

**¿Cuántas veces colonizaron las cuevas las especies de bagres cavernícolas  
(*Trichomycterus* spp.) de Santander?**

**Juan Sebastián Flórez Villamizar**

**Trabajo de Grado para optar el título de Biólogo**

**Director**

**Rafael Mauricio Torres Mejía**

**Dr. en Biología Evolutiva, Ecológica y Organísmica**

**Codirector**

**Carlos Daniel Cadena Ordoñez**

**Dr. en Ecología, Evolución y Sistemática**

**Codirector**

**Carlos Luis DoNascimento Montoya**

**Dr. en Ciencias, mención Zoología**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2018**

### **Agradecimientos**

A la Universidad Industrial de Santander, la escuela de biología, sus profesores y demás vinculados.

A mi director Dr. Mauricio Torres, por la confianza para ser yo quien iniciara este interesante proyecto. Le agradezco por su orientación en el transcurso del trabajo, el cual disfruté mucho.

A mi co-director Dr. Daniel Cadena por su tiempo, amabilidad y orientación en el trabajo mientras estuve visitando su laboratorio de biología evolutiva de vertebrados (Evolvert). De igual forma a sus estudiantes y miembros del laboratorio, Jorge Avendaño y Catalina Palacios, por amablemente guiarme en las prácticas de biología molecular.

A mi co-director Dr. Carlos DoNascimento, por su tiempo y enseñanzas sobre lauchas en mi visita a la colección de peces del Instituto Alexander von Humboldt. Igualmente al ictiólogo Juan Gabriel Albornoz, por su acompañamiento mientras estuve visitando dicha colección.

A mis amigas Yuranis Miranda, Alexandra Jiménez y Nataly Pimiento, por acompañarme a recolectar lauchas en algunas ocasiones. También les agradezco por su amistad, me siento afortunado de haberlas conocido.

A las diferentes personas que me ayudaron a localizar las cuevas como: Gerardo Bárcenas, Francisco Bautista, Diego González y Cinthy Lorena.

Y por último (no por esto menos importante), a mi madre, Graciela Flórez Villamizar, por su constante lucha y comprometida crianza monoparental, de la cual he recibido todo el apoyo necesario para completar esta carrera como biólogo. Me siento muy afortunado y le dedico este trabajo.

**Tabla de contenido**

Introducción .....	11
1. Objetivos .....	14
1.1 Objetivo general .....	14
1.2 Objetivos específicos .....	14
1.3 Hipótesis .....	14
2. Marco teórico .....	15
2.1 Adaptación y convergencia evolutiva .....	15
2.2 Cuevas como laboratorios evolutivos .....	16
2.3 Biota subterránea .....	17
2.4 Especiación en fauna subterránea .....	19
2.5 Vicarianza y dispersión en la fauna subterránea .....	20
2.6 Sistema cárstico santandereano .....	22
2.7 Las lauchas .....	22
3. Materiales y métodos .....	25
3.1 Muestreo taxonómico .....	25
3.2 Extracción de adn y secuenciación .....	28
3.3 Análisis de secuencias y filogenia .....	28
4. Resultados .....	29
4.1 Aspectos generales de la matriz y modelo evolutivo .....	29

4.2 Análisis filogenético .....	30
5. Discusión.....	33
5.1 Evolución del troglomorfo en las lauchas santandereanas.....	33
5.2 Consideraciones taxonómicas y de conservación.....	37
6. Conclusiones.....	40
Referencias.....	41
Apéndices.....	48

**Lista de figuras**

Figura 1. Hipótesis filogenética de la subfamilia Trichomycterinae .....	24
Figura 2. Mapa del departamento de Santander (Colombia), donde se ubican las localidades de recolecta de los <i>Trichomycterus</i> .....	26
Figura 3. Relaciones filogenéticas de los <i>Trichomycterus</i> de cueva y superficie en Santander .....	32

**Lista de apéndices**

Apéndice A. Muestreo taxonómico y secuencias utilizadas en el análisis .....	48
Apéndice B. Método de extracción de ADN utilizado.....	51
Apéndice C. Árbol filogenético obtenido del análisis de Máxima verosimilitud (ML) .....	52
Apéndice D. Árbol filogenético obtenido del análisis de Inferencia Bayesiana (IB) .....	53

## RESUMEN

TÍTULO: ¿CUÁNTAS VECES COLONIZARON LAS CUEVAS LAS ESPECIES DE BAGRES

CAVERNÍCOLAS (*Trichomycterus* spp.) DE SANTANDER?\*

AUTOR: JUAN SEBASTIÁN FLÓREZ VILLAMIZAR\*\*

PALABRAS CLAVES: ADAPTACIÓN, ANDES, CONVERGENCIA EVOLUTIVA, PAISAJE CÁRSTICO, PECES NEOTROPICALES, TROGLOMORFISMO.

## DESCRIPCIÓN:

Los organismos de diferentes linajes que se encuentran bajo ambientes con fuertes presiones selectivas tienden a poseer caracteres fenotípicos similares como producto de la selección natural. Estas convergencias permiten estudiar procesos evolutivos independientes y comprender mejor la adaptación evolutiva. Las cuevas son ambientes extremos ante los cuales los organismos han evolucionado fenotipos similares para vivir en completa oscuridad. Los caracteres morfológicos más comunes son la pérdida o reducción de los ojos y de la pigmentación de su piel (rasgos troglomórficos). Un sistema con peces de cuevas con un gran potencial para el estudio de la adaptación es el de las lauchas (*Trichomycterus* spp.) de Santander, Colombia. En Santander se han reportado tres especies endémicas de *Trichomycterus* de ambiente superficial y cuatro especies endémicas restringidas a cuevas, de las cuales tres presentan rasgos troglomórficos. Las múltiples especies de laucha de cueva y de superficie, junto con el troglomorfismo, permiten comprender mejor la adaptación de los organismos de cueva y la pérdida de rasgos complejos como los ojos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si las diferentes especies de lauchas de cueva presentan un patrón de convergencia evolutiva o evolucionaron a partir de un solo linaje de superficie ancestral. Recolecté individuos de diferentes poblaciones de superficie y de cueva, e hice un análisis filogenético usando el gen mitocondrial Citocromo C oxidasa subunidad I (COI) por medio de Inferencia Bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (en inglés ML). Encontré que el troglomorfismo ha evolucionado múltiples veces de manera independiente en las lauchas de cueva de Santander. Las poblaciones de lauchas de cueva troglobias no se diferencian genéticamente de las poblaciones lauchas de superficie, con el marcador utilizado. Se sugiere una revisión taxonómica de las especies de *Trichomycterus* descritas para Santander.

\*Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Mauricio Torres, Dr. en Biología Evolutiva, Ecológica y Organísmica.

## ABSTRACT

TITLE: HOW MANY TIMES DID CAVE-DWELLING CATFISH SPECIES (*Trichomycterus* spp.) COLONIZE CAVES IN SANTANDER, COLOMBIA?\*

AUTHOR: JUAN SEBASTIÁN FLÓREZ VILLAMIZAR\*\*

KEYWORDS: ADAPTATION, ANDES, CONVERGENT EVOLUTION, KARST, NEOTROPICAL FISHES, TROGLOMORPHISM

## DESCRIPTION:

Organisms from different lineages that occur in environments with strong selective pressures tend to have similar phenotypic traits as a result of natural selection. These convergences allow to study independent evolutionary processes and to understand evolutionary adaptations. Caves are extreme environments in which organisms have evolved similar phenotypes to survive in complete darkness. The most common morphological traits include loss or reduction of eyes and pigments. A cave-dwelling fish system with a great potential to study adaptation is “the laucha system” (*Trichomycterus* spp.) from Santander, Colombia. Seven laucha species have been reported in Santander, four of them are endemic and restricted to caves. Three of these cave species present loss or reduction of eyes and pigments, as many others cave restricted animals (troglomorphic traits). The multiple surface and cave-dwelling laucha species with troglomorfism, allow to understand adaptations to the cave environment and to study the loss of complex traits like eyes. Therefore, the aim of this study was to get to know if the cave-dwelling laucha species of Santander have evolved from different surface laucha ancestors (convergence patron), or from a single laucha surface ancestor. Different cave and surface populations were collected. Using the mitochondrial gene Cytochrome c oxidase subunit I (COI), a Bayesian (IB) and a Máximun likelihood (ML) phylogenetic analysis were performed. The results showed that troglomorfism in cave-dwelling laucha species has evolved multiple times independently and that cave laucha populations do not differ genetically from surface ones, with respect to the gene used. Accordingly, a future taxonomic revision of the laucha species of Santander is suggested.

\*Bachelor Thesis

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Mauricio Torres, Dr. en Biología Evolutiva, Ecológica y Organísmica

## Introducción

La adaptación es un tema central en la teoría evolutiva (Reznick y Travis, 1996). Sistemas donde diferentes linajes convergen en fenotipos similares, como respuesta a las mismas presiones selectivas, se pueden ver como experimentos evolutivos naturales que permiten comprender los mecanismos implicados en la evolución convergente y en general en la adaptación de los organismos (Wilcox et al., 2004; Christin et al., 2010).

Hay casos extraordinarios de amplias convergencias evolutivas en una variedad de organismos. Un ejemplo son las múltiples invasiones de poblaciones marinas del pez espinoso *Gasterosteus aculeatus* (*sticklebacks*) a numerosos lagos de agua dulce del hemisferio norte hace 10.000 a 20.000 años. Las poblaciones de agua dulce se han diferenciado en varios rasgos morfológicos, fisiológicos y comportamentales con respecto a sus ancestros marinos. Por ejemplo, las poblaciones marinas se caracterizan por poseer cuerpos con una fila continua de 32 a 36 placas de armadura desde su cabeza a la cola (morfo “completo”). En cambio, las poblaciones de lagos presentan espacios entre la fila de placas de armadura (morfo “parcial”), o algunas llegan a presentar desde nueve placas a carecer por completo de éstas (morfo “reducido”). Varias hipótesis se han propuesto para sustentar la idea de una ventaja selectiva para la reducción de la armadura. Entre éstas se encuentra un incremento en la maniobrabilidad y flexibilidad, cambios en la ejecución del nado y variación en los niveles de depredación en los diferentes lagos (Colosimo et al., 2005; Merilä, 2013).

Otro sistema que podría considerarse un laboratorio ecológico y evolutivo interesante para el entendimiento de la adaptación de los organismos a nuevos ambientes es el de las cuevas. En las cuevas se facilita el estudio de procesos de especiación, adaptación y la formación de nuevos

caracteres fenotípicos. Las cuevas funcionan como unidades discretas en el paisaje, donde el aislamiento temporal y espacial de los organismos sujetos a ambientes extremos, direccionan procesos adaptativos que resultan en convergencias fenotípicas en un amplio conjunto de caracteres (Juan et al., 2010). Algunos caracteres fenotípicos pueden ser considerados más complejos que otros, producto de múltiples adaptaciones acumuladas en el tiempo. Por lo tanto, las convergencias más impresionantes son las que implican la formación o pérdida completa de órganos. En el caso de la fauna de cuevas, la adaptación ha conllevado a la múltiple pérdida independiente de los ojos y la pigmentación corporal, entre otros rasgos morfológicos, fisiológicos y comportamentales (Romero, 2011; Christiansen, 2012). Es por esta razón que las cuevas y su fauna podrían ser cruciales en el entendimiento de la adaptación a nuevos ambientes extremos y en el estudio de la pérdida de órganos complejos como los ojos (Jeffery, 2001).

Un sistema de estudio útil para abordar diferentes aspectos relacionados con adaptación a la vida subterránea es la región cárstica de Santander, Colombia. Este departamento posee el mayor número de cuevas de Colombia, ascendiendo a más de 100 (Muñoz-Saba et al., 2013). Entre los diferentes organismos que se han reportado en algunas de estas cuevas se encuentran las "lauchas", peces del género *Trichomycterus* (Siluriformes). Se han descrito múltiples especies de laucha de ríos y quebradas superficiales de Santander (*T. latistriatus* (Eigenmann, 1917), *T. ruitoquensis* (Ardila-Rodríguez, 2007) y *T. straminius* (Eigenmann, 1917)). Para los cuerpos de agua de cuevas santandereanas se han descrito cuatro especies (*T. sandovali* (Ardila-Rodríguez, 2006), *T. santanderensis* (Castellanos-Morales, 2007), *T. sketi* (Castellanos-Morales, 2010) y *T. uisae* (Castellanos-Morales, 2008)), en aparente aislamiento geográfico (Castellanos-Morales y Galvis, 2012). Las especies de laucha de cueva exhiben una marcada reducción o pérdida total de los ojos y de la pigmentación de su piel, características comunes de otros animales de cueva

(troglomorismos). Se ha observado un gradiente en dicho fenotipo, encontrándose desde especies subterráneas con pigmentos y ojos pequeños, a especies con ausencia completa de los ojos y totalmente despigmentadas. Además existe variación en el grado de atrofia de los ojos a nivel intraespecífico (Bichuette y Rizzato, 2012; Castellanos-Morales, 2007, 2008, 2010).

El gradiente interespecífico en troglomorismo en lauchas podría explicarse por dos escenarios. En el primero, las especies se podrían haber producido por procesos evolutivos independientes, ocurridos sucesivamente, conforme se fueron colonizando las cuevas. En el segundo, la variación estaría relacionada con condiciones abióticas y ecológicas particulares de cada cueva. La variación intraespecífica podría también sugerir que existen niveles variables de flujo genético desde poblaciones del ambiente superficial (Bradic et al., 2012). Sin embargo, a pesar del aparente aislamiento geográfico de las diferentes especies de lauchas de cueva, éstas podrían haberse originado por un único evento y haber especiado por medio de eventos de dispersión a otras cuevas. Alternativamente, el proceso de especiación pudo estar determinado por barreras geográficas generadas por las dinámicas geohidrológicas del sistema cárstico, escenario que se ha propuesto para otros sistemas de peces de cueva (Espinasa y Espinasa, 2015).

Con el fin de abordar diferentes preguntas evolutivas respecto a la adaptación y la evolución de los organismos de cuevas, primero se debe comprender la historia evolutiva de las múltiples especies de lauchas hasta ahora descritas. Por lo tanto, el objetivo principal de éste trabajo es determinar si las especies de laucha de cueva son producto de múltiples eventos evolutivos independientes o de un único evento evolutivo por medio de análisis filogenéticos con datos moleculares.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Determinar cuántos eventos evolutivos dieron origen a las especies de laucha de cueva (*Trichomycterus* spp.) en Santander, a partir de análisis filogenéticos usando datos moleculares.

### 1.2 Objetivos específicos

- Recolectar especímenes de lauchas (*Trichomycterus* spp.) de cuevas y de superficie en localidades tipo y en los drenajes superficiales más cercanos a las localidades tipo de los peces de cueva.
- Reconstruir las relaciones filogenéticas de las lauchas de cueva y de superficie de Santander.

### 1.3 Hipótesis

Ho 1: Las lauchas de cueva (*Trichomycterus* spp.) de la región cárstica santandereana surgieron a partir de varios linajes independientes de lauchas de superficie ancestrales, mostrando un caso de convergencia evolutiva.

Ho 2: Las lauchas de cueva (*Trichomycterus* spp.) de la región cárstica santandereana surgieron a partir de un único evento de colonización de cuevas a partir de un solo linaje de laucha de superficie ancestral.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Adaptación y convergencia evolutiva**

La convergencia evolutiva es un tema central para la biología evolutiva y para la historia de la vida, dada su recurrencia (Wiens et al., 2003; Stayton 2015a, 2015b; Speed y Arbuckle, 2017). A pesar de la ubicuidad de este patrón evolutivo, su definición ha sido tema de debate (Losos, 2011; Stayton, 2015a). Históricamente se han considerado los casos de convergencia evolutiva como evidencia de adaptación, es decir, ejemplos de cómo la selección natural produce independientemente fenotipos aptos similares en diferentes linajes, haciendo que dos o más especies lejanas filogenéticamente evolucionen morfologías muy similares (Losos, 2011; Speed y Arbuckle, 2016). No obstante, en algunos casos la convergencia evolutiva es producto de otros mecanismos o eventos distintos a la selección natural, como cambios evolutivos aleatorios, deriva genética y restricciones evolutivas (Losos, 2011; Speed & Arbuckle, 2016). Por consiguiente, diferentes autores han definido la convergencia evolutiva simplemente como la evolución independiente de caracteres similares, en diferentes linajes evolutivos, sin mencionar el mecanismo por el cual dicho fenómeno ocurre (Arendt & Reznick, 2008; Losos, 2011; Speed & Arbuckle, 2016; Stayton, 2015b; Wiens et al., 2003).

La múltiple aparición o pérdida de un rasgo fenotípico resulta de gran interés en la biología evolutiva, debido a que representa réplicas de procesos evolutivos independientes con los cuales se podría dilucidar los diferentes mecanismos que dirigen la evolución (Christin et al., 2010). Para esto, actualmente se han desarrollado herramientas y enfoques matemáticos, computacionales, genómicos y de la evolución del desarrollo que permiten comprender la convergencia evolutiva desde una perspectiva integral, al igual que los procesos evolutivos implicados (Speed y Arbuckle,

2016). Por ejemplo, los estudios sobre las bases genéticas de los caracteres convergentes muestran que algunos rasgos similares surgen por cambios muy parecidos a nivel genético, mientras que otros estudios evidencian que fenotipos similares pueden tener bases genéticas distintas (Losos, 2011). Esto sugiere que diferentes mecanismos podrían estar implicados en procesos de convergencia evolutiva.

## **2.2 Cuevas como laboratorios evolutivos**

Las cuevas son aberturas naturales presentes en formaciones rocosas con áreas en total oscuridad (Culver y Pipan, 2010). Se conocen varios tipos de cuevas de diversas formas y tamaños, incluyendo cuevas producidas por la acción de olas sobre rocas costeras, en grietas naturales, por tubos de lava, entre otros. Un tipo de cueva común y de gran tamaño es la denominada cueva de tipo caliza o cueva cárstica. El paisaje cárstico cubre aproximadamente el 15% de la superficie seca terrestre y han sido descritas unas 50.000 cuevas de este tipo en Estados Unidos y unas 100.000 en Europa (Culver y Pipan, 2010). El paisaje cárstico es el resultado de la disolución de un tipo de roca sedimentaria de fácil alteración por la acción del agua ácida. La roca caliza, en la cual se forma dicho paisaje, está constituida principalmente de carbonato de calcio, que se forma por precipitaciones orgánicas e inorgánicas de calcita en aguas marinas. La acumulación, sepultación y compactación de este mineral por millones de años producen finalmente la roca, que eventualmente por procesos orogénicos, erosión y fracturas, queda expuesta al agua meteórica. La acidez del agua diluye y moldea la roca, generando con el tiempo el paisaje cárstico (Culver y Pipan, 2010).

Las cuevas son hábitats extremos donde la carencia de luz imposibilita la vida fotosintética. Si bien se han encontrado organismos quimio-sintéticos habitando en algunas cuevas, la fuente principal de energía en estos ambientes subterráneos proviene de la superficie (Culver y Pipan,

2010). Por ejemplo, mediante el movimiento activo de animales que ingresan a la cueva, por escorrentía, arroyos, viento o gravedad. La energía que ingresa, impredecible y escasa, está constituida principalmente por materia orgánica disuelta o particulada, microorganismos, invertebrados, material vegetal, restos de animales que caen atrapados y excretas de animales (Culver y Pipan, 2010). En las cuevas la variación térmica es reducida, sin presentarse los cambios drásticos que se pueden presentar en la superficie (Culver y Pipan, 2010). Los organismos de cueva tienden a ser sensibles a los cambios en la humedad y nivel de agua que ingresa a las cuevas. Cuevas con poca humedad y con una alta variación en el nivel de agua tienden a poseer una menor biodiversidad (Culver y Pipan, 2010).

### **2.3 Biota subterránea**

Las comunidades en el interior de cuevas tienen menos especies en comparación con las comunidades de superficie (Culver y Pipan, 2010). La simplicidad de estas comunidades es consecuencia de la permanente oscuridad que caracteriza las cuevas, entre otros factores abióticos. Sin embargo, existe una diversidad faunística considerable que puede encontrarse en estos ambientes por diversas razones (Culver y Pipan, 2010). Existen tanto invertebrados como vertebrados que pueden estar en el interior de una cueva por simple casualidad o accidente y que, sin la posibilidad de volver al exterior, terminan muriendo. Algunos animales tanto domésticos como silvestres son visitantes temporales, que usan las cuevas como resguardo (Culver y Pipan, 2010). La mayoría de los mamíferos que frecuentan las cuevas, como los murciélagos, pasan sólo una parte del día en éstas. Sin embargo, existen especies tanto terrestres como acuáticas, vertebrados e invertebrados que pasan el ciclo completo de su vida en las cuevas. A este grupo de organismos adaptados a la vida subterránea se les denomina troglobios (Trajano, 2001).

Se estima que podrían existir aproximadamente 50000 especies troglobias alrededor del mundo. Los dos principales grupos de vertebrados que lograron colonizar exitosamente estos lugares son las salamandras y los peces. Existen aproximadamente 150 especies de peces de cueva con representantes de 21 familias (Trajano et al., 2010). A diferencia de las especies de invertebrados cavernícolas, las especies de peces de cueva son más numerosas hacia el trópico. De hecho, sólo recientemente se reportó el primer registro de una población de peces de cueva en Europa (Behrmann-Godel et al., 2017). Se cree que la mayor diversidad de peces cavernícolas en áreas tropicales es debida a la alta productividad que caracteriza la superficie de la región tropical, la cual transfiere energía al ambiente subterráneo, haciendo más probable que los peces colonicen estos ambientes (Culver y Pipan, 2010). Una de las especies de peces cavernícolas más estudiadas es *Astyanax mexicanus*, la cual presenta múltiples poblaciones hipogeas y se ha utilizado ampliamente como modelo para el estudio de la evolución regresiva (pérdida de rasgos sin uso a través del tiempo). El gran interés en este sistema de estudio se debe al hecho de presentar en varios linajes, poblaciones tanto de cueva como de superficie de reciente divergencia, por su capacidad de hibridación con descendencia fértil entre dichas poblaciones y por la facilidad para criarlos en laboratorio (Espinasa y Borowsky, 2001; Jeffery et al., 2003; Jeffery, 2009; Gross, 2012; Strecker et al., 2012).

El ambiente extremo en el interior de una cueva hace que las especies troglobias se adapten y evolucionen adquiriendo características particulares en su morfología, comportamiento y fisiología. Estas características incluyen tanto rasgos reducidos o de pérdida de función, como de aumento o ganancia. Los rasgos troglomórficos más comunes y prominentes son la reducción de los ojos y la pigmentación (Trajano, 2001). Sin embargo, las especies de cuevas varían en su grado de troglomorfismo y algunas inclusive carecen de dichos caracteres, posiblemente debido al

tiempo transcurrido desde la colonización a partir de poblaciones superficiales (Trontelj et al., 2012). Otros rasgos troglomórficos incluyen la pérdida o reducción de órganos visuales, los centros visuales cerebrales, el órgano pineal, el tamaño del cuerpo, las cutículas, escamas y la vejiga de gas. Igualmente, se ha encontrado alteración del ritmo circadiano y reducción en el metabolismo, la fecundidad, el volumen del huevo, la fotorreacción y el comportamiento de agregación y agresión (Romero, 2011). Por otra parte, entre los rasgos que pueden aparecer o aumentar en organismos troglomórficos se destacan los quimio- y mecano-receptores, el tamaño de los apéndices, el tamaño corporal, las reservas de grasa y la longevidad (Romero, 2011).

#### **2.4 Especiación en fauna subterránea**

Diferentes estudios han sugerido dos hipótesis posibles acerca de cómo ocurre la especiación en los animales adaptados a cuevas. La primera hipótesis se denomina “relictos climáticos” (o modelo alopátrico); sostiene que una población de superficie, con pre-adaptaciones a la vida subterránea y con amplia distribución, se extiende al ambiente subterráneo, manteniendo inicialmente flujo genético entre individuos de superficie y de cueva. Posteriormente, cambios climáticos como glaciaciones o sequías (como las ocurridas durante el Pleistoceno), producen extinción de la población de superficie, o un marcado aislamiento entre ésta y la población de cueva, restringiendo a esta última población sobreviviente al ambiente subterráneo. Allí, procesos adaptativos dirigen la adquisición de los caracteres troglomórficos que caracterizan a las especies troglobiontes (Rivera et al., 2002; Juan et al., 2010). En contraste, la hipótesis de “cambio adaptativo” (o modelo parapátrico) sostiene que la población de superficie se extiende al ambiente de cueva en busca de nuevos recursos, enfrentándose a un ambiente con fuertes presiones selectivas que conducen a una divergencia genética entre las poblaciones de superficie y cueva a pesar de no estar separadas físicamente. Eventualmente, la divergencia adaptativa conduce a una disminución del flujo

genético efectivo mediada por selección y a una posterior especiación. Es decir, en este último modelo, la especiación inicialmente ocurre por selección divergente y no por un aislamiento geográfico como en el modelo alopátrico (Rivera et al., 2002; Juan et al., 2010). Estudios con escarabajos buceadores de cueva en Australia sugieren que cambios drásticos en el clima (hace alrededor de 10 a 5 millones de años) estarían relacionados con el aislamiento reproductivo de las poblaciones de cuevas y superficie y, una posterior especiación, apoyando la hipótesis alopátrica de relictos climáticos (Leys et al., 2003). En contraste, estudios filogenéticos con isópodos y caracoles de cuevas en Hawaii y Borneo, respectivamente, sugieren que en el trópico la especiación de estos organismos estaría facilitada por selección divergente entre las poblaciones de cueva y superficie (Rivera et al., 2002; Schilthuizen et al., 2005).

### **2.5 Vicarianza y dispersión en la fauna subterránea**

Aunque se ha observado convergencia evolutiva en la mayoría de sistemas de cuevas con fauna subterránea, existen excepciones (Juan et al., 2010). Un análisis filogenético de un grupo de especies troglobias restringidas y separadas en diferentes cuevas en un mismo sistema cárstico podría tener como resultado que las diferentes especies sean un grupo monofilético. Lo anterior implicaría no la múltiple evolución independiente de las especies troglobias y sus caracteres adaptativos similares, sino un único origen con sucesivas dispersiones a las diferentes cuevas o eventos vicariantes que produjeran dicha especiación (Espinosa y Borowsky, 2001).

Los organismos de cuevas son conocidos por sus distribuciones restringidas y por su capacidad de dispersión limitada (Chacrabarty et al., 2012). De la fauna troglobia, se considera a los organismos subterráneos acuáticos con capacidades mayores de dispersarse, por encontrarse en un medio acuático, el cual tiende a fluctuar en volumen por las inundaciones, generando mayor conectividad entre los hábitats acuáticos subterráneos (Lamoreux, 2004). Sin embargo, a pesar de

que los animales subterráneos acuáticos potencialmente podrían lograr salir de las cuevas a través de los drenajes, la adaptación a la vida subterránea implica una alta especialización fenotípica (pérdida de visión y pigmentos) que limitaría la supervivencia de los animales troglobios fuera de la cueva, haciendo improbable una dispersión de una cueva a otra a través de la superficie (Chacrabarty et al., 2012).

Los sistemas cársticos no son estáticos sino que se encuentran sometidos a través del tiempo a procesos orogénicos, erosivos y de variaciones en el nivel freático. Al mismo tiempo, cambios en el flujo del agua de escorrentía erosionan la roca caliza, creando nuevas cuevas, modificando cuevas preexistentes o haciendo que dos o más cuevas se fusionen (Espinasa y Espinasa, 2015). Es por esta razón que, al igual que con los peces de ríos en superficie, la evolución de estos organismos está ligada a la historia de los ríos, los cuales cambian de curso o presentan captura y secuestro de arroyos a través del tiempo, haciendo que las poblaciones de peces se separen o se reúnan. Estas dinámicas geohidrológicas dirigen los procesos de especiación, hibridación y colonización de especies troglobias a nuevos ambientes subterráneos (Espinasa y Espinasa, 2015). Por ejemplo, en el sistema cárstico de El Abra en México, múltiples poblaciones aisladas de *Astyanax mexicanus* presentan una estructura genética que evidencia que las diferentes poblaciones de cueva de esta región se encuentran genéticamente más emparentadas entre ellas, que con las poblaciones de superficie. Diferentes autores argumentan que esta estructura es debido a un flujo genético subterráneo extenso entre las cuevas en algún tiempo y a posteriores migraciones subterráneas a localidades de cuevas actuales como resultado de la evolución geohidrológica de la región (Espinasa 2001; Espinasa y Espinasa, 2015).

Barreras geográficas pueden terminar separando grupos hermanos de peces de cueva, por kilómetros de distancia. Un análisis filogenético de los peces Gobiiformes encontró que los

géneros de peces troglobios *Typhleotris* y *Milyeringa*, endémicos de cuevas en Madagascar y Australia, respectivamente, se encuentran actualmente separados 7000 km por el Océano Índico, como resultado de procesos vicariantes Gondwánicos a finales del Cretácico, hace 77 millones de años (Chakrabarty et al., 2012). La biota de cuevas puede revelar patrones filogenéticos interesantes, que demandarían una mayor comprensión de los factores históricos y biogeográficos relacionados con su especiación y evolución (Juan et al., 2010).

## **2.6 Sistema cárstico santandereano**

El sistema cárstico santandereano está ubicado en la cordillera oriental de Colombia, en una zona caracterizada por presentar una gran extensión de estratos de roca caliza del Mesozoico, con edades de 245 a 65 millones de años (Muñoz-Saba et al., 2013). En las zonas donde la roca caliza ha quedado expuesta, condiciones propicias como una alta humedad, han favorecido la formación de un extenso paisaje cárstico, con más de 100 cuevas, algunas de ellas entre las más grandes del país (Muñoz-Saba et al., 2013). Las cuevas de Santander poseen una porción de la biodiversidad colombiana poco estudiada que incluye numerosas especies de murciélagos, peces, insectos y arácnidos (Muñoz-Saba et al., 2013). Algunas de estas especies podrían estar presentando algún grado de amenaza debido al turismo informal, la sobreexplotación de las aguas que escurren a ellas y la minería. Por ejemplo, *Trichomycterus sandovali*, una especie endémica de la cueva La Alsacia en Zapatoca, Santander, se considera vulnerable debido a su distribución restringida y a su pequeño tamaño poblacional (Ardila-Rodríguez, 2012).

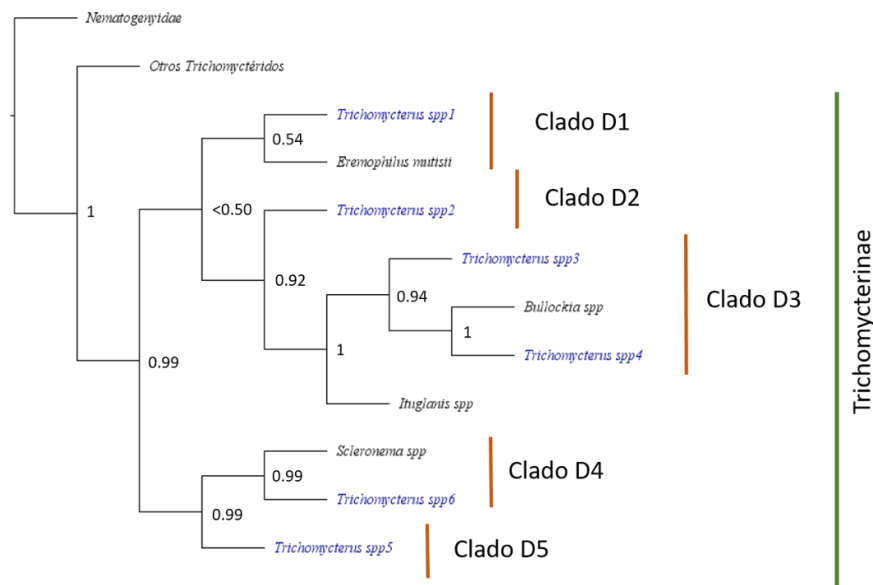
## **2.7 Las lauchas**

Las especies de *Trichomycterus* son bagres (Siluriformes) de pequeño tamaño, omnívoros, que se alimentan principalmente de invertebrados pequeños, carroña y restos de material vegetal (Román-Valencia, 2001). Las especies de este género presentan una distribución geográfica amplia,

encontrándose desde Costa Rica hasta la Patagonia en Argentina e incluso en la isla Gorgona en el Pacífico colombiano (Fernández y Schaefer, 2005). *Trichomycterus* es el género más diverso de la familia Trichomycteridae, con 176 especies descritas, de las cuales 27 son nativas de Colombia (DoNascimento et al., 2014). Junto con representantes de los géneros *Glaphyropoma* e *Ituglanis*, algunas especies de *Trichomycterus* han logrado colonizar ambientes subterráneos. Se han descrito para Colombia cuatro especies restringidas a cuevas, todas en Santander (Castellanos-Morales y Galvis, 2012). Sin embargo, el número de especies troglóbias podría ser mayor pues se han reportado lauchas sin describir en diferentes cuevas en Santander (Castellanos-Morales et al., 2015) y muchas cuevas aún no han sido exploradas (Muñoz-Saba et al., 2013).

La familia Trichomycteridae se encuentra ubicada filogenéticamente en el clado Loricarioidei, junto con las familias Nematogenyidae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Loricariidae y Astroblepidae (Sullivan et al., 2006). Recientes estudios filogenéticos con datos mitocondriales y nucleares de la familia Trichomycteridae confirmaron la monofilia de las subfamilias Trichogeninae, Copionodontinae, Vandellinae, Tridentinae y Stegophilinae (Ochoa et al., 2017). Los mismos análisis apoyan la monofilia de la subfamilia Trichomycterinae, la más diversa de la familia debido al género *Trichomycterus*. El género *Trichomycterus* está conformado por cinco clados, tres de los cuales presentan distribución al occidente de los Andes y los dos restantes al oriente (Figura 1). Hasta el momento, las lauchas santandereanas incluidas en dicho estudio se encuentran en dos de los tres clados que se distribuyen al occidente de los Andes. Es decir, las lauchas epigeas santandereanas *Trichomycterus ruitoquensis* y *T. straminius* se encuentran cercanamente emparentadas y hacen parte de un clado con otras especies de *Trichomycterus* que se distribuyen al occidente de los Andes y también al nororiente de Sur América (en Colombia, Panamá, Venezuela y Las Guayanas). En cambio, la laucha santandereana hipogea-troglobia

*Trichomycterus sandovali*, se encuentra en otro clado, junto con el capitán de la Sabana (*Eremophilus mutisii*) y otras especies de *Trichomycterus* que se distribuyen al occidente y hacia el centro de los Andes (en Ecuador y Perú). La actual ubicación filogenética de los géneros *Scleronema*, *Eremophilus*, *Bullockia* e *Ituglanis* conformando clados con algunas especies de *Trichomycterus* (Figura 1), muestran la necesidad de hacer cambios nomenclaturales dentro del género, por medio de posteriores análisis con un mayor número de representantes, datos moleculares y acompañados de evidencia morfológica (Ochoa et al., 2017). Sin embargo, se ha dificultado un análisis morfológico para establecer las relaciones filogenéticas del grupo por la similitud morfológica de las especies del género, algunas descripciones de especies con pocos datos y la dificultad de extraer caracteres de especímenes tipo inaccesibles o deteriorados (DoNascimento et al., 2014).



**Figura 1.** Hipótesis filogenética de la subfamilia Trichomycterinae. Los valores en los nodos corresponden a probabilidades posteriores (PP). Los clados D1, D2 y D3 se distribuyen al occidente de los Andes y los clados D4 y D5 al oriente de los Andes. Modificado de Ochoa *et al.* (2017).

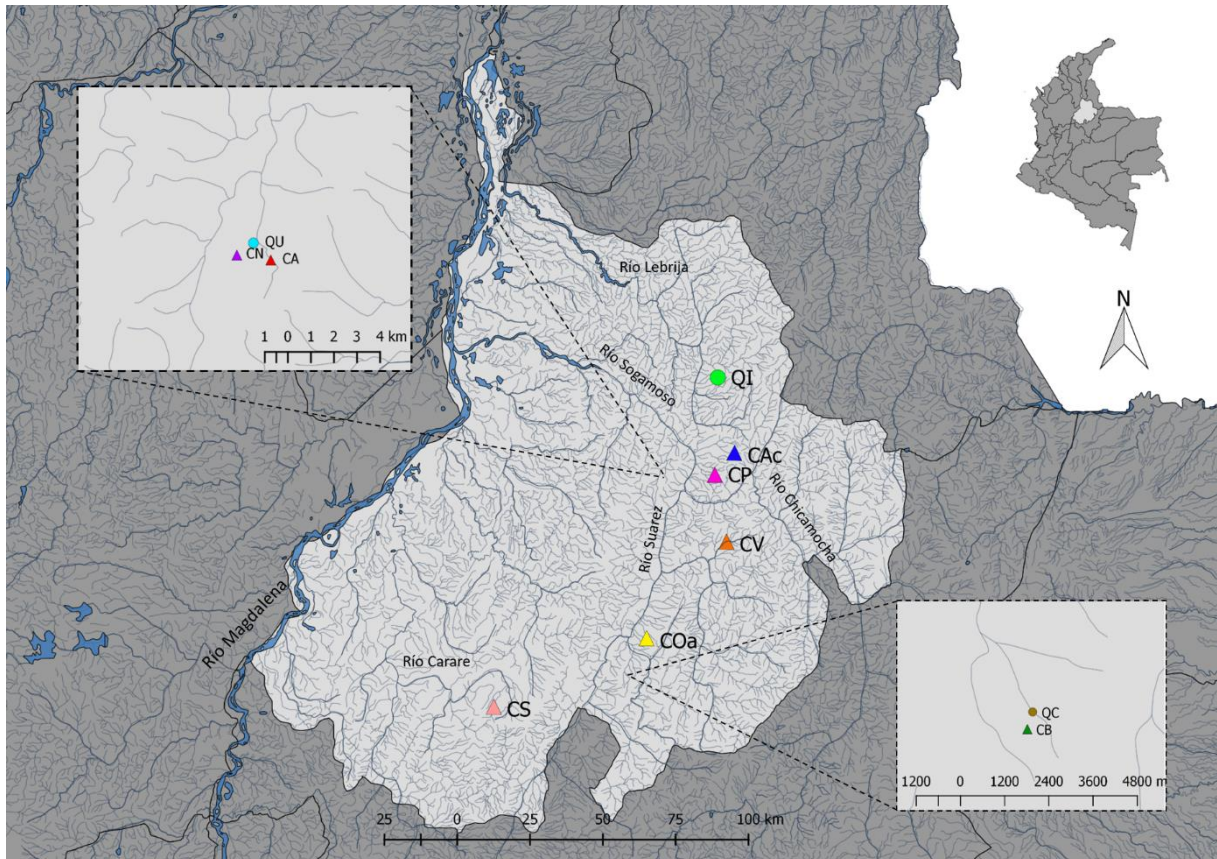
### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Muestreo taxonómico

Muestreé poblaciones de *Trichomycterus* de ambiente epigeo (superficial) e hipogeo (subterráneo o cueva), en su respectiva localidad tipo y en quebradas superficiales cercanas a las localidades tipo de las especies de cueva en Santander (Figura 2). Hice la recolección por medio de redes de pesca y electro pesca (Samus-725M), con el acompañamiento de guías locales y siguiendo las recomendaciones de acceso a ambientes cársticos de Muñoz-Saba et al. (2013). Fotografíé en vida todos los especímenes recolectados y luego los sacrificué con una dosis letal de roxicaína. Extraje la aleta pélvica derecha de cada individuo y la preservé en etanol al 70% para posteriormente hacer extracción de ADN. Fijé los especímenes en formol al 10 % y luego los preservé en alcohol al 70 % en la Colección Ictiológica de la Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga, Colombia.

En total recolecté 49 individuos de 10 poblaciones, tres de las cuales son epigeas y siete hipogeas. De las poblaciones hipogeas, solo tres presentan caracteres troglomórficos (Tabla 1). Visité la localidad tipo de la especie *Trichomycterus santanderensis* en la cueva El Puente en Lebrija, Santander, pero no encontré peces en la cueva. Tampoco logré recolectar especímenes de *Trichomycterus uisae* en su respectiva localidad tipo, debido a que no se encontró la cueva El Misterio, siguiendo las indicaciones y coordenadas geográficas provistas en Castellanos-Morales (2008). Incluso los locales manifestaron que en ese sector no conocían cuevas. Sin embargo, logré recolectar individuos de *Trichomycterus* en dos cuevas en Los Santos, a los cuales decidí identificar inicialmente como *T. uisae*. Visité la localidad tipo de *Trichomycterus latistriatus* en

la quebrada Pinchote, en Pinchote, Santander. La quebrada se encontraba visiblemente contaminada con desechos antrópicos y no encontré peces.



*Figura 2.* Mapa del departamento de Santander (Colombia), donde se ubican las localidades de recolecta de los *Trichomycterus*. Los triángulos corresponden a localidades de cueva y los círculos a localidades de superficie. **QI**: Quebrada la Iglesia, Bucaramanga, **CAc**: Cueva Acuarela, Los Santos. **CP**: Cueva de Los Petroglifos, Los Santos. **CV**: Cueva de La Vaca, Curití. **COa**: Cueva Ojo de Agua, Guapotá. En ampliación superior izquierda: **QU**: Quebrada La Uchuval, Zapatoca. **CN**: Cueva Del Nitro, Zapatoca. **CA**: Cueva La Alsacia, Zapatoca. En ampliación inferior derecha: **QC**: Quebrada La Coca, Guadalupe. **CB**: Cueva El Berraco, Guadalupe. **CS**: Cueva Las Sardinas, Peñón (datos de georreferenciación de localidad de *T. rosablanca* proporcionados por el IAvH). Las líneas y áreas en azul corresponden a drenajes principales y cuerpos de agua en Colombia.

Investigadores del Instituto Alexander von Humboldt (IAvH) me proporcionaron las secuencias del gen COI de *Trichomycterus rosablanca*, especie troglomórfica en proceso de descripción,

recolectada en la cueva Las Sardinas, en el Peñón, Santander, y de otra población hipógea recolectada en la cueva Los Aviones, Guadalupe, Santander (ver apéndice A).

Adicionalmente, analicé las secuencias del gen COI del análisis filogenético hecho por Ochoa et al. (2017) para Trichomycteridae. Incluí la secuencia de las especies de ambiente superficial santandereanas *T. straminius*, *T. ruitoquensis* y la troglobia *T. sandovali*, y todos los demás representantes de los clados D1, D2 y E, por su aparente cercanía filogenética con las lauchas santandereanas y por su distribución al occidente de los Andes. También incorporé al análisis solo algunos representantes de los clados D3, D4 y D5, debido a que están más lejanamente emparentadas con las lauchas santandereanas y se distribuyen al oriente de los Andes. Como grupo externo incluí representantes de las subfamilias Trichogeninae y Copiodonodontinae y como grupo externo más distante consideré a *Nematogenys inermis*, de la familia Nematogenyidae (ver apéndice A).

Tabla 1

*Localidad y número de especímenes recolectados.*

Hábitat	Troglomorfismo	Especie	n	Localidad	Coordenadas
S	NO	<i>T. ruitoquensis</i>	7	Quebrada la Iglesia, Pan de Azúcar, Bucaramanga	7.115378, -73.098459
C	SI	<i>T. sp1</i>	5	Cueva del Nitro, Zapatoca, Santander	6.803134, -73.272824
C	SI	<i>T. sandovali</i>	4	Cueva La Alsacia, Zapatoca, Santander	6.798394, -73.257285
S	NO	<i>T. sp2</i>	7	Quebrada Uchuval, Zapatoca, Santander	6.805944 -73.2646388
C	NO	<i>T. uisae</i>	4	Cueva de Los Petroglifos, Los Santos, Santander	6.809055, -73.114861
C	NO	<i>T. uisae</i>	5	Cueva Acuarela, Los Santos, Santander	6.878450,-73.045205
C	NO	<i>T. sp5</i>	5	Cueva de La Vaca, Curití, Santander	6.604582, -73.073542
C	SI	<i>T. sp6</i>	5	Cueva Ojo de Agua, Guapotá, Santander	6.308152, -73.320957
C	NO	<i>T. sp7</i>	3	Cueva el Berraco, Guadalupe, Santander	6.19802, -73.41380
S	NO	<i>T. sp8</i>	4	Quebrada La Coca, Guadalupe, Santander	6.19471, -73.41343
Total			49		

S: superficie, C: cueva

### 3.2 Extracción de ADN y secuenciación

Extraje el ADN total por medio del método Fenol-Cloroformo, a partir de la aleta pélvica derecha de cada espécimen recolectado. El procedimiento detallado está descrito en el apéndice B.

La secuencia parcial de la sub-unidad I del gen Citocromo c Oxidasa (COI), que corresponde a la región del *barcode* de aproximadamente 660 pares de bases (pb), la amplifiqué por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), implementando los cebadores descritos por Ward et al. (2005): *FishF1* (5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3') y *FishR1* (5'TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC3'). Las amplificaciones del gen COI las hice en un volumen total de 25 µl con 2.5 µl de Buffer 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.2 µl de Taq Polimerasa (5U/ µl), 1.25 µl de cada cebador, 1 µl de BSA (0.066 mM), 4 µl de ADN genómico y 12.80 µl de ddH<sub>2</sub>O. El protocolo consistió en una fase inicial de desnaturalización (2 min a 94°C), seguido por 34 ciclos de desnaturalización (4 seg a 94°C), una anillamiento (30 seg a 54°C), e hibridación (45 seg a 72°C) y finalmente, una fase de extensión (10 min a 72°C). Los productos de PCR los visualicé en gel de agarosa al 1% y los envié a purificar y secuenciar en Macrogen Inc., o en el laboratorio de secuenciación de la Universidad de los Andes.

### 3.3 Análisis de secuencias y filogenia

De los 49 productos de PCR que envié a purificar y secuenciar, solo obtuve para 23 muestras cromatogramas en ambas direcciones de buena calidad y para 10 muestras solo cromatogramas en una dirección. Analicé y edité manualmente los cromatogramas en Geneious 10.1.3 (Kearse et al. 2012). Alineé las secuencias resultantes (33 en total), junto con las secuencias de otros *Trichomycterus* descargadas de Genbank y las proporcionadas por el IAvH. El alineamiento lo hice mediante el algoritmo MUSCLE (Edgar 2004), con parámetros por defecto en Geneious 10.1.3, incluyendo un total de 63 secuencias para este estudio (apéndice A).

Por medio del programa DNAsp v6 hice una búsqueda de los sitios variables, informativos según parsimonia y los invariantes. Seleccioné el mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada posición de codón del gen COI por medio del programa PartitionFinder v2.1.1 (Lanfear et al., 2012), bajo el criterio de información de Akaike corregido (AICc). Hice la reconstrucción filogenética mediante Inferencia Bayesiana (IB), usando el programa MrBayes 3.2.6. (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), y Máxima Verosimilitud (en inglés ML) por medio de RAxML v.8.2.10 (Stamatakis, 2014). Hice un análisis bayesiano por particiones que correspondieron a cada posición del codón y especifiqué para cada una el modelo evolutivo obtenido con PartitionFinder. Para el análisis de IB fueron ejecutadas cuatro corridas, tres cadenas calientes y una fría de 30 millones de generaciones con muestreo cada 1000. Descarté el 25 % de las topologías muestreadas como *burn-in*. Evalué la convergencia de cada corrida y el tamaño de muestreo efectivo para cada parámetro del análisis de IB por medio de Tracer v.1.5 (Rambaut et al., 2010). Para encontrar el árbol de ML hice el análisis bajo el modelo GTR+GAMMA y evalué el soporte de los nodos mediante un *bootstrap* no paramétrico (B), bajo el criterio de parada autoMRE en RAxML. Visualicé las topologías obtenidas de cada análisis por medio de figtree v1.4.3.

## 4. Resultados

### 4.1 Aspectos generales de la matriz y modelo evolutivo

La matriz de datos moleculares del gen COI resultó de 522 pares de bases (pb). Con el análisis de la matriz en el programa DNAsp v6, encontré 167 sitios variables (polimórficos), 152 sitios informativos bajo parsimonia y 258 sitios invariantes. El mejor modelo evolutivo encontrado para cada posición de codón del gen COI en PartitionFinder fue: COI-1ra posición: TIM+I+G, COI-2da posición: F81+I y COI-3ra posición: GTR+I+G.

## 4.2 Análisis filogenético

La Figura 3 muestra la topología obtenida por medio del análisis de ML e IB. Ambos análisis mostraron resultados bastante similares (apéndices C y D). Aunque los árboles no resultaron completamente resueltos (ver figura 3), las lauchas de Santander se ubican en tres clados, sólo uno de los cuales está fuertemente apoyado tanto por PP como % B (S1: 0.97 PP/ 60 % B, S2: 0.95 PP/ 65 % B y S3: 1 PP/ 95 % B). Los tres clados no se encuentran cercanamente emparentados entre sí, sino que cada uno está relacionado con especies que no se distribuyen en Santander.

El clado S1 está conformado por un primer clado con buen soporte de PP (0.99 PP/ 67 % B), que muestra a la laucha epigea santandereana *T. straminius* (secuencia descargada de Genbank), como especie hermana de *T. banneai*. Estas dos especies se distribuyen en el río Manco en Piedecuesta, Santander y en la quebrada De Bernal en Honda, Tolima, respectivamente. El clado hermano de *T. straminius* + *T. banneai* agrupa con bajo soporte de nodo (0.57 PP/ 59 % B), a los *Trichomycterus* recolectados en la quebrada superficial La Iglesia, del barrio Pan de Azúcar en Bucaramanga. Cuatro de estas secuencias forman un clado bien apoyado (1 PP/ 95 % B), junto al representante de la especie epigea *Trichomycterus ruitoquensis* (secuencia descargada de Genbank), que se distribuye en el río Frio (cuenca del río Lebrija), en Floridablanca, Santander. Sin embargo la secuencia *01\_QI*, de un individuo recolectado en Pan de Azúcar, se ubica como grupo hermano -aunque con bajo soporte- del clado que agrupa a los cuatro especímenes restantes recolectados en dicha localidad y a *T. ruitoquensis* (0.57 PP/ 59 % B). Es decir, cuatro especímenes coinciden genéticamente con *T. ruitoquensis* y el espécimen divergente (*01\_QI*), de Pan de Azúcar se diferencia genéticamente de *T. ruitoquensis* en cinco sustituciones. La especie hermana del clado S1 es *T. striatus*, especie epigea que se distribuye en el río Cana, en Panamá.

El clado S2 está conformado por la especie troglomórfica *Trichomycterus rosablanca* (Mesa et al., 2018), especie hermana de *Eremophilus mutisii* (clado S2: 0.95 PP/ 65 % B). *Trichomycterus rosablanca* es una especie restringida a la cueva Las Sardinas en el Peñón y *Eremophilus mutisii* es una especie que se distribuye en drenajes superficiales (lagunas y ríos) de la cuenca del río Bogotá, Cundinamarca, Colombia.

El clado S3 corresponde a un clado bien apoyado (1 PP/ 95 % B), dentro del cual las relaciones no están completamente resueltas. Este clado parece ser el grupo hermano de la especie con distribución en el río Bobanaza en Ecuador *T. knerii* (0.73 PP/ 61% B) y muestra a los *Trichomycterus* hipogeos recolectados en la cueva El Ojo de Agua en Guapotá, Santander, compartiendo una politomía con un clado no resuelto de buen soporte (1 PP/ 88 % B), que agrupa a: (1) un clado bien apoyado (0.99 PP/ 86 % B), que comprende los *Trichomycterus* hipogeos de la Mesa de los Santos (cuevas Acuarela y Los Petroglifos) con los *Trichomycterus* recolectados en Zapatoca, tanto hipogeos-troglobios (cuevas La Alsacia y El Nitro), como epigeos (quebrada superficial La Uchuval). Es decir, los individuos de dichas localidades son genéticamente idénticos según los datos y todos coinciden genéticamente con la especie hipogea-troglobia *Trichomycterus sandovali* (secuencia descargada de Genbank), la cual se ha descrito como una especie restringida a la cueva La Alsacia, en Zapatoca. (2) Un clado no tan bien apoyado (0.60 PP / 59 % B), que corresponde a los *Trichomycterus* tanto hipogeos (cueva El Berraco y cueva Los Aviones), como epigeos (quebrada superficial La Coca), recolectados en Guadalupe, Santander. Al igual que en los *Trichomycterus* de Zapatoca y Los Santos, no hay una diferenciación genética en el marcador analizado entre poblaciones de superficie y cueva en Guadalupe. (3) Finalmente, un clado con buen soporte (1 PP/ 87 % B), que corresponde a los *Trichomycterus* hipogeos recolectados en la cueva de La Vaca, en Curití. Los tres clados mencionados anteriormente aparecen muy

cercanamente emparentados y se diferencian genéticamente sólo por la presencia de una o dos sustituciones.

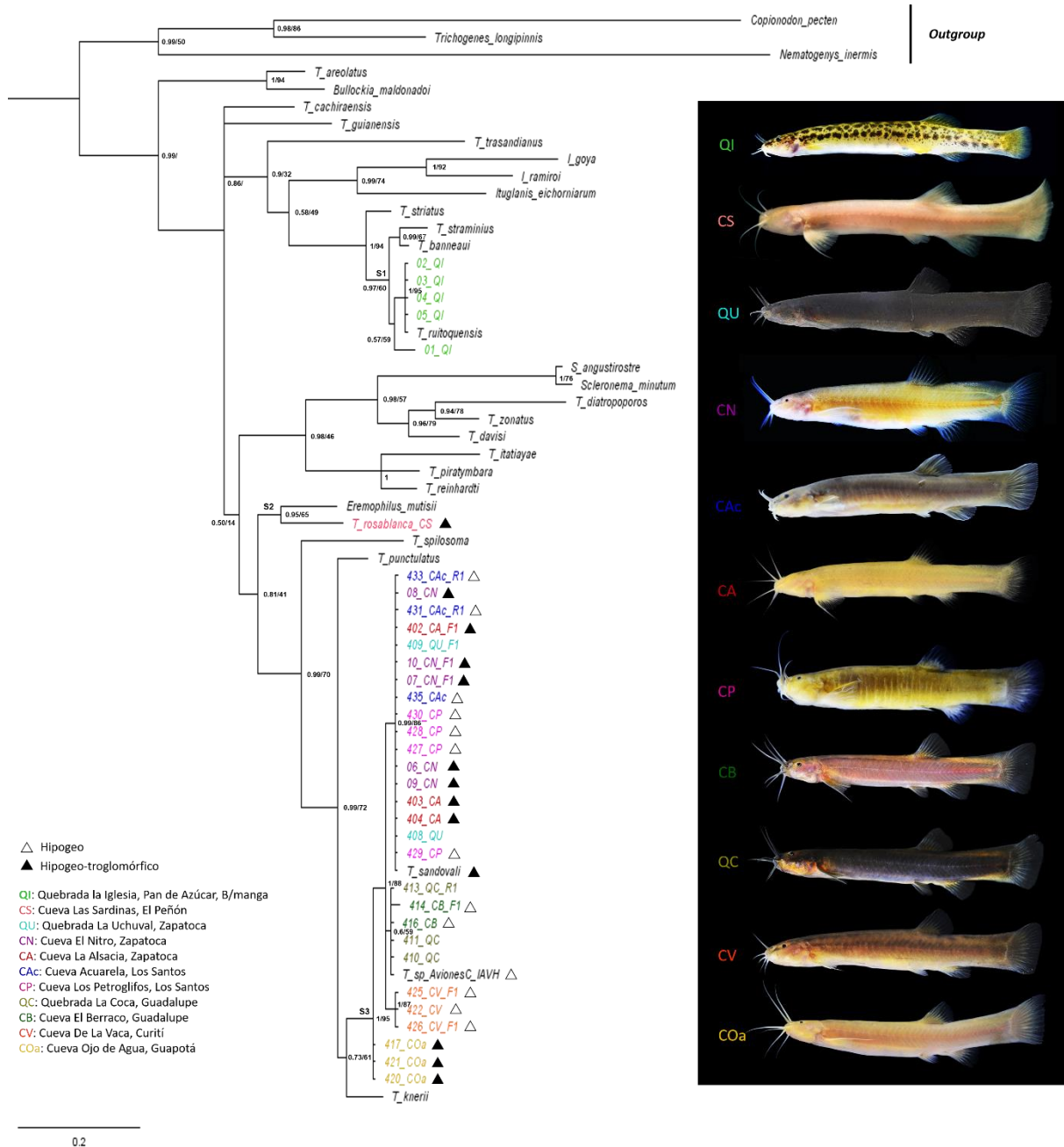


Figura 3. Relaciones filogenéticas de los *Trichomycterus* de cueva y superficie en Santander. Valores en los nodos corresponden al soporte de nodo dado por Probabilidades Posteriores bayesianas (PP) / Valores de *Bootstrap* (B). En los nodos donde no aparece valor de B, es debido a que la topología resultante de ML e IB difiere (ver apéndices C y D). Los terminales que no presentan símbolo, corresponden a especies o especímenes de quebradas superficiales (epigeos). Fotografías de *Trichomycterus* santandereanos muestreados y de *T. rosablanca* (proporcionada

por el IAvH). No se tiene registro fotográfico del espécimen de la población hipogea de la Cueva los Aviones de Guadalupe, Santander (T\_sp\_AvionesC\_IaVH), secuencia proporcionada por el IAvH.

## 5. Discusión

### 5.1 Evolución del troglomorfismo en las lauchas santandereanas

El principal objetivo de este estudio fue determinar por medio de análisis filogenéticos de secuencias del gen mitocondrial COI si las múltiples especies de lauchas hipogeas santandereanas con fenotipo troglobio habían evolucionado una vez o múltiples veces de manera independiente. Los datos sugieren que el troglomorfismo ha aparecido más de una vez de manera independiente en las lauchas santandereanas. Un primer evento evolutivo hacia el troglomorfismo ocurrió en *Trichomycterus rosablanca* (clado S2) y, dentro del clado S3, varios linajes han colonizado diferentes cuevas y podrían haber evolucionado al troglomorfismo de manera independiente (Figura 3). Los datos no fueron suficientemente informativos para resolver de manera completa las relaciones dentro del clado S3, pero sugieren que las lauchas han colonizado independientemente desde la superficie los sistemas subterráneos de las localidades Zapatoca+Los Santos y de Guadalupe, ya que los peces no forman clados según su ambiente, sino según su localidad. Es decir, las poblaciones hipogeas están más emparentadas con las poblaciones epigeas cercanas geográficamente que con poblaciones hipogeas de otras zonas. Es posible que esto mismo ocurra con las lauchas hipogea de Curití y la troglobia de Guapotá, ya que no se agruparon con las lauchas de Zapatoca+Los Santos, sino que se muestran como un linaje muy estrechamente relacionado pero independiente. Sin embargo, es necesario incluir en posteriores estudios poblaciones epigeas de Curití y Guapotá para probar dicha hipótesis.

También encontré evidencia de que algunas poblaciones de lauchas hipogeas santandereanas no se diferencian en ADN mitocondrial de las poblaciones epigeas. Incluso la especie troglobia *T. sandovali*, que se pensaba estaba restringida a la cueva la Alsacia en Zapatoca (Ardila-Rodríguez, 2006), no se diferencia en el marcador analizado de las poblaciones hipogeas y epigeas cercanas, lo que sugiere que estas poblaciones podrían pertenecer a la misma especie.

*T. sandovali* fue descrita como una especie troglobia a partir de la comparación de medidas morfológicas y osteológicas con otras especies de *Trichomycterus* epigeos, como *T. stramineus*, *T. striatus* y *T. banneui*, entre otros. Sin embargo, no se hicieron comparaciones morfológicas o genéticas con las poblaciones epigeas más cercanas geográficamente (Ardila-Rodríguez, 2006). La impresionante divergencia morfológica de los peces troglobios con respecto a los epigeos ha confundido a taxónomos en otros sistemas de peces, llegando a describir sólo con base en el troglomorfismo, géneros o especies nuevas (Romero, 2005). Sin embargo, cuando se hacen estudios posteriores con datos moleculares, se ha encontrado que genéticamente corresponden a la misma especie epigea cercana, como fue el caso de las poblaciones troglobias de *Astyanax mexicanus*, las cuales originalmente fueron descritas como tres especies pertenecientes a un nuevo género llamado *Anoptichthys* (Kirby et al., 1977, Gross et al., 2015). Esto mismo ocurrió con poblaciones hipogeas que fueron inicialmente descritas como un género nuevo (*Caecorhamdia urichi*), teniendo en cuenta la reducción de sus ojos y su pigmentación, pero luego se demostró que se trataba de poblaciones hipogeas de *Rhamdia quelen*, una especie epigea de amplia distribución (Romero, 2005).

La falta de diferenciación genética entre las poblaciones hipogeas-troglobias y epigeas de *T. sandovali* sugiere que éstas han divergido hace poco tiempo y es posible que aún exista flujo genético entre ellas (Brdic et al., 2012; Dowling et al., 2002). El aumento del caudal de las

quebradas superficiales que podrían eventualmente drenar a las cuevas en temporadas alta de lluvia podría explicar un posible flujo genético, ya que en la actualidad no existe una corriente continua de agua a su interior desde la superficie. Lo anterior concuerda con resultados encontrados en otros sistemas de peces troglobios como *Astyanax mexicanus* y *Garra barreimiae*, y en salamandras de cueva (*Gyrinophilus* spp). En estos sistemas se han hecho estudios con datos de marcadores mitocondriales, microsátélites y de la región control mitocondrial y han encontrado que las poblaciones hipogeas-troglobias se diferencian poco genéticamente de las epigeas y existe flujo genético de peces de cueva a superficie y viceversa (Bradic et al., 2012; Niemiller et al., 2008; Kirchner et al., 2017).

Por ahora, en las lauchas santandereanas parece que el troglomorfismo ha evolucionado múltiples veces y rápidamente, incluso a pesar del potencial efecto de homogenización de la divergencia por el flujo genético. Esto sugiere que las presiones selectivas del ambiente subterráneo deben ser altas para que el troglomorfismo evolucione como resultado adaptativo a pesar de la inmigración de individuos epigeos (Cartwright, 2017). Recientemente, un estudio encontró que la pérdida de los ojos en *Astyanax mexicanus* estaría relacionada con metilación de ADN en los genes del desarrollo de los ojos relacionados con la pérdida de los mismos (Gore et al., 2017). El silenciamiento de dichos genes por efectos epigenéticos sería responsable de la atrofia de los ojos, sumado a que no se han encontrado mutaciones de inactivación en estos genes (Gore et al., 2017). En contraste, en otro organismo adaptado al ambiente subterráneo como la rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*), sí se ha encontrado pérdida de función por mutaciones de inactivación en varios genes relacionados con la pérdida de los ojos (Gore et al., 2017). La plasticidad fenotípica y epigenética podrían conducir a la pérdida de los ojos en poblaciones troglobias que han divergido relativamente hace poco tiempo, como *Astyanax mexicanus* (hace 1

a 5 millones de años). En contraste, con suficiente tiempo podrían aparecer y fijarse mutaciones en genes implicados como en el caso de la rata topo desnuda, la cual a diferencia de *Astyanax mexicanus*, divergió hace 73 millones de años (Gore et al., 2017). No existen estudios sobre la edad de las cuevas santandereanas, pero sabemos que la mayor diversificación de los trichomyctéridos está relacionada con eventos geológicos durante el Mioceno. *T. sandovali* parece que divergió del ancestro compartido con *T. knerii* hacia finales del Mioceno, hace 11.15 millones de años aproximadamente (Ochoa et al., 2017). Posteriores estudios filogeográficos con datos moleculares adicionales permitirían conocer mejor las relaciones filogenéticas de las diferentes poblaciones hipogeas y epigeas en Santander, así como estimar tiempos de divergencia y flujo genético.

Los datos utilizados en este estudio no mostraron una diferenciación genética entre las poblaciones hipogeas y epigeas, con la cual pudiese relacionar la cantidad de divergencia genética con la cantidad de divergencia fenotípica relacionada con el troglomorfismo. Sin embargo, logré observar que las poblaciones hipogeas con mayor troglomorfismo, como las de *T. sandovali* de la cueva La Alsacia y EL Nitro, las cuales presentan individuos con pérdida completa de ojos y pigmentación, se encontraban mucho más alejadas de la entrada de la cueva (>100 m) y en cuerpos de agua pequeños, lénticos y presentaban un tamaño poblacional aparentemente menor. En contraste, los peces de la cueva de La Vaca en Curití, la cueva El Berraco en Guadalupe y las dos cuevas de la Mesa de los Santos, que no presentan rasgos troglomórficos, se caracterizaban por ser poblaciones mucho más grandes, se encontraban en cuerpos de agua lóticos y se podían encontrar muy cerca de la entrada de la cueva (<10 m). Una población hipogea en un estado “intermedio” en el troglomorfismo es la de la cueva El Ojo de Agua en Guapotá, que presenta despigmentación y una reducción parcial de los ojos. Los peces en esta localidad se encuentran en corrientes de agua

pequeñas y lólicas, más retiradas de la entrada que en las anteriores poblaciones (> 10 m), pero no tan alejadas como en las de Zapatoca. Futuros estudios en los cuales se cuantifique de forma precisa diferentes variables ambientales de cada cueva permitirían investigar si existe un efecto del ambiente en la variación encontrada en el troglomorfo de las lauchas de Santander.

## 5.2 Consideraciones taxonómicas y de conservación

*Trichomycterus uisae* ha sido descrita con base en evidencia morfológica como una especie troglobia restringida a la cueva El Misterio en la Mesa de los Santos, aunque no existen comparaciones morfológicas o genéticas con individuos de poblaciones epigeas cercanas (Castellanos-Morales, 2008). No logré encontrar la localidad tipo de dicha especie, pero muestreé poblaciones hipogeas de otras cuevas relativamente cercanas a la localidad tipo de *T. uisae* (según la información proporcionada en Castellanos-Morales, 2008). Hice comparaciones de la descripción y de la morfología externa de los especímenes recolectados con los paratipos de *T. uisae* depositados en la Colección de Peces de Agua Dulce del Instituto Alexander von Humboldt (IAvH-P 10806) y no encontré diferencia alguna en su morfología externa y merística. Además, teniendo en cuenta que han sido recolectados en diferentes drenajes de la misma cuenca (cuenca superior del río Sogamoso), decidí identificar inicialmente dichos especímenes como *T. uisae*. Sin embargo, los individuos identificados como *T. uisae* son muy similares a especímenes de *T. sandovali* recolectados en Zapatoca, lo que concuerda con los resultados donde se evidencia que no hay diferenciación genética entre las poblaciones de *T. uisae* y *T. sandovali*. Geográficamente ambas poblaciones pertenecen a la cuenca del río Sogamoso, lo que podría indicar que no existe una barrera geográfica al flujo genético. Por lo tanto, los resultados sugieren que *T. uisae* podría constituir un sinónimo más moderno de *T. sandovali*. Lo anterior podría probarse con posteriores estudios aumentando la cantidad de datos moleculares.

Encontré que las poblaciones hipogeas (incluyendo las troglobias), de *T. sandovali* no se diferencian genéticamente (con respecto al marcador usado), de las poblaciones epigeas cercanas, lo que podría indicar que dichas poblaciones pertenecen a la misma especie. De probarse lo anterior teniendo en cuenta más datos moleculares, tanto mitocondriales como nucleares, *T. sandovali* debería ser redescrita como una especie con amplia distribución, con subpoblaciones epigeas e hipogeas-troglobias, que incluye a las poblaciones de la Mesa de los Santos (*Trichomycerus uisae*), Curití, Guapotá y Guadalupe, ya que estas últimas poblaciones según los resultados, se muestran como linajes muy estrechamente relacionados con *T. sandovali*, donde la diferenciación es debida a una o dos substituciones. Además, su morfología externa es muy similar y hacen parte de la misma cuenca hidrográfica, que comprende los ríos Sogamoso, Suárez y Chicamocha.

No fue posible incluir a *Trichomycerus latistriatus* en el análisis ya que no se encontraron poblaciones en su localidad tipo. Sin embargo, al revisar y comparar la morfología externa y merística de especímenes de *T. latistriatus* y *T. sandovali*, junto con su distribución (ambas especies se distribuyen en la cuenca de los ríos Suárez, Sogamoso y Chicamocha), es probable que se trate de la misma especie. Futuros análisis, incluyendo especímenes de *T. latistriatus* permitirán probar dicha hipótesis.

Una de las especies de *Trichomycerus* restringidas a cueva que puede encontrarse extinta es *T. santanderensis* (Castellanos-Morales, 2007), la cual no pude encontrar en la Cueva El Puente en Lebrija, Santander (localidad tipo). En el interior de la cueva encontré desechos antrópicos; en la microcuenca que drena a la cueva observé cambios recientes de uso de suelo de sistemas agroforestales (cafetales y cacaotales) hacia potreros para ganadería. No se si la actividad antropogénica alrededor de la cueva habría causado una disminución y potencialmente la extinción de la población. Se requieren futuras visitas a la localidad tipo para confirmar el estado de *T.*

*santanderensis* y hacer exploraciones en búsqueda de otras entradas al sistema subterráneo con el fin de encontrar poblaciones hipogeas. También se requiere hacer recolecciones de poblaciones epigeas cercanas, todo esto con el fin de confirmar el estado de conservación de dicha especie, su taxonomía y su posición filogenética.

Encontré que el individuo (*01\_QI*), se muestra como un linaje hermano de *T. ruitoquensis*. Éste se diferencia por la presencia de cinco sustituciones, además, el patrón de manchado dorsal es irregular con respecto a *T. ruitoquensis*. Recientemente, Ardila-Rodríguez (2017) describió *Trichomycterus betuliaensis* y *T. mogotensis* para el departamento de Santander. Comparando las descripciones se encontró que es posible que la secuencia *01\_QI* se trate de un individuo de la nueva especie *T. betuliensis*. Se requieren hacer estudios comparativos con datos morfológicos y genéticos, con más individuos de este morfotipo, para probar si efectivamente se trata de esta especie.

*Trichomycterus sandovali* es considerada una especie vulnerable debido a su distribución restringida y reducida a cueva (Ardila-Rodríguez, 2012). Aunque los resultados sugieren que *T. sandovali* podría ser una especie con una más amplia distribución tanto en superficie como en diferentes cuevas, la población troglobia de *T. sandovali* de las cuevas La Alsacia y El Nitro, efectivamente podría ser vulnerable debido a su pequeño tamaño. Estudios han encontrado que las poblaciones de peces hipogeos poseen una menor diversidad genética como consecuencia de sus pequeñas poblaciones como resultado de una menor disponibilidad de espacio y alimento (Juan et al., 2010). Sin embargo, teniendo en cuenta que no hay estudios de las cuevas santandereanas y lo complejo que puede ser el paisaje cárstico, es posible que las poblaciones hipogeas se encuentren subestimadas y mal muestreadas, debido a la complejidad y la dificultad de acceder a todo el sistema cárstico (Day et al., 2014). Estudios en peces (*Typhlichthys subterraneus*) y cangrejos de

agua dulce (Cambaridae), han demostrado que las cuevas no siempre son un callejón sin salida evolutivo, sino que organismos troglobios pueden mostrar una diversidad similar a organismos de superficie y mantener linajes a través del tiempo (Stern et al., 2017; Niemiller et al., 2012).

## 6. Conclusiones

Se evidencia que las lauchas santandereanas han colonizado múltiples veces el ambiente hipogeo del departamento.

El troglomorfo ha evolucionado de manera independiente en la especie troglobia *Trichomycterus rosablanca* y más de una vez dentro de *Trichomycterus sandovali*.

*Trichomycterus sandovali* podría no ser una especie restringida al ambiente subterráneo de Zapatoca sino que presentaría poblaciones hipogreas y epigreas a través de las cuencas de los ríos Chicamocha, Suárez y Sogamoso. Las poblaciones hipogreas de *Trichomycterus sandovali* comprenden las localidades de La Mesa de los Santos, Zapatoca, Curití, Guapotá y Guadalupe.

No se encontró diferencias genéticas con el marcador utilizado entre *Trichomycterus uisae* y *Trichomycterus sandovali*.

### Referencias

- Ardila-Rodríguez, C. A. (2006). *Trichomycterus sandovali*, (Siluriformes, Trichomycteridae) una nueva especie de pez cavernícola para el departamento de Santander-Colombia. *Peces del departamento de Santander*, 2, 1-16.
- Ardila-Rodríguez, C. A. (2007). *Trichomycterus ruitoquensis*, (Siluriformes, Trichomycteridae) una nueva especie de pez de la cuenca alta del río Lebrija, departamento de Santander, Colombia. *Peces del departamento de Santander* 3, 1-16.
- Ardila-Rodríguez. (2012). *Trichomycterus sandovali*. En Mojica, J. I., J. S. Usma, R. Álvarez-León y C. A. Lasso (Ed), *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012* (pp. 139). Bogotá, Colombia: Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales.
- Arendt, J., y Reznick, D. (2008). Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Trends in ecology & evolution*, 23(1), 26-32. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.011>
- Behrmann-Godel, J., Nolte, A. W., Kreiselmaier, J., Berka, R., y Freyhof, J. (2017). The first European cave fish. *Current Biology*, 27(7), 257-258. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.048>
- Bichuette, M. E., y Rizzato, P. P. (2012). A new species of cave catfish from Brazil, *Trichomycterus rubbioli* sp. n., from Serra do Ramalho karstic area, São Francisco River basin, Bahia State (Siluriformes: Trichomycteridae). *Zootaxa*, 3480(1), 48-66.
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F. J., Esquivel-Bobadilla, S., y Borowsky, R. L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC evolutionary biology*, 12(1), 9. Recuperado de <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-9>
- Cartwright, R. A., Schwartz, R. S., Merry, A. L., y Howell, M. M. (2017). The importance of selection in the evolution of blindness in cavefish. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 45.
- Castellanos-Morales, C. A. (2007). *Trichomycterus santanderensis*: A new species of troglomorphic catfish (Siluriformes, Trichomycteridae) from Colombia. *Zootaxa*, 1541(1), 49-55. Recuperado de <https://doi.org/10.11646/%x>
- Castellanos-Morales, C. A. (2008). *Trichomycterus uisae*: a new species of hypogean catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from the northeastern Andean Cordillera of Colombia. *Neotropical Ichthyology*, 6(3), 307-314. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000300003>

- Castellanos-Morales, C. A. (2010). *Trichomycterus sketi*: a new species of subterranean catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from the Andean Cordillera of Colombia. *Biota Colombiana*, 11(1), 33–41.  
Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49120969004>
- Castellanos-Morales, C. A., y Galvis, F. (2012). Species from the *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae) genus in Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 16(1), 194-206.
- Castellanos-Morales, C. A., Moreno, F., Malagón, L. M., Arango, Á. J., Pardo, D. D., y Méndez, M. A. (2015). Aportes al conocimiento y uso de los ecosistemas subterráneos del municipio de La Paz (Santander). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 19(2), 173-185.
- Chakrabarty, P., Davis, M. P., y Sparks, J. S. (2012). The first record of a trans-oceanic sister-group relationship between obligate vertebrate troglobites. *PLoS One*, 7(8), e44083.
- Christiansen, K. (2012). *Morphological adaptations*. En Culver, D. C., y White, W. B. (Eds.), *Encyclopedia of Caves* (pp. 517-528). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012383832200075X>
- Christin, P. A., Weinreich, D. M., y Besnard, G. (2010). Causes and evolutionary significance of genetic convergence. *Trends in Genetics*, 26(9), 400-405. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.06.005>
- Colosimo, P. F., Hosemann, K. E., Balabhadra, S., Villarreal, G., Dickson, M., Grimwood, J., ... y Kingsley, D. M. (2005). Widespread parallel evolution in sticklebacks by repeated fixation of ectodysplasin alleles. *Science*, 307(5717), 1928-1933. Recuperado de <https://doi.org/10.1126/science.1107239>
- Culver, D. C., & Pipan, T. (2009), *The biology of caves and other subterranean habitats*, Oxford, England: Oxford University Press.
- Day, J. L., Starkey, D. E., Adams, G., Brummett, S., y Keeney, D. (2014). Population genetics of grotto sculpin (*Cottus specus*), a new cave-adapted fish species. *Environmental biology of fishes*, 97(12), 1305-1315.
- DoNascimento, C., Prada-Pedrerros, S., y Guerrero-Kommritz, J. (2014). A new catfish species of the genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae) from the río Orinoco versant of Páramo de Cruz Verde, Eastern Cordillera of Colombia. *Neotropical Ichthyology*, 12(4), 717-728. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140005>

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Espinasa, L., y Borowsky, R. B. (2001). Origins and relationship of cave populations of the blind Mexican tetra, *Astyanax fasciatus*, in the Sierra de El Abra. *Environmental Biology of Fishes*, 62(1-3), 233-237. Recuperado de [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-015-9795-1\\_19](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-015-9795-1_19)
- Espinasa, L., Espinasa, M., Keene, A., Yoshizawa, M., y McGaugh, S. E. (2015). Hydrogeology of caves in the Sierra de El Abra region. En Keene, A., Yoshizawa, M., y McGaugh, S. E. *Biology and evolution of the Mexican cavefish* (pp. 41-57). Amsterdam, Netherland: Elsevier.
- Fernández, L., y Schaefer, S. A. (2005). New *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae) from an offshore island of Colombia. *Copeia*, 2005(1), 68-76.
- Gore, A., Tomins, K., Iben, J., Ma, L., Castranova, D., Davis, A., Davis, A., Parkhurst, A., Jeffery, W., y Weinstein, B. (2017). An epigenetic mechanism for cavefish eye degeneration. *bioRxiv*, 199018.
- Gross, J. B. (2012). The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 105. Recuperado de <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-105>
- Gross, J. B., Meyer, B., y Perkins, M. (2015). The rise of *Astyanax* cavefish. *Developmental Dynamics*, 244(9), 1031-1038. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.24253>
- Huelsenbeck, J. P., y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Jeffery, W. R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental biology*, 231(1), 1-12. Recuperado de <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0121>
- Jeffery, W. R. (2009). Evolution and development in the cavefish *Astyanax*. *Current topics in developmental biology*, 86(1), 191-221. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)01008-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)01008-4)
- Jeffery, W. R., Strickler, A. G., y Yamamoto, Y. (2003). To see or not to see: evolution of eye degeneration in Mexican blind cavefish. *Integrative and Comparative Biology*, 43(4), 531-541. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/icb/43.4.531>

- Juan, C., Guzik, M. T., Jaume, D., y Cooper, S. J. (2010). Evolution in caves: Darwin's 'wrecks of ancient life' in the molecular era. *Molecular Ecology*, 19(18), 3865-3880. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04759.x>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Aston, B., Meintjes, P., y Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Krishnan, J., y Rohner, N. (2017). Cavefish and the basis for eye loss. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 372(1713), 20150487. Recuperado de <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0487>
- Kirby, R. F., Thompsom, K. W., y Hubbs, C. L. (1977). Karyotypic similarities between the Mexican and blind tetras. *Copeia*, 1977(3): 578-580
- Kirchner, S., Sattmann, H., Haring, E., Plan, L., Victor, R., y Kruckenhauser, L. (2017). Investigating gene flow between the blind cavefish *Garra barreimiae* and its conspecific surface populations. *Scientific Reports*, 7(1), 5130.
- Lamoreux, J. (2004). Stygobites are more wide-ranging than troglobites. *Journal of Cave and Karst Studies*, 66(1), 18-19.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., y Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Leys, R., Watts, C. H., Cooper, S. J., y Humphreys, W. F. (2003). Evolution of subterranean diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae: Hydroporini, Bidessini) in the arid zone of Australia. *Evolution*, 57(12), 2819-2834. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01523.x>
- Losos, J. B. (2011). Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution*, 65(7), 1827-1840. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01289.x>
- Merilä, J. (2013). Nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*): an emerging model for evolutionary biology research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1289(1), 18-35. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/nyas.12089>
- Muñoz-Saba, Y. del S., González-Sánchez, I., Calvo-Roa, N., Federación Espeleológica de América Latina y el Caribe (FEALC), y Asociación Espeleológica Colombiana (Especol) (Eds.). (2013). *Cavernas de Santander, Colombia: guía de campo*, Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Geociencias.

- Niemiller, M. L., Fitzpatrick, B. M., y Miller, B. T. (2008). Recent divergence with gene flow in Tennessee cave salamanders (Plethodontidae: Gyrinophilus) inferred from gene genealogies. *Molecular ecology*, 17(9), 2258-2275.
- Niemiller, M. L., Near, T. J., y Fitzpatrick, B. M. (2012). Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). *Evolution*, 66(3), 846-866.
- Ochoa, L. E., Roxo, F. F., DoNascimento, C., Sabaj, M. H., Datovo, A., Alfaro, M., y Oliveira, C. (2017). Multilocus analysis of the catfish family Trichomycteridae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes) supporting a monophyletic Trichomycterinae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 115, 71-81. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.007>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., y Suchard, M. (2007). Tracer v1. 6 <http://beast.bio.ed.ac.uk>. Tracer (visited on 2017-06-12).
- Reznick, D. N., Mateos, M., y Springer, M. S. (2002). Independent origins and rapid evolution of the placenta in the fish genus Poeciliopsis. *Science*, 298(5595), 1018-1020. Recuperado de <https://doi.org/10.1126/science.1076018>
- Reznick, D. y Travis, J. (1996). *The empirical study of adaptation in natural populations*. En Rose, M. R. y Lauder, G.V. *Adaptation* (pp. 243-289), San Diego, USA: Academic Press
- Rivera, M. A. J., Howarth, F. G., Taiti, S., y Roderick, G. K. (2002). Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods (Oniscidea: Philosciidae): vicariant speciation or adaptive shifts?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(1), 1-9. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00353-6](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00353-6)
- Román-Valencia, C. (2001). Ecología trófica y reproductiva de *Trichomycterus caliense* y *Astroblepus cyclopus* (Pisces: Siluriformes) en el río Quindío, Alto Cauca, Colombia. *Revista de biología tropical*, 49(2), 657-666. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442001000200025](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442001000200025)
- Romero, A. 2011. The Evolution of Cave Life. *American Scientist*, 99(1), 144-155. Recuperado de <https://doi.org/10.1511/2011.89.144>
- Schilthuisen, M., Cabanban, A. S., y Haase, M. (2005). Possible speciation with gene flow in tropical cave snails. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43(2), 133-138. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2004.00289.x>
- Speed, M. P., y Arbuckle, K. (2016). Quantification provides a conceptual basis for convergent evolution. *Biological Reviews*, 92(2), 815-829. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/brv.12257>

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stayton, C. T. (2015). The definition, recognition, and interpretation of convergent evolution, and two new measures for quantifying and assessing the significance of convergence. *Evolution*, 69(8), 2140-2153. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/evo.12729>
- Stayton, C. T. (2015). What does convergent evolution mean? The interpretation of convergence and its implications in the search for limits to evolution. *Interface focus*, 5(6), 20150039. Recuperado de <https://doi.org/10.1098/rsfs.2015.0039>
- Stern, D. B., Breinholt, J., Pedraza-Lara, C., López-Mejía, M., Owen, C. L., Bracken-Grissom, H., Fetzner Jr, J.W., y Crandall, K. A. (2017). Phylogenetic evidence from freshwater crayfishes that cave adaptation is not an evolutionary dead-end. *Evolution*, 71(10), 2522-2532.
- Strecker, U., Hausdorf, B., y Wilkens, H. (2012). Parallel speciation in *Astyanax* cave fish (Teleostei) in Northern Mexico. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(1), 62-70. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.005>
- Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., y Hardman, M. (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(3), 636-662. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.044>
- Trajano, E. (2001). Ecology of subterranean fishes: an overview. *Environmental Biology of Fishes*, 62(1-3), 133-160. Recuperado de <https://doi.org/10.1023/A:1011841913569>
- Trajano, E., Bichuette, M. E., & Kapoor, B. G. (Eds.). (2010). *Biology of subterranean fishes*. CRC Press.
- Trontelj, P., Blejec, A., y Fišer, C. (2012). Ecomorphological convergence of cave communities. *Evolution*, 66(12), 3852-3865. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01734.x>
- Ward, R. D., Zemplak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., y Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857. Recuperado de <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Wiens, J. J., Chippindale, P. T., & Hillis, D. M. (2003). When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders. *Systematic Biology*, 52(4), 501-514.

Wilcox, T. P., de León, F. G., Hendrickson, D. A., y Hillis, D. M. (2004). Convergence among cave catfishes: long-branch attraction and a Bayesian relative rates test. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(3), 1101-1113. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.11.006>

## Apéndices

## Apéndice A. Muestreo taxonómico y secuencias utilizadas en el análisis.

Familia-subfamilia	Especie/secuencia	N. de Colección	País	Drenaje/localidad	COI (pb)	N. de Genbank	Estudio
<i>Grupo externo</i>							
Nematogenyidae	<i>Nematogenys inermis</i>	-	Chile	Concepción	522	KY857952	Ochoa et al. 2017
Copionodontinae	<i>Copionodon pecten</i>	-	Brasil	Paraguaçu (Atlántico)	522	KY857929	Ochoa et al. 2017
Trichogeninae	<i>Trichogenes longipinnis</i>	-	Brasil	Camburi (Atlántico)	522	KY857961	Ochoa et al. 2017
<i>Grupo interno (Trichomycterinae)</i>							
Clado D1	<i>Eremophilus mutisii</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY857931	Ochoa et al. 2017
	<i>Trichomycterus sandovali</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY857985	Ochoa et al. 2017
	<i>T. cf. knerii</i>	-	Colombia	Meta (Orinoco)	522	KY857987	Ochoa et al. 2017
	<i>T. punctulatus</i>	-	Perú	Pisco (Pacífico)	522	KY857983	Ochoa et al. 2017
Clado D2	<i>T. transandianus</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY858007	Ochoa et al. 2017
	<i>T. ruitoquensis</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY857984	Ochoa et al. 2017
	<i>T. stramineus</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY858006	Ochoa et al. 2017
	<i>T. striatus</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY858003	Ochoa et al. 2017
	<i>T. banneaui</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY857968	Ochoa et al. 2017
	<i>T. cachiraensis</i>	-	Colombia	Magdalena	522	KY857971	Ochoa et al. 2017
	<i>T. guianensis</i>	-	Guyana	Potaro (Essequibo)	522	KY857974	Ochoa et al. 2017
	<i>T. spilosoma</i>	-	Ecuador	Pacífico	522	KY857942	Ochoa et al. 2017
Clado E	<i>Bullockia maldonadoi</i>	-	Chile	Biobío (Pacífico)	522	KY857926	Ochoa et al. 2017
	<i>T. areolatus</i>	-	Chile	Paicavi (Pacífico)	522	KY857963	Ochoa et al. 2017
Clado D3	<i>Ituglanis goya</i>	-	Brasil	das Brancas (Tocantins)	522	KY858000	Ochoa et al. 2017
	<i>I. cf. ramiroi</i>	-	Brasil	Paraná (Tocantins)	522	KY857998	Ochoa et al. 2017
	<i>I. eichhorniarum</i>	-	Brasil	Paraguay (Paraná)	522	KY857939	Ochoa et al. 2017

Clado D4	<i>Scleronema minutum</i>	-	Brasil	Laguna dos Patos (Atlántico)	522	KY857957	Ochoa et al. 2017
	<i>S. angustirostre</i>	-	Brasil	Laguna dos Patos (Atlántico)	522	KY857962	Ochoa et al. 2017
	<i>T. diatropoporos</i>	-	Brasil	Jacuí (Laguna dos Patos)	522	KY857996	Ochoa et al. 2017
	<i>T. zonatus</i>	-	Brasil	Ribeira de Iguape (Atlántico)	516	KY857986	Ochoa et al. 2017
	<i>T. davisi</i>	-	Brasil	Parapanema (Paraná)	522	KY857988	Ochoa et al. 2017
Clado D5	<i>T. itatiayae</i>	-	Brasil	Paraíba do Sul (Atlántico)	522	KY857977	Ochoa et al. 2017
	<i>T. pyratimbara</i>	-	Brasil	Grande (Paraná)	522	KY857970	Ochoa et al. 2017
	<i>T. reinhardti</i>	-	Brasil	Paraopeba (São Francisco)	522	KY857997	Ochoa et al. 2017
	<i>*T. rosablanca (_CS)</i>	IAvH-P 16086	Colombia	Cueva Las Sardinias, Peñón	522	-	Mesa et al. 2018
	<i>* T. sp (AvionesC_IAVH)</i>	-	Colombia	Cueva Los Aviones, Guadalupe	522	-	IAVH-Colombia
	<i>01_QI</i>	MT2016051408	Colombia	Quebrada la Iglesia, B/manga	522	-	Este estudio
	<i>02_QI</i>	MT2016051402	Colombia	Quebrada la Iglesia, B/manga	522	-	Este estudio
	<i>03_QI</i>	MT2016051401	Colombia	Quebrada la Iglesia, B/manga	522	-	Este estudio
	<i>04_QI</i>	MT2016051406	Colombia	Quebrada la Iglesia, B/manga	522	-	Este estudio
	<i>05_QI</i>	MT2016051501	Colombia	Quebrada la Iglesia, B/manga	522	-	Este estudio
	<i>435_CAc</i>	JF2017080607	Colombia	Cueva Acuerela, Los Santos	522	-	Este estudio
	<i>433_CAc_RI</i>	JF2017080610	Colombia	Cueva Acuerela, Los Santos	424	-	Este estudio
	<i>431_CAc_RI</i>	JF2017080608	Colombia	Cueva Acuerela, Los Santos	522	-	Este estudio
	<i>430_CP</i>	JF2017072202	Colombia	Cueva Petroglifos, Los Santos	522	-	Este estudio
	<i>429_CP</i>	JF2017072203	Colombia	Cueva Petroglifos, Los Santos	522	-	Este estudio
	<i>428_CP</i>	JF2017072205	Colombia	Cueva Petroglifos, Los Santos	522	-	Este estudio
	<i>427_CP</i>	JF2017072204	Colombia	Cueva Petroglifos, Los Santos	522	-	Este estudio
	<i>426_CV_FI</i>	JF2017083025G	Colombia	Cueva de la Vaca, Curití	522	-	Este estudio
	<i>425_CV_FI</i>	JF2017083024	Colombia	Cueva de la Vaca, Curití	522	-	Este estudio
	<i>422_CV</i>	JF2017083022	Colombia	Cueva de la Vaca, Curití	522	-	Este estudio
	<i>421_COa</i>	JF2017102406	Colombia	Cueva Ojo de Agua, Guapotá	522	-	Este estudio
	<i>420_COa</i>	JF2017102405	Colombia	Cueva Ojo de Agua, Guapotá	522	-	Este estudio
	<i>417_COa</i>	JF2017102402	Colombia	Cueva Ojo de Agua, Guapotá	522	-	Este estudio
	<i>416_CB</i>	JF2017102201	Colombia	Cueva el Berraco, Guadalupe	522	-	Este estudio
	<i>414_CB_RI</i>	JF2017102203	Colombia	Cueva el Berraco, Guadalupe	522	-	Este estudio

<i>411_QC</i>	JF2017102206	Colombia	Quebrada la Coca, Guadalupe	522	-	Este estudio
<i>413_QC_RI</i>	JF2017102207	Colombia	Quebrada la Coca, Guadalupe	485	-	Este estudio
<i>410_QC</i>	JF2017102204	Colombia	Quebrada la Coca, Guadalupe	522	-	Este estudio
<i>409_QU_F1</i>	JF2017081316	Colombia	Quebrada la Uchuval, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>408_QU_S</i>	JF2017081315	Colombia	Quebrada la Uchuval, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>404_CA</i>	JF2017081320	Colombia	Cueva La Alsacia, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>403_CA</i>	JF2017081319	Colombia	Cueva La Alsacia, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>402_CA_F1</i>	JF2017081318	Colombia	Cueva La Alsacia, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>06_CN</i>	MT2016101403	Colombia	Cueva del Nitro, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>07_CN_F1</i>	MT2016101404	Colombia	Cueva del Nitro, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>08_CN</i>	MT2016101402	Colombia	Cueva del Nitro, Zapatoca	479	-	Este estudio
<i>09_CN</i>	MT2016101402	Colombia	Cueva del Nitro, Zapatoca	522	-	Este estudio
<i>10_CN_F1</i>	MT2016101401	Colombia	Cueva del Nitro, Zapatoca	522	-	Este estudio

---

## Apéndice B. Método de extracción de ADN utilizado.

1. Ponga la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5mL con 300  $\mu$ L de Buffer de extracción (ATL).
2. Agregue 8  $\mu$ L de proteinasa K (~ 20mg/mL), posteriormente vortex.
3. Incubar a 65°C de 1 a 8 horas.
4. En cámara de flujo, agregue 300 mL de FCIA (Fenol-Cloroformo-Isoamil Alcohol 25:24:1), posteriormente vortex.
5. Centrifugue a 13000rpm por 5 min.
6. Transfiera la fase acuosa (superior) a un tubo Eppendorf de 1.5mL nuevo.
7. Agregue 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>Odd.
8. En cámara de flujo, agregue 300uL de CIA (Cloroformo-Isoamil Alcohol 24:1), posteriormente vortex.
9. Centrifugue a 13000rpm por 5 min.
10. Transfiera la fase acuosa (superior) a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo (final).
11. Agregue 800  $\mu$ L de etanol a 98% frío (< 4°C), posteriormente agite suavemente y deje 1 hora en frío (< 20°C).
12. Centrifugue a 13000rpm por 15 min.
13. Descarte el etanol.
14. Agregue 500  $\mu$ L de etanol al 70% frío (<4°C). No se agita.
15. Centrifugue a 13000rpm por 15 min.
16. Descarte el etanol.
17. Deje secar.
18. Resuspenda en H<sub>2</sub>Odd (entre 50 y 100 $\mu$ L) y deje una hora a temperatura ambiente.
19. Guarde a 4°C por toda la noche antes de utilizar el ADN en otros procedimientos.

Apéndice C. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de Máxima verosimilitud (ML).

Valores en los nodos corresponde a soporte de *bootstrap*.

