creó un grupo de ciencia ciudadana a través de las redes sociales (<https://www.facebook.com/RanaChilena/>). La ciencia ciudadana es un fenómeno reciente donde los científicos invitan a la participación pública de una investigación y, por lo tanto, todas las personas no profesionales en el área científica pueden aportar a este objetivo (Hand 2010). En este modo de operar, se le pidió a la ciudadanía interesada por la naturaleza, colaborar con registros fotográficos, acompañados de la fecha, la localidad y eventualmente con la georreferencia para así dar mayor veracidad y validez al dato que se está aportando. No obstante, es necesario considerar que estos registros aportados por la ciudadanía deben ser posteriormente corroborados por investigadores con experiencia en la especie, o al menos en anfibios.

Adicionalmente, en cada nuevo sitio explorado se realizó una encuesta breve a los pobladores que se encontraban al momento de la prospección. La encuesta incluye un set de seis preguntas cuyo principal objetivo es determinar si los pobladores conocen a la rana chilena. Las preguntas son las siguientes:

- 1) ¿Hace cuántos años usted es residente en este sector?
- 2) ¿Conoce o ha escuchado hablar de la rana chilena?
- 3) ¿Usted ha visto y/o escuchado a la rana chilena?
- 4) Si la pregunta 3 es afirmativa, ¿podría reconocerla?
- 5) Si la pregunta 3 es afirmativa, ¿cuándo fue la última vez que vio/escuchó a la rana chilena?
- 6) ¿Le gustaría participar de un taller para conocer o saber más de la rana chilena?.

Dentro de estas preguntas (pregunta nº 4), se le mostró a la gente un set de fotografías que incluye especies co-distribuidas con la rana chilena, como son el sapo espinoso (*Rhinella spinulosa*), el sapito de cuatro ojos (*Pleurodema thaul*), y la rana africana (*Xenopus laevis*), además de la rana grande chilena; para así determinar si realmente son capaces de reconocer a la especie, en caso que afirmen haberla visto; o bien que la conozcan en caso de que no sea así.



**Figura 1.** Mapa de distribución potencial de *Calyptocephalella gayi* para la Región Metropolitana elaborado en el programa Maxent (v.3.3) en base a registros históricos y observaciones obtenidas en primavera de 2015.



## **2.2 Objetivo específico nº 2: desarrollar estudios ecológicos y biológicos de la especie de manera de estimar abundancia de las poblaciones, caracterizar el hábitat y determinar las especies que habitan en simpatria con *C. gayi*.**

### *Revisión de la literatura asociada al tema*

Acuña *et al.*, (2014); Benevides *et al.*, (2019); Castañeda *et al.*, (2006); Darras *et al.*, (2016); Dodd (2010); Donnelly & Guyer (1994); Dorcas *et al.*, (2010); Gajardo, (1994); Green (2003); Hammer *et al.*, (2001); Hermosilla & Pincheira (1992); Lemos-Espinal *et al.*, (2005); Luebert & Plischoff, (2006); Penna (2005); Penna & Veloso (1990); Soto *et al.*, (2008); Valenzuela-Sánchez *et al.*, (2019); Vélez (2013); Willacy *et al.*, (2015); Williams *et al.*, (2002).

### *Sitios de estudio*

Para desarrollar este objetivo se seleccionaron dos sitios con ambientes contrastables en cuanto a la intervención antrópica. Para fines de este proyecto, un ambiente con alta intervención humana es aquel que presenta una presión antropogénica constante, con presencia de modificaciones deliberadas en el curso de agua, así como de contaminantes en el ambiente. Por el contrario, un ambiente con baja intervención humana es aquel que presenta nula o baja presión antropogénica, cambios menores en el curso de agua, con nula o baja presencia de contaminantes en el ambiente. Considerando los antecedentes recolectados por el proyecto “Acciones de Conservación para la rana chilena” (Seremi del Medio Ambiente, Región Metropolitana), se seleccionó el Parque Municipal El Trapiche, ubicado en la comuna de Peñaflor, y que presenta una alta intervención humana; y la localidad de Pichi, ubicada en la comuna de Alhué, ya que este sitio presenta una baja intervención antrópica. Es necesario considerar que, dado que la Región Metropolitana corresponde a la más densamente pobladas del país y, que, por lo tanto, posee una fuerte intervención no fue posible seleccionar ambientes con nula intervención humana (prístinos).

### *Estimación poblacional usando grabaciones de sonido*

Para abordar este objetivo se instalaron sistemas de grabación automática (SM3 Wildlife Acoustics) en los dos sitios de monitoreo: Parque Municipal El Trapiche y Pichi, en diversos periodos en los años 2016 (octubre a diciembre), 2017 (octubre a diciembre) y 2018 (enero y agosto a noviembre). Los sistemas de grabación se montaron en árboles con un DAP > 40cm a aproximadamente 120 cm de altura sobre el suelo. El muestreo de sonidos se realizó durante cinco minutos cada media hora después del atardecer y antes del amanecer entre las 20:00 y las 6:30 hrs. De acuerdo con el primer monitoreo realizado en 2016 que abarcó las 24 hrs del día, la actividad vocal de *C. gayi* ocurre exclusivamente en dicho horario. Las grabaciones se realizaron a una tasa de frecuencia de 44 kHz, sin filtros y en formato WAV.

El contenido de las grabaciones se analizó utilizando el software Adobe Audition CC, la detección y el conteo de cantos se hizo de forma manual con base en las características temporales y espectrales del canto de *C. gayi* reportado por Penna & Veloso (1990). La tasa de actividad de canto se registró a partir del conteo de los cantos de *C. gayi* por su detección visual y auditiva en el espectrograma. Si bien la inspección manual se realiza en más tiempo que la detección automática realizada por software especializado, ésta suele incluir solamente conteos de cantos con una resolución que supera el ruido ambiental, por lo cual la supervisión visual de las grabaciones aproxima mayor precisión que la detección automática realizada por distintos softwares (Willacy *et al.*, 2015). Durante el conteo manual de los cantos se consideraron observaciones sobre el rango del armónico dominante de las señales para identificar firmas espectrales que podrían corresponder a individuos de distinto tamaño.

Adicionalmente, se registró el área de detección de los sistemas de grabación en los dos sitios de estudio emitiendo el canto de *C. gayi* a distancias de 1, 2, 5, 10 y 20 m en tres direcciones

al azar y en una intensidad de 95 dB (SPL RMS a 50 cm de distancia), la cual es conocida a partir de los de los registros de Penna & Veloso (1990) y Penna (2005). Este cálculo permitió aproximar el espacio de detección confiable en un área de 400m<sup>2</sup> alrededor del sistema de grabación. Adicionalmente, se buscó relacionar la tasa de cantos con la densidad de individuos registrada con el número de firmas espectrales siguiendo el modelo de Benevides *et al.*, (2019) para generar un modelo predictivo entre la actividad vocal observada y la amplitud con la densidad o abundancia de individuos en los coros.

#### *Caracterización de los hábitats y especies en simpatria con C. gayi*

Se utilizaron dos variables y/o criterios para la comparación de los hábitats, estos son: la calidad del agua y la caracterización de la vegetación (número de especies nativas e introducidas) asociada al sistema donde se registró a *C. gayi* con respecto a la urbanización y sitios agrícolas. La caracterización de la calidad del agua se realizó en base a los parámetros de pH, TDS (sólidos disueltos totales), salinidad, conductividad y temperatura, tomados con un equipo multiparámetros modelo PCS Testr 35 (Oakton®). Se realizó un análisis de componentes principales y una prueba de t entre dos muestras para comparar las características ambientales entre sitios y localidades en el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001)

Respecto de la vegetación, con el objetivo de contextualizar el marco biogeográfico en el cual se inserta el área de estudio, se realizó una revisión bibliográfica de las clasificaciones vegetacionales que existen en la literatura más reciente. Para ello, se consultó “*La vegetación natural de Chile; clasificación y distribución geográfica*” (Gajardo, 1994), y la “*Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile*” (Luebert & Pliscoff, 2006). La clasificación propuesta por Gajardo (1994), establece de manera jerárquica una clasificación acorde a las formas de vida, adaptaciones, estructura espacial y composición florística de los paisajes vegetacionales, los cuales quedan finalmente ordenados en ocho regiones, 21 sub-regiones y 84 formaciones vegetales. Por otro lado, la clasificación propuesta por Luebert & Pliscoff (2006), efectúa una delimitación de la vegetación asociada en comunidades, principalmente definidas por los factores ecológicos que influyen en ellas. Las unidades ecológicas creadas a partir de este criterio se denominan “pisos vegetacionales”, los cuales están determinados por el clima, usándose para definir este criterio la fisionomía y composición florística.

Se ha observado que la cobertura vegetal de plantas acuáticas es relevante para la presencia de rana chilena, esto debido a que sirve de refugio para los diferentes estados ontogenéticos de la rana chilena. Por lo tanto, para este proyecto es importante estimar la cobertura, así como también la composición vegetal presentes en los sitios de estudios. Para ello se estimó la cobertura total de la vegetación y se realizó un listado con las especies vegetales en los sitios. Adicionalmente, se registró por observación directa las especies de vertebrados (aves, mamíferos, anfibios y peces) que cohabitan en los lugares de estudio y las interacciones observadas con la rana chilena, con especial énfasis sobre las especies exóticas (e.g *Oncorhynchus mykiss*, *Xenopus laevis*), las que podrían tener un efecto negativo extra sobre las poblaciones de *C. gayi*. Se cuantificó la presencia de bioindicadores del estado del agua, mediante una caracterización general de la entomofauna asociada a la vegetación de los ambientes estudiados.

#### *Justificación de la metodología*

Estudios de variables ambientales y su relación con *C. gayi* han sido realizados esencialmente en condiciones de cautiverio y laboratorio, estos estudios se han centrado en los efectos sobre el desarrollo y características de larvas y embriones como tamaño, sobrevivencia, tiempo a la metamorfosis entre otros aspectos:

- Los aspectos de crianza, como ganancia de peso, tipo de alimentación, temperatura del agua fueron tratados extensamente en el libro: “Manejo en Cautiverio de la Rana Grande Chilena”, Claudia Vélez (2013), editado por la Universidad Santo Tomás que recoge experiencias obtenidas de Tesis y trabajos de investigación desarrollados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Recursos Naturales.
- Otros trabajos han abordado factores como el pH, Temperatura y agentes genotóxicos sobre el desarrollo larval en esta especie (Hermosilla & Pincheira 1992, Castañeda *et al.*, 2006, Soto *et al.*, 2008), o la desecación causando eventos de mortalidad masiva de adultos (Acuña *et al.*, 2014). Pocos trabajos han hecho un esfuerzo de caracterizar o analizar variables ambientales en esta especie en poblaciones naturales, el trabajo aquí presentado significa un aporte a entender los tipos de ambientes (variables de calidad del agua) donde habita *Calyptocephalella gayi* en Chile Central.

En relación con la evaluación de estatus poblacional de anfibios, esta está basada en mediciones de cambio en la abundancia. Los métodos comúnmente utilizados incluyen protocolos de muestreo de captura-recaptura que requieren que una población sea muestreada  $k$ -veces en distintos intervalos de tiempo para que la dimensión de la población se estime con base en la subsecuente historia de capturas (Williams *et al.*, 2002). La abundancia también puede estimarse mediante la remoción permanente de individuos capturados hasta la conclusión del estudio, sin embargo, estos métodos de muestreos no se consideran cuando la densidad poblacional es escasa o su estatus poblacional se estima en declinación (Lemos-Espinal, *et al.*, 2005).

El uso de métodos de captura-recaptura tienen muchas limitaciones para que su ejecución e interpretación sea exitoso, por ejemplo, el número de individuos anfibios puede fluctuar ampliamente en los sitios de estudio debido a causas naturales y a limitaciones ambientales para realizar capturas y detectar individuos en los hábitats naturales (Green 2003; Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2019). Además, requieren de esfuerzos de muestreo intensivos que implican el marcado de un gran número de individuos para satisfacer los supuestos mínimos estadísticos de los modelos (Donnelly & Guyer, 1994; Dodd, 2010). Estos factores en conjunto limitan el número de sitios que pueden ser muestreados y frecuentemente resultan en estimaciones poblacionales con grandes varianzas, lo que implica poder estadístico bajo para detectar las tendencias poblacionales (Lemos-Espinal *et al.*, 2005; Dodd 2010).

El muestreo pasivo por medio de sonidos permite detectar señales específicas de adultos de la especie a la cual se enfoca este estudio y estimar mediante el uso de índices o conteos simples de cantos, la actividad vocal que se concentra durante el periodo reproductivo (Dorcas *et al.*, 2010; Willacy *et al.*, 2015). Este método de muestreo permite mejorar las posibilidades de detección de individuos adultos durante ventanas de tiempo más amplias que incluyen la obtención de datos de manera remota y permanente a partir de la identificación del espacio acústico al que tiene alcancen los sistemas de grabación que dependiendo del ambiente (Darras *et al.*, 2016).

Durante la estación no reproductiva del año 2016, el conteo de individuos se realizó mediante captura manual por medio de redes y trampas acuáticas para *C. gayi*. En esta etapa se descartó la metodología basada en el análisis de registros de captura-recaptura debido a la insuficiencia de recapturas para cubrir los supuestos mínimos de capturas y recapturas (Lemos-Espinal *et al.*, 2005; Dodd 2010). Alternativamente, se consideró que el registro acústico de la actividad de cantos aportaba mejor resolución para el esfuerzo que requería el cumplimiento del objetivo de este estudio. Algunas aproximaciones metodológicas han permitido estimar la densidad de individuos a partir del uso de sistemas de grabación en pocas especies bien estudiadas de anuros y aves. Sin embargo, ello requiere la estandarización a partir de la medición

de otros factores adicionales, como los niveles de ruido (medido mediante un sonómetro), el monitoreo continuo de la densidad de los espacios monitoreados aunado del monitoreo acústico respectivo y un conocimiento detallado de la biología reproductiva de la especie y la influencia de la dinámica ambiental sobre la actividad vocal (Benevides *et al.*, 2017). Estas condiciones no se cumplen para el caso de *C. gayi*, particularmente en lo relacionado al desconocimiento de la influencia ambiental (precipitación y temperatura) con la actividad vocal y el conocimiento de la densidad vocal en los sitios de estudio. Sin embargo, esta es una primera aproximación que ha permitido conocer las tasas de canto producidas en los sitios de estudio y su variación intra- e inter-anual. Estos niveles de tasa de actividad permiten estimar de manera indirecta niveles mínimo y máximo de abundancia coral, así como determinar los niveles basales de la tasa de canto individual de la especie (Dorcas *et al.*, 2010; Willacy *et al.*, 2015).

### **2.3 Objetivo específico nº 3: generar estudios genéticos de las poblaciones de *C. gayi* encontradas en la región**

#### *Revisión de la literatura asociada al tema*

Frankham, Ballou & Briscoe (2002); Fouquet *et al.*, (2012); Gallardo *et al.*, (2012); Irisarri *et al.*, (2012); Lobos *et al.*, (<https://www.herpetologiadechile.cl/documentos>); McCartney-Melstad & Shaffer (2015); Van Buskirk & McCollum (2000).

#### *Metodología*

La recolección de los ejemplares se realizó con una red de pesca con abertura de malla <1cm. Durante la captura y manipulación se utilizó guantes de látex o nitrilo. Para obtener las muestras biológicas los individuos capturados fueron sometidos a anestesia utilizando benzocaína (300 mg/L) diluida en agua procedente del mismo sitio de captura. Luego de la recuperación completa de la anestesia los ejemplares fueron liberados en el lugar de *procedencia*. Las muestras obtenidas corresponden a células de mucosa bucal obtenidas con tómulas, o un trozo de membrana interdigital (< 3 mm<sup>3</sup>), en el caso de los adultos; y un trozo de cola (< 3 mm<sup>3</sup>), en el caso de los renacuajos. Este tipo de muestras han sido ampliamente utilizadas en estudios genéticos de anfibios y han mostrado carecer de efectos dañinos para los individuos (Van Buskirk & McCollum 2000; Gallardo *et al.*, 2012). Todas las muestras se conservaron en etanol absoluto para biología molecular, en el Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

#### *Justificación de la metodología*

La metodología para la captura y manipulación de ejemplares de *C. gayi* utilizada para este objetivo se sustenta en el “Protocolo para el control de enfermedades infecciosas en Anfibios durante estudios de campo” (<https://www.herpetologiadechile.cl/documentos>), elaborado por investigadores especialistas en anfibios de la Red Chilena de Herpetología. Por su parte, la metodología para la obtención de las muestras biológicas aquí utilizada se encuentra respaldada por estudios científicos que han mostrado carecer de efectos dañinos para los individuos (Van Buskirk & McCollum 2000; Gallardo *et al.*, 2012).

## 2.4 Objetivo específico nº 4: Obtener datos sobre enfermedades emergentes que pudieran estar afectando a *C. gayi*

### *Revisión de la literatura asociada al tema*

Berger *et al.*, (2005); Boyle *et al.*, (2004); Garland *et al.*, 2010; Hyatt *et al.*, 2007; Longcore *et al.*, (1999); Soto-Azat *et al.*, (2013); Soto-Azat *et al.*, (2016); Valenzuela-Sánchez & Medina-Vogel, (2014); Valenzuela-Sánchez *et al.*, (2017).

### *Metodología*

La toma de muestras para la detección de quitridiomycosis en *Calyptocephalella gayi* se realizó a través de un método no invasivo descrito por Soto-Azat *et al.*, (2013), en el cual se utilizaron hisopos previamente esterilizados (MW100, Medical & WireEquipment Co.). El muestreo se realizó frotando firmemente un hisopo, en cada individuo cinco veces sobre el abdomen, la pelvis, la superficie ventral de cada miembro posterior (fémur y tibia), y la superficie plantar de cada pata trasera, para completar un total de 35 pasadas (**Figura X**). Todas las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta ser procesadas. Después del muestreo los animales fueron liberados en el sitio de recolección.

La detección de la enfermedad se realizó mediante el método molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR). El protocolo utilizado se describe a continuación: los hisopos se introdujeron individualmente en un tubo estéril de 1,5 mL con 60 µL de PrepMan Ultra (Applied Biosystems®), y entre 30 y 40 mg de perlas de zirconio/sílice de 0,5 mm de diámetro (productos Biospec®). Para cada muestra, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo de Boyle *et al.*, (2004). El ADN extraído fue diluido (1:10) en agua doblemente destilada y fue analizado con un ensayo cuantitativo de qPCR Taqman, con primers específicos para la región ITS-1/5.8S del DNA ribosomal de *B. dendrobatidis*. Además, se utilizó suero de albúmina bovina (BSA), incluido en la mezcla para minimizar la inhibición de la PCR (Garland *et al.*, 2010). Para cada muestra, los ensayos de diagnóstico se realizaron en duplicado y los estándares de concentración conocida de zoosporas fueron incluidos dentro de cada placa de PCR, al igual que los controles negativos. El resultado se fue positivo cuando: (1) la amplificación (es decir, una sigmoide) ocurra en los dos ensayos de PCR replicados; (2) los valores superiores a 0,1 equivalentes genómicos (GE) se obtengan de ambas reacciones replicadas; y (3) el promedio GE de ambas réplicas sean mayores que su desviación estándar. El DNA extraído de cualquier muestra positiva se analizó nuevamente por duplicado y sólo se determinó positivo si el DNA del hongo es claramente amplificado en pocillos duplicados por segunda vez (Soto-Azat *et al.*, 2013).

### *Justificación de la metodología*

La detección de la enfermedad se realizó mediante el método molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), técnica que permite diagnosticar y cuantificar la enfermedad desde una zoospora en adelante, a partir del cuarto día de post infección (Boyle *et al.*, 2004; Hyatt *et al.*, 2007). Se escogió esta metodología debido a que permite detectar efectivamente y de manera temprana la presencia del hongo quítrido a partir de las muestras de hisopo sin necesidad de recurrir a la eutanasia de los individuos muestreados, así como cuantificar su carga infecciosa (Boyle *et al.*, 2004). Asimismo, esta metodología ha sido ampliamente utilizada en estudios de detección del hongo quítrido en Chile (Soto-Azat *et al.*, 2013). Este análisis molecular se realizó en el Centro de Investigación para la Sustentabilidad (CIS), de la Facultad de Ecología y Recursos Naturales, de la Universidad Andrés Bello; a cargo del Dr. Claudio Soto Azat y del Médico Veterinario Mg. Cs. Mario Alvarado Rybak.



**Figura 2.** Procedimiento de obtención de muestras para detección del hongo quítrido en espécimen de rana chilena. Pichi, Alhué, 24.05.2017.

### **2.5 Objetivo específico n° 5: desarrollar actividades de educación y difusión en todos los lugares con presencia de la especie, tanto a la comunidad como a las escuelas existentes en la zona de influencia, entre otros.**

Durante la realización de este proyecto, se desarrollaron cuatro tipos de actividades de educación y difusión: (1) difusión en una página web, (2) charlas en colegios, (3) participación en el “Día de la Fauna Chilena” y (4) taller de capacitación para guardaparques de áreas protegidas. Para todas estas actividades se utilizó material de apoyo desarrollado especialmente, y que consistió en la elaboración de afiches informativos e ilustraciones sobre las características de *Calyptocephalella gayi*, así como de sus principales amenazas. Los afiches fueron confeccionados por el biólogo de la Universidad de Chile, Moisés Valladares, y consistieron en un póster con una infografía y un póster con una actividad de origami que incluye una pequeña reseña de la especie. Las ilustraciones consistieron en cinco caricaturas confeccionadas por Tomás Infante ([www.faanaimo.cl](http://www.faanaimo.cl)), que se especializa en diseñar caricaturas de fauna nativa. Todo el material de difusión confeccionado para este proyecto se adjunta en un archivo digital como producto del proyecto.

#### *Difusión en página web Facebook @RanaChilena*

Para realizar la difusión de las actividades asociadas al proyecto, tanto el trabajo de campo como las actividades de difusión, se creó un grupo de ciencia ciudadana a través de las redes sociales (<https://www.facebook.com/RanaChilena/>). Esta plataforma también se utilizó para extender la red de búsqueda de poblaciones de rana chilena en la Región Metropolitana (ver objetivo específico n°1).

### *Charlas de educación y difusión en colegios*

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron dos charlas en colegios localizados en cercanía a poblaciones de rana chilena. Las charlas se programaron en cinco etapas, según el siguiente detalle: a) encuesta verbal, b) presentación audiovisual, c) actividad grupal, d) actividad práctica y e) entrega de material de difusión.

La encuesta verbal tuvo como objetivo determinar si el público objetivo era capaz de reconocer a la rana chilena y su hábitat, y se evaluó mediante preguntas expuestas en una presentación audiovisual. Se realizaron tres preguntas: (1) ¿conoces a la rana chilena?, para lo cual se mostró al público cuatro fotografías de anfibios, incluyendo a la rana chilena, estas son: sapito de cuatro ojos (*Pleurodema thaul*), sapo espinoso (*Rhinella spinulosa*), ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*); (2) ¿has escuchado a la rana chilena?, para esta pregunta se presentó el audio de los cantos de las mismas especies mostradas en la primera pregunta; y (3) ¿dónde vive la rana chilena?, para lo cual se presentó cuatro fotografías de ambientes contrastantes. Para cada pregunta, se registró el número de respuestas positivas por alternativa.

La presentación audiovisual tuvo como objetivo dar a conocer generalidades de los anfibios y de la rana chilena, considerando su forma de vida, hábitat y amenazas. Seguido de la presentación, se realizó la actividad grupal, la que tuvo como objetivo determinar si los estudiantes eran capaces de percibir, en base a la presentación audiovisual, cuáles son las principales amenazas que podrían afectar a la rana chilena, y de proponer acciones para proteger a la especie de cada una de esas amenazas. Para ello se les pidió a los estudiantes que propusieran tres amenazas y tres acciones de protección. En la actividad práctica se hizo una exposición utilizando material conservado, pertenecientes a la colección herpetológica del Laboratorio de Genética y Evolución. Esta muestra incluyó ejemplares de anfibios en los distintos estados de metamorfosis (en particular de la especie *Rhinella spinulosa*), y se procuró que el público se familiarizara con el ciclo de vida de estos organismos. Asimismo, se exhibieron animales que forman parte de la red trófica de la rana chilena, tales como insectos y peces. Adicionalmente, se exhibió una muestra de piezas óseas de un ejemplar de rana chilena. Finalmente, se realizó una actividad de manualidades con origami y se hizo entrega de material de difusión al público, esto con el objetivo plasmar el conocimiento adquirido en la presentación audiovisual y actividades prácticas con elementos que destaquen las características de la especie y sus principales amenazas. La presentación audiovisual utilizada para esta actividad se adjunta en un archivo digital como producto del proyecto.

### *Día de la Fauna chilena Chilena*

Esta actividad se creó el año 2014, y es organizada por el Instituto Jane Goodall Chile, con apoyo del Museo Nacional de Historia Natural. El día de la fauna se realiza en el Parque Quinta Normal el primer sábado del mes de noviembre de cada año. En esta actividad se realizaron charlas breves acerca de la especie y de las actividades del equipo consultor en este proyecto (objetivos, principales resultados, etc.), las que se presentaron en un *stand* alusivo a la rana chilena. Se distribuyó material de difusión a los visitantes del *stand* y se expuso un set de fotografías (30 x 40 cm aproximadamente) de *C. gayi*.

### *Taller de capacitación de guardaparques y administradores de las áreas protegidas (privadas y públicas)*

Se realizó un taller de capacitación dirigido a personal de guardaparques y administradores de áreas protegidas que se desempeña en áreas silvestres públicas y privadas. En este taller se entregó información general de la especie *C. gayi* y se expusieron los principales resultados del presente estudio. Se dio énfasis a la identificación de la rana chilena, y a la caracterización del hábitat, de modo que los asistentes fueran capaces de reconocer los

ambientes donde habita esta especie y así aumentar la probabilidad de registro de las poblaciones dentro de las áreas protegidas.

El taller se realizó en dos módulos (mañana y tarde). El programa de trabajo consistió en la exposición y discusión de diferentes temas que incluyeron: antecedentes biológicos de la rana chilena, búsqueda, captura y monitoreo de anfibios (técnicas de marcaje y estudios acústicos), toma de muestras para estudios genéticos y enfermedades emergentes; y protocolos de bioseguridad. Los expositores del Laboratorio de Genética y Evolución fueron los Médicos Veterinarios Mg. Ciencias Biológicas Paola Sáez y Franco Cruz; los Licenciados en Ciencias Biológicas y Mg. Ciencias Biológicas Pablo Fibla y José Serrano. Todos ellos estudiantes del Programa de Doctorado en Ciencias c/m en Ecología y Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Y la Licenciada en Ciencias Biológicas Alejandra Fabres. Las presentaciones audiovisuales utilizadas para esta actividad se adjuntan en un archivo digital como producto del proyecto. Además, durante este taller se realizó una actividad práctica que consistió en la capacitación a los guardaparques y administradores de áreas protegidas en el protocolo de manejo de la rana chilena. Este protocolo considera los procedimientos para el control de enfermedades infecciosas en Anfibios de la Red Chilena de Herpetología (<http://www.herpetologiadechile.cl/#!documentos/cihc>).

En este taller de capacitación se distribuyeron los afiches informativos elaborados para las actividades de difusión con el objetivo de que cada guardaparque y administrador pueda exponerlo en el área protegida en la que se desempeña.



### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Objetivo específico n°1: ampliar las prospecciones realizadas durante el año 2015

Entre septiembre de 2016 y enero de 2019 se prospectaron en total 37 sitios (**Figura 3**) en búsqueda de poblaciones de *Calyptocephalella gayi* en la Región Metropolitana de Santiago. Las exploraciones abarcaron 13 comunas de la región, considerando los principales sistemas hidrográficos de la cuenca del río Maipo e incluyeron las sub-cuencas del río Maipo bajo y medio; y las sub-cuencas del río Mapocho bajo y alto (**Tabla 1**). Adicionalmente, se visitaron 11 sitios (**Tabla 2**) que fueron explorados primeramente en 2015. Lo anterior con el objetivo de reevaluar registros de presencia y ausencia. Fotografías de los sitios prospectados se muestran en el **Anexo Fotográfico**.

El resultado de las prospecciones arrojó tres nuevos sitios con presencia de *C. gayi*: (1) afluente de río Mapocho en la comuna de El Monte, (2) pozones en las cercanías del Parque Municipal El Trapiche, en la comuna de Peñaflor; y (3) el río Angostura en el puente Águila norte, Hospital, en la Comuna de Paine. El sitio donde se descubrió la presencia de *C. gayi* en el Monte, queda ubicado en el sector del puente San Francisco. La presencia de la especie se constató mediante la metodología de *playback*, donde fue posible escuchar el canto de al menos tres machos. Al igual que el Trapiche, el Monte, es un sistema de vertientes laterales (afluentes) al curso principal del río Mapocho que posee vegetación abundante en los bordes de espejo de agua, esencialmente zarzamora. El agua es clara, con flujo bajo y presencia de vegetación acuática. En torno al lugar existen terrenos con tomas ilegales, abundante basura, y aparentemente el sitio es utilizado como balneario durante verano.

En relación con el sitio en las cercanías del Parque Municipal El Trapiche, este corresponde a un sector de pozones alimentados por el río Mapocho y distante por más de un kilómetro de los sitios de monitoreo (ver objetivo específico n°2). En este sitio se observó evidencia de reproducción, mediante el hallazgo de una puesta de huevos en agosto de 2018, y la presencia de larvas en distinto estado de desarrollo desde agosto de 2018 y hasta enero de 2019. Además, en este sitio se constató la presencia de *Pleurodema thaul*. El lugar recibe alta afluencia de público, sobretodo en el periodo estival, ya que es utilizado como balneario por los lugareños. Por lo tanto, es un sitio expuesto al deterioro ambiental donde es posible observar restos de fogatas y abundantes desechos. Por su parte, el sitio Águila norte corresponde a un sector del río Angostura, ubicado al sur de la localidad de Hospital y al norte de Angostura, a aproximadamente 8 kilómetros del límite regional. El curso de agua presenta abundante vegetación acuática y de borde. El sitio posee tomas de terreno y es utilizado como balneario y zona de pesca. Fotografías de los tres sitios de muestran en el **Anexo Fotográfico**.

En algunos de los sistemas prospectados se registró la presencia de otras especies de anfibios, entre los cuales están el sapito de cuatro ojos (*Pleurodema thaul*) y el sapo de rulo (*Rhinella arunco*) (**Tabla 1**). Además, destaca la presencia de la especie introducida, rana africana (*Xenopus laevis*) en siete de los sitios prospectados.

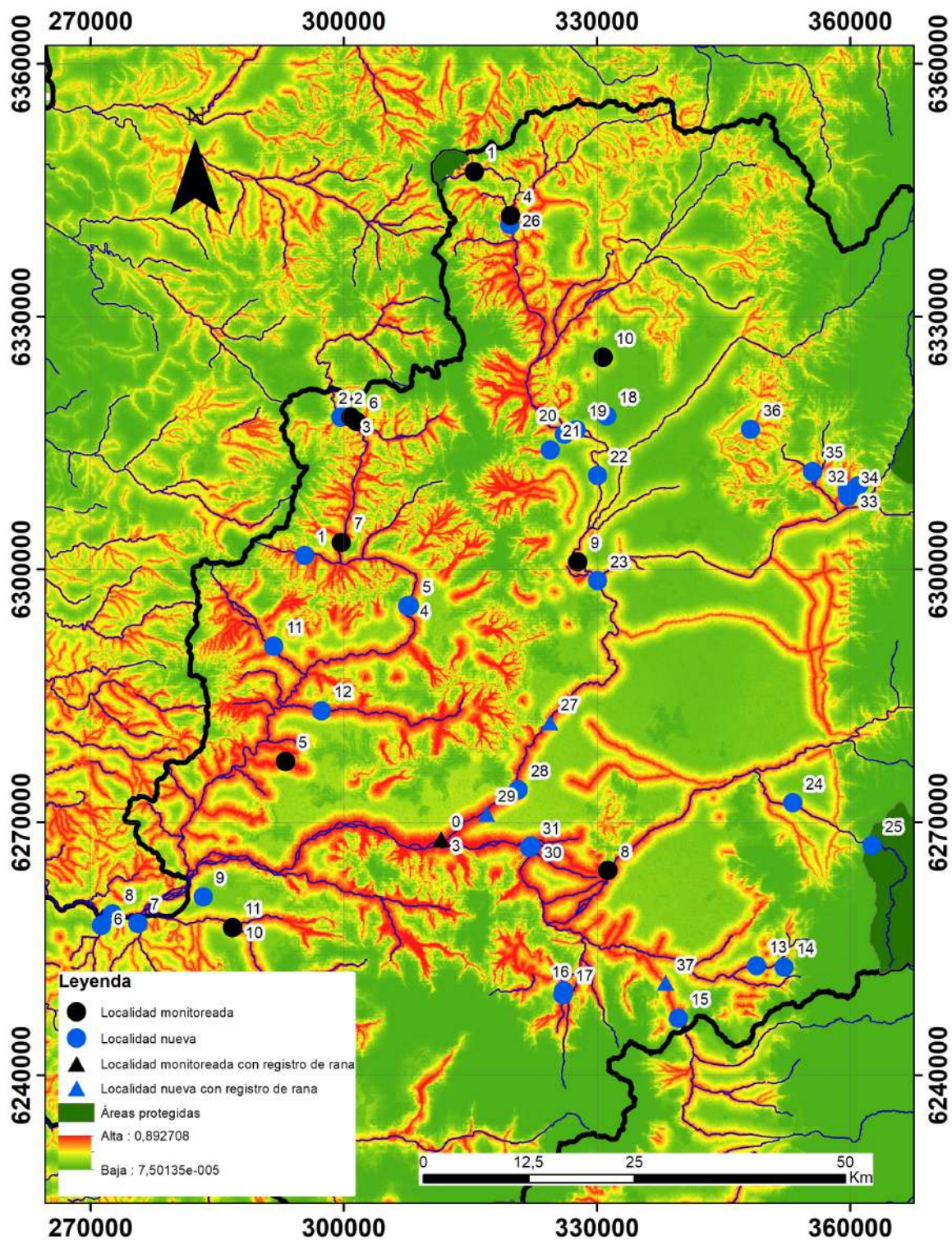


Figura 3. Mapa de los sitios prospectados durante le ejecución del proyecto.

**Tabla 1.** Localidades prospectadas desde septiembre de 2016 a enero de 2019.

| N  | Localidad                      | Comuna       | Fecha       | UTM (WGS84) |           | Msnm | Sub-cuenca   | Presencia<br><i>C. gayi</i> | Otros anfibios              |
|----|--------------------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
|    |                                |              |             | Este (X)    | Norte (Y) |      |              |                             |                             |
| 1  | Los Hornitos                   | Curacaví     | 13.sep.2017 | 295310      | 6301674   | 251  | Maipo Bajo   | No                          | <i>X. laevis</i>            |
| 2  | Crucero                        | Curacaví     | 13.sep.2017 | 299634      | 6318102   | 321  | Maipo Bajo   | No                          | <i>P. thaul, R. arunco</i>  |
| 3  | Cruce a Colliguay              | Curacaví     | 13.sep.2017 | 300622      | 6318150   | 312  | Maipo Bajo   | No                          | <i>P. thaul, R. arunco</i>  |
| 4  | Los Rulos 1                    | María Pinto  | 21.sep.2017 | 307511      | 6295741   | 180  | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 5  | Los Rulos 2                    | María Pinto  | 21.sep.2017 | 307776      | 6295705   | 180  | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 6  | Quincahue                      | Melipilla    | 09.sep.2017 | 271211      | 6257809   | 59   | Maipo Bajo   | No                          | <i>R. arunco</i>            |
| 7  | Santa Elena, estero el Sauce   | Melipilla    | 09.sep.2017 | 275556      | 6258030   | 63   | Maipo Bajo   | No                          | <i>P. thaul</i>             |
| 8  | Río Maipo                      | Melipilla    | 09.sep.2017 | 272515      | 6259141   | 53   | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 8  | Parcelación Las Águilas        | Melipilla    | 09.sep.2017 | 283287      | 6261192   | 105  | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 10 | Puente Mandinga                | Melipilla    | 09.sep.2017 | 286775      | 6257538   | 90   | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 11 | Amestica                       | Melipilla    | 09.sep.2017 | 291668      | 6290912   | 166  | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 12 | Chiriguas                      | Melipilla    | 09.sep.2017 | 297331      | 6283263   | 159  | Maipo Bajo   | No                          |                             |
| 13 | Puente El Inca                 | Paine        | 29.nov.2017 | 348907      | 6252976   | 445  | Maipo Medio  | No                          |                             |
| 14 | Tranque El Escorial            | Paine        | 29.nov.2017 | 352147      | 6252796   | 610  | Maipo Medio  | No                          |                             |
| 15 | Puente Águila sur              | Paine        | 29.nov.2017 | 339618      | 6246770   | 407  | Maipo Medio  | No                          | <i>X. laevis</i>            |
| 16 | Estero Pintué                  | Paine        | 29.nov.2017 | 326034      | 6250025   | 372  | Maipo Medio  | No                          | <i>P. thaul, X. laevis</i>  |
| 17 | Huiticalán                     | Paine        | 29.nov.2017 | 325914      | 6249567   | 379  | Maipo Medio  | No                          | <i>P. thaul</i>             |
| 18 | Santa Inés                     | Lampa        | 18.dic.2017 | 331148      | 6318223   | 488  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 19 | Puente Lelo                    | Lampa        | 18.dic.2017 | 327506      | 6316606   | 496  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 20 | Puente Lampa                   | Lampa        | 18.dic.2017 | 326103      | 6316060   | 304  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 21 | Larapinta                      | Lampa        | 18.dic.2017 | 324454      | 6314219   | 506  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 22 | Estero Lampa                   | Lampa        | 18.dic.2017 | 330034      | 6311185   | 483  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 23 | Puente Pudahuel                | Pudahuel     | 18.dic.2017 | 330041      | 6298697   | 469  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 24 | Puente Blanco                  | Pirque       | 11.ene.2018 | 353205      | 6272347   | 667  | Maipo Medio  | No                          |                             |
| 25 | Río Clarillo, Camino la Virgen | Pirque       | 11.ene.2018 | 362603      | 6267270   | 904  | Maipo Medio  | No                          | <i>P. thaul, R. arunco</i>  |
| 26 | Rungue, La Finca               | Tiltil       | 24.ene.2018 | 319662      | 6340916   | 616  | Mapocho Bajo | No                          | <i>R. arunco, X. laevis</i> |
| 27 | Trapiche, pozones              | Peñaflor     | 22.ago.2018 | 324386      | 6281839   | 334  | Mapocho Bajo | Si                          | <i>P. thaul</i>             |
| 28 | Talagante                      | Talagante    | 07.sep.2018 | 320664      | 6273867   | 332  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 29 | El Monte                       | El Monte     | 07.sep.2018 | 316892      | 6271001   | 297  | Mapocho Bajo | Si                          |                             |
| 30 | Lagunas del Maipo 1            | Talagante    | 03.oct.2018 | 322198      | 6267177   | 314  | Maipo Medio  | No                          |                             |
| 31 | Lagunas del Maipo 2            | Talagante    | 03.oct.2018 | 322010      | 6267036   | 316  | Maipo Medio  | No                          |                             |
| 32 | Laguna Lo Barnechea            | Lo Barnechea | 26.oct.2018 | 360974      | 6309949   | 955  | Mapocho Alto | No                          |                             |
| 33 | Camino de la Laguna            | Lo Barnechea | 26.oct.2018 | 359648      | 6309397   | 859  | Mapocho Alto | No                          |                             |
| 34 | El Rodeo                       | Lo Barnechea | 26.oct.2018 | 359733      | 6308689   | 850  | Mapocho Alto | No                          | <i>P. thaul</i>             |
| 35 | Camino Real                    | Lo Barnechea | 26.oct.2018 | 355570      | 6311651   | 892  | Mapocho Alto | No                          |                             |
| 36 | Laguna Piedra Roja             | Colina       | 26.oct.2018 | 348160      | 6316641   | 609  | Mapocho Bajo | No                          |                             |
| 37 | Puente Águila Norte, Hospital  | Paine        | 15.ene.2018 | 338111      | 6250969   | 324  | Maipo Medio  | Si                          | <i>P. thaul</i>             |

**Tabla 2.** Sitios prospectados durante 2015 y que fueron reevaluados durante la realización de este proyecto.

| N  | Localidad                   | Comuna    | Fecha       | UTM (WGS84) |           | msnm | Sub-cuenca   | Presencia<br><i>C. gayi</i> | Otros anfibios             |
|----|-----------------------------|-----------|-------------|-------------|-----------|------|--------------|-----------------------------|----------------------------|
|    |                             |           |             | Este (X)    | Norte (Y) |      |              |                             |                            |
| 1  | Estero Caleu                | Tiltil    | 06.sep.2016 | 315440      | 6347244   | 1137 | Mapocho Bajo | No                          |                            |
| 2  | Estero Puangue, pueblo      | Curacaví  | 06.sep.2016 | 300796      | 6318093   | 308  | Maipo Bajo   | No                          | <i>P. thaul, X. laevis</i> |
| 3  | Piscipozas                  | Melipilla | 06.sep.2016 | 311490      | 6267953   | 248  | Maipo Bajo   | Si                          |                            |
|    |                             |           | 07.sep.2018 | 311490      | 6267953   | 248  | Maipo Bajo   | Si                          |                            |
| 4  | Tranque de Rungue           | Tiltil    | 06.sep.2016 | 319747      | 6342022   | 632  | Mapocho Bajo | No                          |                            |
| 5  | Rumay                       | Melipilla | 09.sep.2017 | 293085      | 6277234   | 159  | Maipo Bajo   | No                          |                            |
| 6  | Estero Puangue, El Pangal 1 | Curacaví  | 13.sep.2017 | 301499      | 6317549   | 304  | Maipo Bajo   | No                          |                            |
| 7  | Estero Puangue, El Pangal 2 | Curacaví  | 13.sep.2017 | 299682      | 6303231   | 210  | Maipo Bajo   | No                          |                            |
| 8  | Estero Champa               | Paine     | 29.nov.2017 | 331282      | 6264282   | 411  | Maipo Medio  | No                          |                            |
| 9  | Noviciado                   | Pudahuel  | 18.dic.2017 | 327704      | 6300941   | 468  | Mapocho Bajo | No                          |                            |
| 10 | Batuco                      | Lampa     | 18.dic.2017 | 330719      | 6325188   | 490  | Mapocho Bajo | No                          |                            |
| 11 | Puente Mandinga             | Melipilla | 07.sep.2018 | 286775      | 6257538   | 90   | Maipo Bajo   | No                          | <i>X. laevis</i>           |

### Recursos web

Por medio del recurso web se aportaron 18 registros de rana chilena, de los cual tres correspondieron a observaciones realizadas en la Región Metropolitana, cuatro a la Región de Valparaíso, dos a la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, dos a la Región del Maule, dos a la Región del Biobío, cuatro a la Región de la Araucanía y un registro proveniente de la Región de los Ríos (**Tabla 3**). En relación con los registros provenientes de la Región Metropolitana, sólo fue posible constatar el sitio en la comuna de Paine, correspondiente a Águila norte, en la localidad de Hospital.

**Tabla 3.** Registros de rana chilena proporcionados a través de la página web.

| Nº | Localidad        | Región             | Nombre                   | Tipo de registro             |
|----|------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1  | Huelquen         | Metropolitana      | Leonardo Ormazábal       | Observación Adulto           |
| 2  | Paine            | Metropolitana      | Bladimir González        | Observación Larvas y Juvenil |
| 3  | Tiltil           | Metropolitana      | Sandro Tapia Severich    | Observación Juvenil          |
| 4  | Villa Alemana    | Valparaíso         | Claudia Gacitúa          | Auditivo                     |
| 5  | Belloto, Quilpué | Valparaíso         | David Rodríguez          | Auditivo y Observación Larva |
| 6  | Quilpué          | Valparaíso         | Vania Tellez             | Observación de Larva         |
| 7  | Quintay          | Valparaíso         | Alejandra Fabres         | Observación Larva            |
| 8  | Desconocido      | Libertador General | Diego Ramírez Álvarez    | Observación Larva            |
| 9  | Vega de Pupuya   | Libertador General | Maite Arriegada          | Auditivo                     |
| 10 | Tomé             | Maule              | Álvaro Zúñiga            | Observación Larva            |
| 11 | Chillán          | Maule              | Roberto Arias            | Observación Adulto           |
| 12 | Concepción       | Biobío             | Nicolás Hernández Soto   | Observación Juvenil          |
| 13 | Concepción       | Biobío             | Mauricio Altamirano      | Observación Adulto           |
| 14 | Angol            | Araucanía          | Danae Vega               | Observación Adulto           |
| 15 | Huiscapi         | Araucanía          | Lorena Ojeda             | Observación Adulto           |
| 16 | Antihue          | Araucanía          | Harold Gillibrand        | Observación Adulto y juvenil |
| 17 | Pucón            | Araucanía          | Marcela Prado            | Observación Larva            |
| 18 | Paillaco         | Los Ríos           | Nicolás González Berríos | Observación Adulto           |

Adicionalmente, se recibieron siete registros a través de comunicaciones personales, los que se detallan en la **Tabla 4**. Del total de registros recibidos por seguidores del sitio web y comentarios personales, destaca que diez corresponden a observaciones realizadas en la Región de Valparaíso.

**Tabla 4.** Registros de rana chilena a través de comunicaciones personales.

| Nº | Localidad                | Región     | Observador                          |
|----|--------------------------|------------|-------------------------------------|
| 1  | Estero Rabuco, Ocoa      | Valparaíso | Guardaparques PN La Campana         |
| 2  | Estero Reñaca            | Valparaíso | J. Clemente, UST                    |
| 3  | Panquehue, río Aconcagua | Valparaíso | F. Cruz                             |
| 4  | Qda. Frutillar, Petorca  | Valparaíso | C. Ugalde, UST                      |
| 5  | Estero Aguas Claras      | Valparaíso | C. Correa, L. Pastenes y D. Vásquez |
| 6  | Quebrada Escobares       | Valparaíso | C. Correa, L. Pastenes y D. Vásquez |
| 7  | Estero Pupío             | Coquimbo   | C. Correa                           |

A pesar del esfuerzo realizado entre 2016 y 2019, sólo se logró registrar tres nuevas localidades con presencia de *Calyptocephalella gayi*. Así, respecto del estudio realizado en 2015, el número de sitios con presencia de *C. gayi* en la Región Metropolitana aumentó a nueve, estos son: (1) Pichi, Alhué, (2) Parque Municipal el Trapiche, Peñaflo, (3) Piscipozas, Melipilla, (4) estero Rungue, Tiltill, (5) Hospital, Paine, (6) el Pangal, Curacaví, (7) El Monte, (8) pozones en las cercanías del Trapiche, Peñaflo, y (9) Águila norte, Hospital, Paine.

Respecto de los sitios con presencia de la especie hasta el año 2015, en la literatura y base de datos para la región había 19 sitios registrados. Por lo tanto, el número de poblaciones actual es menor a lo registrado para los últimos cuatro años. Dentro de las principales causas de esta disminución estaría la pérdida y fragmentación del hábitat, ya que muchos de los sitios han sido modificados para urbanización y extracción de recursos hídricos.

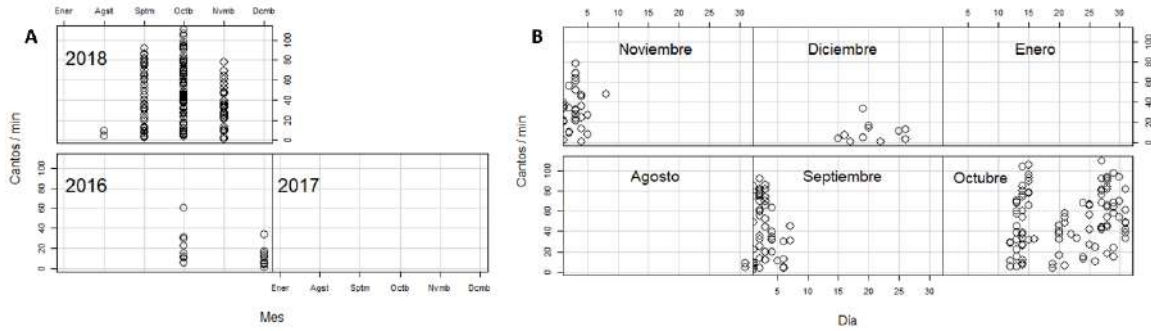
#### *Encuesta*

La encuesta fue posible de realizar en tres oportunidades: (1) en el estero Pintué, (2) en el Puente El Inca, y (3) en el Puente Mandinga. En todos los casos los encuestados fueron capaces de reconocer y distinguir a la rana chilena (cuando se les mostró el set fotográfico). De estas tres encuestas sólo el poblador del puente Mandinga reconoció escuchar a la rana durante agosto 2017. Debido a la escases de encuestas realizadas, producto de que en la mayoría de los sitios prospectados no se observaron pobladores, esta metodología no obtuvo más resultados.

### **3.2 Objetivo específico nº 2: desarrollar estudios ecológicos y biológicos de la especie de manera de estimar abundancia de las poblaciones, caracterizar el hábitat y determinar las especies que habitan en simpatria con *C. gayi*.**

#### *Estimación de la densidad de coros en El Trapiche, Peñaflo*

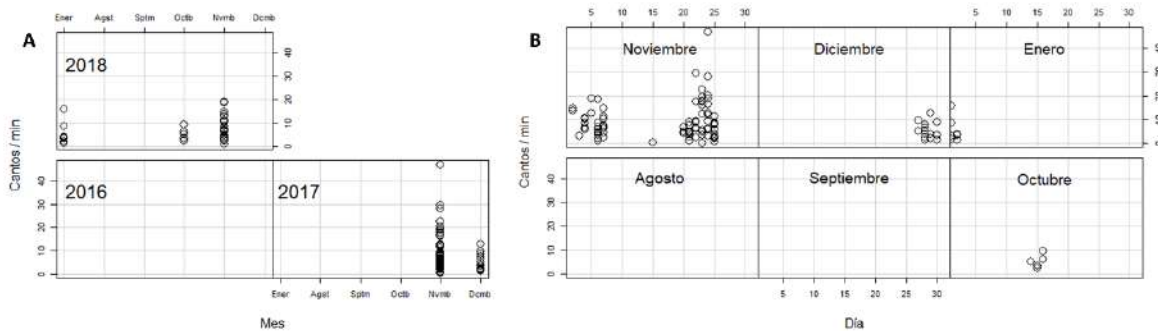
La actividad vocal de *C. gayi* se observó solamente en los años 2016 y 2018 (**Figura 4A**), principalmente en el mes de octubre, y con distintos peaks de actividad entre septiembre y octubre (**Figura 4B**). A partir de las observaciones de las firmas espectrales se pudo detectar que la participación predominante de individuos en los coros suele mantenerse por uno o dos individuos, con un máximo de seis firmas espectrales (o individuos) observada. Además, se observó que un solo individuo puede emitir una tasa máxima de 40 cantos por minuto por periodos mayores a la ventana de observación de cinco minutos. Por lo tanto, cualquier actividad por encima de dicha tasa de cantos involucra la participación de dos y hasta seis individuos en el espacio acústico de 400 m<sup>2</sup> en los meses de septiembre y octubre, siendo en septiembre cuando se observaron hasta seis firmas espectrales (presuntamente individuos distintos) en el coro. Sin embargo, una tasa cercana a 40 cantos por minuto puede mantenerse en el mes de diciembre por hasta tres individuos, dado que en esta fecha la actividad vocal suele sostenerse por menos de dos minutos por individuo.



**Figura 4.** Tasa de actividad vocal de la rana chilena *Calyptocephalella gayi* en El Trapiche registrada como número de cantos por minuto en los distintos años (A) y meses (B) de estudio.

#### Estimación de la densidad de coros en Pichi, Alhué

En el sitio Pichi se pudo detectar actividad vocal de *C. gayi* sólo en 2017 y 2018 (**Figura 5A**), entre octubre y enero, siendo mayor en noviembre (**Figura 5B**). El coro se mantiene vocalmente activo entre cinco a seis días sucesivos, con intervalos de silencio de aproximadamente 30 días entre un evento y otro y está formado principalmente por un solo individuo, con un máximo de tres firmas espectrales (o individuos distintos) observadas en noviembre de 2017. Debido a la ausencia de relaciones entre el número de firmas espectrales y la tasa de cantos, particularmente en Pichi, no fue posible aproximar un modelo predictivo respecto a la abundancia de la especie. Sin embargo, encontramos que la observación de firmas espectrales en el espectrograma puede ser altamente confiable y relativamente sencillo de observar en los muestreos de sonido realizados de cinco minutos.



**Figura 5.** Tasa de actividad vocal de la rana chilena *Calyptocephalella gayi* en Pichi registrada como número de cantos por minuto en los distintos años (A) y meses (B) de estudio.

A partir del reconocimiento de firmas espectrales en los meses de mayor actividad vocal de *C. gayi* fue posible establecer indirectamente rangos de actividad vocal individual en los coros con una tasa de 40 cantos por minuto. Sin embargo, no encontramos que la actividad vocal pudiera tener una relación lineal (o de algún otro tipo) con el número de individuos participando en los coros para estimar la abundancia de la especie en todos los casos. El rango de densidad en los coros varió entre uno a seis individuos en un área de 400 m<sup>2</sup> para ambos sitios de estudio. De esta manera, el reconocimiento de firmas espectrales puede ayudar a ubicar un número

aproximado de las especies, pero no la amplitud o la tasa de cantos como en el caso de otras especies de anuros (por ejemplo, Benevides *et al.*, 2019).

La diferencia en los *peaks* de mayor actividad vocal está probablemente relacionada con los niveles de ruido y el tipo de hábitat. Por ejemplo, al final del invierno en Pichi el caudal en el sitio de estudio produce un ruido de 70 a 93 dB en el rango de frecuencia 0-2500 Hz, que enmascara la señal de *C. gayi* (600-1300 Hz). Tanto la velocidad de la corriente de agua, como el nivel de ruido disminuye a partir de octubre por lo que se presentan condiciones más favorables para la especie. En tanto que en El Trapiche la presencia de una laguna con escasa corriente provee un hábitat más favorable para que la actividad vocal y reproductiva comience de manera notoria desde finales de agosto. La ausencia de registros en los años 2016 y 2017 estuvo relacionada con la falta de ubicación de la especie en Pichi y con eventos de destrucción del hábitat en El Trapiche, respectivamente. Además, durante el 2018 hubo un robo de la batería externa del equipo, lo que limitó la obtención de registros entre el 8 de septiembre y el 12 de octubre. Es posible que la disminución de los cantos de rana chilena y aves, estén asociados a los disturbios mencionados en el sitio.

#### *Flora y fauna presente en El Trapiche, Peñaflo*

En relación con la caracterización del ambiente, la vegetación nativa de acuerdo con Gajardo (1994), corresponde a bosque esclerófilo costero, y de acuerdo con la clasificación de Luebert & Pliscoff (2006), bosque esclerófilo mediterráneo costero, dominado por Litre (*Lithrea caustica*) y Peumo (*Cryptocarya alba*). Sin embargo, la vegetación dominante en el paisaje del Trapiche es de mayoritariamente especies introducidas, ya que los terrenos al estar urbanizados y cultivados, la vegetación nativa dejó de existir casi en su totalidad. La vegetación existente en el Trapiche se encuentra dispuesta de forma lineal, dejando a la vista rastros de lo que fuera el diseño del parque en su origen (año 1930). Las especies existentes en el parque no muestran una alta diversidad, sino más bien se concentran en especies dispuestas en masas dominantes, principalmente plátanos orientales (*Plátanus acerifolia*), álamos (*Populus alba*, *Populus nigra*) y eucaliptos (*Eucaliptus globulus*). No obstante, es posible encontrar otras especies, las que se señalan en la **Tabla 5**. El terreno del parque se caracteriza por una topografía prácticamente plana donde la pendiente general en promedio alcanza entre 0,6 al 1% (Manetti & Pérez de Arce 2008).

**Tabla 5.** Especies arbóreas presentes en el Parque Municipal El Trapiche. Obtenido de Ibaceta, Urbina & Macaya (2008).

| <b>Especie</b>              | <b>Nombre común</b> |
|-----------------------------|---------------------|
| <i>Prunus sp.</i>           | Ciruelo             |
| <i>Cydonia sp.</i>          | Membrillo           |
| <i>Robinia pseudoacacia</i> | Acacia              |
| <i>Juglans regia</i>        | Nogal               |
| <i>Phoenix canariensis</i>  | Palmera fénix       |
| <i>Phytolacca dioica</i>    | Ombú                |
| <i>Acer negundo</i>         | Acer                |
| <i>Schinus molle</i>        | Pimiento            |
| <i>Ficus carica</i>         | Higuera             |
| <i>Paulonia tomentosa</i>   | Paulonia            |
| <i>Morus alba</i>           | Morera              |
| <i>Catalpa bignonioides</i> | Catalpa             |
| <i>Melia azederach</i>      | Melia               |
| <i>Fraxinus excelsior</i>   | Fresno              |
| <i>Salix chilensis</i>      | Sauce               |



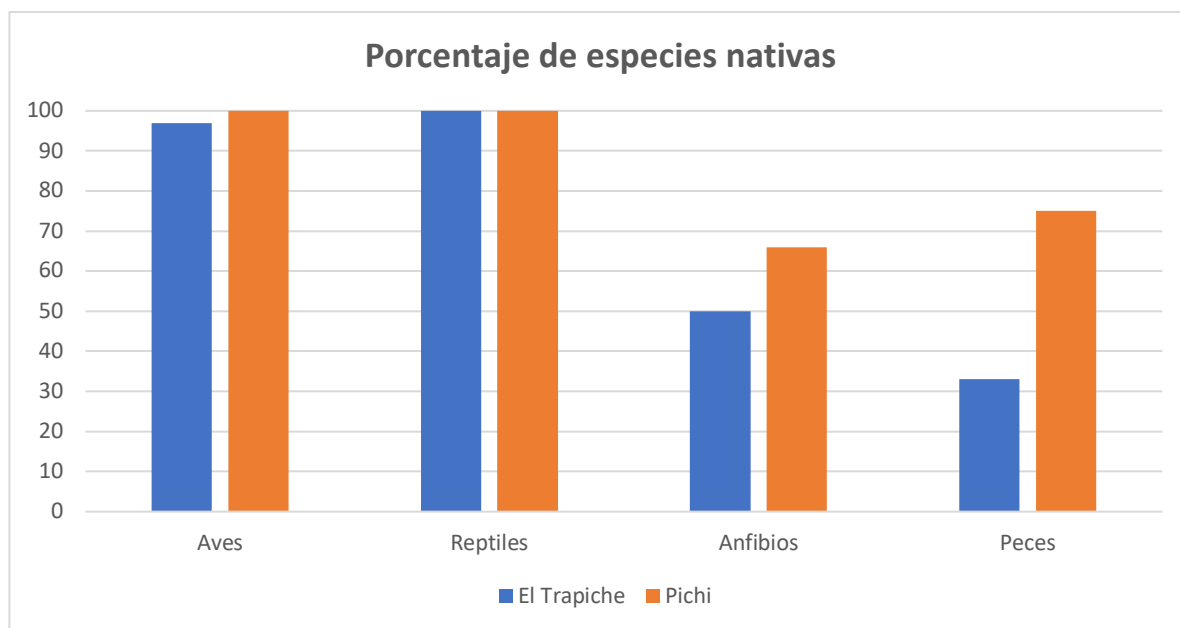
|                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| <i>Salix matsudana</i>      | Sauce crespón         |
| <i>Salix babilonica</i>     | Sauce                 |
| <i>Ulmus sp.</i>            | Olmo                  |
| <i>Gleditzia triacantos</i> | Árbol de tres espinas |
| <i>Ligustro sp</i>          | Ligustro              |

El sitio del humedal, ubicado en el área sur-poniente del Parque El Trapiche, constituye un importante sistema ecológico, cuya formación vegetal (**Tabla 6**) se asocia a la fauna específica que allí habita. Es así como se encuentran especies vegetales con un alto grado de endemismo, siendo muchas de ellas elementos importantes que contribuyen con la oxigenación del agua, permitiendo la vida vegetal y animal sub-acuática (*Limnobium* spp) (Ibaceta, Urbina & Macaya 2008).

**Tabla 6.** Especies vegetales presentes en el sector del humedal. Obtenido de Ibaceta, Urbina & Macaya (2008).

| Plantas de borde             | Plantas acuáticas                |
|------------------------------|----------------------------------|
| <i>Pluchea absisntioides</i> | <i>Hydrocotyle ranunculoides</i> |
| <i>Thupa dominguensis</i>    | <i>Limnobium laevigatum</i>      |
| <i>Madia sativa</i>          | <i>Myriophyllum aquaticum</i>    |
| <i>Rubus ulmifolius</i>      | <i>Sagitaria montevidensis</i>   |
| <i>Calystegia sepium</i>     | <i>Lemna spp.</i>                |
| <i>Xanthium cavanillesii</i> | <i>Potamogeton berteroaunum</i>  |
| <i>Baccharis salycifolia</i> |                                  |
| <i>Centaurea calatrapa</i>   |                                  |
| <i>Psapalum paspaloides</i>  |                                  |
| <i>Galega officinalis</i>    |                                  |
| <i>Baccharis paniculada</i>  |                                  |
| <i>Hirchffelsia incana</i>   |                                  |
| <i>Sanchus oleraceum</i>     |                                  |
| <i>Verbena litorales</i>     |                                  |
| <i>Bidens aurea</i>          |                                  |
| <i>Chenopodium glaucum</i>   |                                  |

Respecto a las especies de vertebrados co-distribuidas con *C. gayi*, se registró un total de 45 especies en el humedal. Las Aves mostraron una mayor riqueza de especies (34 especies), seguida de los Peces (seis especies), Reptiles (tres especies) y Anfibios (dos especies) (**Tabla 7**). No se realizó muestreo mediante captura viva de mamíferos, por lo que la diversidad de este grupo está subestimada. Respecto a los anfibios, se registró la presencia de la especie invasora *Xenopus laevis* en el humedal. Las Aves y Reptiles del humedal mostraron un alto porcentaje de especies nativas respecto a los Peces (**Figura 6**), los cuales mostraron un mayor porcentaje de especies exóticas (67% de especies exóticas).



**Figura 6.** Porcentaje de especies nativas por sistema monitoreado.

Se registró una baja diversidad de invertebrados acuáticos representados principalmente por artrópodos acuáticos (e.g. *Hyaella* sp., *Aegla laevis*, Dytiscidae) y moluscos (*Diplodon chilensis*, *Heleobia* sp., *Physa* sp.) (Tabla 8).

Cabe destacar que parte de las especies acuáticas registradas en sectores del humedal de El Trapiche representan miembros conocidos de la comunidad de especies que conforma la rana chilena en Chile central, como por ejemplo *Aegla laevis*, *Hyaella* sp., *Percilia gillissi*, *Gambusia affinis*, *Cheirodon* sp., *Ardea alba* y *Egretta thula*, entre otros (Bahamondes & López 1963). A su vez, resulta interesante la presencia de algunas especies como la Carmelita (*Percilia gillissi*) o la Pancora de agua dulce (*Aegla laevis*) las cuales han sido escasamente documentadas para la zona central, encontrándose clasificadas en categoría de conservación En Peligro para Chile (RCE, DS N° 50/2008 del MINSEGPRES)

**Tabla 7.** Especies de vertebrados registrados en el Parque Municipal El Trapiche, Peñaflo. Se indica Estado de Conservación (EC) de acuerdo a IUCN y RCE(\*), respectivamente; y Origen. LC = Preocupación Menor; DD = Datos Deficientes; NT = Casi Amenazada; VU= Vulnerable; EN = En Peligro. \*\* = EN(IV-X), VU(XI-XII).

| Clase/Orden     | Especie                               | Nombre común           | EC         | Origen  |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------|------------|---------|
| <b>Aves</b>     |                                       |                        |            |         |
| Anseriformes    | <i>Anas flavirostris flavirostris</i> | Pato jergón chico      | LC         | Nativa  |
| Anseriformes    | <i>Anas georgica spinicauda</i>       | Pato jergón grande     | LC         | Nativa  |
| Anseriformes    | <i>Anas platyrhynchos</i>             | Pato mallard           | LC         | Exótica |
| Anseriformes    | <i>Anas sibilatrix</i>                | Pato real              | LC         | Nativa  |
| Apodiformes     | <i>Sephanoides sephaniodes</i>        | Picaflor chico         | LC         | Nativa  |
| Charadriiformes | <i>Himantopus mexicanus melanurus</i> | Perrito                | LC         | Nativa  |
| Charadriiformes | <i>Larus dominicanus</i>              | Gaviota dominicana     | LC         | Nativa  |
| Columbiformes   | <i>Columbina picui</i>                | Cuculí                 | LC         | Nativa  |
| Columbiformes   | <i>Patagioenas araucana</i>           | Torcaza                | LC/EN,VU** | Nativa  |
| Columbiformes   | <i>Zenaida auriculata auriculata</i>  | Tortola                | LC         | Nativa  |
| Columbiformes   | <i>Zenaida meloda</i>                 | Paloma de alas blancas | LC         | Nativa  |
| Falconiformes   | <i>Falco sparverius</i>               | Cernícalo              |            |         |

|                    |                                             |                       |        |          |
|--------------------|---------------------------------------------|-----------------------|--------|----------|
| Falconiformes      | <i>Milvago chimango</i>                     | Tiuque                | LC     | Nativa   |
| Galliformes        | <i>Callipepla californica</i>               | Codorniz              | LC     | Nativa   |
| Gruiformes         | <i>Fulica ruffifrons</i>                    | Tagua frente roja     | LC     | Nativa   |
| Gruiformes         | <i>Pardirallus sanguinolentus landbecki</i> | Pidén                 | LC     | Nativa   |
| Gruiformes         | <i>Porphyriops melanops cassirostris</i>    | Tagüita               | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Agelasticus thilius</i>                  | Trile                 | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Anairetes palurus</i>                    | Cachudito             | -      | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Curaeus curaeus</i>                      | Tordo                 | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Elaenia albiceps</i>                     | Fío fío               | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Leptasthenura aegithaloides</i>          | Tijeral               | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Phrygilus gayi gayi</i>                  | Cometocino            | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Pterotochos megapodius</i>               | Turca                 | -      | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Tachycineta leucopyga</i>                | Golondrina chilena    | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Troglodytes aedon chilensis</i>          | Chercán               | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Turdus falcklandii</i>                   | Zorzal                | LC     | Nativa   |
| Passeriformes      | <i>Zonotrichia capensis</i>                 | Chincol               | LC     | Nativa   |
| Pelecaniformes     | <i>Ardea alba egretta</i>                   | Garza blanca          | LC     | Nativa   |
| Pelecaniformes     | <i>Egretta thula</i>                        | Garza chica           | LC     | Nativa   |
| Pelecaniformes     | <i>Nycticorax nycticorax</i>                | Huairavo              | LC     | Nativa   |
| Piciformes         | <i>Nyctoides lignarus</i>                   | Carpinterito          | -      | Nativa   |
| Podicipediformes   | <i>Podilymbus podiceps antarcticus</i>      | Picurio               | LC     | Nativa   |
| Suliformes         | <i>Phalacrocorax brasilianus</i>            | Yeco                  | LC     | Nativa   |
| <b>Mamíferos</b>   |                                             |                       |        |          |
| Lagomorpha         | <i>Oryctolagus cuniculus</i>                | Conejo                | NT     | Exótica  |
| Rodentia           | <i>Myocastor coypus</i>                     | Coipo                 | LC     | Nativa   |
| <b>Peces</b>       |                                             |                       |        |          |
| Perciformes        | <i>Percilia gillisi</i>                     | Carmelita             | -/EN*  | Endémica |
| Charasiformes      | <i>Cheirodon pisciculus</i>                 | Pocha                 | DD/VU* | Nativa   |
| Cyprinodontiformes | <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>           | Gambusia manchada     | -      | Exótica  |
| Cyprinodontiformes | <i>Gambusia affinis</i>                     | Pez mosquito          | LC     | Exótica  |
| Cyprinodontiformes | <i>Jenynsia lineata</i>                     | Listado               | -      | Exótica  |
| Cypriniformes      | <i>Cyprinus carpio</i>                      | Carpa japonesa        | VU     | Exótica  |
| <b>Reptiles</b>    |                                             |                       |        |          |
| Squamata           | <i>Philodryas chamissonis</i>               | Culebra de cola larga | LC/VU* | Endémica |
| Squamata           | <i>Liolemus chiliensis</i>                  | Lagarto chileno       | LC*    | Nativa   |
| Squamata           | <i>Liolaemus tenuis</i>                     | Lagartija tenue       | LC*    | Endémica |
| <b>Anfibios</b>    |                                             |                       |        |          |
| Anura              | <i>Xenopus laevis</i>                       | Rana africana         | -      | Exótica  |

**Tabla 8.** Invertebrados acuáticos registrados en el Parque Municipal El Trapiche, Peñaflo. Se indica Estado de Conservación (EC) de acuerdo a IUCN y RCE(\*), respectivamente; y Origen. LC = Preocupación Menor; DD = Datos Deficientes; NT = Casi Amenazada; N = Nativa; ED = Endémica; EX = Exótica.

| Clase               | Orden           | Familia        | Especie            | EC  | Origen   |
|---------------------|-----------------|----------------|--------------------|-----|----------|
| <b>Hirudinea</b>    | -               | -              | Hirudinea sp.      | -   | -        |
| <b>Bivalvia</b>     | Unionoida       | Hyriidae       | Diplodon chilensis | LC  | Nativa   |
| <b>Gastropoda</b>   | Littorinimorpha | Cochliopidae   | Heleobia sp.       | -   | -        |
|                     | -               | Physidae       | Physa sp.          | -   | -        |
| <b>Malacostraca</b> | Decapoda        | Aegliidae      | Aegla laevis       | EN* | Endémica |
|                     |                 | Hyaellidae     | Hyaella sp.        | -   | -        |
| <b>Hexapoda</b>     | Coleoptera      | Dytiscidae     | Lancetes sp.       | -   | -        |
|                     | Hemiptera       | Belostomatidae | Belostoma sp.      | -   | -        |
| <b>Chelicerata</b>  | Aranae          | -              | Aranae sp.         | -   | -        |

## Flora y fauna presente en Pichi, Alhué

Pichi es una localidad que se encuentra en la vertiente oeste de la Cordillera de la Costa, presenta vegetación de tipo matorral esclerófilo de la zona central, especies típicas de la zona como el espino y el quisco en las laderas de los cerros. Hay presencia de zonas de mayor densidad de vegetación donde se observa Peumo, Boldo, Quillay y Patagua. En las zonas bajas de las quebradas, esteros y lechos de ríos se cubre de vegetación azonal como sauces y, en algunos casos con abundante presencia de especies introducidas, como la zarzamora. De acuerdo con la clasificación de Gajardo (1994), la vegetación corresponde a bosque esclerófilo costero, y de acuerdo con la clasificación de Luebert & Pliscoff (2006), bosque esclerófilo mediterráneo costero, dominado por Peumo (*Cryptocarya alba*) y Boldo (*Peumus boldus*).

En la **Tabla 9** se indican las especies de vertebrados registradas para la localidad de Pichi (29 especies en total), siendo las Aves el grupo que presentan un mayor número de especies (17 especies), seguida de los Reptiles (cinco especies), Peces (cuatro especies) y Anfibios (3 especies). A pesar de que en total se registró un menor número de vertebrados en esta localidad respecto a El Trapiche, en Pichi fue posible detectar sólo dos especies exóticas (el pejerrey argentino y la rana africana), lo que indica una mayor proporción de componentes nativos o endémicos.

Se observó la presencia de insectos perteneciente a seis Órdenes (**Tabla 10**). Los invertebrados estuvieron principalmente representados por Insectos (Hexapoda) y Crustáceos (Decapoda; **Tabla 10**). En Pichi se registró un mayor número de especies acuáticas (invertebrados, anfibios y peces) que en El Trapiche. Sin embargo, ambas localidades comparten especies como la Pocha (*Cheirodon* sp.), la Carmelita (*Percilia gillissi*), la pulga de agua (*Hyalella* sp.), la pancora (*Aegla* sp.) y la almeja de agua dulce (*Diplodon chilensis*). Como se mencionó anteriormente, estas especies han sido señaladas como miembros de la comunidad de especies que co-habitan con la rana chilena en Chile central (Bahamondes & López 1963). Sin embargo, en el caso de Pichi la comunidad registrada es más diversa, ya que incluye un mayor número de artrópodos acuáticos (*Samastacus spinifrons*, Odonata, Ephemeroptera, Trichoptera, etc.), el bagrecito (*Trychomicterus aerolatus*) y el sapito cuatro ojos (*Pleurodema thaul*), los cuales no han sido registrados a la fecha en El Trapiche.

Fotografías de la fauna asociada a ambos sitios de monitoreo se presentan en el **Anexo Fotográfico**.

**Tabla 9.** Especies de vertebrados registrados en la localidad de Pichi, Alhué. Se indica Estado de Conservación (EC) de acuerdo a IUCN y RCE(\*), respectivamente; y Origen. LC = Preocupación Menor; DD = Datos Deficientes; NT = Casi Amenazada; VU = Vulnerable; EN = En Peligro. \*\* = EN(IV-X), VU(XI-XII).

| Clase/Orden    | Especie                                     | Nombre común         | EC         | Origen |
|----------------|---------------------------------------------|----------------------|------------|--------|
| <b>Aves</b>    |                                             |                      |            |        |
| Apodiformes    | <i>Sephanoides sephanioides</i>             | Picaflor chico       | LC         | Nativa |
| Cathartiformes | <i>Coragyps atratus foetens</i>             | Jote de cabeza negra | LC         | Nativa |
| Columbiformes  | <i>Patagioenas araucana</i>                 | Torcaza              | LC/EN,VU** | Nativa |
| Falconiformes  | <i>Milvago chimango chimango</i>            | Tiuque               | LC         | Nativa |
| Galliformes    | <i>Callipepla californica</i>               | Codorniz             | LC         | Nativa |
| Gruiformes     | <i>Pardirallus sanguinolentus landbecki</i> | Pidén                | LC         | Nativa |
| Passeriformes  | <i>Anairetes palurus</i>                    | Cachudito            | LC         | Nativa |
| Passeriformes  | <i>Curaeus curaeus</i>                      | Tordo                | LC         | Nativa |
| Passeriformes  | <i>Elaenia albiceps</i>                     | Fío fío              | LC         | Nativa |
| Passeriformes  | <i>Phrygilus gayi gayi</i>                  | Cometocino de gay    | LC         | Nativa |
| Passeriformes  | <i>Pterotochos megapodius</i>               | Turca                | LC         | Nativa |

|                 |                                 |                       |        |          |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------|--------|----------|
| Passeriformes   | <i>Mimus thenca</i>             | Tenca                 | LC     | Nativa   |
| Passeriformes   | <i>Scytalopus fuscus</i>        | Churrín               | LC     | Nativa   |
| Passeriformes   | <i>Turdus falcklandii</i>       | Zorzal                | LC     | Nativa   |
| Passeriformes   | <i>Xolmis pirope</i>            | Diucón                | -      | Nativa   |
| Passeriformes   | <i>Zonotrichia capensis</i>     | Chincol               | LC     | Nativa   |
| Piciformes      | <i>Picoides lignarus</i>        | Carpinterito          | -      | Nativa   |
| <b>Peces</b>    |                                 |                       |        |          |
| Atheriniformes  | <i>Odontesthes bonariensis</i>  | Pejerrey argentino    | -      | Exótica  |
| Charasiformes   | <i>Cheirodon pisciculus</i>     | Pocha                 | DD/VU* | Nativa   |
| Perciformes     | <i>Percilia gillisi</i>         | Carmelita             | -/EN*  | Endémica |
| Siruliformes    | <i>Trychomicterus aerolatus</i> | Bagrecito             | -/VU*  | Nativa   |
| <b>Reptiles</b> |                                 |                       |        |          |
| Squamata        | <i>Callopietes maculatus</i>    | Iguana chilena        | DD/VU* | Endémica |
| Squamata        | <i>Liolaemus chiliensis</i>     | Lagarto llorón        | LC/LC* | Nativa   |
| Squamata        | <i>Liolaemus lemniscatus</i>    | Lagartija lemnistaca  | LC/LC* | Nativa   |
| Squamata        | <i>Liolaemus tenuis</i>         | Lagartija tenue       | LC/LC* | Endémica |
| Squamata        | <i>Philodryas chamissonis</i>   | Culebra de cola larga | LC/VU* | Endémica |
| <b>Anfibios</b> |                                 |                       |        |          |
| Anura           | <i>Pleurodema thaul</i>         | Sapito de cuatro ojos | LC/NT* | Nativa   |
| Anura           | <i>Xenopus laevis</i>           | Rana africana         | -      | Exótica  |

**Tabla 10.** Invertebrados acuáticos registrados en la localidad de Pichi, Alhué. Se indica Estado de Conservación (EC) de acuerdo a IUCN y RCE(\*), respectivamente; y Origen. LC = Preocupación Menor; DD = Datos Deficientes; NT = Casi Amenazada; N = Nativa; ED = Endémica; EX = Exótica.

| Clase               | Orden           | Familia        | Especie               | EC     | Origen   |
|---------------------|-----------------|----------------|-----------------------|--------|----------|
| <b>Gastropoda</b>   | Littorinimorpha | Cochliopidae   | Heleobia sp.          | -      | -        |
|                     | -               | Physidae       | Physa sp.             | -      | -        |
| <b>Bivalvia</b>     | Unionoida       | Hyriidae       | Diplodon chilensis    | LC     | Nativa   |
| <b>Malacostraca</b> | Decapoda        | Aeglidae       | Aegla laevis          | EN*    | Endémica |
|                     |                 | Parastacidae   | Samastacus spinifrons | DD/LC* | Nativa   |
|                     |                 | Hyaellidae     | Hyaella sp.           | -      | -        |
| <b>Hexapoda</b>     | Coleoptera      | Dytiscidae     | Lancetes sp.          | -      | -        |
|                     | Odonata         | Aeshnidae      | Rhionaeschna sp.      | -      | -        |
|                     |                 | Libellulidae   | -                     | -      | -        |
|                     |                 | Lestidae       | Lestes sp.            | -      | -        |
|                     | Hemiptera       | Belostomatidae | Belostoma sp.         | -      | -        |
|                     | Hymenoptera     | Sphecidae      | Sphex latrellei       | -      | -        |
|                     | Trichoptera     | -              | Trichoptera sp. 1     | -      | -        |
|                     |                 |                | Trichoptera sp. 2     | -      | -        |
|                     | Ephemeroptera   | -              | Ephemeroptera sp.     | -      | -        |

Respecto a la diversidad de especies se pudo observar en simpatria con la rana chilena elementos comunes en todos sistemas monitoreados, asociados a la comunidad nativa de especies de los humedales continentales de Chile mediterráneo (pancora de agua dulce, Tricópteros, Hemípteros, Efemerópteros, pocha, carmelita, sapo de cuatro ojos, rana chilena, etc.). Sin embargo, fue posible detectar una serie de especies exóticas en ambos sistemas. En el caso de los Peces, se puede notar que existen diferencias en la proporción de especies

exóticas respecto a las nativas entre sistemas, lo que sugiere un mayor grado de intervención antrópica en el Trapiche, donde el porcentaje de Peces nativos fue de solo el 33% (**Figura 6**). En el caso de las Aves, que correspondieron a la mayoría de las especies registradas, se observó un mayor número de especies en El Trapiche respecto a Pichi, lo que podría ser explicado por la presencia de la laguna que es parte del humedal, es decir, porque es un sistema de mayor área que cuenta con un espejo de agua permanente, a diferencia del estero presente en Pichi. No obstante, el porcentaje de especies nativas fue mayor en Pichi, situación que se repite con las especies de anfibios y peces (**Figura 6**).

A pesar de que se logró un listado completo de las especies que habitan en simpatria con la rana chilena, queda pendiente determinar las interacciones ecológicas que existen entre ellas, sobre todo en las especies subacuáticas. Un avance es que en el manuscrito elaborado por nuestro grupo reportamos el primer registro de depredación de larvas de rana chilena por parte de la invasora *X. laevis*. Esto revela la necesidad de hacer monitoreos que involucren estudios de dieta de anfibios (por ejemplo, mediante lavado estomacal) en las zonas donde ambas especies coexisten en la zona central, lo que permitiría establecer la dieta de la rana y así conocer las interacciones depredatorias que establece con las otras especies, ya sean nativas o exóticas, de su comunidad.

#### *Calidad del agua en El Trapiche, Peñaflo*

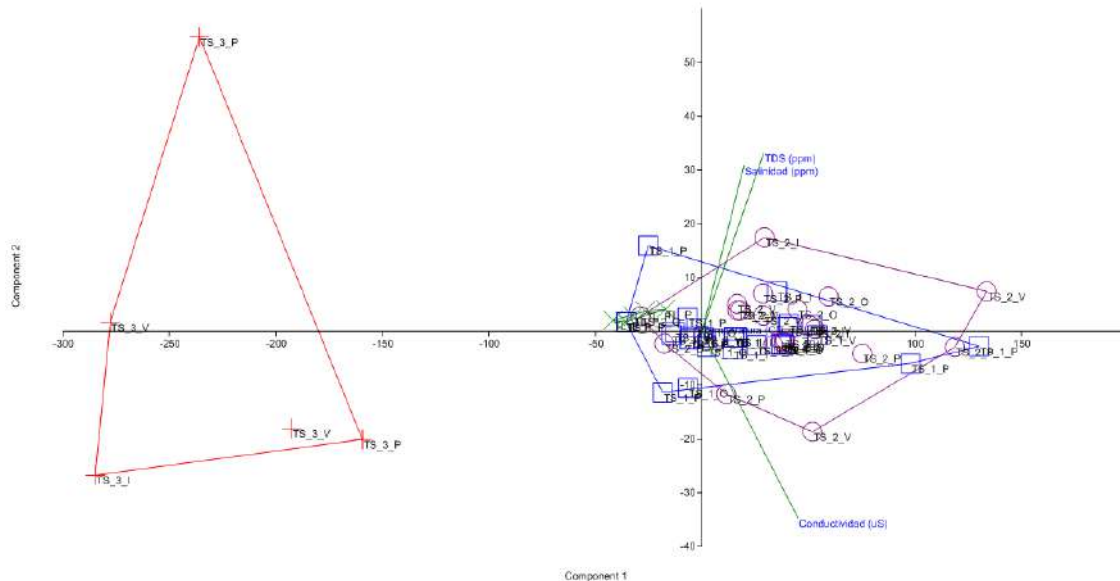
Respecto a las características de los sitios monitoreados, es posible observar que la localidad de El Trapiche presenta baja variabilidad estacional, no se observaron diferencias estacionales ni interanuales en las variables de Conductividad, Salinidad, pH y Sólidos Totales Disueltos (TDS). La Temperatura del agua presentó alta variabilidad estacional (**Tabla 11, Figura 7**). De los tres sitios identificados con presencia de reproducción (TS1, TS2 y TS3), el sitio TS3 poseía características particulares de calidad de agua, presentó menores valores de Salinidad, Conductividad y TDS que los otros sitios monitoreados (TL, TS1 y TS2; **Tabla 11, Figura 7**). Resulta interesante destacar que en el lugar TS3 fue registrada una puesta de huevos en agosde de 2018.

**Tabla 11.** Variables del agua obtenidas en los monitoreos en El Trapiche, Peñaflo. TS\_1 = Sitio 1 324042 / 6281044 UTM, TL = 323966 / 6280992, TS\_2 = Sitio 2 323715 / 6281004 UTM, TS\_3 = Sitio 3 324386 / 6281839, TL = Sitio Laguna. NR = No registrado.

| Sitio | Fecha      | Conductividad (uS) | TDS (ppm) | Salinidad (ppm) | Temperatura (C°) | pH   |
|-------|------------|--------------------|-----------|-----------------|------------------|------|
| TS_1  | 15-12-2016 | 1208               | 858       | 598             | 17               | 8,1  |
| TS_1  | 15-12-2016 | 1227               | 870       | 603             | 16,8             | 7,98 |
| TL    | 15-12-2016 | 1203               | 855       | 596             | 23,5             | 8,13 |
| TL    | 15-12-2016 | 1208               | 856       | 600             | 24,1             | 8,01 |
| TL    | 15-12-2016 | 1210               | 860       | 600             | 21,7             | 7,93 |
| TL    | 15-12-2016 | 1214               | 863       | 603             | 22               | 8,2  |
| TL    | 15-12-2016 | 1221               | 870       | 604             | 21,2             | 8,6  |
| TS_1  | 15-12-2016 | 1233               | 876       | 601             | 17,5             | 8,13 |
| TS_1  | 15-12-2016 | 1230               | 875       | 606             | 17,5             | 8,2  |
| TS_1  | 15-12-2016 | 1233               | 874       | 603             | 17,8             | 8,26 |
| TS_2  | 30-12-2016 | 1258               | 892       | 620             | 19,2             | 7,23 |
| TS_2  | 30-12-2016 | 1238               | 874       | 610             | 19,9             | 7,37 |
| TS_2  | 30-12-2016 | 1249               | 886       | 618             | 20,3             | 7,48 |

|      |            |      |     |     |      |           |
|------|------------|------|-----|-----|------|-----------|
| TS_2 | 30-12-2016 | 1247 | 887 | 617 | 19,9 | 7,32      |
| TS_2 | 30-12-2016 | 1248 | 885 | 618 | 19,9 | 7,36      |
| TS_1 | 07-06-2017 | 1258 | 893 | 609 | 11,3 | 8,44      |
| TS_1 | 07-06-2017 | 1267 | 900 | 612 | 11   | 8,14      |
| TS_1 | 07-06-2017 | 1268 | 900 | 613 | 10,6 | 8,34      |
| TS_2 | 07-06-2017 | 1268 | 900 | 614 | 10,2 | 7,89      |
| TS_2 | 07-06-2017 | 1267 | 898 | 615 | 12   | 7,8       |
| TS_2 | 27-07-2017 | 1249 | 905 | 623 | 13,8 | 7,58      |
| TS_2 | 27-07-2017 | 1278 | 907 | 622 | 13,6 | 7,84      |
| TS_2 | 27-07-2017 | 1276 | 906 | 622 | 13,4 | 8,02      |
| TS_1 | 27-07-2017 | 1268 | 900 | 620 | 14,5 | 8,2       |
| TS_1 | 27-07-2017 | 1260 | 901 | 621 | 14,4 | 8,2       |
| TS_1 | 27-07-2017 | 1268 | 899 | 620 | 14,7 | 8,32      |
| TS_2 | 20-10-2017 | 1252 | 884 | 595 | 15,3 | 7,61      |
| TS_2 | 20-10-2017 | 1265 | 891 | 619 | 15,4 | 7,63      |
| TS_2 | 20-10-2017 | 1255 | 897 | 619 | 15,3 | 7,63      |
| TS_1 | 20-10-2017 | 1230 | 854 | 603 | 15,6 | 8,3       |
| TS_1 | 20-10-2017 | 1207 | 875 | 605 | 15,7 | 8,26      |
| TS_1 | 20-10-2017 | 1226 | 870 | 601 | 16   | 8,3       |
| TS_2 | 06-02-2018 | 1274 | 901 | 627 | 20,4 | <b>NR</b> |
| TS_2 | 06-02-2018 | 1248 | 888 | 620 | 22,3 | <b>NR</b> |
| TS_1 | 27-03-2018 | 1239 | 860 | 608 | 20,6 | 6,33      |
| TS_2 | 27-03-2018 | 1280 | 910 | 632 | 18,9 | 6,58      |
| TS_2 | 27-03-2018 | 1270 | 900 | 627 | 19,5 | 6,29      |
| TS_2 | 06-06-2018 | 1212 | 867 | 595 | 13,4 | 7,34      |
| TS_2 | 06-06-2018 | 1224 | 869 | 597 | 14,1 | 7,44      |
| TS_1 | 06-06-2018 | 1240 | 880 | 602 | 12,5 | 7,68      |
| TS_1 | 06-06-2018 | 1238 | 880 | 603 | 13   | 7,79      |
| TS_1 | 06-06-2018 | 1234 | 878 | 604 | 13,1 | 7,89      |
| TS_3 | 22-08-2018 | 1028 | 719 | 492 | 15,8 | 7,49      |
| TS_2 | 22-08-2018 | 1268 | 899 | 616 | 13   | 7,2       |
| TS_1 | 22-08-2018 | 1250 | 886 | 606 | 12,9 | 7,62      |
| TS_1 | 22-08-2018 | 1249 | 887 | 608 | 12,7 | 7,61      |
| TS_1 | 22-08-2018 | 1250 | 889 | 607 | 12,9 | 7,61      |
| TS_2 | 12-10-2018 | 1299 | 910 | 634 | 14,6 | 7,46      |
| TS_2 | 12-10-2018 | 1333 | 930 | 653 | 14,7 | 7,55      |
| TS_1 | 12-10-2018 | 1318 | 922 | 639 | 16,9 | 8,2       |
| TS_1 | 12-10-2018 | 1342 | 935 | 658 | 15,9 | 8,3       |
| TS_3 | 12-10-2018 | 1017 | 791 | 553 | 16,7 | 7,65      |
| TS_3 | 12-10-2018 | 1124 | 778 | 549 | 16,7 | 7,77      |
| TS_2 | 10-01-2019 | 1339 | 940 | 668 | 19   | 7,42      |
| TS_2 | 10-01-2019 | 1288 | 903 | 602 | 19   | 7,31      |

|      |            |      |     |     |    |      |
|------|------------|------|-----|-----|----|------|
| TS_1 | 10-01-2019 | 1281 | 896 | 635 | 17 | 8,16 |
| TS_1 | 10-01-2019 | 1278 | 896 | 635 | 17 | 8,25 |
| TS_3 | 10-01-2019 | 1017 | 733 | 517 | 18 | 8,41 |
| TS_3 | 10-01-2019 | 1096 | 767 | 533 | 18 | 7,69 |



**Figura 7.** Análisis de componentes principales, variables del agua 2016-2019 localidad El Trapiche.

El Análisis de Componentes Principales muestra que los sitios TS1 y TS2 presentan claras similitudes y no muestran gran variabilidad estacional, el sitio TS3 presenta características de calidad de agua distinta a los otros sitios, con menores valores de Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos (**Tabla 11, Figura 7**).

En general las características del agua en el Trapiche son constantes, sin embargo, pueden verse perturbadas al corresponder un sitio de alta intervención antrópica, un ejemplo es el uso del estero para lavar automóviles, hecho observado al inicio del proyecto (año 2016), situación que no se ha repetido debido al aumento del control municipal. Un segundo evento de contaminación desechos líquidos (aceite) en el curso del estero (TS2), se detectó durante el mes de octubre de 2016, el que fue manejado por personal de Medio Ambiente de la Municipalidad de Peñaflor. El Municipio además ha realizado varias campañas de limpieza del humedal, sin embargo, la aparición de desechos en el curso de agua persiste (refrigeradores, neumáticos, plásticos, etc).

Recientemente, durante el año 2018, se implementó un sector para la construcción de canchas de fútbol, cercana al sitio de reproducción (TS2). Además, durante el monitoreo se observó la presencia de bombas de extracción de agua ubicadas en el estero, las que posiblemente son utilizadas para el riego, esta situación deberá ser evaluada con el Municipio para generar un manejo razonable del recurso y evitar el impacto sobre el sitio reproductivo de *C. gayi*.





### Calidad del agua en Pichi, Alhué

En el monitoreo de la localidad de Pichi se siguieron dos sitios con presencia de *C. gayi* (PS1 y PS2). Esta localidad presenta diferencias en las características generales y en la calidad del agua entre los dos sectores, PS1 y PS2.

PS1 Corresponde a una parte profunda del estero (Pozón), que presenta escasa vegetación acuática, presencia de rocas en el fondo y una profundidad aproximada de 1,4 m. Este lugar fue detectado durante el año 2015, y presenta intervención baja. En este sitio se ha observado uso para actividades humanas (zona de acampada, fogata y desechos en la orilla) y además es una zona donde se extrae agua mediante camión aljibe con distinta periodicidad. El sitio PS2 corresponde a un estero con vegetación acuática, piedras en el fondo de diversos tamaños y una profundidad máxima de 0,8 m, presenta bajo flujo de agua y una evidente estacionalidad en la profundidad y nivel de agua. El sitio PS2 presentó menores valores de Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos que el PS1 en todos monitoreos. PS2 corresponde a la zona de mayor diversidad y presencia de reproducción de *C. gayi*. Es posible observar una baja intervención, sólo destaca el uso de agua para bebedero de animales domésticos.

Durante el año 2015, previo al inicio del presente proyecto, en Pichi se identificó un área de presencia de *C. gayi*, la que había sido registrada con anterioridad por el Dr. Claudio Correa (U. de Concepción). Este sitio, ubicado en el puente, se perdió durante el año 2016, por la modificación del ambiente causada por obras por parte de Ministerio de Obras Públicas, modificando el curso de agua, removiendo material e instalando una obra de mayor tamaño. Esto generó que esa parte del estero sólo posea agua estacionalmente, permaneciendo seco durante gran parte del año.

Pichi presenta una marcada estacionalidad en los valores de calidad de agua, los meses de mayores precipitaciones (Invierno y Primavera) presentan menores valores de Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos (TDS) (**Tabla 12**), esto hace evidente la influencia de las lluvias sobre el nivel de agua y el hábitat de *C. gayi*, los meses de verano ocurre una disminución del nivel de agua y desecación parcial en PS2, lo que aumentaría la concentración del agua, aumentando dichos valores, sin embargo, el hábitat se mantiene todo el año con agua, permitiendo la observación de larvas de *C. gayi* en variados periodos (ver registro de larvas en objetivo específico n° 3).

**Tabla 12.** Variables del agua obtenidas en el Monitoreo de Pichi, Alhué. NR: No registrado. PS\_1 = 308808 / 6237906 UTM; PS2 = 310086 / 6239432 UTM.

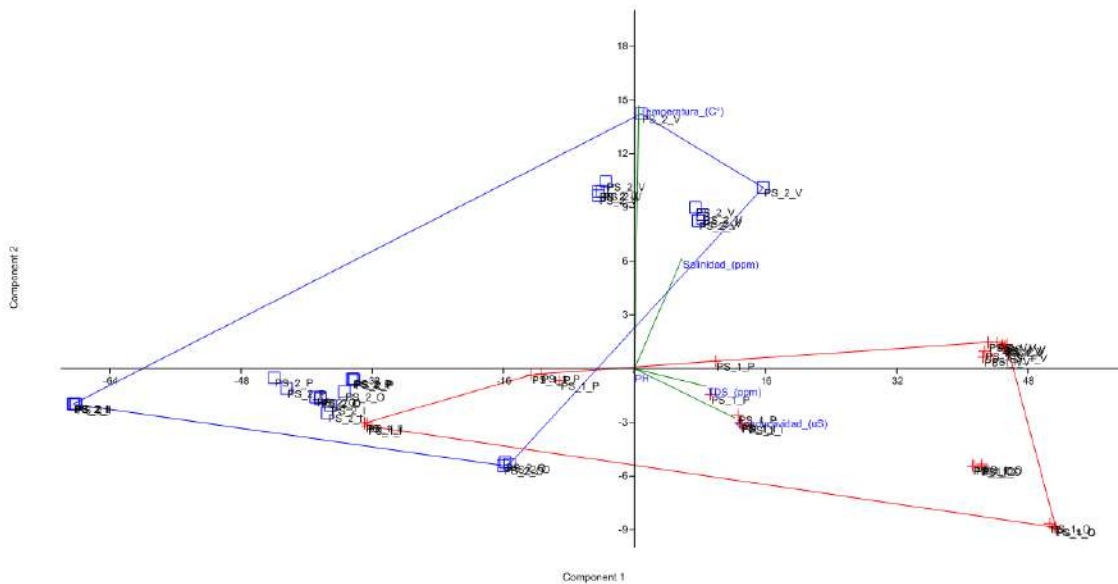
| Sitio | Fecha      | Conductividad (uS) | TDS (ppm) | Salinidad (ppm) | Temperatura (C°) | pH   |
|-------|------------|--------------------|-----------|-----------------|------------------|------|
| PS_1  | 29-12-2016 | 163,6              | 116       | 78,2            | 18               | 7,52 |
| PS_1  | 29-12-2016 | 162,8              | 115       | 78,4            | 17,7             | 7,24 |
| PS_1  | 29-12-2016 | 162,9              | 116       | 77,7            | 17,2             | 7,31 |
| PS_1  | 29-12-2016 | 162,5              | 115       | 77,5            | 17,1             | 7,22 |
| PS_1  | 29-12-2016 | 162,6              | 115       | 77,7            | 17,4             | 7,18 |
| PS_2  | 29-12-2016 | 126,8              | 90        | 73,8            | 25,2             | 7,95 |
| PS_2  | 29-12-2016 | 125,7              | 89,1      | 63              | 24,4             | 7,8  |
| PS_2  | 29-12-2016 | 125,9              | 89,5      | 63,3            | 24,6             | 7,75 |
| PS_2  | 29-12-2016 | 125,6              | 89,2      | 63,1            | 24,6             | 7,62 |

|      |            |       |      |      |      |           |
|------|------------|-------|------|------|------|-----------|
| PS_2 | 29-12-2016 | 126,2 | 89,6 | 63,7 | 25,1 | 7,62      |
| PS_1 | 19-01-2017 | 164,5 | 116  | 79,2 | 17,5 | 7,13      |
| PS_1 | 19-01-2017 | 164,5 | 117  | 78,6 | 17,4 | 7,19      |
| PS_1 | 19-01-2017 | 164,5 | 116  | 78,7 | 17,6 | 7,13      |
| PS_1 | 19-01-2017 | 164,2 | 117  | 78,8 | 17,8 | 7,1       |
| PS_1 | 19-01-2017 | 164,2 | 116  | 78,7 | 17,7 | 7,16      |
| PS_2 | 19-01-2017 | 135,3 | 96,3 | 67,3 | 23,5 | 7,47      |
| PS_2 | 19-01-2017 | 135,4 | 96,1 | 67,4 | 23,7 | 7,36      |
| PS_2 | 19-01-2017 | 135   | 95,8 | 67,2 | 23,3 | 7,2       |
| PS_2 | 19-01-2017 | 134,7 | 95,6 | 67,1 | 24,1 | 7,27      |
| PS_2 | 19-01-2017 | 136,5 | 106  | 70,6 | 24,9 | 7,1       |
| PS_1 | 24-05-2017 | 162,9 | 116  | 75,2 | 11,6 | 7,61      |
| PS_1 | 24-05-2017 | 162,2 | 115  | 75   | 11,4 | 7,43      |
| PS_1 | 24-05-2017 | 162,8 | 116  | 75,1 | 11,5 | 7,31      |
| PS_1 | 24-05-2017 | 162,6 | 115  | 74,9 | 11,5 | 7,42      |
| PS_2 | 24-05-2017 | 103,1 | 73,3 | 49,3 | 12,7 | 7,73      |
| PS_2 | 24-05-2017 | 100,6 | 71,4 | 47,8 | 12,4 | 7,79      |
| PS_2 | 24-05-2017 | 100,9 | 71,8 | 48   | 12,3 | 7,81      |
| PS_2 | 24-05-2017 | 101   | 71,8 | 48   | 12,4 | 7,83      |
| PS_1 | 24-08-2017 | 105,3 | 74,9 | 49,3 | 11,3 | 7,83      |
| PS_1 | 24-08-2017 | 105,6 | 75   | 49,4 | 11,3 | 8         |
| PS_1 | 24-08-2017 | 105,6 | 75   | 49,3 | 11,2 | 7,97      |
| PS_2 | 24-08-2017 | 78,1  | 55,4 | 37,1 | 11,1 | 8         |
| PS_2 | 24-08-2017 | 78,1  | 55,5 | 37,1 | 11,1 | 8         |
| PS_2 | 24-08-2017 | 78,4  | 55,6 | 37,2 | 11,1 | 7,95      |
| PS_2 | 24-08-2017 | 78,2  | 55,5 | 37,2 | 11,1 | 7,96      |
| PS_1 | 02-11-2017 | 120,7 | 85,4 | 57,2 | 14,6 | 7,97      |
| PS_1 | 02-11-2017 | 124   | 86,7 | 58   | 14,6 | 7,8       |
| PS_1 | 02-11-2017 | 121,5 | 86   | 57,8 | 14,6 | 7,8       |
| PS_2 | 02-11-2017 | 104   | 73,6 | 49,5 | 13,6 | 8,2       |
| PS_2 | 02-11-2017 | 104,1 | 73,7 | 49,6 | 13,6 | 8,17      |
| PS_2 | 02-11-2017 | 104,3 | 73,7 | 49,5 | 13,6 | 8,2       |
| PS_2 | 19-01-2018 | 138,2 | 98,2 | 69,2 | 25,3 | <b>NR</b> |
| PS_2 | 19-01-2018 | 138,2 | 98   | 69,2 | 25,9 | <b>NR</b> |
| PS_2 | 19-01-2018 | 137,9 | 98,2 | 68,9 | 25,3 | <b>NR</b> |
| PS_1 | 19-01-2018 | 167,6 | 118  | 80,3 | 18   | <b>NR</b> |
| PS_1 | 19-01-2018 | 166,3 | 118  | 79,8 | 18,5 | <b>NR</b> |
| PS_1 | 19-01-2018 | 165,5 | 116  | 80,2 | 19,9 | <b>NR</b> |
| PS_1 | 14-06-2018 | 170,4 | 121  | 77,1 | 8,7  | 8,16      |
| PS_1 | 14-06-2018 | 170,2 | 121  | 77,1 | 8,7  | 8,07      |
| PS_1 | 14-06-2018 | 169,6 | 121  | 76,8 | 8,9  | 7,64      |
| PS_2 | 14-06-2018 | 118,9 | 84,1 | 54,5 | 9,9  | 7,81      |

|      |            |       |       |      |      |      |
|------|------------|-------|-------|------|------|------|
| PS_2 | 14-06-2018 | 118,8 | 84    | 54,2 | 9,8  | 7,77 |
| PS_2 | 14-06-2018 | 119,3 | 84,5  | 54,5 | 9,9  | 7,55 |
| PS_1 | 29-08-2018 | 140,5 | 101   | 65,6 | 12,8 | 7,32 |
| PS_1 | 29-08-2018 | 140,3 | 99,6  | 65,7 | 12,7 | 7,48 |
| PS_1 | 29-08-2018 | 140,4 | 99,3  | 65,6 | 12,8 | 7,28 |
| PS_2 | 29-08-2018 | 101,8 | 72,3  | 47,8 | 11,7 | 7,4  |
| PS_2 | 29-08-2018 | 102   | 72,4  | 48,3 | 12   | 7,48 |
| PS_1 | 10-10-2018 | 135,5 | 98,8  | 68,3 | 14,5 | 7,52 |
| PS_1 | 10-10-2018 | 141,4 | 98    | 64,6 | 13,8 | 7,42 |
| PS_1 | 10-10-2018 | 136,8 | 97,6  | 65,7 | 13,7 | 7,39 |
| PS_2 | 10-10-2018 | 97,4  | 67,9  | 45,5 | 13,7 | 7,95 |
| PS_2 | 10-10-2018 | 98,6  | 69    | 45,6 | 13,3 | 8,04 |
| PS_2 | 20-12-2018 | 131,8 | 91,9  | 60   | NR   | 7,78 |
| PS_1 | 20-12-2018 | 181,8 | 122,5 | 84,6 | NR   | 7,3  |

Otro aspecto interesante es la disminución en los valores de Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales (TDS) observados durante el año 2017, estos fueron menores que los observados durante todo el periodo de monitoreo. Este cambio puede ser asociado a mayores precipitaciones registradas en ese periodo y posiblemente a un evento El Niño ocurrido durante 2018 (Garreaud *et al.*, 2018).

El análisis de Componentes principales muestra que hay diferencias entre los dos sitios monitoreados en Pichi (PS1, PS2). Sin embargo, estas diferencias disminuyen en invierno y primavera, posiblemente por la influencia de las precipitaciones estacionales (**Figura 9**). La temperatura presentó una marcada estacionalidad y los valores de pH fueron estables a lo largo del monitoreo, presentando valores en torno a la neutralidad (**Tabla 12**).



**Figura 9.** Análisis de componentes principales, variables del agua 2016-219 localidad El Trapiche.

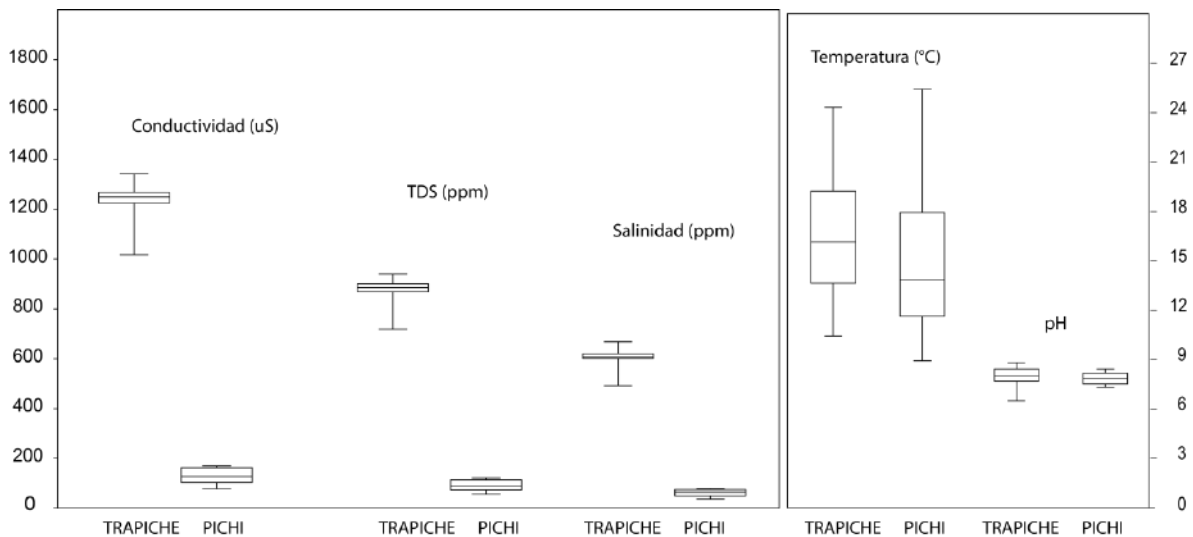


### Comparación entre localidades

Al comparar las variables del agua entre localidades, se observa una clara diferencia entre ellas, siendo El Trapiche el lugar que presentó los mayores valores de Conductividad, Salinidad y TDS, siendo hasta 10 veces superiores (**Tabla 13**). Los análisis muestran diferencias estadísticas significativas entre las medias de estas variables, el caso de la Temperatura no presentó diferencias en el análisis (t de dos muestras 10.000 permutaciones), mientras que el pH sí presentó diferencias, aunque ambos sitios presentaron valores cercanos a la neutralidad pH= 7,0 (**Tabla 13, Figura 11**)

**Tabla 13.** Comparaciones de las variables del agua, Media y Error estándar, Test t para dos muestras. TR = Trapiche, PC = Pichi. N: Trapiche=57; Pichi=57; p-value obtenido de 10.000 permutaciones

|                        | Conductividad (uS) |        | TDS (ppm) |       | Salinidad (ppm) |       | Temperatura (°C) |       | pH     |      |
|------------------------|--------------------|--------|-----------|-------|-----------------|-------|------------------|-------|--------|------|
|                        | TR                 | PC     | TR        | PC    | TR              | PC    | TR               | PC    | TR     | PC   |
| <b>Media</b>           | 1236,90            | 129,99 | 876,95    | 92,35 | 607,07          | 62,08 | 16,26            | 15,16 | 7,79   | 7,62 |
| <b>E.E.</b>            | 65,91              | 27,76  | 42,79     | 19,82 | 29,61           | 13,23 | 3,28             | 4,93  | 0,49   | 0,33 |
| <b>t Test, p value</b> | 0,0001             |        | 0,0001    |       | 0,0001          |       | 0,1671           |       | 0,0355 |      |



**Figura 11.** Box Plot con las variables del agua para dos localidades monitoreadas durante 2016-2019.

Las variables ambientales de los cuerpos de agua han sido indicadas como muy importantes para los anfibios, ya que debido a su forma de vida los ambientes influyen, entre otros aspectos, en las tasas de crecimiento, desarrollo embrionario, rasgos fenotípicos y reproducción, haciendo muy relevante caracterizar los hábitats y particularmente la variables del agua para la conservación de las poblaciones de anfibios en ambientes naturales. El hábitat de *C. gayi* ha sido identificado como lagunas, ambientes lénticos y con sedimentos, ubicados en zonas arbustivas templadas del Matorral Mediterráneo de Chile Central (Veloso, 2006)

La desecación de los sistemas acuáticos puede desencadenar cambios en la velocidad de desarrollo de los estadios larvales en anfibios, se sabe que larvas de anfibios que habitan en pozas pequeñas que se desecan, aceleran su desarrollo y completan su metamorfosis antes que larvas que habitan sistemas más estables (Márquez-García *et al.*, 2010), este cambio se explicaría ya que deben estar completamente desarrollados para sobrevivir en ambientes terrestres. Acelerar la metamorfosis también tiene un efecto en el tamaño corporal de estos individuos, observándose que los individuos que completan antes su metamorfosis poseen un menor tamaño corporal que individuos de la misma especie que retardan su crecimiento (Márquez-García *et al.*, 2009).

En el caso de *C. gayi* la etapa embrionaria (desde la segmentación del huevo fecundado hasta la eclosión de una pequeña larva) puede durar de 4 a 7 días (Vélez *et al.*, 2014a), esta es seguida de la etapa pre-metamórfica hasta el estado Gosner 37 (Gosner, 1960), que puede durar de 7 a 8 meses (Venegas *et al.*, 1987), incluso se ha sugerido puede alcanzar un periodo de dos veranos >12 meses (Krieg, 1924, mencionado por Cei, 1962). La metamorfosis completa (incluyendo las etapas antes mencionadas), posee una duración variable y se ha sugerido que se completa en un periodo de hasta 4 años (Vélez *et al.*, 2014b), la gran extensión de su etapa larval y metamórfica, genera una dependencia de esta especie para hábitats de agua permanente y relativamente estables a lo largo del tiempo, así también cambios por desecación pueden generar mortalidad en adultos (Acuña *et al.*, 2014; Mizobe *et al.*, 2014).

En nuestros resultados observamos que las localidades monitoreadas con presencia de rana chilena (larvas y adultos, ver **Tabla 14**) corresponden a esteros y vertientes que no han sufrido mayores cambios en el último periodo de tiempo, ni en el último ciclo de sequías de la zona central, mega sequía 2010-2015 (Garreaud *et al.*, 2017). Ya que corresponden a sistemas alimentados por vertientes y en menor medida influenciados por las lluvias. En el caso del Trapiche, la vertiente y laguna alimentarían los sitios de reproducción durante todo el año; y Pichi es un estero permanente que disminuye su nivel de agua en verano pero que mantiene pozas y flujo constante.

La Temperatura del agua también posee un efecto sobre el desarrollo larval, las tasas de crecimiento se ven incrementadas en ambientes de altas temperaturas del agua (>20°C), esto se ha observado en *Rhinella spinulosa* (Méndez & Correa-Solis 2009) y en *C. gayi* criadas en cautiverio (Vélez *et al.*, 2014b), en este último caso al exponer a larvas a temperatura de 30°C su tasa de crecimiento y sobrevivencia caen drásticamente. En otros estudios la temperatura también influiría en el proceso digestivo y asimilación de nutriente (Benavides *et al.*, 2005) y sobre la longitud del tracto digestivo y su plasticidad fenotípica (Castañeda *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que la temperatura del agua en las localidades monitoreadas, fluctúa cerca de los 10 grados en época de invierno y los 25 grados en verano (**Tabla 11 y 12**).

Otra característica importante de los sistemas acuáticos corresponde al pH, se sabe que los anfibios son muy vulnerables a cambios en esta variable y valores de pH inferiores a 4,5, generan alta mortalidad. En *C. gayi*, este efecto es similar a otros anfibios, y larvas expuestas a condiciones de pH ácido (3,5 - 4,5) generan mortalidades entre el 100 y 65%, respectivamente, y las larvas sobrevivientes muestran daños en los epitelios superficiales y retardo en su desarrollo. Los pH cercanos a la neutralidad (5,5 a 6,5) prácticamente no generan mortalidad y las larvas no sufren cambios en su desarrollo (Hermosilla & Pincheira 1992). Todos los registros del monitoreo presentaron pH cercanos a la neutralidad (6,19 y 8,6), sin embargo, en el monitoreo de marzo de 2018 se obtuvo un valor de pH cercano a 6,0 (Trapiche sitio TS2), en esa oportunidad no se observaron larvas en el lugar.

Respecto a las variables de Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos (TDS), las localidades monitoreadas, Pichi y El Trapiche, se encuentran en extremos opuestos para estas variables (**Tabla 11**) y presentan una gran diferencia (de hasta 10 veces). Esto sugiere que

*C. gayi* puede tolerar una gran gama de ambientes, presentando reproducción en ambos extremos de condiciones ambientales del agua. Interesante es que la especie no fue registrada en lugares con turbidez del agua, y alto flujo. Además, se ve asociada a fauna nativa acompañante, que expresaría la calidad del ambiente como Artrópodos del género *Aegla sp.*, Amphipodos, Moluscos (Gasteropoda y bivalvia), peces nativos *Cheirodon spp.*, *Basilichthys australis*, *Percilia gillissi* y *Trichomycterus areolatus*. Durante este estudio no se evaluaron aspectos de presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos, lo que deberán ser evaluados en el futuro.

### 3.3 Objetivo específico nº 3: generar estudios genéticos de las poblaciones de *C. gayi* encontradas en la región

Durante la realización de este proyecto se obtuvo un total de 105 muestras biológicas de *C. gayi* para estudios genéticos, procedentes de cuatro localidades de la Región Metropolitana de Santiago. A cada individuo muestreado se le asignó un código de colección asociado al Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El detalle por fecha y localidad se presenta en la **Tabla 14**.

Del total de muestras recolectadas, siete provienen de la localidad de Piscipozas (Comuna de Melipilla), siete se obtuvieron en Hospital (Comuna de Paine), 45 provienen del Parque Municipal El Trapiche (Comuna de Peñaflores), y 46 se obtuvieron en el Fundo San Juan de Pichi (Comuna de Alhué). Se obtuvo un número similar de muestras en ambas poblaciones foco para estudios ecológicos y biológicos. Casi la totalidad de las muestras obtenidas corresponden a ejemplares en estado de desarrollo temprano (larva o renacuajo), por lo que la densidad de adultos en los sitios muestreados sería baja. Por su parte, la presencia de larvas y metamórficos durante los meses de junio y hasta enero pone en evidencia la ocurrencia de actividad reproductiva en los cuatro sitios donde se logró la captura de ejemplares de *C. gayi*.

**Tabla 14.** Muestras biológicas de *Calyptocephalella gayi* obtenidas para estudios genéticos poblacionales en el periodo comprendido entre agosto de 2016 y enero de 2019.

| N  | Código Colección | Localidad              | Georreferencia (UTM, WGS84) | Fecha       | Ejemplar |
|----|------------------|------------------------|-----------------------------|-------------|----------|
| 1  | 1608001          | Piscipozas             | 311490 / 6267953            | 30.ago.2016 | Larva    |
| 2  | 1608002          | Piscipozas             | 311490 / 6267953            | 30.ago.2016 | Larva    |
| 3  | 1608003          | Piscipozas             | 311490 / 6267953            | 30.ago.2016 | Larva    |
| 4  | 1608004          | Piscipozas             | 311490 / 6267953            | 30.ago.2016 | Larva    |
| 5  | 1608005          | Piscipozas             | 311490 / 6267953            | 30.ago.2016 | Larva    |
| 6  | 1608006          | Piscipozas             | 311490 / 6267953            | 30.ago.2016 | Larva    |
| 7  | 1610001          | Pichi                  | 308799 / 6237887            | 28.oct.2016 | Larva    |
| 8  | 1611001          | Pichi, puente Lagartos | 309452 / 6238725            | 25.nov.2016 | Larva    |
| 9  | 1611002          | Pichi, puente Lagartos | 309452 / 6238725            | 25.nov.2016 | Larva    |
| 10 | 1611003          | Pichi, puente Lagartos | 309452 / 6238725            | 25.nov.2016 | Larva    |
| 11 | 1611004          | Pichi, puente Lagartos | 309452 / 6238725            | 25.nov.2016 | Larva    |
| 12 | 1611005          | Pichi, puente Lagartos | 309452 / 6238725            | 25.nov.2016 | Larva    |
| 13 | 1611006          | Pichi, puente Lagartos | 309452 / 6238725            | 25.nov.2016 | Larva    |
| 14 | 1612001          | El Trapiche            | 323734 / 6280901            | 29.dic.2016 | Larva    |
| 15 | 1612002          | El Trapiche            | 323734 / 6280901            | 29.dic.2016 | Larva    |
| 16 | 1612003          | Pichi, Fundo San Juan  | 310093 / 6239437            | 29.dic.2016 | Larva    |



|    |         |                       |                  |             |                 |
|----|---------|-----------------------|------------------|-------------|-----------------|
| 17 | 1612004 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 29.dic.2016 | Larva           |
| 18 | 1612005 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 29.dic.2016 | Larva           |
| 19 | 1612006 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 29.dic.2016 | Larva           |
| 20 | 1612007 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 29.dic.2016 | Larva           |
| 21 | 1612008 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 29.dic.2016 | Larva           |
| 22 | 1612009 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 29.dic.2016 | Larva           |
| 23 | 1612010 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 30.dic.2016 | Larva           |
| 24 | 1612011 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 30.dic.2016 | Larva           |
| 25 | 1612012 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 30.dic.2016 | Larva           |
| 26 | 1701562 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2017 | Larva           |
| 27 | 1701563 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2017 | Larva           |
| 28 | 1701564 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2017 | Larva           |
| 29 | 1701565 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2017 | Larva           |
| 30 | 1701566 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2017 | Larva           |
| 31 | 1701567 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2017 | Larva           |
| 32 | 1705001 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 24.may.2017 | Juvenil         |
| 33 | 1706068 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 07.jun.2017 | Larva           |
| 34 | 1706069 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 07.jun.2017 | Larva           |
| 35 | 1706070 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 07.jun.2017 | Larva           |
| 36 | 1706071 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 07.jun.2017 | Larva           |
| 37 | 1706072 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 07.jun.2017 | Larva           |
| 38 | 1706073 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 07.jun.2017 | Larva           |
| 39 | 1707001 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 27.jul.2017 | Larva           |
| 40 | 1707002 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 27.jul.2017 | Larva           |
| 41 | 1707003 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 27.jul.2017 | Larva           |
| 42 | 1711001 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 02.nov.2017 | Postmetamórfico |
| 43 | 1711002 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 02.nov.2017 | Larva           |
| 44 | 1711003 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 02.nov.2017 | Larva           |
| 45 | 1801001 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Larva           |
| 46 | 1801002 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Metamórfico     |
| 47 | 1801003 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Larva           |
| 48 | 1801004 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Larva           |
| 49 | 1801005 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Larva           |
| 50 | 1801006 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Larva           |
| 51 | 1801007 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 19.ene.2018 | Larva           |
| 52 | 1803233 | El Trapiche           | 323734 / 6280901 | 27.mar.2018 | Larva           |
| 53 | 1806001 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 54 | 1806002 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 55 | 1806003 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 56 | 1806004 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 57 | 1806005 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 58 | 1806006 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 59 | 1806007 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 60 | 1806008 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |
| 61 | 1806009 | Pichi, Fundo San Juan | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva           |

|     |         |                           |                  |             |             |
|-----|---------|---------------------------|------------------|-------------|-------------|
| 62  | 1806010 | Pichi, Fundo San Juan     | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva       |
| 63  | 1806011 | Pichi, Fundo San Juan     | 310093 / 6239437 | 14.jun.2018 | Larva       |
| 64  | 1808001 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Larva       |
| 65  | 1808002 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Larva       |
| 66  | 1808003 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Larva       |
| 67  | 1808004 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Larva       |
| 68  | 1808005 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Larva       |
| 69  | 1808006 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Embrión     |
| 70  | 1808007 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Embrión     |
| 71  | 1808008 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Embrión     |
| 72  | 1808009 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Embrión     |
| 73  | 1808010 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Embrión     |
| 74  | 1808011 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 22.ago.2018 | Embrión     |
| 75  | 1808012 | Pichi, Fundo San Juan     | 310093 / 6239437 | 29.ago.2018 | Larva       |
| 76  | 1809001 | Piscipozas                | 311490 / 6267953 | 07.sep.2018 | Larva       |
| 77  | 1810001 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 78  | 1810002 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 79  | 1810003 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 80  | 1810004 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 81  | 1810005 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 82  | 1810006 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 83  | 1810007 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 84  | 1810008 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 05.oct.2018 | Larva       |
| 85  | 1810009 | Pichi, Fundo San Juan     | 310093 / 6239437 | 10.oct.2018 | Larva       |
| 86  | 1810010 | Pichi, Fundo San Juan     | 310093 / 6239437 | 10.oct.2018 | Larva       |
| 87  | 1812001 | Pichi, Fundo San Juan     | 310093 / 6239437 | 21.dic.2018 | Adulto      |
| 88  | 1901001 | El Trapiche               | 323734 / 6280901 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 89  | 1901002 | El Trapiche               | 323734 / 6280901 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 90  | 1901003 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 91  | 1901004 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 92  | 1901005 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 93  | 1901006 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 94  | 1901007 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 95  | 1901008 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 96  | 1901009 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 97  | 1901010 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 98  | 1901011 | El Trapiche, pozones      | 324386 / 6281839 | 10.ene.2019 | Larva       |
| 99  | 1901012 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |
| 100 | 1901013 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |
| 101 | 1901014 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |
| 102 | 1901015 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |
| 103 | 1901016 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |
| 104 | 1901017 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |
| 105 | 1901018 | Hospital, puente Águila N | 338111 / 6250969 | 15.ene.2019 | Metamórfico |

Aunque el número de muestras obtenidas durante este proyecto fue relativamente alto para las poblaciones foco, Pichi y Trapiche (91 muestras sólo en estas dos localidades), el número de muestras obtenidas en las otras dos localidades donde fue posible recolectar muestras biológicas es insuficiente para la realización de análisis genéticos poblacionales que permitan caracterizar la diversidad y grado de diferenciación genética en las poblaciones de la Región Metropolitana. Lo anterior considerando que el número total proyectado para realizar un estudio genético adecuado es de al menos 25 animales por localidad. Más aún, el número de poblaciones con este tipo de muestra (sólo cuatro) es insuficiente para realizar análisis genéticos comparativos que tengan como objetivo determinar los niveles de estructuración y flujo genético de esta especie en la Región Metropolitana. Debido a lo anterior, no fue posible realizar estudios de genética de poblaciones en *C. gayi* de la Región Metropolitana. No obstante, se desarrolló una colección de muestras biológicas que constituyen una fase inicial que permitirá desarrollar estudios de genética de poblaciones que contribuyan a la conservación de *Calyptocephalella gayi* a corto y mediano plazo.

Lo antes expuesto indica que se requiere de un mayor esfuerzo de muestreo en los sitios donde se registró la presencia de *C. gayi* y que no fueron monitoreados periódicamente durante este proyecto (Hospital, comuna de Paine; Piscipozas, comuna de Melipilla; El Pangal, comuna de Curacaví; Estero Rungue, comuna de Tiltil y comuna del Monte). Lo anterior permitirá obtener un número de muestras representativo que permita realizar inferencias robustas sobre las características genéticas de las poblaciones de *C. gayi* en la Región Metropolitana.

La relevancia de realizar estudios genéticos para la conservación de las especies está determinada por los factores genéticos que afectan el riesgo de extinción. Estos factores están dados principalmente por los efectos de los bajos tamaños poblacionales, ya que las especies amenazadas presentan tamaños poblacionales bajos y/o en declinación. Las poblaciones pequeñas sufren de endogamia y pérdida de diversidad genética, resultando en un elevado riesgo de extinción. Por lo tanto, uno de los principales objetivos de realizar estudios genéticos es minimizar este riesgo (Frankham, Ballou & Briscoe 2002).

La endogamia posee un efecto deletéreo sobre la reproducción y la sobrevivencia, incrementando en forma directa el riesgo de extinción (depresión de endogamia); mientras que la pérdida de diversidad genética compromete la habilidad de adaptación en respuesta a los cambios ambientales, reduciendo la oportunidad de persistencia de las poblaciones a largo plazo. Por otro lado, la información con respecto a la magnitud del flujo genético entre las poblaciones es crítica para determinar medidas de manejo, por ejemplo, la translocación de individuos para prevenir la endogamia y la pérdida de diversidad genética, ya que la diversidad genética está directamente relacionada con los tamaños poblacionales (mayores tamaños poblacionales presentarán mayor diversidad genética). No obstante, poblaciones dentro de una especie pueden estar suficientemente diferenciadas tal que ameriten ser manejadas como unidades independientes, por ejemplo, pueden estar adaptadas a diferentes ambientes lo que resultaría en una desventaja para los híbridos de esas poblaciones (depresión de exogamia) (Frankham, Ballou & Briscoe 2002). En este contexto, los marcadores genéticos moleculares se han convertido en una herramienta fundamental para las estrategias de conservación modernas, ya que permiten estimar parámetros demográficos (tamaño poblacional efectivo) y los patrones temporales de eventos históricos y actuales (por ejemplo, cuellos de botella y procesos de expansión) (McCartney-Melstad & Shaffer 2015). Además, permiten caracterizar el grado de diferenciación genética entre las poblaciones (estructura poblacional), e identificar aquellas poblaciones donde factores como la endogamia están afectando la capacidad de persistencia a largo plazo de las poblaciones (Frankham, Ballou & Briscoe 2002).

Debido a los escasos registros de presencia reportados para *C. gayi* en la Región Metropolitana, resulta de suma importancia realizar estudios genéticos poblacionales que

permitan caracterizar la diversidad genética y establecer el grado de diferenciación que existe entre las poblaciones, así como determinar sus parámetros demográficos. Asimismo, conocer la estructura geográfica de las poblaciones a lo largo de toda su distribución en Chile permitiría implementar medidas de manejo a una escala espacial y temporal amplia. En particular, para la Región Metropolitana resultaría interesante analizar su relación con las poblaciones de la Región de Valparaíso, ya que la presencia de *C. gayi* está asociada principalmente con las sub-cuencas del río Mapocho y río Maipo que desembocan en dicha región.

En relación con este tema, hasta la fecha no existen estudios genéticos poblacionales en *C. gayi* (de acuerdo con búsquedas realizadas en el servicio de información científica en línea, *Web of Science*, suministrado por Thomson Reuters <https://apps.webofknowledge.com>). No obstante, existen estudios desde el área de la sistemática y para los que se obtuvo el genoma mitocondrial (hebra liviana) y loci nucleares (Irisarri *et al.*, 2012; Fouquet *et al.*, 2012), los que constituyen un precedente para desarrollar marcadores moleculares específicos para *C. gayi* que permitan realizar estudios genético-poblacionales y filogeográficos.

### 3.4 Objetivo específico nº 4: obtener datos sobre enfermedades emergentes que pudieran estar afectando a *C. gayi*

Se analizó un total de 47 muestras de diferentes especies de anfibios (**Tabla 15**), de las cuales se obtuvieron siete en El Trapiche, mientras que las muestras restantes fueron obtenidas en la localidad de Pichi (40 muestras). Las especies analizadas correspondieron mayoritariamente a *C. gayi* y *P. thaul*, y *X. laevis* en menor cantidad. En Pichi fue posible detectar 13 individuos (28%) con presencia de hongo quítrido, de los cuales 12 correspondían a especímenes de rana chilena y un ejemplar de rana africana. En el caso de El Trapiche, cinco de los siete individuos muestreados (71%) mostraron presencia de hongo quítrido, todos especímenes de rana chilena. En general, el equivalente genómico (zoosporas por tórula) fue inferior a 10.000, lo que indicaría que la carga de zoosporas detectada es moderada. No obstante, el 22% de los animales con presencia del hongo mostró una alta carga de zoosporas. Cabe notar que del total de muestras analizadas de la especie *P. thaul* (23), ninguna fue positiva a la presencia del hongo. No fue posible detectar síntomas de la enfermedad (e.g. desprendimiento de epidermis, decoloración de la piel) en ninguno de los individuos recolectados.

**Tabla 15.** Resultados del análisis de detección de hongo quítrido (Bd) mediante qPCR realizados por el Centro de Investigación para la Sustentabilidad (CIS), de la Facultad de Ecología y Recursos Naturales, de la Universidad Andrés Bello.

| N  | Especie         | Localidad | Coordenadas |          | Altura (m) | Fecha muestreo | Estado  | Equivalente genómico | Bd       |
|----|-----------------|-----------|-------------|----------|------------|----------------|---------|----------------------|----------|
| 1  | <i>C. gayi</i>  | Pichi     | -33,9692    | -71,0559 | 303        | 24-05-2017     | Juvenil | <b>2810,489</b>      | <b>+</b> |
| 2  | <i>P. thaul</i> | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |
| 3  | <i>C. gayi</i>  | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | <b>9939,323</b>      | <b>+</b> |
| 4  | <i>P. thaul</i> | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |
| 5  | <i>C. gayi</i>  | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |
| 6  | <i>C. gayi</i>  | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |
| 7  | <i>P. thaul</i> | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Juvenil | 0,00000              | -        |
| 8  | <i>P. thaul</i> | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |
| 9  | <i>P. thaul</i> | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |
| 10 | <i>P. thaul</i> | Pichi     | -33,9689    | -71,0557 | 314        | 13-11-2017     | Larva   | 0,00000              | -        |

|    |                  |             |          |          |     |            |         |                   |   |
|----|------------------|-------------|----------|----------|-----|------------|---------|-------------------|---|
| 11 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 12 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 13 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 14 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 15 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 16 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 17 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 18 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 19 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 20 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 21 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 22 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 23 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 24 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 25 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 26 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 27 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>7326,398</b>   | + |
| 28 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>7788,184</b>   | + |
| 29 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>14766,190</b>  | + |
| 30 | <i>X. laevis</i> | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Adulto  | <b>12,501</b>     | + |
| 31 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Adulto  | 0,00000           | - |
| 32 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>2712,428</b>   | + |
| 33 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>3443,711</b>   | + |
| 34 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>30204,510</b>  | + |
| 35 | <i>X. laevis</i> | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Adulto  | 0,00000           | - |
| 36 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>243318,046</b> | + |
| 37 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>105881,352</b> | + |
| 38 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>38613,325</b>  | + |
| 39 | <i>C. gayi</i>   | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Larva   | <b>85771,069</b>  | + |
| 40 | <i>P. thaul</i>  | Pichi       | -33,9689 | -71,0557 | 314 | 13-11-2017 | Juvenil | 0,00000           | - |
| 41 | <i>C. gayi</i>   | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Larva   | 0,00000           | - |
| 42 | <i>X. laevis</i> | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Adulto  | 0,00000           | - |
| 43 | <i>C. gayi</i>   | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Adulto  | <b>440,454</b>    | + |
| 44 | <i>C. gayi</i>   | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Larva   | <b>7587,718</b>   | + |
| 45 | <i>C. gayi</i>   | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Larva   | <b>4756,952</b>   | + |
| 46 | <i>C. gayi</i>   | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Larva   | <b>7005,012</b>   | + |
| 47 | <i>C. gayi</i>   | El Trapiche | -33,5965 | -70,8985 | 377 | 20-11-2017 | Adulto  | <b>237,021</b>    | + |

En los últimos años los anfibios se han enfrentado a diversos factores que han diezmando sus poblaciones. Uno de los principales factores implicados en este declive poblacional son las enfermedades emergentes como la quitridiomycosis, la cual es ocasionada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.*, 1999). Este organismo microscópico pertenece a un grupo de descomponedores de materia orgánica del suelo y se reproduce por esporas que

se transportan a través del agua. Con la quitridiomycosis, la piel del individuo o infectado se vuelve gruesa debido a un cambio microscópico llamado hiperplasia e hiperqueratosis, condición que puede causar la muerte.

En Chile las enfermedades infecciosas (EIs) representan una amenaza para las especies de animales silvestres, categorizadas como “vulnerables”, “en peligro” y “en peligro crítico”, dentro de la Lista roja de la UICN. Se ha mencionado que el 16,2% de las especies animales amenazadas de Chile presentan como principal amenaza las EIs, siendo los anfibios los organismos con uno de los mayores números de especies amenazadas por EIs (e.g. Quitridiomycosis) (Valenzuela- Sánchez & Medina-Vogel, 2014). Según la base de datos global del hongo quitridio (Bd-Maps) ([http://www.bd-maps.net/surveillance/s\\_country.asp?country=CL](http://www.bd-maps.net/surveillance/s_country.asp?country=CL)), se ha reportado su presencia en 17 sitios a lo largo del país, siendo tres las principales especies afectadas *Rhinoderma darwinii* y *Xenopus laevis*.

*B. dendrobatidis* afecta principalmente a especies de anfibios asociadas a cuerpos de agua en su etapa reproductiva (Berger *et al.*, 2005), razón por la cual es de vital interés determinar la presencia de *Bd* en poblaciones de *Calyptocephalella gayi*. Aunque el hongo quitridio ha sido detectado principalmente en la especie invasora *X. laevis*, no existen registros de poblaciones naturales de *C. gayi* infectadas con quitridiomycosis en la Región Metropolitana.

Los resultados obtenidos por este proyecto corresponden al primer registro en la Región Metropolitana de poblaciones naturales de la rana grande chilena infectadas con el hongo quitridio. A la fecha, sólo existe un registro de individuos de *C. gayi* infectados con quitridiomycosis en la región, pero estos correspondían a ejemplares de criadero crecidos en condiciones artificiales (Soto-Azat *et al.*, 2016). A nivel nacional, a la fecha sólo existía un registro de infección de poblaciones naturales de rana chilena en el cual se detectó una larva con signos visibles de infección por hongo quitridio en los alrededores de Valdivia (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2017). No obstante, en ninguno de los ejemplares en los que se detectó la presencia del hongo fue posible observar la sintomatología descrita para la enfermedad. Por lo tanto, con este estudio no es posible establecer una relación entre la presencia del hongo y la enfermedad que produce, y la disminución de las poblaciones de *C. gayi* en la Región Metropolitana.

A pesar de que, en ambos sistemas estudiados, El Trapiche y Pichi, se registró a la especie invasora *X. laevis*, sólo fue posible detectar un individuo infectado con hongo quitridio en la localidad de Pichi. Este bajo número de individuos infectados probablemente se asoció a la escasez de muestras de *X. laevis* recolectadas en ambos sitios. Por lo tanto, se sugiere realizar a futuro un muestreo a largo plazo de detección de quitridiomycosis, abarcando todos los sitios en los cuales se detectó que *C. gayi* se encuentra en simpatria con la especie invasora *X. laevis*, lo que permitiría sobrellevar el problema del bajo número muestral y tener una perspectiva más general de esta problemática en la región.

Por su parte, llama la atención que ninguno de los ejemplares de la especie *Pleurodema thaul*, en simpatria con *C. gayi*, resultaron infectados. Lo anterior podría deberse a las características de historia de vida (ciclo de vida más corto, por lo que alcanzan la metamorfosis más rápidamente en comparación con *C. gayi*), o a características propias de la piel. Lo anterior resulta interesante para estudiar el alcance de la enfermedad producida por el hongo, pudiendo haber especies más susceptibles de contraerla.

### **3.5 Objetivo específico n° 5: desarrollar actividades de educación y difusión en todos los lugares con presencia de la especie, tanto a la comunidad como a las escuelas existentes en la zona de influencia, entre otros.**

*Difusión en página web: Facebook @RanaChilena*

La difusión de las actividades asociadas al proyecto se publicó de forma continua en la red social de *Facebook* en una página utilizando el nombre “*Salva a Tu Rana C. gayi*” (<https://www.facebook.com/RanaChilena/>). Como parte de las actividades de difusión, durante el 2017 se realizó un concurso fotográfico con la temática de “rana chilena”. El concurso estuvo abierto por tres meses y se recibieron cinco fotografías de la rana chilena. Estas fotografías fueron posteadas en la página y el ganador fue seleccionado por el público. El concurso tuvo una ganadora (Danae Vega), que fue premiada con un tazón mágico (cambian de color con la temperatura), las infografías y autoadhesivos de las ilustraciones de Faunánimo. Todas las fotografías enviadas fueron utilizadas para la elaboración del material de difusión.

La página de *Facebook* fue creada el 2016 y cuenta con un total de 111 publicaciones promocionando las actividades de difusión y estudio asociadas con los objetivos del proyecto. Dentro de estas, destacan las publicaciones sobre el concurso fotográfico, las publicaciones con las ilustraciones de la rana chilena, y las publicaciones realizadas durante el día de la fauna; cada una alcanzando entre mil a siete mil personas. Hasta enero de 2019, la página de *Facebook* posee un total de 534 “me gusta”, y 543 seguidores, los cuales son todos orgánicos.

*Charlas de educación y difusión en colegios*

El día 26 de julio de 2017 se realizó una charla en el Liceo Polivalente Gregorio Morales Miranda, en la localidad de Hospital, comuna de Paine. Se seleccionó esta localidad ya que existe un registro de una población de rana chilena en este sector, el que fue corroborado en 2015, y posteriormente en 2019. El público objetivo consistió en alumnos de enseñanza básica y media (9 a 17 años), con un total de 34 asistentes. La actividad tuvo una duración aproximada de dos horas y en el Liceo la actividad estuvo a cargo de la Profesora Carolina Arce Pérez (contacto: [caroarceorf@gmail.com](mailto:caroarceorf@gmail.com)). En la encuesta verbal participaron 22 niños, y los resultados se presentan en la **Tabla 16**. El 40,9% de los encuestados reconoció a la rana chilena, mientras que el 59,1% de los asistentes señaló la fotografía del sapito de cuatro ojos (*Pleurodema thaul*) como la rana chilena. Ninguno de los asistentes reconoció el canto de la rana chilena, sin embargo, la mitad de los asistentes fue capaz de identificar el ambiente donde habita *C. gayi*.

En la **Tabla 17** se muestran los resultados de la actividad realizada en grupos donde se les solicitó a los niños manifestaran su propia idea respecto de las causas por las que la rana chilena se encuentra en la categoría de conservación Vulnerable. Los cuatro grupos coincidieron en que el cambio global (o climático), y la destrucción o contaminación del ambiente, son factores importantes. Dos grupos indicaron a las especies invasoras como causantes de la disminución de la abundancia de las poblaciones de rana chilena, y un grupo mencionó el consumo humano como un factor de amenaza. En relación con las acciones para disminuir o evitar el efecto de estas amenazas, se mencionó la creación de áreas protegidas, la vigilancia y sanción de quienes contaminen y/o destruyan el medio ambiente.

Una segunda charla se realizó el día 23 de noviembre del 2017, en la Escuela Paraíso, en la comuna de Lampa. Esta escuela esta dirigida a niños con necesidades especiales de lenguaje, por lo tanto, la Psicóloga Paulina Valdivia Mandiola (contacto: [valdm.paulina@gmail.com](mailto:valdm.paulina@gmail.com)) llevó acabo la actividad. El objetivo de esta charla fue crear interés por la fauna con la cual conviven los niños. Durante esta actividad asistieron nueve alumnos, los que realizaron el taller de origami de la rana chilena y un repaso de la historia natural expuesta en la infografía. Fotografías de ambas actividades de educación y difusión se muestran en el **Anexo Fotográfico**.

**Tabla 16.** Encuesta realizada a 22 asistentes en base a la presentación audiovisual, donde en las preguntas n°1 y n°2 la opción (1) correspondía a *Rhinella spinulosa*, (2) *Rhinoderma darwinii*, (3) *Calyptocephalella gayi* y (4) *Pleurodema thaul*. En la pregunta n°3 la opción (1) correspondía a una laguna en el Altiplano, (2) río en el extremo sur de Chile, (3) laguna en zona central de Chile, y (4) río precordillerano.

| Respuestas              | N°1 ¿Conoces a la rana chilena? | N°2 ¿Has escuchado a la rana chilena? | N°3 ¿Sabes donde vive la rana chilena? |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| Opción (1)              | 0                               | 7                                     | 0                                      |
| Opción (2)              | 0                               | 0                                     | 0                                      |
| Opción (3)              | 9                               | 0                                     | 11                                     |
| Opción (4)              | 13                              | 15                                    | 11                                     |
| <b>Total respuestas</b> | <b>22</b>                       | <b>22</b>                             | <b>22</b>                              |

**Tabla 17.** Resultados de la actividad grupal donde se les solicitó a los niños su propia idea respecto de las principales amenazas para la rana chilena, y una acción para contrarrestar dicha amenaza.

| Grupo | Amenaza                                         | Acción propuesta                                          |
|-------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1     | Calentamiento global                            | Evitar contaminación                                      |
|       | Destrucción del hábitat                         | Proteger poblaciones                                      |
|       | Depredadores                                    | Reservas naturales                                        |
| 2     | Contaminación                                   | Aumentar sanciones a quienes contaminen                   |
|       | Cambio climático                                | Evitar contaminación de las grandes industrias            |
|       | Especies invasoras                              | Evitar su ingreso, capturar y reubicar                    |
| 3     | Cambio de temperatura                           | Disminución de gases contaminantes                        |
|       | Contaminación del agua                          | Tratamiento de la basura                                  |
|       | Rana africana                                   | Caza                                                      |
| 4     | Depredación indiscriminada por parte del hombre | Vigilancia en los territorios en que se encuentra la rana |
|       | Cambio climático                                | Disminución de la contaminación                           |
|       | Contaminación medioambiental                    | Crear reservas naturales                                  |

### Día de la Fauna Chilena

Esta actividad se realizó los días sábado 4 de noviembre del 2017, y 10 de noviembre de 2018 en el frontis del Museo de Historia Natural, dentro del Parque Quinta Normal. Ambos años la actividad tuvo una duración de seis horas, aproximadamente. En su cuarta versión (2017) participaron 25 organizaciones, y en su quinta versión (2018) participaron 35 organizaciones que trabajan en la conservación e investigación de fauna chilena. La institución organizadora, Jane Goodall Chile, estimó la asistencia de cerca de 3.000 personas en ambas oportunidades.

El stand exhibido, tuvo por nombre “Salva a tu rana”, mismo nombre utilizado para la página en redes sociales *Facebook*; y durante el 2017 fue visitado por al menos 119 personas de distintas edades y comunas de la Región Metropolitana registradas en un libro de visitas. Del total de visitantes registrados, 28 personas eran menores de edad, 34 personas estaban en el rango etario 20-30 años, 21 personas entre 31-40 años, cuatro personas entre 41-50 años, dos adultos mayores (65 y 78 años), y 25 personas que no entregaron dicha información. Durante el 2018, no se realizó un libro de visitas, ya que se favoreció la realización de otras actividades. Es así como, durante 2018, se realizaron dos actividades prácticas dirigidas a distintos rangos etarios. La primera actividad se denominó “Alimenta tu Rana”, y fue dirigida para niños de 5 a 7 años, y consistió en “atrapar” presas de las que se alimenta la rana chilena en un panel con distintos



ítems, dentro del que había elementos como basura. En esta actividad participaron un total de 5 niños. La segunda actividad, llamada “carrera de ranas”, consistió en un taller de origami de la rana chilena dirigido a niños de 9 a 15 años, luego de armar la rana de origami se realizó una carrera de ranas saltarinas, en la que participaron 20 niños. En ambas actividades se les entregó material de difusión y un premio para los ganadores consistente en un tazón con información de la rana chilena.

Durante los dos años de esta actividad a cada visitante se le realizó una charla breve sobre la rana chilena y sobre el proyecto en la Región Metropolitana. Además, se realizó una pequeña encuesta verbal, la cual tuvo como objetivo determinar si el público era capaz de reconocer a la rana chilena, la cual se evaluó mediante preguntas (1) ¿conoces a la rana chilena?, para lo cual se mostró al público cuatro fotografías a escala, de anfibios: rana chilena, sapito de cuatro ojos (*Pleurodema thaul*), sapo espinoso (*Rhinella spinulosa*), ranita de Darwin (*Rhinoderma darwinii*); (2) ¿has escuchado a la rana chilena?, para esta pregunta se presentó el audio de los cantos de las mismas especies mostradas en la primera pregunta. En esta actividad se distribuyó el material de difusión elaborado para el proyecto. Fotografías de la actividad se muestran en el **Anexo Fotográfico**, y un video realizado por la organización se puede ver en el siguiente link: actividad 2017 <https://www.youtube.com/watch?v=vOedPKXXD1Y>; actividad 2018 <https://www.youtube.com/watch?v=TLFHW9cNUjM>.

#### *Taller de capacitación de guardaparques y administradores de las áreas protegidas (privadas y públicas)*

El taller de guardaparques tuvo como objetivo dar a conocer los principales resultados del presente estudio, y capacitar a los asistentes en técnicas generales del estudio de anfibios y el protocolo de bioseguridad para el manejo de estas especies.

La capacitación se realizó el día 11 de enero de 2018 en las dependencias de la Reserva Nacional Río Clarillo, y tuvo una duración aproximada de 5 horas. A la actividad, asistieron un total de 25 personas (detalle de los asistentes en **Tabla 18**), provenientes de la misma Reserva Nacional, así como de otras áreas protegidas, como el Monumento Natural El Morado y del Santuario de la Naturaleza Las Torcazas. Además, asistió personal de la Unidad de Medio Ambiente de la Municipalidad de Peñaflor, a cargo del Parque Municipal El Trapiche; y la contraparte técnica de la SEREMI de Medio Ambiente de la Región Metropolitana.

**Tabla 18.** Asistentes al taller de capacitación de guardaparques y administradores de áreas protegidas realizado el día 11 de enero de 2018 en la Reserva Nacional Río Clarillo.

| Nº | Nombre             | Institución                                      |
|----|--------------------|--------------------------------------------------|
| 1  | Claudia Cortés     | SEREMI MMA RMS                                   |
| 2  | Catalina Parra     | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 3  | Carlos Peña        | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 4  | Carolina Rodríguez | SEREMI MMA RMS                                   |
| 5  | Lorena Ojeda       | Unidad Medio Ambiente, Municipalidad de Peñaflor |
| 6  | Héctor Riquelme    | Unidad Medio Ambiente, Municipalidad de Peñaflor |
| 7  | Luis Ulloa         | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 8  | Ismael Sarmiento   | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 9  | Jorge Ibacache     | Monumento Nacional El Morado, CONAF              |
| 10 | Carlos Valdenegro  | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 11 | Claudio Rosales    | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 12 | Fernanda Peralta   | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 13 | Roberto Ulloa      | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |
| 14 | Oswaldo Herrera    | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF             |

|    |                     |                                         |
|----|---------------------|-----------------------------------------|
| 15 | Eduardo Veliz       | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 16 | Maricel Orrego      | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 17 | Rogelio Moreira     | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 18 | Thomas Catalán      | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 19 | Katherine Arias     | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 20 | Mauricio Valdenegro | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 21 | Javiera Benito      | Santuario de la Naturaleza Las Torcazas |
| 22 | Pilar Fernández     | Santuario de la Naturaleza Las Torcazas |
| 23 | Joaquín Farcea      | Santuario de la Naturaleza Las Torcazas |
| 24 | Francisco Perloz    | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |
| 25 | Judith Sepúlveda    | Reserva Nacional Río Clarillo, CONAF    |

Los asistentes al taller no poseían registros de rana chilena dentro de la Reserva en los últimos cinco años, pero observaron la existencia de otros anfibios que si cuentan con poblaciones dentro de la Reserva. No obstante, la mayoría de los guardaparques no era capaz de reconocer las especies de anfibios registradas. Lo anterior evidencia la necesidad de realizar capacitaciones en el reconocimiento de especies que habitan dentro de las áreas protegidas.

Adicionalmente a los cuatro tipos de actividades antes descritas, durante la realización de este proyecto se mantuvo una estrecha relación con la Unidad de Medio Ambiente de la Municipalidad de Peñaflor, la que está a cargo del Parque Municipal El Trapiche. Es así como el 24 de enero de 2017 se sostuvo una reunión con representantes del municipio. El objetivo de la cita fue presentar este proyecto, por parte del equipo del Laboratorio de Genética y Evolución de la Universidad de Chile, y de la SEREMI del Medio Ambiente de la Región Metropolitana; para establecer vínculos que promuevan la protección de la población de rana chilena presente en el humedal dentro del Parque Municipal el Trapiche. En esta reunión participaron representantes del Municipio, quienes presentaron el “Proyecto Humedal”, elaborado por profesionales a cargo de la Municipalidad de Peñaflor. Dicho proyecto tiene como objetivo fomentar el ecoturismo en el Parque Municipal El Trapiche, y se desarrollará en la zona donde se encuentra la laguna, que posee una extensión de 18 hectáreas; y la zona aledaña que comprende 6,9 hectáreas. El proyecto involucra la elaboración de senderos ecológicos para la observación de flora y fauna nativa, y pretende mantener la zona del humedal protegida por vegetación endémica con una cortina arbórea que evite intervenir el terreno principalmente a la laguna y parte de los brazos que desembocan y conectan en esta misma. Adicionalmente se pretende instalar miradores sobre la laguna con senderos interpretativos, principalmente para avistamiento de aves, y eventualmente de anfibios, como la rana chilena. En esta presentación se explicó la necesidad de la protección del área, y el vínculo que podrían tener ambos proyectos lo que beneficiaría en forma directa a la población de *C. gayi* presente en el humedal. Posteriormente, el día 27 de julio del mismo año, el equipo consultor participó de una reunión en terreno en el Parque Municipal El Trapiche. Esta reunión fue organizada por la Dirección de Medio Ambiente, Aseo y Ornato de la Municipalidad de Peñaflor, y en ella se expuso el proyecto de rescate del humedal, por parte de la Secretaría Comunal de Planificación (SECPLAC). En esta reunión también participaron representantes del Servicio Natural de Turismo (SERNATUR) y autoridades comunales. El objetivo fue diseñar una mesa de trabajo para el desarrollo del proyecto, incorporando a la biodiversidad presente en el parque, y en especial de zonas de importancia para especies en categoría de conservación, como la rana chilena. De esta forma se aseguraría el resguardo durante la ejecución del proyecto municipal de, por ejemplo, sitios donde se ha registrado la reproducción de *C. gayi*. Además, la reunión incluyó un recorrido por zonas aledañas al parque, y que pudieran ser sitios que alberguen a la rana chilena. Fotografías de la actividad se muestran en el **Anexo Fotográfico**.

Bajo la organización de la Seremi de Medio Ambiente de la Región Metropolitana de Santiago, el día 7 de agosto de 2018 se realizó una charla en el seminario “Conservación de

especies Amenazadas en la Región Metropolitana de Santiago”. El objetivo de la charla en este seminario fue exponer los resultados preliminares del proyecto.

Finalmente, como parte de las actividades de educación y difusión, el 9 de octubre de 2018, la bióloga Alejandra Fabres, parte del equipo consultor del proyecto, publicó un artículo sobre la historia natural de *C. gayi* en la página web de Ladera Sur (<https://laderasur.com/articulo/la-rana-chilena-un-sobreviviente-mas-o-ha-llegado-su-fin/?fbclid=IwAR1Y4ZyuckSxmAZo3RVHptSAzZBa1fboGDabbeTlkeOJf3AtojoHo4fk670>).

Ladera Sur es una plataforma y comunidad sobre naturaleza medio ambiente, paisajes, vida *outdoor*, entre otros, donde se publican artículos, columnas, entrevistas y fotografías con el propósito de acercar la naturaleza a las personas. Este artículo tuvo un total de 767 “me gustas” a través de usuarios de *Facebook* y fue compartido un total de 130 veces.

En la **Tabla 19** se resumen las actividades de educación y difusión realizadas durante el desarrollo de este proyecto. Del total de actividades realizadas, el día de la fauna chilena fue la que abarcó una mayor cantidad de personas, en un amplio rango etario. Se pudo constatar, en las diferentes actividades realizadas, el escaso conocimiento de la fauna nativa en general, y en particular de la rana chilena, sobretodo en el público de menor edad. Lo anterior pone en evidencia la importancia de realizar estas actividades de educación y difusión, tanto para público general (niños y adultos), como para personal especializado (guardaparques de áreas protegidas).

**Tabla 19.** Actividades de educación y difusión realizadas entre 2016 y 2019.

| Actividad                                          | Lugar                                      | Fecha       |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------|
| <b>Difusión en página web</b>                      | Página de Facebook @RanaChilena            | 2016-2019   |
| <b>Charlas de educación y difusión en colegios</b> | Liceo Polivalente Gregorio Morales Miranda | 26-jul-2017 |
|                                                    | Escuela Paraíso                            | 23-nov-2017 |
| <b>Día de la Fauna Chilena</b>                     | Parque Quinta Normal                       | 04-nov-2017 |
|                                                    | Parque Quinta Normal                       | 10-nov-2018 |
| <b>Taller de capacitación de guardaparques</b>     | Reserva Nacional Río Clarillo              | 11-ene-2018 |
| <b>Otras actividades de difusión</b>               |                                            |             |
| - Reunión Municipalidad Peñaflor                   | El Trapiche, Peñaflor                      | 10-ene-2017 |
| - Reunión Municipalidad Peñaflor                   | El Trapiche, Peñaflor                      | 27-jul-2017 |
| - Seminario Conservación de Especies Amenazadas    | Ministerio de Medio Ambiente, RM           | 07-ago-2018 |
| - Artículo de Difusión                             | Página web Ladera Sur                      | 09-oct-2018 |

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que:

1. Las prospecciones de nuevos sitios revelaron la existencia de tres localidades con presencia de *Calyptocephalella gayi* antes desconocidas. Lo anterior, sumado a las localidades identificadas en 2015, aumenta el total de sitios con presencia de la especie a nueve en toda la Región Metropolitana de Santiago (RM).

La presencia de *C. gayi* en la RM se centra esencialmente en dos cursos de agua importantes: el Río Mapocho (y vertientes cercanas) y el río Maipo con sus afluentes. Estos corresponden a los ejes de la distribución de la especie en la región, manteniendo poblaciones posiblemente por las características de sus laderas y a que son cursos de agua permanente. Estos ríos se relacionan estrechamente a algunos sistemas costeros con los que potencialmente se conectan (desembocadura del río Maipo y humedal del Yali). Al ser la Región de Valparaíso una de las más intervenidas a nivel nacional producto de la alta densidad de población humana (segunda a nivel nacional, Instituto Nacional de Estadísticas), el estatus de *C. gayi* en esta región debería ser una prioridad a corto plazo. Por lo tanto, sería relevante evaluar la contribución de los sistemas hidrológicos ubicados en la RM como fuentes de poblaciones en los sistemas costeros de la Región de Valparaíso y comparar el estatus poblacional de *C. gayi* en ambas regiones. Considerando que las prospecciones en la RM se realizaron en los sitios con mayor probabilidad de ocurrencia, así como el esfuerzo de búsqueda realizado en este estudio, es altamente probable que el número de sitios con presencia de rana chilena en la RM está suficientemente explorado.

2. Los estudios ecológicos y biológicos realizados en las poblaciones foco, mostraron que:
  - El registro sonoro permitió ubicar firmas espectrales para estimar el número de individuos ubicados en los coros de *C. gayi* en habitats representativos de sistemas hidrológicos con distintas condiciones ambientales y niveles de intervención humana. Hasta ahora no se contaba con una noción precisa respecto a la fenología reproductiva de *C. gayi* (en ambientes naturales), por lo que este estudio representa la primera evidencia de la estacionalidad que se prolonga por hasta cuatro meses entre el final del invierno y el inicio del verano. Sin embargo, no fue posible generar un modelo para estimar el número de individuos a partir de variables como la tasa de cantos o la amplitud. La tasa de cantos puede ser un *proxy* para estimar la densidad de los coros, pero no tiene una precisión adecuada respecto a la abundancia total de la especie, dado que este método sólo detecta la presencia de machos adultos en un radio restringido. En el futuro deberían registrarse datos simultáneos de temperatura y tener conteos testigo durante muestreos nocturnos para lograr establecer un modelo predictivo sobre la densidad de los coros. De manera particular, se recomienda restringir eventos ruidosos propios de actividades como conciertos en el parque El Trapiche, particularmente entre los meses de septiembre a diciembre y en horarios nocturnos, dado que los niveles de ruido pueden interferir severamente con la propagación de los cantos a largas distancias, afectando de forma indirecta la reproducción de la especie.
  - Las características de diversidad de los sistemas elegidos respecto a su intervención antrópica, fue contrastante y justifican las apreciaciones iniciales del Proyecto. Estas características se vieron complementadas con información de la vegetación presente, la especies nativas y especies introducidas en cada uno de los ambiente evaluados.
  - Pichi presenta las características de menor intervención, mayor proporción de

vegetación y fauna nativa, así como menor proporción de especies introducidas. Las características del agua muestran una baja salinidad, baja conductividad y bajos niveles TDS los que presentan variación estacional e interanual asociadas a las precipitaciones. Estas características del hábitat se asociarían a la presencia de *C. gayi*. Sin embargo, aunque Pichi es una de las localidades mas interesantes registradas con presencia de rana chilena, esta localidad corresponde a un sitio privado, sin ningún grado de protección legal.

- El Trapiche, a su vez representa el otro extremo del tipo de habitat donde se mantiene una población de *C. gayi* con alta intervención humana y demanda para usos recreacionales, aunque esta situación se ha ido regulando por participación activa del Municipio de Peñaflo. Las características del agua, con altos valores de Salinidad, Conductividad y TDS (estables en el tiempo) y la presencia de especies introducidas, potenciales depredadores de *C. gayi*, implican una alta vulnerabilidad para la continuidad del sitio reproductivo. En este lugar se han observado baja reproducción y escasa evidencia de adultos en la zona. Un sitio cercano (TS3) podría presentar mejores características para la reproducción de *C. gayi*. Lo interesante del Trapiche radica en su cercanía a la población humana (incierta en el centro de la comuna de Peñaflo), además de contar con un grado de protección al corresponder a un sitio municipal. Sin embargo, los cambios de administración y el interés por el uso del humedal para recreación humana, ponen este sitio en un estado de incertidumbre. Destacamos el potencial que tiene el lugar para realizar acciones de manejo, educación ambiental y monitoreo prolongado en el tiempo, pudiendo transformarse en uno de los sitios importantes para la conservación de *C. gayi* en la Región Metropolitana. Aunque para ello se deberían comprometer a instituciones con capacidad formativa que complementen la acción del Municipio.

3. Los estudios de genética de poblaciones de *C. gayi* presentes en la Región Metropolitana se restringieron al desarrollo de una colección de muestras biológicas de referencia para estudios posteriores debido a que el número de poblaciones con este tipo de muestra (cuatro en total) es insuficiente para realizar análisis genéticos comparativos que tengan como objetivo determinar los niveles de estructuración y flujo genético de esta especie en la Región Metropolitana.

La colección de referencia dio cuenta de un total de 105 muestras, las que fueron mayormente obtenidas en las poblaciones foco Trapiche y Pichi. Dada la importancia de realizar este tipo de estudios para realizar planes de gestión y manejo que contribuyan a la conservación de las especies, resulta necesaria la obtención de un mayor número de muestras genéticas en sitios poco muestreados con presencia de *C. gayi* en la RM y regiones aledañas. Lo anterior permitirá caracterizar la diversidad genética, establecer el grado de diferenciación entre las poblaciones, así como estimar los patrones de flujo genético.

4. Los análisis de detección de quitridomicosis anfibia revelaron la presencia del hongo en *C. gayi* en ambas poblaciones foco, Trapiche y Pichi. Sin embargo, no se detectaron síntomas de la enfermedad en ninguno de los individuos muestreados. Estos resultados corresponden al primer registro en poblaciones naturales de la RM. Queda aún por esclarecer el rol de *Xenopus laevis* en la transmisión de esta enfermedad, pues el número de individuos recolectados de esta especie fue bajo. Más aún, no fue posible establecer

una relacion entre la presencia del hongo quítrido y la declinacion de las poblaciones de *C. gayi* en la Region Metropolitana de Santiago. De acuerdo con la importancia de esta enfermedad en la declinación de las poblaciones de anfibios, es recomendable realizar un plan de monitoreo que incluya todos los sitios con presencia de rana chilena.

5. Las actividades de educación y difusión realizadas durante este proyecto mostraron la importancia de este tipo de actividades, no sólo por la concientización acerca de las amenazas de la fauna nativa, si no que también por la retribución de información valiosa por parte del público al que se tuvo acceso. Esto se vio reflejado en el hallazgo de un nuevo sitio reproductivo que surgió gracias al aporte de información por un alumno donde se realizó una charla educativa.
6. Finalmente, el estado de conservación de *Calyptocephalella gayi* se ubica como Vulnerable a nivel nacional. Sin embargo, a partir del estudio realizado se puede constatar la disminución evidente en el número de sitios con presencia así como de la abundancia dentro de la Región Metropolitana, por lo que se sugiere fuertemente modificar el estado de conservación a Peligro Crítico para la RM.

## 5. Referencias

- Acuña, P., Vélez, C., Mizobe, C.E., Bustos, C., Contreras, M. (2014) Mortalidad de la población de rana grande chilena, *Calyptocephalella gayi* (Calyptocephalellidae), en la laguna Matanzas, del humedal El Yali, en Chile central. *Anales Museo de Historia Natural de Valparaíso* 27: 35-50.
- Bahamonde, N. & López, M.T. (1963) Decápodos de Aguas Continentales en Chile. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 10: 123-149.
- Benavides, A.G., Veloso, A., Jiménez, P., Méndez, M.A. (2005) Assimilation efficiency in *Bufo spinulosus* tadpoles (Anura: Bufonidae): effects of temperature, diet quality and geographic origin. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78(2), 295-302. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2005000200013>
- Benevides Jr, F. L., Mautz, W. J., Jacobsen, C. J., & Hara, A. H. (2019) Estimating density of calling male *Eleutherodactylus coqui* in Hawaii from audio recordings of the nighttime frog chorus. *Bioacoustics* 28: 101-114.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R. & Longcore, J.E. (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:51-63.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & Hyatt A.D. (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141-148.
- Castañeda, L., Sabat Kirkwood, A., González, S. & Nespolo, R. (2006) Digestive plasticity in tadpoles of the Chilean giant frog (*Caudiverbera caudiverbera*): Factorial effects of diet and temperature. *Physiological and Biochemical Zoology* 79: 919-926.
- Cei, J.M. (1962) Batracios de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile, Santiago. 128 pp.
- Darras, K., Pütz, P., Rembold, K., & Tschardt, T. (2016) Measuring sound detection spaces for acoustic animal sampling and monitoring. *Biological Conservation* 201: 29-37.
- Dodd, C. K. (Ed.). (2010) Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. Oxford University Press.
- Donnelly, M. A., & Guyer, C. (1994) Mark-recapture. Pp. 183–200. In W. R. Heyer, M. Donnelly, R. W. McDiarmid, L.-A. Hayek, and M. S. Foster (Eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., U.S.A.
- Dorcas, M. E., Price, S. J., Walls, S. C., & Barichivich, W. J. (2010) Auditory monitoring of anuran populations. *Amphibian ecology and conservation: a hand book of techniques*. Oxford University Press, Oxford, 281-298.
- Fouquet, A., Loebmann, D., Castroviejo-Fisher, S., Padial, J.M., Orrico, V.G., Lyra, M.L., Roberto, I.J., Kok, P.J., Haddad, C.F. & Rodrigues, M.T. (2012) From Amazonia to the Atlantic forest: Molecular phylogeny of *Phyzelaphryninae* frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65, 547–561.
- Frankham, R., Ballou J.D. & Briscoe D.A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, UK. 617 p.
- Gajardo, R. (1994) *La vegetación natural de Chile: clasificación y distribución geográfica* (p. 121). Santiago: Editorial Universitaria.

- Gallardo, C.E., Correa, C., Morales, P., Sáez, P.A., Pastenes, L. & Méndez M.A. (2012) Validation of a cheap and simple nondestructive method for obtaining AFLPs and DNA sequences (mitochondrial and nuclear) in amphibians. *Molecular Ecology Resources* 12, 1090–1096.
- Garland, S., Baker, A., Phillott, A.D. & Skerratt, L.F. (2010) BSA reduces inhibition in a TaqMan (R) assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organism* 92: 113-116.
- Garreaud, R.D., Alvarez-Garreton, C., Barichivich, J., Boisier, J. P., Christie, D., Galleguillos, M., LeQuesne, C., McPhee, J., and Zambrano-Bigiarini, M. (2017) The 2010–2015 megadrought in central Chile: impacts on regional hydroclimate and vegetation, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 21, 6307-6327, <https://doi.org/10.5194/hess-21-6307-2017>.
- Garreaud Salazar, R. (2018) A plausible atmospheric trigger for the 2017 coastal El Niño. *International Journal of Climatology*. 38 (Suppl.1): e1296–e1302. DOI: 10.1002/joc.5426
- Gosner, K.L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Green, D. M. (2003) The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biological Conservation* 111:331–343.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1).
- Hand, E. (2010) Citizen science: People power. *Nature* 466 (7307): 685–687.
- Hermosilla, B., Pincheira, S. (1992) Efectos del pH ácido en el desarrollo embrionario de la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera*. *Gayana Zool.* 56(1-2), 3-12.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Berger, L., Obendorff, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, J-M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Colling, A. (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic organisms* 73:175-192.
- Ibaceta, F., Urbina, N. & Macaya, J. (2008) Informe análisis fitosanitario Parque El Trapiche, comuna Peñaflo. Realizado por MpdA arquitectura-diseño-paisajismo a petición de la Municipalidad de Peñaflo.
- Irisarri, I., San Mauro, D., Abascal, F., Ohler, A., Vences, M. & Zardoya, R. (2012) The origin of modern frogs (Neobatrachia) was accompanied by acceleration in mitochondrial and nuclear substitution rates. *BMC Genomics*, 13:626.
- Lemos-Espinal, J.A., Rojas-González, R.I., & Zúñiga-Vega, J.J. (2005) Técnicas para el estudio de poblaciones de fauna silvestre. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., & Nichols, D. K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227. <https://doi.org/10.2307/3761366>
- Luebert, F. & Plissock, P. (2006) Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. Editorial Universitaria.
- Manetti, M. & Pérez de Arce, M. (2008) Antecedentes generales y análisis de situación actual Parque El Trapiche, comuna Peñaflo. Realizado por MpdA arquitectura-diseño-paisajismo a petición de la Municipalidad de Peñaflo.
- Márquez-García, M. , Correa-Solis, M., Sallaberry , M. Méndez, M.A. (2009). Effects of pond



- drying on morphological and life history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research* 11: 1-13.
- Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Méndez, M.A. (2010) Life history trait variation in tadpoles of the warty toad in response to pond drying. *Journal of Zoology* 281(2): 105-111.
- Mccartney-Melstad E. & Shaffer H.B. (2015) Amphibian molecular ecology and how it has informed conservation. *Molecular Ecology* 24: 5084–5109.
- Méndez, M.A., Correa-Solis, M. (2009) Divergence in morphometric and life history traits in two thermally contrasting andean populations of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Journal of Thermal Biology*. Volume 34 (7): 342-347.
- Mizobe, C.E., Contreras-López, M., Acuña, P., Vélez, C., Bustos-López, C. (2014). Mortalidad masiva de la rana grande chilena (*Calyptocephalella gayi*) en la Reserva Nacional El Yali. *Biodiversidata* 2: 30-34.
- Penna, M. (2005) Voces de los anfibios de Chile. [Disco Compacto]. Universidad de Chile.
- Penna, M. & Veloso, A. (1990). Vocal diversity in frogs of the South American temperate forest. *Journal of Herpetology* 24: 23-33.
- Soto-Azat, C., Peñafiel-Ricaurte, A., Price, S. J., Sallaberry-Pincheira, N., García, M. P., Alvarado-Rybak, M., & Cunningham, A. A. (2016) *Xenopus laevis* and emerging amphibian pathogens in Chile. *EcoHealth* 13, 775. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1186-9>
- Soto-Azat, C., Valenzuela-Sánchez, A., Clarke, B.T. *et al.* (2013) Is chytridiomycosis driving Darwin's frogs to extinction?. *PLoS One* 8 e79862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079862>
- Valenzuela-Sánchez, A., O'Hanlon, S.J., Alvarado-Rybak, M., Uribe-Rivera, D.E. Cunningham, A.A., Fisher, M.C. & Soto-Azat, C. 2017 .Genomic epidemiology of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* from native and invasive amphibian species in Chile. *Transboundary Emerging Diseases* 1–6.
- Valenzuela-Sánchez, A., Schmidt, B. R., Pérez, C., Altamirano, T., Toledo, V., Pérez, Í., ... & Soto-Azat, C. (2019) Assessing habitat quality when forest attributes have opposing effects on abundance and detectability: A case study on Darwin's frogs. *Forest Ecology and Management* 432: 942-948.
- Valenzuela- Sánchez, A. & Medina-Vogel, G. (2014) Importancia de las enfermedades infecciosas para la conservación de la fauna silvestre amenazada de Chile. *Gayana* 78:1.
- Van Buskirk, J. & McCollum, S.A. (2000) Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *The Journal of Experimental Biology* 203, 2149–2158.
- Vélez, C., Acuña, P., Bustos, C. (2014) Aspectos fisiológicos En: Manejo en cautiverio de la rana grande chilena, *Calyptocephalella gayi* (Duméril and Bibron, 1841) (ed. C. Vélez). Pp. 63-77. Santiago, Chile: Ed Universidad Santo Tomás).
- Vélez, C., Núñez, J., Acuña, P., López, O. (2014) Aspectos generales En: Manejo en cautiverio de la rana grande chilena, *Calyptocephalella gayi* (Duméril and Bibron, 1841) (ed. C. Vélez). Pp. 15-24. Santiago, Chile: Ed Universidad Santo Tomás).
- Veloso, A. (2006) Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: origen, diversidad y estado de conservación. En: *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*, (eds. Vila I, A Veloso, R Schlatter & C Ramírez): 103-140. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Venegas, W., Hermosilla, I., Gavilán, J.F., Naveas, R., Carrasco, P. (1987). Estados Larvales del

anfibio anuro *Caudiverbera caudiverbera*: Modelo biológico para estudios de agentes genotóxicos. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* 58, 177-180.

Willacy, R.J., Mahony, M. & Newell, D.A. (2015). If a frog calls in the forest: Bioacoustic monitoring reveals the breeding phenology of the endangered Richmond Range mountain frog (*Phyllorhina richmondensis*). *Austral Ecology* 40: 625-633.

Williams, B. K., Nichols, J. D., & Conroy, M. J. (2002) Analysis and Management of Animal Populations. Academic Press, San Diego, California, U.S.A.

## 6 Anexo Fotográfico

### 6.1 Objetivo específico nº1: Ampliar las prospecciones.

F1



F2



Fotografías 1-2. Los Hornitos, Curacaví. F2, *Xenopus laevis*.

**F3**



**F4**



**Fotografías 3-4.** Crucero, Curacaví.

**F5**



**Fotografía 5.** Puangue en cruce a Colliguay, Curacaví

**F6**



**Fotografía 6** El Pangal, Curacaví.

F7



**Fotografía 7.** El Pangal, Curacaví.

F8



**Fotografía 8.** Puangue, Curacaví.

F9



F10



**Fotografía 9-10.** Estero Puangue en Los Rulos, María Pinto.

F11



F12



Fotografía 11-12. Quinchahue, Melipilla.



**F13**



**Fotografía 13.** Santa Elena, Melipilla.

**F14**



**Fotografía 14.** Parcelación Las Águilas, Melipilla.

**F15**



**Fotografía 15.** Puente Mandinga 2, Melipilla.

**F16**



**Fotografía 16.** Puente Rumay, Melipilla.

**F17**



**Fotografía 17.** Puente El Inca, Paine.

**F18**



**Fotografía 18.** Tranque El Escorial, Paine.

**F19**



**Fotografía 19.** Águila sur, Paine.

**F20**



**Fotografía 20.** Estero Pintué, Aculeo.

F21



F22



**Fotografía 21-22.** Humedal de Batuco, Lampa.

F23



F24



**Fotografía 23-24.** Humedal Santa Inésde Batuco, Lampa.

F25



**Fotografía 25.** Noviciado, Pudahuel.

F26



**Fotografía 26.** Puente La Virgen, Río Clarillo, Pirque.

**F27**



**F28**



**Fotografía 27-28. Puente Blanco, Pirque.**



F29



F30



Fotografía 29-30. La Finca, Tiltit

**F31**



**F32**



**Fotografía 31-32. Lagunas del Maipo**

**F33**



**F34**



**Fotografías 33-34. El Monte.**

**F35**



**Fotografía 35. El Monte**

6.2 Objetivo específico nº 2: desarrollar estudios ecológicos y biológicos

F36



F37



Fotografías 36-37. El Monte Parque Municipal el Trapiche, sitio 1 (TS\_1)

**F38**



**F39**



**Fotografías 38-39.** Parque Municipal El Trapiche, sitio 2 (TS\_2)

**F40**



**F41**



**Fotografías 40-41. Parque Municipal El Trapiche, sitio 2 (TS\_2)**

F42



Fotografía 42. Larva de *Calyptocephalella gayi* capturada en el Parque Municipal El Trapiche, sitio 2 (TS\_2)

F43



Fotografía 43. *Percilia gillissi* recolectada en el Parque Municipal El Trapiche.



F44



F45



Fotografías 44-45. Pichi, Alhué. Sitio 1.

F46



F47



Fotografías 46-47. Pichi, Alhué. Sitio 1. Grabadora instalada.

**F48**



**Fotografía 48.** Pichi, Alhué. Sitio 2.

**F49**



**Fotografía 49.** Bagrecito. Pichi, Alhué.

F50



Fotografía 50. *Aegla* sp. Pichi, Alhué.

F51



Fotografía 51. *Diplodon* sp. Pichi, Alhué.

F52



Fotografía 52. Pocha. Pichi, Alhué.

F53



Fotografía 53. Individuo Metamórfico de *C. gayi*, Pichi Enero 2018

**F54**



**Fotografía 54.** Localidad de Pichi, Monitoreo de Enero 2018, se observa un bajo nivel de agua.

**F55**



**Fotografía 55.** Iguana chilena (*C. maculatus*), Pichi enero 2018.

F56



Fotografía 56. Sapito de cuatro ojos (*P. thaul*), Pichi enero 2018.

F57



Fotografía 57. Larvas de rana chilena capturadas en el Sitio 2.

F58



Fotografía 58. *Xenopus laevis* capturado en el Sitio 2.

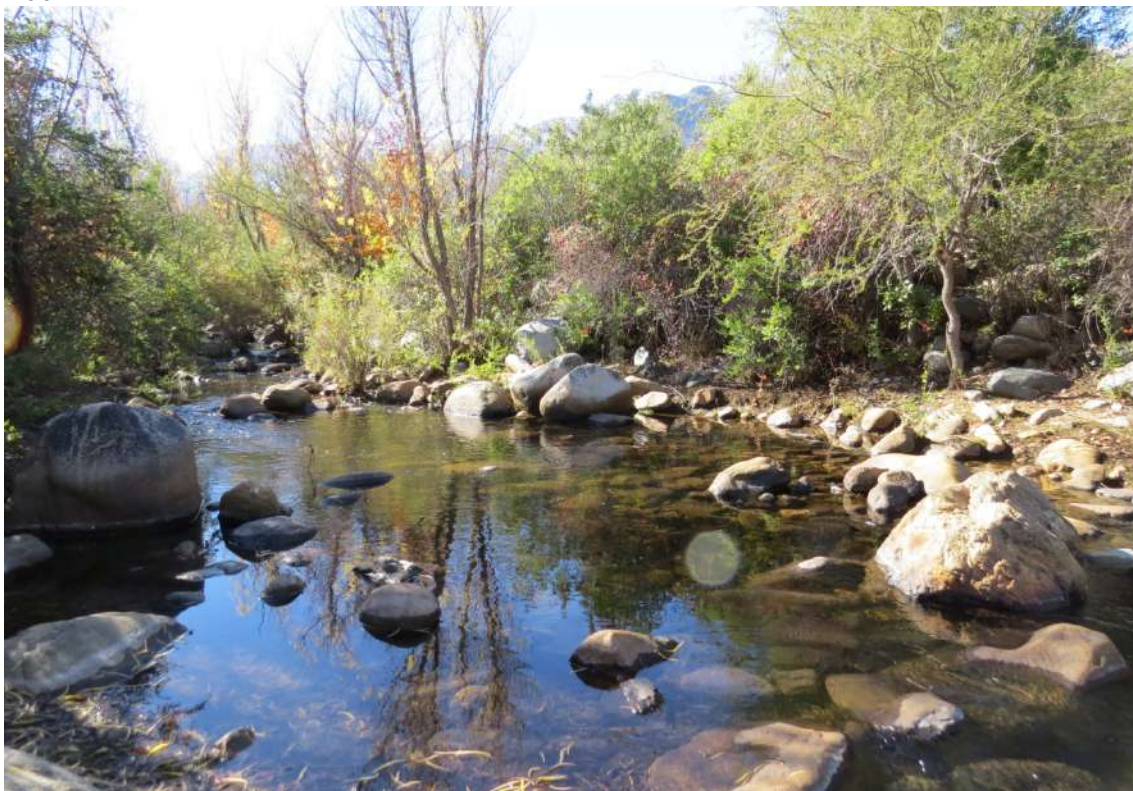


**F59**



**Fotografía 59.** Sitio 2 Fundo San Juan en mayo de 2017. Comparar nivel de agua con F10.

**F60**



**Fotografía 60.** Sitio 2 Fundo San Juan en julio de 2018.

**6.3 Objetivo específico nº 4: Obtener datos sobre enfermedades emergentes que pudieran estar afectando a *C. gayi***

**F61**



**Fotografía 61.** Toma de muestras para detección de hongo quitrido en larvas de rana chilena capturadas en Sitio 2.

**6.4 Objetivo específico nº 5: desarrollar actividades de educación y difusión**

**F62**



**F63**



**Fotografías 62-63.**Actividad en el Liceo Polivalente "Gregorio Miranda Morales". Hospital (Paine), 26-7-2017.

F64



F65



**Fotografías 64-65.**Actividad en el Liceo Polivalente “Gregorio Miranda Morales”. Hospital (Paine), 26-7-2017.

F66



F67



Fotografías 66-67. Actividad en el Liceo Polivalente "Gregorio Miranda Morales". Hospital (Paine), 26-7-2017

F68



F69



Fotografías 68-69. Actividad en el Liceo Polivalente "Gregorio Miranda Morales". Hospital (Paine), 26-7-2017

F70



**Fotografía 70.**Actividad en el Liceo Polivalente “Gregorio Miranda Morales”. Hospital (Paine), 26-7-2017

F71



F72



Fotografía 71-72. Día de la fauna chilena, Parque Quinta Normal.



F73



F74



Fotografía 73-74. Taller de guardaparques, Río Clarillo.

F75



**Fotografía 75.** Taller de guardaparques, Río Clarillo.