

DIVERSIDAD DE VERTEBRADOS EN ECOSISTEMAS SUBTERRÁNEOS DE COLOMBIA A PARTIR DE ANÁLISIS DE ADN AMBIENTAL

DIVERSITY OF VERTEBRATES IN UNDERGROUND ECOSYSTEMS OF COLOMBIA FROM ENVIRONMENTAL DNA ANALYSIS

SUSANA CABALLERO¹; DANIELA MARTINELLI¹; CARLOS A. LASSO²

¹LABORATORIO DE ECOLOGÍA MOLECULAR DE VERTEBRADOS ACUÁTICOS (LEMVA)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

²INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT

RESUMEN

Colombia cuenta con una enorme diversidad de especies y ecosistemas, dentro de los cuales se encuentran los ecosistemas subterráneos representados por cuevas, cavernas, simas, grutas y abrigos rocosos. La fauna y las interacciones ecológicas que albergan estos ecosistemas han sido pobremente estudiadas. Las condiciones extremas de luz, humedad relativa, y flujos de materia y energía, generan escenarios evolutivos y adaptativos únicos para dichos organismos. Este estudio utilizó el ADN ambiental (ADN liberado al medio a partir de diversos procesos biológicos como la excreción o recambio de células) y la técnica de “Metabarcoding” para conocer la diversidad de vertebrados presentes en estos ecosistemas. Se colectaron y filtraron muestras de agua en 12 cuevas y cavernas en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Santander, Boyacá y Amazonas. Se extrajo ADN total, amplificando y secuenciando la región 12s mediante secuenciación masiva por el sistema Hi Seq de Illumina. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con bases de datos libres para realizar la identificación a nivel de género y especie. Se encontró representación de todas las clases de vertebrados en la mayoría (90%) de las localidades muestreadas, con un total de 60 géneros. En la localidad amazónica solo se reportaron mamíferos (murciélagos) y aves (Capromulgiformes-guácharos). La diversidad Alpha más alta ($\text{expShannon}=15.8$) se detectó en la gruta de La Cascada (entrada y caída del salto de agua) en el departamento de Boyacá, caracterizada por géneros de aves como *Anas*, *Spizaetus* y *Columba*, así como murciélagos (*Carollia*), roedores (*Rhipidomys*) y peces (*Bryconamericus*). La diversidad Alpha más baja ($\text{expShannon}=2.1$) se detectó en las cuevas la Tronera y Sardinas (partes profundas) en el departamento de Santander, donde se encontró únicamente el género de murciélagos *Myotis*. La diversidad beta (reportada en disimilaridad de Bray Curtis) sugirió que la cueva amazónica fue las más disímil, mientras que las cuevas de la región andina fueron las más similares en cuanto a la composición de géneros. Este es el primer estudio de este tipo que se realiza en el país y sus resultados prometedores sugieren que esta técnica puede ser de gran utilidad para conocer la diversidad en estos ecosistemas en el país.

Palabras clave: ADN ambiental, cavernas, Colombia, ecosistemas subterráneos, estigobiota, vertebrados.

INTRODUCCION

Colombia cuenta con una enorme diversidad de especies y ecosistemas, entre los cuales destacan los ecosistemas subterráneos (cuevas, cavernas, grutas, simas y abrigos rocosos) (Muñoz-Saba & Lasso 2021). En general, estos se pueden clasificar en cuatro grandes grupos de acuerdo con su tipo de formación, origen geológico y biogeográfico (Muñoz-Saba & Lasso 2021): 1) karst; 2) pseudokarts; 3) sufusión o piping y 4) antropogénicos. Los karst o carst incluyen a las cuevas clásicas de caliza de los Andes colombianos y las marinas o anquihalinas, y a las del Archipiélago de San Andrés y Providencia. Las pseudokársticas por su parte se refieren a las cuevas cuarcíticas del Amazonas y Orinoquia (serranías de La Lindosa, Macarena, Chiribiquete y Formación Araracuara).

La colonización de estos ecosistemas subterráneos ha ocurrido de forma independiente en los diferentes grupos de animales (White & Culver, 2012). Las condiciones particulares de estos ecosistemas hipogeos como la ausencia total de luz, alta humedad, temperatura bastante estable y una limitación importante de nutrientes y alimento, ha dado lugar a modificaciones características de grupos faunísticos filogenéticamente distantes, ideales para estudios evolutivos (Mammola & Isaia, 2017). La clasificación ecológico-evolutiva de los organismos subterráneos según la clasificación de Schiner-Racovitza de 1907 (Trajano & Bichuette 2006) reconoce tres categorías (Trajano & Bichuette, 2006): troglobios (especies restringidas al medio subterráneo, en general con adaptaciones al aislamiento o troglomorfismos); troglófilos o cavernícolas facultativos (capaces de completar su ciclo de vida tanto en el medio subterráneo como epigeo); y troglóxenos (necesitan volver al sistema epigeo para completar su ciclo de vida). También hay especies que ocasionalmente pueden encontrarse en las cuevas o cavernas, que pueden entrar “voluntariamente” o ser arrastradas por las corrientes de agua, ellas mismas o parte de su ADN (Ruppert et al., 2019). Las especies estrictamente acuáticas de ambientes subterráneos se denominan estigobias (Trajano & Bichuette 2006). En Colombia los estudios bioespeleológicos cuentan apenas con una línea base de información muy reducida (Muñoz-Saba et al., 1998, 2013; Angarita Sierra, 2018; Angarita-Sierra et al., 2019) y están circunscritos en su mayoría a la región andina (Dulcey-Ulloa & Lasso 2018, Lasso et al. 2019).

El estudio integral de la biodiversidad cavernícola como un todo, requiere de numerosos especialistas, presupuesto elevado y técnicas específicas objeto de un gran esfuerzo, como ocurre en otros medios terrestres y acuáticos superficiales (Beng & Corlett 2020). Frente a este reto, el estudio del ADN Ambiental (metabarcoding), surge como herramienta fundamental (Ruppert et al.

2019), y se considera una técnica novedosa que permite realizar “monitoreos” rápidos de la biodiversidad (Deiner et al. 2017). Todos los organismos al estar en interacción constante con el ambiente liberan moléculas de ADN a su entorno (suelo, agua o aire) de manera continua a través de la piel, escamas, moco, saliva, secreciones, orina, heces, sangre, etc. (Li et al. 2020). En ambientes acuáticos, esta huella genética de ADN permanece en el agua por un periodo determinado de tiempo (Bakker et al. 2017), haciendo posible que en ambientes cavernícolas o subterráneos con condicionales físicas o abióticas estables y ausencia de radiación UV, se conserve aun por periodos prolongados.

Este material genético presente en el agua puede ser colectado, extraído, amplificado y comparado con bases de datos genéticas, para así revelar la composición de especies (fauna y/o flora) de un hábitat en particular (Tillotson et al., 2018). Todos los organismos subterráneos que formen parte de la estigobiota o no, interactúan con los ríos subterráneos que recorren las cavernas. Como consecuencia se convierten en una fuente de información de la vida allí existente. También, las corrientes de agua pueden arrastrar consigo muestra de ADN de especies de origen epigeo que interactúan con el medio acuático en el exterior.

El objetivo de este trabajo fue describir por primera vez la biodiversidad de vertebrados acuáticos (estigofauna) y terrestres, sea troglobia, troglófila, troglóxena e incluso accidental en Colombia. Mediante técnicas de metabarcoding comparamos el ADN ambiental de los ecosistemas subterráneos con los sistemas tradicionales de estudios y muestreos previos en ecosistemas subterráneos.

METODOLOGIA

ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

Entre 2019 y 2020 se realizaron salidas de campo a diversos sistemas de cuevas y cavernas en los departamentos de Antioquia, Santander y Boyacá (cuenca Magdalena); Cundinamarca (cuenca Orinoco), y Amazonas (cuenca Amazonas). Se emplearon kits de colecta de ADN ambiental (NatureMetrics™), compuestos principalmente por un filtro de ADN, una jeringa vacía y estéril de 60 ml y una pequeña jeringa con 1,5 ml de solución para preservación de ADN. Se muestrearon 12 localidades en total (cuevas o cavernas, 1 filtro por cueva), que tuvieran cuerpos de agua, los cuales pueden ser de origen interno (subterráneo) o epigeo (externo), que discurren al interior de estos ecosistemas subterráneos. De esta, los puntos 1 a 7 y 9 a 11 corresponden a la cuenca del Magdalena, 8 a la cuenca del Orinoco y 12 al Amazonas (Figura 1 y Tabla 1).

Posteriormente, se inició el proceso de filtrado, en el cual se tomaron 60 ml de agua, luego se unía la jeringa al filtro y se presionaba el émbolo hasta que el agua se filtrara por completo. Este procedimiento se repetió hasta que el filtro se tapara, impidiendo el ingreso de más agua, anotando el volumen total agua filtrado. Luego, al separar la jeringa del filtro, esta se llenaba de aire y se unía nuevamente al filtro para expulsar cualquier remanente de agua. Para la conservación del ADN, la jeringa que contenía la solución de preservación era adherida al filtro, el cual se posicionaba de manera vertical con la jeringa en dirección hacia abajo, y se oprimía el émbolo hasta evidenciar una gota de la solución en el extremo superior del filtro. Finalmente, se sellaba el filtro y se continuaba a diligenciar los datos de campo requeridos por la empresa NatureMetrics.

EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los filtros fueron enviados a la sede de NatureMetrics Ltd en Egham, Surrey, Inglaterra, donde se realizaron los procesos de extracción, amplificación y secuenciación. El ADN de cada filtro se extrajo utilizando un kit comercial de extracción de ADN (QIAGEN™), el cual fue modificado para aumentar los rendimientos del material genético. Así mismo, el ADN fue purificado, con el fin de eliminar los inhibidores de la PCR. Luego, las muestras de ADN purificadas se amplificaron cada una por medio de 12 réplicas de PCR, en presencia de un control negativo y positivo. Se amplificó por PCR la región hipervariable del gen 12S del ADN mitocondrial y se comprobó la amplificación por medio de geles de electroforesis. Las réplicas de ADN que presentaron amplificación positiva

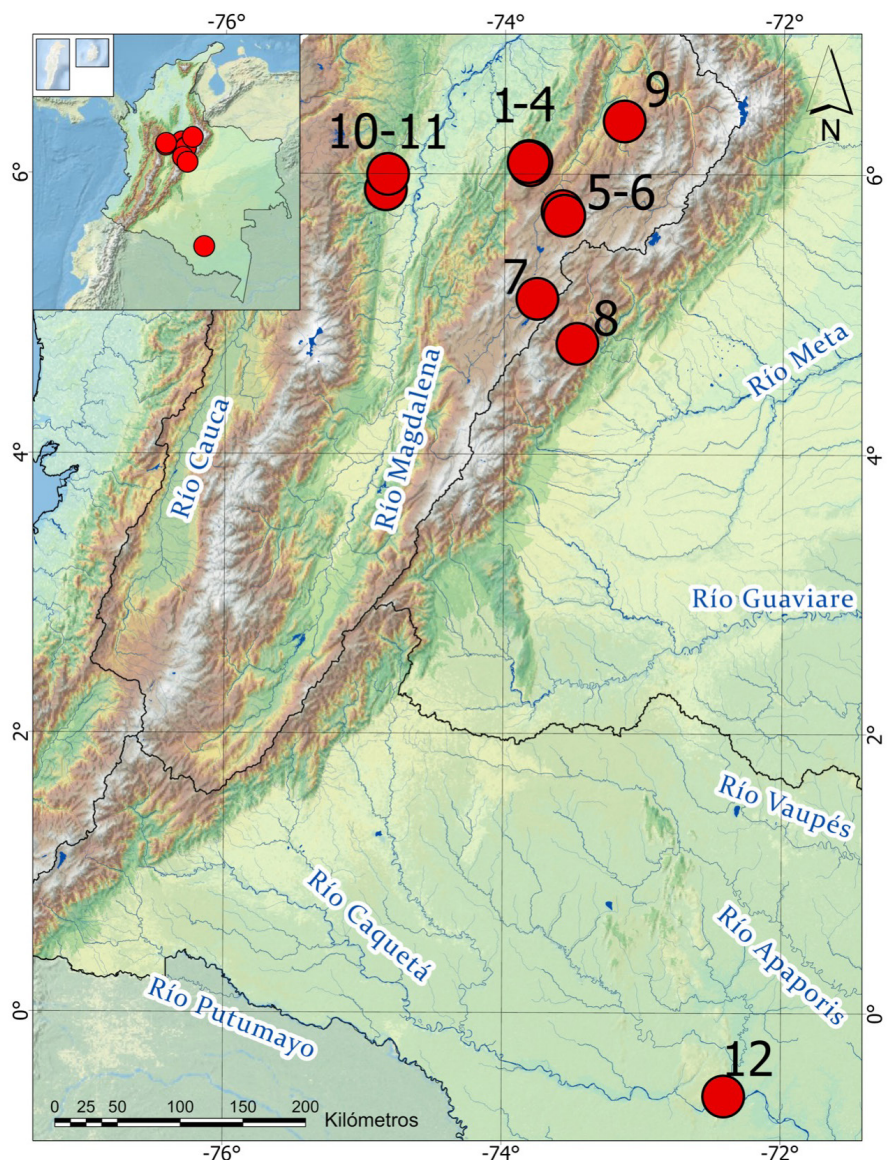


Figura 1. Cuevas y cavernas muestreadas en este estudio. C1-C4: cueva Caracol, caverna las Sardinias, caverna La Tronera y cueva los Carracos, El Peñón, Santander; C5: cueva Cascada del Hayal, Moniquirá, Boyacá; C6: cueva la Fábrica, Santa Rosa, Boyacá; C7: cueva la Chocoancia, Suesca, Cundinamarca; C8: cueva la Pichonera, Ubalá, Cundinamarca; C9: cueva El Cristal, San Gil, Santander; C10: cueva los Mármoles, San Francisco, Antioquia; C11: Cueva La Danta (La Gruta), Cañón del Río Claro, Puerto Triunfo, Antioquia; C12: cueva los Guácharos, Araracuara, Amazonas. Ver Tabla 1 para mas información sobre las localidades.

Tabla 1. Información sobre las cuevas y cavernas muestreadas en este estudio, junto a información sobre su localización geográfica (departamento, municipio, altitud y coordenadas geográficas)

Código	Nombre	País	Departamento	Municipio	Datos localidad	Altura (msnm)	Coordenadas	Coordenadas
C1	Cueva Caracol	Colombia	Santander	El Peñón	Cueva Caracol, vereda Llano de Vargas sector aguas blancas	2384	6°3'51,4"N	73°49'11,1"W
C2	Caverna Las Sardinas	Colombia	Santander	El Peñón	Caverna Las Sardinas, vereda Llano de Vargas sector aguas blancas	2205	6°5'35,3"N	73°49'42,7"W
C3	Caverna La Tronera	Colombia	Santander	El Peñón	Caverna La Tronera, vereda Llano de Vargas sector aguas blancas	2459	6°05'21,3"N	73°48'40,8"W
C4	Cueva Los Carracos	Colombia	Santander	El Peñón	Cueva Los Carracos, vereda Llano de Vargas sector aguas blancas	2247	6°5'2,9"N	73°49'55,2"W
C5	Cueva (Cascada) del Hayal	Colombia	Boyacá	Entre Monquirá y Santa Rita	Cueva (Cascada) del Hayal, carretera Monquirá-Santa Rita	2051	5°44'13,5"N	73°34'74,9"W
C6	Cueva La Fábrica	Colombia	Boyacá	Santa Sofía	Cueva La Fábrica, vía museo Paleontológico de Villa de Leyva	2017	5°42'14,6"N	73°34'23,3"W
C7	Cueva La Chocoancia	Colombia	Cundinamarca	Suesca	Cueva La Chocoancia, Vereda Tausaquira = 8,6 km desde el casco urbano	2772	5°6'36,2"N	73°45'53,5"W
C8	Cueva La Pichonera	Colombia	Cundinamarca	Ubalá	Cueva La Pichonera, Vereda Las Mercedes (abajo de la casa de la finca La Betania)	1986	4°47'24,3"N	73°28'35,9"W
C9	Cueva El Cristal (La Laucha)	Colombia	Santander	San Gil	Vereda Agua Fría	1525	6°22'45,3"N	73°08'25,9"W
C10	Cueva Los Güacharos (Los Mármoles)	Colombia	Antioquia	San Francisco	Cueva Los Güacharos (Los Mármoles), qda. afl. Río Claro, Reserva Natural Río Claro, Mpo. San Francisco, Antioquia	350	05° 53' 13,72"N	74°51' 09"W
C11	Cueva El Condor	Colombia	Antioquia	Puerto Triunfo	Quebrada Piedras Blancas, Vereda Las Delicias	350	5°65'43,83"N	74°50'20,15"W
C12	Cueva Los Güacharos	Colombia	Amazonas	Araracuara	Cueva Los Güacharos (Cañon del río Caquetá)	125	00° 35'41,1" S	72° 24' 29,7 " W

fueron agrupadas y purificadas, para luego añadir adaptadores de secuenciación. Posteriormente, los amplicones (productos de la PCR) fueron purificados, se realizaron geles de electroforesis para su observación y se empleó el kit de ensayo de HS (alta sensibilidad) de ADNbc Qubit para su respectiva cuantificación. En seguida, se agruparon los amplicones en una librería final con mismas concentraciones, la cual fue secuenciada por medio del kit Illumina MiSeq V3 a 12 pM con un porcentaje de 10% de PhiX spike-in. Los datos secuenciados fueron procesados por un “pipeline” bioinformático para su respectiva filtración por calidad, des-replicación y asignación taxonómica. Se agregó dicha información a cada Unidad

Taxonómica Operativa (OTU), por medio de similitud de secuencias frente a la base de datos de nucleótidos de NCBI (GenBank). Para determinar el taxonómico de las muestras a nivel de especie, género, familia y orden se utilizó un método probabilístico (PROTAX) (Somervuo et al., 2016). Las OTUs, se definen como secuencias que son agrupadas en unidades taxonómicas operativas con base a su similitud. Es decir, al porcentaje (~ 97%) de sitios que concuerdan cuando se alinean dos secuencias (Nguyen et al., 2016). Finalmente se realizó depuraron lo datos para eliminar las OTUs con baja abundancia (< 0,05% o <10 lecturas) para cada muestra. También

se removieron contaminantes comunes, como material genético humano y de animales domésticos.

Se analizaron todos los grupos vertebrados juntos, independientemente de sus características de hábitat (terrestre, acuático o semiacuático). Luego se realizó una búsqueda en literatura y estudios realizados o en curso, para comparar el número de géneros y especies tentativas halladas en cada localidad por medio del método de metabarcoding, versus especies reportadas mediante métodos tradicionales. Se eliminaron a aquellos taxones dudosos según la taxonomía, no registrados en ecosistemas colombianos, o en la región muestreada y/o indicativos de posible contaminación.

Luego, utilizando los datos de porcentaje de lecturas según la información disponible con respecto al total de lecturas obtenido, se determinó la abundancia relativa de vertebrados (número de lecturas por cada grupo taxonómico en relación con el número total de lecturas obtenidas para cada localidad). Se tomó el nivel taxonómico de género como una de análisis ya que fue la categoría con el mayor número de lecturas obtenidas.

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD ALFA (α) Y BETA (β)

A partir de matrices binarias caracterizadas con presencia (1) y ausencia (0) de géneros para vertebrados en cada localidad, se calculó la diversidad alfa y beta. Para esto se empleó la versión de RStudio Desktop 1.3.1056 y el paquete “vegan”. Como índices de diversidad alfa, se optó por utilizar el índice de Simpson (1-D) y el índice de Shannon-Wiener. El primero indica la probabilidad de extraer de la comunidad dos individuos al azar que sean del mismo género, siendo influenciado por los géneros más dominantes (Mouillot y Leprêtre, 1999). El segundo, asume que todos los géneros están representados en las unidades muestreadas y que el muestreo de los individuos fue al azar (Moreno, 2001). Para el índice de Simpson, se tuvieron en cuenta los valores de diversidad baja (0,00-0,35), media (0,36-0,75) y alta (0,76-1,00); al igual que para el índice de Shannon con valores de diversidad baja (0,1 - 1,5), media (1,6 - 3,0) y alta (3,1 - 4,5) reportados por Magurran (1988).

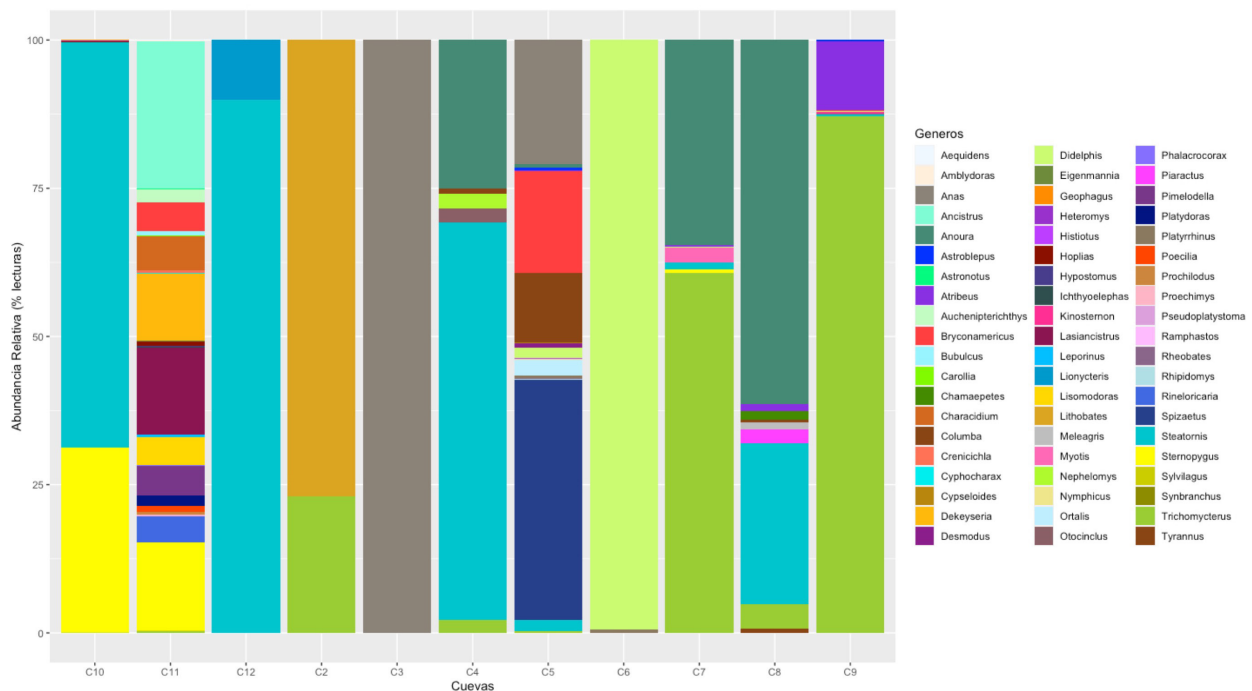


Figura 2. Abundancia relativa (% de lecturas) de géneros de vertebrados identificados en las distintas cuevas muestreadas. C1: cueva Caracol, C2: caverna las Sardinas, C3: caverna La Tronera, C4: cueva los Carracos, El Peñón, Santander; C5: cueva Cascada del Hayal, Moniquirá, Boyacá; C6: cueva la Fábrica, Santa Rosa, Boyacá; C7: cueva la Chocoancia, Suesca, Cundinamarca; C8: cueva la Pichonera, Ubalá, Cundinamarca; C9: cueva El Cristal, San Gil, Santander; C10: cueva los Mármoles, San Francisco, Antioquia; C11: Cueva La Danta (La Gruta), Cañón del Río Claro, Puerto Triunfo, Antioquia; C12: cueva los Guácharos, Araracuara, Amazonas.

Posteriormente, empleando los paquetes “lattice”, “permute” y “ggplot2” en Rstudio, se realizó un histograma, para observar las diferencias de valores en los índices de diversidad alfa entre las 10 localidades. Para determinar la diversidad beta, se calculó el índice Bray-Curtis basada en una matriz de disimilaridad entre los lugares muestreados, las cuales se evaluaron en un dendrograma de similitud-disimilitud (Bray - Curtis)(Ricotta y Podani, 2017).

RESULTADOS

ABUNDANCIA RELATIVA DE VERTEBRADOS

En total, para todas las localidades muestreadas, se identificaron 60 géneros entre todas las clases de vertebrados, siendo el más numeroso el grupo de los peces con 30 géneros, seguido por el grupo de los mamíferos, representado por 15 géneros entre murciélagos, roedores, conejos y zarigüeyas. El grupo de aves se encontró representado por 13 géneros y los menos numerosos fueron los géneros de reptiles y anfibios, con 1 género cada uno. La abundancia relativa de lecturas, que representa el número de secuencias de ADN identificadas por cada género se puede ver en la Figura 2. En esta figura no se incluyó la cueva 1 (cueva el Caracol, El Peñón, Santander), debido a que para esta cueva no se lograron identificaciones a nivel de género, identificándose solamente lecturas de la familia de aves Apodidae. La lista completa de identificaciones se presenta en el Anexo 1.

La cueva de la Danta (C11), presentó la mayor diversidad y patrones de abundancia relativa de lecturas de ADN, seguida por la cueva Cascada el Hayal (5) (Moniquirá, Boyacá), la cueva los Carracos (C4) (El Peñón, Santander) y por la cueva la Pichonera (C8) (Ubalá, Cundinamarca). En estas cuatro localidades se encontró en común la presencia de peces (bagres) del género *Trichomycterus* y aves (guácharos) del género *Steatornis*. En la cueva de La Danta se encontraron 23 géneros de peces únicos, no compartidos con ninguna otra localidad y se compartieron los géneros de peces *Bryconamericus*, con la cueva del Hayal y con la cueva El Cristal, así como los géneros *Peocilia* y *Hoplias* con la cueva los Mármoles. También en dicha localidad se encontró el género *Pseudoplatystoma* (bagre rayao endémico y muy amenazado del Magdalena).

En la cueva de La Danta también se identificaron aves del género *Bubulcus*, *Ramphastos* y *Phalacrocorax* y el roedor del género *Proechimys*. En la cueva Cascada el Hayal se identificaron el género de anuros *Rheobates*, los géneros de aves *Spizaetus*, *Ortalis* y *Nymphicus*, así como el género de ratones *Rhipidomys* y el de conejos *Sylvilagus*. En la cueva los Carracos, se identificó el género de roedores *Nephelomys*. En la cueva la Pichonera

se identificó el género de peces, *Piaractus* (cachama), los géneros de aves *Chamaepetes*, *Meleagris* y *Tyranus*. En la cueva los Mármoles (C9), (San Francisco, Antioquia), se identificó el género de tortugas *Kinosternon*. En la caverna Las Sardinas únicamente se detectaron el género de peces *Trichomycterus* y el género de anfibio *Lithobates*, y en la cueva la Tronera solo se detectó el género de aves *Anas*. En la cueva los Guacharos, únicamente se detectó el género de aves *Steatornis* y el género de murciélago *Lionycteris*, el cual también fue detectado en la cueva de la Danta.

DIVERSIDAD ALFA (α) Y BETA (β)

La diversidad alfa, representada por el índice de Simpson se determinó en niveles medios para tres cuevas (0.35-0.75) y en nivel alto para siete cuevas (0.76-1). Al observar los índices de Shannon, se observaron niveles bajos para dos cuevas (0.1-1.5), niveles medios para 6 cuevas) y niveles altos para una cueva (3.1-4.5) (Figura 3, Tabla 2).

El análisis de similitud de Bray-Curtis mostró que las localidades de la región Andina, las cuevas y formaciones de los Departamentos de Santander, Boyacá, Cundinamarca y Antioquia, son más similares entre si formando un único grupo, contrastando con la cueva de la región Amazónica, que aparece como la mas disímil (Figura 4). La cueva la Fabrica, a pesar de ser parte de las formaciones de la región Andina, fue muy disímil a las del grupo principal, posiblemente por el número muy reducido de géneros identificados. La cueva La Danta, donde se detectó la mas alta diversidad, fue el sistema hipogeo más disímil entre todos los estudiados a todas las otras cuevas, seguido por la cueva los Guácharos, en la región Amazónica.

DISCUSION

De acuerdo con la clasificación de Muñoz-Saba y Lasso (2021), las cuevas, cavernas y/o abrigos rocosos C1 al C7 y C9 pertenecen al karst de la Cordillera Cundi-Boyacence-Santandereana, la 8 a la subregión del Piedemonte oriental-medio de la Cordillera Oriental (Región Orinoquia), la 10 y 11 al Suroriente antioqueño y finalmente la 12 al pseudokarst de la Formación Araracuara (región Amazonas). Desde el punto de vista hidrográfico, corresponden a la cuenca del Magdalena (1 a 7, 9 a 11), 8 cuenca del Orinoco y 12 al Amazonas. Esta diferenciación biogeográfica (regiones y cuencas) determina entonces una composición faunística particular y en especial ictiogeográfica.

Actualmente son pocos los trabajos publicados a nivel mundial sobre la utilización del método de análisis de

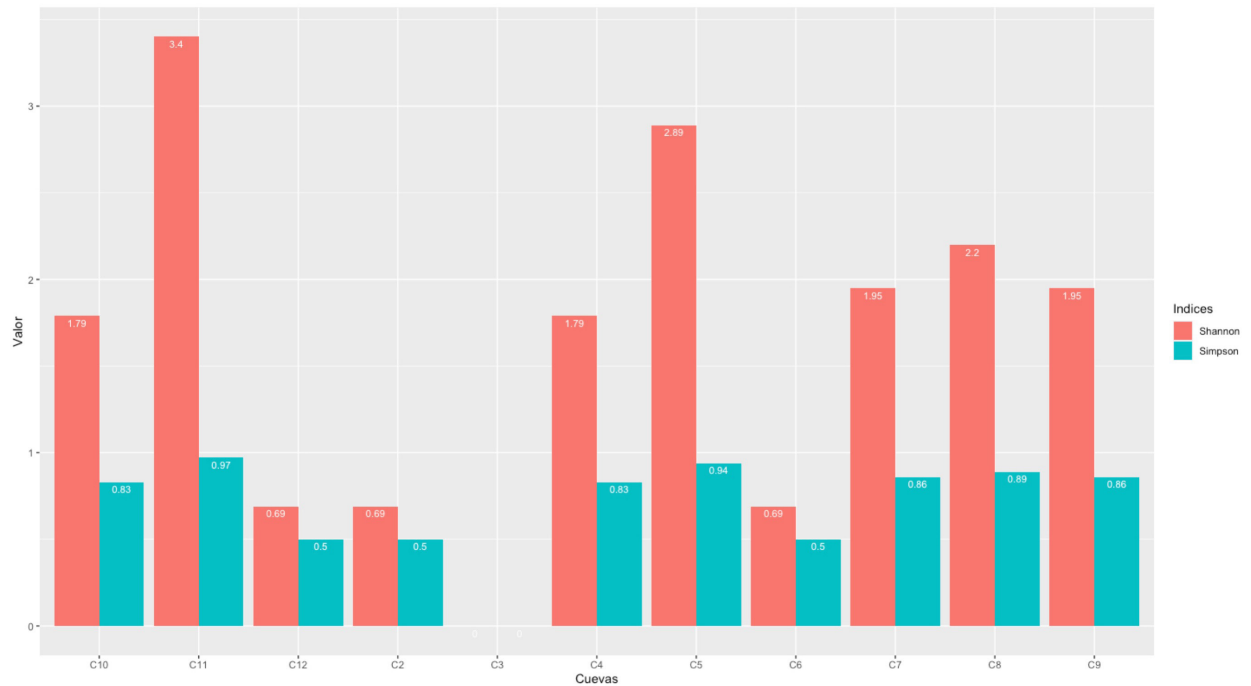


Figura 3. Diagrama de barras representando los valores de índices de diversidad alpha Simpson y Shannon para las diversas cuevas muestreadas. C1: cueva Caracol, C2: caverna las Sardinas, C3: caverna La Tronera, C4: cueva los Carracos, El Peñón, Santander; C5: cueva Cascada del Hayal, Moniquirá, Boyacá; C6: cueva la Fábrica, Santa Rosa, Boyacá; C7: cueva la Chocoancia, Suesca, Cundinamarca; C8: cueva la Pichonera, Ubalá, Cundinamarca; C9: cueva El Cristal, San Gil, Santander; C10: cueva los Mármoles, San Francisco, Antioquia; C11: Cueva La Danta (La Gruta), Cañón del Rio Claro, Puerto Triunfo, Antioquia; C12: cueva los Guácharos, Araracuara, Amazonas.

Tabla 2. valores de índices de diversidad alpha Simpson y Shannon para las diversas cuevas muestreadas.

Código	Nombre	Indice Simpson (1-D)	Indice Shannon
C1	Cueva Caracol	-	-
C2	Caverna Las Sardinas	0.5	0.69
C3	Caverna La Tronera	0	0
C4	Cueva Los Carracos	0.83	1.79
C5	Cueva (Cascada) del Hayal	0.94	2.89
C6	Cueva La Fábrica	0.5	0.69
C7	Cueva La Chocoancia	0.86	1.95
C8	Cueva La Pichonera	0.89	2.2
C9	Cueva El Cristal (La Laucha)	0.86	1.95
C10	Cueva Los Güacharos (Los Mármoles)	0.83	1.79
C11	Cueva El Condor	0.57	3.4
C12	Cueva Los Guácharos	0.5	0.69

ADN ambiental en ecosistemas de cuevas y cavernas. La mayoría buscan la detección de grupos o especies particulares en estos lugares, por ejemplo, crustáceos en cuevas de Alabama, Estados Unidos (Boyd et al., 2020) o anfibios en cuevas de Croacia (Vörös et al., 2017). Hasta la fecha, solo se han publicado dos trabajos similares a este, en el que se evalúa el método de metabarcoding de ADN ambiental. El primero en las cuevas de la isla Christmas en el Océano Índico, al noroccidente de Australia (West et al., 2020). En dicho trabajo se analizó información obtenida de 23 cuevas y 156 muestras de agua, detectando un total de 71 familias de invertebrados y vertebrados. El segundo, utilizó la técnica para detectar la presencia de la anguila ciega de cuevas (*Ophisternon candidum*) en Australia (White et al., 2020). Considerando los pocos estudios publicados sobre esta metodología, es importante recalcar la importancia de su aplicación en estos ecosistemas en Colombia y su potencial para posteriormente relacionar la composición biótica de dichos lugares con variables ambientales presentes en estas formaciones, así como con su origen geológico (West et al., 2020). En este trabajo es claro que esta metodología muestra rápidamente una composición y riqueza de especies en sistemas desconocidos o explorados parcialmente mediante metodologías tradicionales. Se detecta la presencia de especies de peces endémicas, caso de la cuenca del Magdalena con especies como *Ichthyolephas longirostris*, *Geophagus steindachneri* y *Sternopygus aequilabitaus*, algunas de ellas de interés pesquero y que también están amenazadas.

Un caso interesante es la presencia de la cachama blanca (*Piaractus*) en el sistema de la cueva de Ubalá (cuenca del Orinoco). Este género y especie, identificada en este caso como *P. brachypomus* (especie amazónica), corresponde en realidad a una especie de gran tamaño y endémica del Orinoco (*P. orinocoensis*), cuya presencia en este sistema subterráneo se debe probablemente a la contaminación procedente de actividades acuícolas en la región o por el lavado de pescado en las aguas, derivado de la alimentación local. El metabarcoding detecta también una diversidad críptica o desconocida de especies de interés ornamental y larvófago (*Poecilia*), pesquero y para la conservación. Este es el caso del bocachico (*Prochilodus*) -se detectan lo que podrían ser tres especies-, cuando en la cuenca del Magdalena solo se reconoce una especie. La ventaja de este método en su aplicación en las pesquerías, conservación y detectabilidad de una diversidad desconocida, ha sido demostrada por Martinelli-Marín et al. (2020) en ríos de la Orinoquia.

Una parte importante de las especies detectadas con este método pueden considerarse desde el punto de vista ecológico como accidentales, visitantes ocasionales o que simplemente quedan atrapadas en estos sistemas subterráneos, dado el origen epigeo o superficial de las corrientes de agua. Este es el caso de 39 de las 40 especies potenciales de peces. La única especie troglobia es el bagre cavernícola, *Trichomycterus* sp 1 que corresponde a *T. rosablanca*, especie endémica y que habita en sistemas

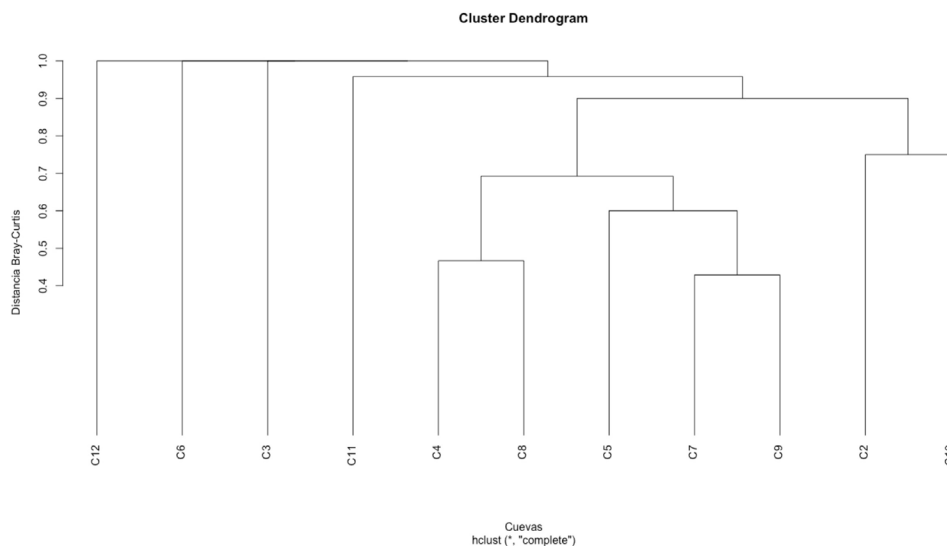


Figura 4. Dendrograma de similitud de Bray-Curtis. C1: cueva Caracol, C2: caverna las Sardinias, C3: caverna La Tronera, C4: cueva los Carracos, El Peñón, Santander; C5: cueva Cascada del Hayal, Moniquirá, Boyacá; C6: cueva la Fábrica, Santa Rosa, Boyacá; C7: cueva la Chocoancia, Suesca, Cundinamarca; C8: cueva la Pichonera, Ubalá, Cundinamarca; C9: cueva El Cristal, San Gil, Santander; C10: cueva los Mármoles, San Francisco, Antioquia; C11: Cueva La Danta (La Gruta), Cañón del Rio Claro, Puerto Triunfo, Antioquia; C12: cueva los Guácharos, Araracuara, Amazonas.

hídricos hipogeos del Macizo de El Peñón (cuevas 1-4) (Lasso *et al.* 2018).

La gran mayoría de las especies reseñadas son categorizadas como asociadas (Muñoz-Saba & Lasso 2021), que anidan, descansan o habitan ocasionalmente en la entrada (zonas de penumbra) de los sistemas subterráneos (al menos una especie de anfibio, una especie de tortuga, 12 especies de aves y seis de mamíferos, especialmente de roedores), aunque no se descarta la entrada del ADN de estas especies por aportes alóctonos de las corrientes de agua. La clasificación de ciertas especies de murciélagos -7 géneros- en troglófilas-cavernícolas facultativas, que usan estos sistemas como fuente de alimento o troglóxenas, que completan su ciclo de vida en las cuevas, es difícil de establecer en algunos casos dada la falta de información. A nivel biogeográfico, el género *Anoura* está ampliamente distribuido en Colombia entre los 500-3600 m s.n.m. (Solari *et al.* 2012) y fue registrada en El Peñón por Casallas-Pabón *et al.* (2019) mediante métodos tradicionales de colecta. El resto de los géneros y especies tienen una distribución también amplia entre los 0 y 300 m s.n.m. (Solari *et al.* 2012) pero si bien fueron detectados con metabarcoding en El Peñón, no fueron colectadas con métodos de muestreo tradicionales.

En siete de los 12 ecosistemas estudiados, se detectó la presencia del guácharo (*Steatornis caripensis*), una especie de ave considerada como troglóxena o cavernícola ocasional. Ha sido registrados por observación directa para la cueva La Tronera y El Caracol en El Peñón (Córdoba-Córdoba & Sierra 2019), ampliamente distribuida en las regiones Andina, Caribe, Orinoquia y Amazonia desde los 0 a 3400 m s.n.m. Córdoba-Córdoba y Sierra (2019) la encontraron en las cuevas de La Tronera y Caracol, y el metabarcoding la registró en las cuevas de Las Sardinas y Los Carracos, lo que amplía la distribución en el macizo cárstico de El Peñón. La cacatúa (*Nymphicus hollandicus*) es una especie exótica (mascota) ampliamente introducida en todo el mundo (endémica de Australia) (BirdLife 2009) y detectada en este trabajo, al igual que la paloma (*Columba*). En estos dos casos se muestra la utilidad del uso de este método para detectar especies exóticas, como ha sido descrito en otros estudios (Takahara *et al.*, 2013).

Si bien los 30 géneros de peces identificados mediante el metabarcoding podrían corresponder potencialmente

a unas 40 especies, hay que considerar la premisa de que no todas las especies presentes en estos sistemas acuáticos están representadas en la base de datos de nucleótidos, por ejemplo, la base de datos del NCBI (Genbank), por lo que hay una subestimación obvia de la riqueza de especies y esto aplicaría también a otras especies de vertebrados poco conocidas o raras. De igual forma, estos análisis los relacionan o asignan a géneros y especies filogenéticamente y genéticamente muy cercanas, pero que no corresponden en realidad a los patrones biogeográficos definidos, p. e. *Pseudoplatystoma tigrinum* cuando en realidad debe ser *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, especie de murciélago endémica del Magdalena; lo mismo ocurre con varios géneros e incluso especies, que no están presentes en la cuenca. Este es el caso particular del Magdalena, donde se reconocen algunos géneros y especies típicamente amazónicos y/o orinoquenses que no están presentes realmente en la cuenca (*Aequidens metae*, *Amblydoras*, *Astronotus* sp, *Auchenipterichthys*, *Crenicichla*, *Dekeyseria scaphyrhincha*, *Leporinus*, *Liosomadoras*, *Otocinclus* y *Platydoras armatulus*).

CONCLUSIONES

De acuerdo con la bibliografía revisada, esta es la primera vez que se aplica este método de barcoding de ADN ambiental en ecosistemas subterráneos de Colombia y en Suramérica. Si bien el método todavía tiene algunas limitaciones de tipo metodológico tanto en campo como en el laboratorio y particularmente en la posterior identificación de OTUs, especies y/o morfoespecies, es de utilidad para contar rápidamente con información sobre la diversidad en áreas de muestreo tradicional más complejo como lo son los sistemas subterráneos. Es importante entonces realizar un esfuerzo importante para contribuir a la construcción de bases de datos que permitan mejorar la identificación de las secuencias obtenidas. También este método ha permitido detectar especies crípticas y exóticas, con aplicaciones en conservación, ya que dicho método podría ayudar a revisar las áreas de distribución geográfica de dichas especies y a determinar lugares donde iniciar estudios y posteriormente realizar acciones de manejo.



Para ver presentación escanee el código QR o ingrese a <https://youtu.be/u1zAspsqoTM>

REFERENCIAS

- Angarita-Sierra, T. (2018). Brief History of Biospeleology in Colombia: Perspectives and Opportunities. Conference proceedings of the I Colombian Congress of Speleology and VIII Speleological Congress of Latin America and the Caribbean. 43-61pp
- Angarita-Sierra, T., Ulloa, J.D., y Lasso, C.A. (2019). Biodiversidad subterránea del Departamento de Santander Pp. 257-286. In: Lasso, C. A., J. Barriga y J. Fernández-Auderset (Eds.). Biodiversidad subterránea y epigea de los sistemas cársticos de El Peñón (Andes), Santander, Colombia. VII. Serie Fauna Silvestre Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia.
- Bakker, J., Wangensteen, O. S., Chapman, D. D., Boussarie, G., Buddo, D., Guttridge, T. L., Mariani, S. 2017. Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact. Scientific Reports 7: 16886
- Beng, K. C., Corlett, R. T. 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. Biodiversity and Conservation: 1-33
- BirdLife International. 2009. «*Nymphicus hollandicus*». Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2020 (en inglés). ISSN 2307-8235. Consultado el 19 de septiembre de 2020.
- Boyd, S. H., Niemiller, D. K. K., Dooley, K. E., Nix, J., Niemiller, M. L. 2020. Using environmental DNA methods to survey for rare groundwater fauna: detection of an endangered endemic cave crayfish in northern Alabama. Plos One 15(12): e0242741.
- Casallas-Pabón, D., Muñoz-Saba., Y., Valdivieso, N., Pinto, R. 2019. Murciélagos de las cuevas, cavernas y áreas adyacentes de El Peñón (Andes), Santander, Colombia. En: Lasso, C. A., Barriga, J. C., Fernández-Auderset, J. C. (Eds). Biodiversidad subterránea y epigea de los sistemas cársticos de El Peñón (Andes), Santander, Colombia. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical . Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D. C. Colombia. 157-174.
- Córdoba-Córdoba, S., Sierra, S. 2019. Aves de los ecosistemas exocársticos andinos de El Peñón y registros de guácharos (*Steatornis caripensis*) en Santander, Colombia. En: Lasso, C. A., Barriga, J. C., Fernández-Auderset, J. C. (Eds). Biodiversidad subterránea y epigea de los sistemas cársticos de El Peñón (Andes), Santander, Colombia. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical . Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D. C. Colombia. 429-456.
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière, A., Altermatt, F., Pfrender, M. 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology 26:5872-5895.
- Dulcey-Ulloa, J., Lasso, C. A. 2018. Cuevas y cavernas de Santander (Colombia): estado del conocimiento, uso y conservación. Memorias del I Congreso Colombiano de Espeleología y VIII Congreso Espeleológico de América Latina y El Caribe. San Gil, Santander, Colombia, 6-10 noviembre 2018: 70-76.
- Lasso, C. A., Mesa S. L. M., Castellanos- Morales, C., Fernández-Auderset, J. DoNascimento, C. Peces cavernícolas de Colombia. Memorias I Congreso Colombiana de Espeleología 2018 VIII Congreso Espeleológico de América Latina y el Caribe, San Gil, Santander, Colombia. 6-10 noviembre 2018: 164-169.
- Lasso, C. A., Barriga, J. C., Fernández-Auderset, J. C. (Eds). 2019. Biodiversidad subterránea y epigea de los sistemas cársticos de El Peñón (Andes), Santander, Colombia. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical . Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D. C. Colombia. Pp. 476.
- Li, M., Shan, X., Wang, W., Ding, X., Dai, F., Lv, D., Wu, H. 2020. Qualitative and quantitative detection using eDNA technology: a case study of *Fenneropenaeus chinensis* in the Bohai Sea. Aquaculture and Fisheries 5: 148-155.
- Magurran, A. 1988. Ecological diversity and its measurements. Princeton University Press, New Jersey, USA. 80 pp.
- Mammola, S., Isaia, M. 2017. Spiders in caves. Proceedings of the Royal Society, B. 284: 20170193.

- Martinelli-Marin, D., Lasso, C. A., Caballero, S. 2020. Diversidad y riqueza de vertebrados de la Reserva Natural Bojonawi y áreas adyacentes (Orinoquía, Colombia), estimadas a partir del análisis de ADN ambiental. En: Lasso, C. A., Trujillo, F., Morales-Betancourt, M. A. (Eds). VIII. Biodiversidad de la Reserva Natural Bojonawi, Vichada, Colombia: río Orinoco y planicie de inundación. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical. Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 345-370.
- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M6T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, España. 84 pp.
- Mouillot, D., Leprêtre, A. 1999. A comparison of species diversity estimators. *Researches on Population Ecology* 41: 203-215
- Muñoz-Saba, Y., Andrade, G. F., Baptiste, L. G., Salas, D., Villarreal, H., Armenteras, D. 1998. Conservación de los Ecosistemas Subterráneos en Colombia. Biosíntesis. Boletín Informativo No. 10, Instituto Humboldt. Bogotá, Colombia. 325 pp.
- Muñoz-Saba, Y., Hoyos, M., Baptiste, B., Salas, D. 2013. Biodiversidad de cavernas en Colombia. Pp. 28-30. En: Muñoz-Saba, Y., González-Sánchez, I., Calvo-Roa, N. (Eds). Cavernas de Santander, Colombia: Guía de campo. Serie de Guías de Campo, No. 13, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.
- Muñoz-Saba, Y., Lasso, C. A. 2021. Biodiversidad cavernícola de Colombia: diversidad, uso y conservación. En: Moreno, L. a., G. Andrade y A. Rueda (eds.). Biodiversidad 2020. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D. C. (en prensa).
- Nguyen, N. P. Warnow, T., Pop, M., White, B. 2016. A perspective on 16s rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes* 2: 1-8.
- Ricotta, C., Podani, J. 2017. On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecological Complexity* 31: 201-205.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., Rahman, M. S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* 17: e00547.
- Solari, S., Muñoz, Y., Rodríguez, J. V. Defler, T. R., Ramírez, H. E., Trujillo, F. 2013. Riqueza, endemismo y conservación de los mamíferos de Colombia. *Mastozoología Tropical* 20:301-365.
- Somervuo, P., Koskela, S., Pennanen, J., Nilsson, R. H., Ovaskainen, O. (2016). Unbiased probabilistic taxonomic classification for DNA barcoding. *Bioinformatics* 32: 2920-2927.
- Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *Plos One* 8(2): e56584
- Tillotson, M. D., Kelly, R. P., Duda, J., Hoy, J. M., Kralj, D., Quinn, T. P. 2018. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation* 220:1-11.
- Trajano, E., Bichuette, M. E. 2006. *Biología Subterránea. Introducao. REDESPELEO BRASIL*. 92 pp.
- Vörös, J., Márton, O., Schmidt, B. R., Gál, T., Jelic, D. 2017. Surveying Europe's only cave dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA. *Plos One* 12(1): e0170945.
- West, K. M., Richards, Z. T., Harvey, E. S., Susac, R., Grearly, A., Bunce, M. 2020. Under the karst: detecting hidden subterranean assemblages using eDNA metabarcoding in the caves of Christmas Island, Australia. *Scientific Reports* 10:21479.
- White, N. E., Guzik, M. T., Austin, A. D., Moore, G. I., Humphreys, W. F., Alexander, J., Bunce, M. 2020. Detection of the rare Australian endemic blind cave eel (*Ophisternon candidum*) with environmental DNA: Implications for threatened species management in subterranean environments. *Hydrobiologia* 847: 3201-3211.
- White, W. B., Culver, D. C. 2012. *Encyclopedia of Caves (Second Edition)*, Academic Press, pp. 945

ANEXO 1. Lista de géneros y especies identificados para los 12 ecosistemas subterráneos (en rojo se marcan géneros y especies dudosas).

Ecosistemas subterráneos	Géneros	Especies
Cueva Caracol		
Caverna las Sardinias	<i>Lithobates, Trichomycterus</i>	<i>Lithobates sp. 1, Trichomycterus sp. 1</i>
Caverna la Tro-nera	<i>Anas</i>	<i>Anas sp. 1</i>
Cueva los Carracos	<i>Otocinclus, Trichomycterus, Steatornis, Columba, Anoura, Nephelomys</i>	<i>Otocinclus sp. 1, Trichomycterus sp. 1, Steatornis caripensis, Columba livia, Anoura geoffroyi, Nephelomys albigularis</i>
Cueva Cascada del Hayal	<i>Bryconamericus, Astroblepus, Trichomycterus, Rheobates, Spizaetus, Anas, Cypseloides, Steatornis, Columba, Ortalis, Nymphicus, Anoura, Atribeus, Carollia, Desmodus, Platyrrhinus, Histiotus, Didelphis, Sylvilagus, Rhipidomys</i>	<i>Bryconamericus sp. 1, Astroblepus sp. 1, Trichomycterus sp. 1, Rheobates palmatus, Spizaetus melanoleucus, Anas sp. 1, Cypseloides sp. 1, Steatornis caripensis, Columba livia, Ortalis sp. 1, Nymphicus sp. 1, Anoura geoffroyi, Atribeus sp. 1, Carollia perspicillata, Carollia sp. 2, Desmodus sp. 1, Platyrrhinus helleri, Histiotus sp. 1, Didelphis marsupialis, Sylvilagus brasiliensis, Rhipidomys sp. 1,</i>
Cueva la Fábrica	<i>Carollia, Platyrrhinus, Didelphis</i>	<i>Carollia perspicillata, Carollia sp. 2, Platyrrhinus helleri, Didelphis marsupialis</i>
Cueva la Cho-coancia	<i>Trichomycterus, Steatornis, Anoura, Artibeus, Myotis, Didelphis</i>	<i>Trichomycterus sp. 1, Steatornis caripensis, Anoura geoffroyi, Anoura sp. 2, Artibeus sp. 1, Myotis sp. 1, Didelphis marsupialis</i>
Cueva la Pichonera	<i>Piaractus, Trichomycterus, Steatornis, Columba, Chamaepetes, Meleagris, Tyrannus, Anoura, Artibeus</i>	<i>Piaractus brachypomus, Trichomycterus sp., Steatornis caripensis, Columba livia, Chamaepetes goudotii, Meleagris sp. 1, Tyrannus melancholicus, Anoura geoffroyi, Anoura sp. 2, Artibeus planirostris, Artibeus sp. 2,</i>
Cueva El Cristal	<i>Bryconamericus, Astroblepus, Trichomycterus, Rheobates, Steatornis, Artibeus, Carollia, Didelphis, Kinosternon</i>	<i>Bryconamericus sp. 1, Astroblepus sp. 1, Trichomycterus sp. 1, Rheobates palmatus, Steatornis caripensis, Artibeus planirostris, Artibeus sp. 2, Carollia sp. 1, Didelphis marsupialis, Kinosternon leucostomum</i>
Cueva los Már-moles	<i>Hoplias, Poecilia, Sternopygus, Geophagus, Trichomycterus, Steatornis, Heteromys</i>	<i>Hoplias sp. 1, Poecilia sp. 1, Poecilia sp. 2, Sternopygus aequilabiatum, Geophagus steindachneri, Trichomycterus sp. 1, Steatornis caripensis, Heteromys sp. 1,</i>
Cueva del Con-dor	<i>Leporinus, Bryconamericus, Characidium, Cyphocharax, Hoplias, Ichthyocephalus, Prochilodus, Poecilia, Eigenmannia, Sternopygus, Aequidens, Astronotus, Crenicichla, Auchenipterichthys, Liosomadoras, Amblydoras, Platydoras, Pimelodella, Ancistrus, Dekeyseria, Hypostomus, Lasiacistrus, Rinelorica, Pseudoplatystoma, Trichomycterus, Synbranchus, Bubulcus, Ramphastos, Steatornis, Phalacrocorax, Lionycteris, Proechimys.</i>	<i>Bryconamericus sp. 1, Characidium sp. 1, Characidium sp. 2, Cyphocharax sp. 1, Hoplias sp. 1, Ichthyocephalus longirostris, Prochilodus sp. 1, Prochilodus sp. 2, Prochilodus sp. 3, Poecilia sp. 1, Poecilia sp. 2, Eigenmannia sp. 1, Sternopygus aequilabiatum, Aequidens metae, Astronotus sp. 1, Auchenipterichthys sp. 1, Liosomadoras morrowi, Amblydoras sp. 1, Platydoras armatulus, Pimelodella sp. 1, Ancistrus sp. 1, Dekeyseria scaphirhynchus, Hypostomus sp. 1, Hypostomus sp. 2, Lasiacistrus sp. 1, Lasiacistrus sp. 2, Rinelorica sp. 1, Pseudoplatystoma tigrinum, Trichomycterus sp. 1, Synbranchus sp. 1, Bubulcus ibis, Ramphastos ambiguus, Steatornis caripensis, Phalacrocorax brasilianus, Lionycteris spurrelli, Proechimys sp. 1.</i>
Cueva los Guá-charos	<i>Lionycteris, Steatornis</i>	<i>Lionycteris spurrelli, Steatornis caripensis</i>