



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO RESERVATÓRIO DA ITAIPU NA DIVERSIDADE E  
ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)  
E *Heptapterus mustelinus* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE)**

**VILMARA DE OLIVEIRA**

Foz do Iguaçu  
2024



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA  
VIDA E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO RESERVATÓRIO DA ITAIPU NA DIVERSIDADE E  
ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) E  
*Heptapterus mustelinus* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE)**

**VILMARA DE OLIVEIRA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Neotropical, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

Foz do Iguaçu  
2024

VILMARA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO RESERVATÓRIO DA ITAIPU NA DIVERSIDADE E  
ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE) E  
*Heptapterus mustelinus* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira  
Orientador  
UNILA

---

Dra. Maria Claudia Gross  
UNILA

---

Dr. Guilherme José da Costa Silva  
UNISA

Foz do Iguaçu, 05 de setembro de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

O48

Oliveira, Vilmara de.

Análise da influência do reservatório da Itaipu na diversidade e estrutura genéticas de *Ancistrus sp.* (Siluriformes: Loricariidae) e *Heptapterus mustelinus* (Siluriformes: Heptapteridae) / Vilmara de Oliveira. - Foz do Iguaçu, 2024.

72 f.: il., color

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical. Foz do Iguaçu - PR, 2024.

1. Diversidade genética. 2. Estrutura populacional. 3. Peixes. 4. Riachos. 5. SNP . I. Pereira, Luiz Henrique Garcia. II. Título.

CDU 574.1:575

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz H. G. Pereira. Sua orientação, sabedoria, paciência e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho. Desde os tempos de Iniciação Científica até a conclusão desta dissertação, seu apoio constante e confiança no meu potencial me inspiraram a crescer acadêmica e pessoalmente.

Em segundo lugar, agradeço às instituições que possibilitaram a realização deste trabalho: à CAPES, pelo apoio financeiro; e à UNILA, à ITAIPU BINACIONAL e ao Itaipu Parquetec, pela infraestrutura e pelos recursos disponibilizados, como equipamentos e materiais.

Agradeço também aos professores das bancas de qualificação (Profa. Dra. Maria L. Terencio, Dra. Mariana C. Terra e Profa. Dra. Carolina I. Miño) e de defesa de dissertação (Profa. Dra. Maria C. Gross e Prof. Dr. Guilherme J. C. Silva). Suas contribuições e sugestões foram verdadeiramente enriquecedoras e agregaram valor a este trabalho. Agradeço por terem dedicado seu tempo, atenção e conhecimento, o que tornou este projeto ainda mais significativo.

Não posso deixar de agradecer aos meus queridos colegas de curso Anderson, Diana, Jimena e Karina por todos os momentos compartilhados. Vocês tornaram essa jornada mais leve e divertida com sua amizade. Aos colegas do LaBEM, especialmente às Dras. Caroline Apolinário e Same C. Lima, sou extremamente grata por todo o apoio na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço de coração a todos que me acompanharam ao longo desta trajetória, à minha rede de apoio, que esteve ao meu lado nos dias difíceis, incentivando-me a continuar, e também nas conquistas.

Muito obrigada!

OLIVEIRA, Vilmar de. **Análise da influência do reservatório da Itaipu na diversidade e estrutura genéticas de *Ancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae) e *Heptapterus mustelinus* (Siluriformes: Heptapteridae)**. 2024. 72 f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

## RESUMO

A diversidade genética é necessária para a adaptação e sobrevivência das espécies. Ela está distribuída em um padrão dentro e entre populações, conhecido como estrutura genética. Os ecossistemas fluviais são significativamente influenciados por barreiras, que afetam diretamente a diversidade e a estrutura genética de peixes. Reservatórios e canais de grandes rios podem atuar como barreiras causando estruturação genética populacional. No entanto, os reservatórios formados, também podem atuar de forma a ampliar a conectividade ao permitir a dispersão de peixes. Estimam-se que 50% das espécies de peixes sul-americanas possuem pequeno porte ( $\leq 15$  cm de comprimento), geralmente vivendo em riachos e possuindo baixa capacidade de deslocamento. O presente trabalho objetivou avaliar a influência do reservatório da Itaipu nos índices de diversidade e estrutura genética de peixes de riachos, com base em marcadores moleculares SNPs. Foram analisadas duas espécies de pequenos peixes: *Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus*, coletados em riachos de cinco microbacias da bacia hidrográfica do Paraná 3. A biblioteca genômica foi construída por meio da técnica de sequenciamento com dupla digestão enzimática associada à sítios de restrição. Após o sequenciamento e devidas filtrações, foram obtidos 11.240 e 9.647 marcadores SNPs, para 39 indivíduos de *Ancistrus* sp. e 37 indivíduos de *H. mustelinus*, respectivamente. Ambas as espécies apresentaram uma baixa a moderada diversidade genética e parentesco intrapopulacional, especialmente *Ancistrus* sp. A Análise de Variância Molecular, os índices de fixação interpopulacionais, a análise bayesiana realizada no STRUCTURE e a Análise Discriminante de Componentes Principais mostram evidências de estruturação genética entre a maioria das microbacias para ambas as espécies. Para *Ancistrus* sp. também há diferenciação populacional entre riachos. O rio Paraná/reservatório da Itaipu parece atuar como uma barreira ao fluxo gênico entre as diferentes microbacias. O Teste de Mantel não evidenciou isolamento por distância para nenhuma das espécies, reforçando que a estrutura genética encontrada é causada pelo rio/reservatório. Por outro lado, algumas microbacias não se mostraram fortemente estruturadas ao compartilharem diferentes linhagens genéticas, o que sugere que o reservatório da Itaipu, ao submergir algumas áreas após o seu enchimento, pode ter propiciado um contato secundário entre microbacias antes estruturadas.

**Palavras-chave:** Diversidade genética; Estrutura populacional; Peixes; Riachos; SNP.

OLIVEIRA, Vilmara de. **Análisis de la influencia del embalse de Itaipú en la diversidad y estructura genéticas de *Ancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae) y *Heptapterus mustelinus* (Siluriformes: Heptapteridae)**. 2024. 72 h. Disertación de maestría del Programa de Postgrado en Biodiversidad Neotropical - Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2024.

## RESUMEN

La diversidad genética es necesaria para la adaptación y supervivencia de las especies. Esta diversidad está distribuida en un patrón dentro y entre poblaciones, conocido como estructura genética. Los ecosistemas fluviales son significativamente influenciados por barreras que afectan directamente la diversidad y la estructura genética de peces. Los embalses y canales de grandes ríos pueden actuar como barreras provocando la estructuración genética poblacional. Sin embargo, los embalses formados también pueden actuar para aumentar la conectividad permitiendo la dispersión de peces. Se estima que el 50% de las especies de peces sudamericanas son de pequeño tamaño ( $\leq 15$  cm de longitud), generalmente viven en arroyos y tienen baja capacidad de desplazamiento. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del embalse de Itaipú en los índices de diversidad y estructura genética de peces de arroyos, a partir de marcadores moleculares SNP. Se analizaron dos especies de pequeños peces: *Ancistrus* sp. y *Heptapterus mustelinus*, colectados en arroyos de cinco microcuencas de la cuenca hidrográfica del Paraná 3. La biblioteca genómica fue construida mediante la técnica de secuenciación con doble digestión enzimática asociada a sitios de restricción. Después de la secuenciación y las filtraciones debidas, se obtuvieron 11,240 y 9,647 marcadores SNP para 39 individuos de *Ancistrus* sp. y 37 individuos de *H. mustelinus*, respectivamente. Ambas especies presentaron una diversidad genética baja a moderada y un parentesco intrapoblacional, especialmente *Ancistrus* sp. El Análisis de Varianza Molecular, los índices de fijación inter-poblacionales, el análisis bayesiano realizado en STRUCTURE y el Análisis Discriminante de Componentes Principales muestran evidencias de estructuración genética entre la mayoría de las microcuencas para ambas especies. Para *Ancistrus* sp. también hay diferenciación poblacional entre arroyos. El río Paraná/embalse de Itaipú parece actuar como una barrera al flujo génico entre las diferentes microcuencas. La prueba de Mantel no mostró aislamiento por distancia para ninguna de las especies, reforzando que la estructura genética encontrada es causada por el río/embalse. Por otro lado, algunas microcuencas no se mostraron fuertemente estructuradas al compartir diferentes linajes genéticos, lo que sugiere que el embalse de Itaipú, al sumergir algunas áreas después de su llenado, puede haber proporcionado un contacto secundario entre microcuencas previamente estructuradas.

**Palabras clave:** Diversidad genética; Estructura poblacional; Pez; Arroyos; SNP.

OLIVEIRA, Vilmara de. **Analysis of the influence of the Itaipu reservoir on the genetic diversity and structure of *Ancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae) and *Heptapterus mustelinus* (Siluriformes: Heptapteridae)**. 2024. 72 p. Master's thesis of the Graduate Program in Neotropical Biodiversity - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2024.

## ABSTRACT

Genetic diversity is necessary for the adaptation and survival of species. This diversity is distributed in a pattern within and among populations, known as genetic structure. Riverine ecosystems are significantly influenced by barriers that directly affect the genetic diversity and structure of fish. Reservoirs and channels of large rivers can act as barriers causing population genetic structuring. However, the reservoirs formed can also act to increase connectivity by allowing fish dispersal. It is estimated that 50% of South American fish species are small-sized ( $\leq 15$  cm in length), generally living in streams and having low displacement capacity. The present study aimed to evaluate the influence of the Itaipu reservoir on diversity indices and genetic structure of stream fish based on molecular markers SNP. Two species of small fish were analyzed: *Ancistrus* sp. and *Heptapterus mustelinus*, collected in streams of five microbasins of the Paraná 3 river basin. The genomic library was constructed using the double digest restriction-site-associated DNA sequencing technique. After sequencing and appropriate filtering, 11,240 and 9,647 SNP markers were obtained for 39 individuals of *Ancistrus* sp. and 37 individuals of *H. mustelinus*, respectively. Both species showed low to moderate genetic diversity and intrapopulation kinship, especially *Ancistrus* sp. Analysis of Molecular Variance, interpopulation fixation indices, Bayesian analysis performed in STRUCTURE and Discriminant Analysis of Principal Components provide evidence of genetic structuring among most microbasins for both species. For *Ancistrus* sp. there is also population differentiation between streams. The Paraná River/Itaipu reservoir appears to function as a barrier to gene flow between different microbasins. The Mantel Test did not show isolation by distance for any of the species, reinforcing that the genetic structure found is caused by the river/reservoir. On the other hand, some microbasins did not show strong structuring as they shared different genetic lineages, which suggests that the Itaipu reservoir, by submerging some areas after its filling, may have provided secondary contact between previously structured microbasins.

**Keywords:** Genetic diversity; Population structure; Fish; Streams; SNP.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Riacho pertencente à microbacia do Rio São João, bacia do Paraná 3. 14
- Figura 2** - Bacia do Alto rio Paraná e bacia do rio Paraná 3. 19
- Figura 3** - Espécime de *Ancistrus* sp. coletado em um riacho situado na bacia hidrográfica do Paraná 3. a) Vista lateral. b) Vista dorsal. c) Vista ventral. Barra de escala: 3 cm. 23
- Figura 4** - Espécime de *Heptapterus mustelinus* coletado em um riacho situado na bacia hidrográfica do Paraná 3. a) Vista lateral. b) Vista dorsal. Barra de escala: 3 cm. 24
- Figura 5** - Pontos de amostragem das espécies *Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus* (números em vermelho) e suas localizações nas cinco microbacias analisadas dentro da bacia hidrográfica do Paraná 3. 34
- Figura 6** - Gráfico STRUCTURE para os 39 indivíduos de *Ancistrus* sp. demonstrando: (a) os quatro *clusters* genéticos representados pelas quatro cores (verde, amarelo, azul e roxo) para  $k = 4$ . (b) os cinco *clusters* genéticos representados pelas cinco cores (verde, amarelo, azul, roxo e vermelho) para  $k = 5$ . (c) Réplicas sumarizadas para  $k = 5$ . MB1 a MB5 representam as microbacias as quais pertencem os indivíduos. 45
- Figura 7** - Gráfico DAPC demonstrando os cinco *clusters* para os 39 indivíduos de *Ancistrus* sp., onde G1 = *cluster* 1, que possui todos os indivíduos da MB1, G2 = *cluster* 2, que possui alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3, G3 = *cluster* 3, que possui alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3, G4 = *cluster* 4, que possui todos os indivíduos da MB4 e G5 = *cluster* 5, que possui todos os indivíduos da MB5. 46
- Figura 8** - Gráfico STRUCTURE para os 37 indivíduos de *Heptapterus mustelinus* demonstrando os três *clusters* genéticos representados pelas três cores (azul, roxo e vermelho) para  $k = 3$ . MB1 a MB5 representam as microbacias as quais pertencem os indivíduos. 52
- Figura 9** - Gráfico DAPC demonstrando os cinco *clusters* para os 37 indivíduos de *Heptapterus mustelinus*, com sobreposição entre os *clusters* G1, G2 e G3, onde G1 = *cluster* 1, que possui alguns indivíduos da MB1, G2 = *cluster* 2, que possui alguns indivíduos da MB2, G3 = *cluster* 3, que possui todos os indivíduos da MB3, alguns indivíduos da MB1 e alguns indivíduos da MB2, G4 = *cluster* 4, que possui todos os indivíduos da MB4 e G5 = *cluster* 5, que possui todos os indivíduos da MB5. 53

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Espécies e números de indivíduos analisados ( $N$ ), além das microbacias e seus pontos de coleta com coordenadas (latitude e longitude), lote onde os espécimes foram depositados e seus *voucher*. 32
- Tabela 2** - Amostras de *Ancistrus* sp. utilizados para técnica de ddRADseq. Ao final da tabela consta a quantidade de SNPs e sítios polimórficos obtidos para todas as amostras. Amostras: corresponde ao número de voucher seguido do nome do ponto de coleta; Microbacias: conjunto de riachos que se unem a um rio principal e desaguam direto no reservatório de Itaipu; *Reads*: corresponde as *reads* remanescentes após processo de filtragem. 41
- Tabela 3** - Índices de diversidade genética para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias (MB1 – MB5) situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3.  $N$ : número de indivíduos;  $S$ : sítios polimórficos;  $He$ : heterozigosidade esperada;  $Ho$ : heterozigosidade observada;  $\pi$ : diversidade nucleotídica;  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia. 42
- Tabela 4** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando uma única população. 43
- Tabela 5** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando cada microbacia uma população. 43
- Tabela 6** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando três grupos: o primeiro grupo contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5. 43
- Tabela 7** - Diferenciação genética ( $F_{ST}$  par a par) obtida para amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias (MB1 – MB5) situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3. 44
- Tabela 8** - Tabela de atribuição de associação para os 39 indivíduos de *Ancistrus* sp. calculada por meio de análise DAPC. Estão representados os *clusters* (colunas) aos quais cada amostra (linhas) pertencem. 47
- Tabela 9** - Amostras de *Heptapterus mustelinus* utilizados para técnica de ddRADseq. Ao final da tabela consta a quantidade de SNPs e sítios polimórficos obtidos para todas as amostras. Amostras: corresponde ao número de voucher seguido do nome do ponto de coleta; Microbacias: conjunto de riachos que se unem a um rio principal e desaguam direto

no reservatório de Itaipu; *Reads*: corresponde as *reads* remanescentes após processo de filtragem. 48

**Tabela 10** - Índices de diversidade genética para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias (MB1 – MB5) situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3. *N*: número de indivíduos; *S*: sítios polimórficos; *He*: heterozigosidade esperada; *Ho*: heterozigosidade observada;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; *F<sub>IS</sub>*: coeficiente de endogamia. 49

**Tabela 11** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando uma única população. 50

**Tabela 12** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando cada microbacia uma população. 50

**Tabela 13** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando três grupos: o primeiro grupo contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5. 51

**Tabela 14** - Diferenciação genética (*F<sub>ST</sub>* par a par) obtida para amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3. 51

**Tabela 15** - Tabela de atribuição de associação para os 37 indivíduos de *Heptapterus mustelinus* calculada por meio de análise DAPC. Estão representados os *clusters* (colunas) aos quais cada amostra (linhas) pertencem. 54

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>1.1 Ecossistemas de riachos: barreiras e conectividade</b>	13
<b>1.2 Diversidade de peixes de água doce</b>	16
<b>1.3 Bacias hidrográficas do Alto rio Paraná e Paraná 3</b>	17
<b>1.4 Caracterização das espécies <i>Ancistrus</i> sp. e <i>Heptapterus mustelinus</i></b>	22
<b>1.5 Genética de populações</b>	24
<b>1.6 Genômica de populações e Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP)</b>	26
<b>1.7 Genética/genômica de populações em peixes de água doce</b>	27
<b>2. OBJETIVOS</b>	30
<b>2.1 Objetivo geral</b>	30
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
<b>3.1 Obtenção das amostras</b>	31
<b>3.2 Da extração de DNA à construção de biblioteca genômica</b>	35
<b>3.3 Análises de bioinformática</b>	37
<b>3.4 Análises de diversidade e estruturação genéticas</b>	38
<b>4 RESULTADOS</b>	40
<b>4.1 <i>Ancistrus</i> sp.</b>	40
4.1.1 Identificação de SNPs	40
4.1.2 Diversidade genética de <i>Ancistrus</i> sp.	41
4.1.3 Estrutura genética populacional de <i>Ancistrus</i> sp.	42
<b>4.2 <i>Heptapterus mustelinus</i></b>	47
4.2.1 Identificação de SNPs	47
4.2.2 Diversidade genética de <i>Heptapterus mustelinus</i>	49
4.2.3 Estrutura genética populacional de <i>Heptapterus mustelinus</i>	49
<b>5 DISCUSSÃO</b>	55
<b>5.1 Diversidade genética</b>	55
<b>5.2 Estrutura genética populacional</b>	57
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	65
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	66

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ecossistemas de riachos: barreiras e conectividade

Os rios são corpos d'água lóticos de sistema aberto e de fluxo unidirecional (DUDGEON et al., 2006), configurando-se em mosaicos de tipos de habitat e gradientes ambientais (ALLAN, 2004), de alta complexidade espacial e conectividade lateral, longitudinal e vertical (ALLAN & CASTILLO, 2007). Os riachos diferem dos rios por seu tamanho menor, baixa produção primária autotrófica local e maior dependência da vegetação ripária e matéria orgânica alóctone (CASTRO, 1999; ALLAN & CASTILLO, 2007) (Figura 1). Possuem também correnteza relativamente forte, fundo com predomínio de areia grossa, cascalho e rochas, alternância de poços e corredeiras e folhiço em decomposição no fundo de poços e remansos (CASTRO, 1999). Podem ser classificados hierarquicamente por ordens, onde o menor riacho com fluxo permanente é referido como de primeira ordem; a união de dois riachos de primeira ordem forma um riacho de segunda ordem; e assim por diante (ALLAN & CASTILLO, 2007). São considerados riachos os corpos d'água até a quarta ordem (CASTRO, 1999). Essa classificação é uma medida aproximada de tamanho e correlaciona-se com medidas mais precisas, como a área drenada, o volume de água descarregada e as dimensões do canal (ALLAN & CASTILLO, 2007). Os componentes mais abundantes de um sistema fluvial são os riachos de menor ordem, de pequeno comprimento e área de drenagem; e à medida que os afluentes de um rio se juntam a ele, seu tamanho, volume d'água e área de drenagem são aumentados (ALLAN & CASTILLO, 2007).

**Figura 1** - Riacho pertencente à microbacia do Rio São João, bacia do Paraná 3.



Fonte: O autor (2024).

Pela natureza dos canais de rios e riachos eles estão altamente conectados com o ambiente terrestre do entorno, sendo bastante influenciados por eventos de chuva (ALLAN & CASTILLO, 2007), que quando torrenciais, determinam um grande aumento do volume de água dos riachos, enquanto rios de médio e grande porte são submetidos a variações sazonais no nível fluviométrico (ESTEVES, 2011). Desta forma, a principal função de força em sistemas lóticos é a vazão hidrológica (ESTEVES, 2011) e as ações humanas muitas vezes alteram a variação natural da vazão (ALLAN & CASTILLO, 2007). Entre as principais ameaças aos ecossistemas de riachos e sua biodiversidade associada está a modificação dos regimes hidrológicos naturais. A modificação dos regimes hidrológicos naturais tem como um de seus principais causadores o represamento dos ambientes lóticos (ALLAN & CASTILLO, 2007). Estruturas de desvio d'água como barragens, podem alterar os regimes de fluxo e até mesmo causar a seca permanente de riachos, causando a perda de conectividade hidrológica longitudinal, lateral e vertical, levando a perda de rotas de dispersão da biota (LAKE, 2003). Por serem estruturados em redes ecológicas dendríticas, os ecossistemas fluviais são significativamente influenciados pelas barreiras, as quais afetam diretamente a diversidade e a estruturação populacional de peixes. Os processos ecológicos como dispersão, crescimento populacional e interações das comunidades ocorrem dentro dos ramos do sistema dendrítico (habitats primários para as espécies residentes), com os nós servindo como pontos de transferência. A arquitetura das

ramificações nos sistemas dendríticos contribui para a heterogeneidade do hábitat local e oferece refúgios para os organismos, além de acesso à calha principal para indivíduos migratórios (CAMPBELL GRANT; LOWE; FAGAN, 2007). Nesses ecossistemas, as populações de organismos aquáticos movem-se longitudinalmente ao longo das ramificações, e uma única barreira, natural ou artificial, pode reduzir substancialmente o fluxo gênico, transformando uma metapopulação em populações isoladas e aumentando o risco de extinções locais (KELSON et al., 2015). As alterações irreversíveis no regime hidrológico natural dos rios promovidas por barragens e represamentos são: I. a alteração do ambiente lótico para lântico na região do reservatório, II. as grandes alterações paisagísticas com a criação de um gradiente hidrológico longitudinal a montante e, III. o controle de vazão que altera o ciclo de cheias sazonais e a diminuição da conectividade hidrológica entre o rio e a planície lateral nas zonas ribeirinhas e a jusante (AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2008).

É sabido que barragens e reservatórios, obstáculos produzidos pelo represamento de rios, têm efeitos diferentes. Enquanto as barragens impedem principalmente os movimentos a montante, os reservatórios dificultam os movimentos a jusante (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2014). As barragens são obstruções físicas que interrompem a conectividade longitudinal dos rios, bloqueando totalmente o movimento ascendente dos peixes, sendo então desenvolvidos diversos mecanismos de passagens para peixes na tentativa de facilitar esses movimentos (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2014). Os grandes reservatórios, funcionam como barreiras comportamentais à migração dos peixes. Eles não possuem uma estrutura física, mas se estendem longitudinalmente e horizontalmente por um grande espaço, criando uma transição gradual entre ambientes lóticos, semilânticos e lânticos, afetando negativamente o comportamento dos peixes. Os reservatórios diferem do regime fluvial original, constituindo uma barreira ecológica que leva os peixes a preferirem áreas a montante que mantêm as condições ribeirinhas (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2014). A ausência de fluxo nos reservatórios também impede a deriva passiva de ovos e larvas, aumentando a pressão de predação e o risco de deposição em ambientes inadequados. A troca genética também é prejudicada, com a redução significativa do fluxo gênico. Ao contrário das barragens, os reservatórios não são um grande obstáculo aos movimentos rio acima dos peixes adultos (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2014).

Além disso, os canais dos grandes rios podem atuar como barreiras à dispersão de algumas espécies de peixes, principalmente as de pequeno porte, tanto por

seu tamanho e regime de descarga, como por neles ser maior a competição interespecífica, a pressão de predação (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003), ou ainda, a falta de abrigo encontrada pela menor heterogeneidade ambiental (FITZGERALD et al., 2018). Assim, em espécies de pequeno porte, as populações tendem a ficar isoladas nas microbacias onde ocorrem. Neste sentido, os represamentos podem atuar de forma diferente, acabando por ampliar a conectividade hidrológica, ao permitir a dispersão de peixes em sistemas fora de seu alcance natural, removendo barreiras geográficas naturais e promovendo a homogeneização biótica por meio da homogeneização de hábitat. O represamento de Itaipu é um exemplo, pois inundou a barreira natural das antigas cachoeiras de Sete Quedas, permitindo que peixes da parte inferior da bacia do Paraná colonizassem intensamente os trechos superiores, resultando em homogeneização (VITULE; SKÓRA; ABILHOA, 2012). Além disso, também transformou o trecho do rio Paraná sob sua influência de um ambiente lótico em um ambiente lêntico, o que pode ter removido a barreira natural causada pelo próprio rio Paraná, permitindo o trânsito de peixes entre microbacias antes isoladas.

## **1.2 Diversidade de peixes de água doce**

Os ecossistemas de água doce abrigam uma grande riqueza da vida. Neles, estão presentes cerca de 6% de todas as espécies de organismos descritas e 40% da diversidade de espécies de peixes, em apenas 0,01% do total de água do planeta Terra e em 0,8% de sua superfície (DUDGEON et al., 2006). Para o continente sul-americano, existem cerca de 5.200 espécies de peixes de água doce descritas, número que representa cerca de um terço do total de espécies de peixes de água doce mundial, em 12% da área continental terrestre. Além disso, a maioria das estimativas para o total de espécies de peixes de água doce da região Neotropical supera 8 mil espécies, podendo chegar a 9 mil, baseando-se nas tendências históricas nas taxas de descoberta e descrição de espécies, e na aceleração das taxas de descrição e de sinonimização (REIS et al., 2016). Além da grande riqueza de espécies de peixes em si, temos que levar em consideração o fato de que no mínimo 50% das espécies de peixes de água doce sul-americanos são espécies de pequeno porte (até 15 cm de comprimento), que geralmente vivem em riachos e apresentam um alto grau de endemismo. Esses peixes possuem, em geral, baixa capacidade de deslocamento, não realizando grandes migrações durante suas vidas, o que

facilita o isolamento e a ocorrência de eventos vicariantes levando à especiação alopátrica (CASTRO, 1999).

O Brasil atualmente apresenta mais de 3.600 espécies de peixes de água doce (FISHBASE, 2024). Somente na drenagem do Alto rio Paraná, que compreende as drenagens a montante do reservatório da Itaipu, nos estados brasileiros Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, existem 341 espécies nativas, que estão alocadas em seis ordens e 30 famílias, além de 128 espécies não nativas (DAGOSTA et al., 2024). Seguindo a tendência relatada para a região Neotropical (LOWE-MCCONNEL, 1999), a maior riqueza é encontrada nas ordens Siluriformes e Characiformes (LANGEANI et al., 2007). Dentre as espécies do Alto Paraná, cerca de 76% são autóctones (espécies que ocorrem naturalmente no Alto Paraná), 22% são alóctones (espécies que são provenientes de outras bacias da região Neotropical e introduzidas no Alto Paraná) e 2% exóticas (espécies provenientes de outros continentes). Dentre as espécies alóctones e exóticas, 50% passaram a ocorrer no Alto Paraná após a construção da barragem de Itaipu (LANGEANI et al., 2007). Cerca de 88% das espécies do Alto rio Paraná são sedentárias ou migratórias curtas, com ciclo de vida relativamente curto, tamanho corporal pequeno a médio e com estratégias reprodutivas variadas. O restante de espécies migratórias (cerca de 12%), possuem tamanho corporal maior, ciclo de vida mais longo, fertilização externa e não exibem cuidados parentais (AGOSTINHO et al., 2007).

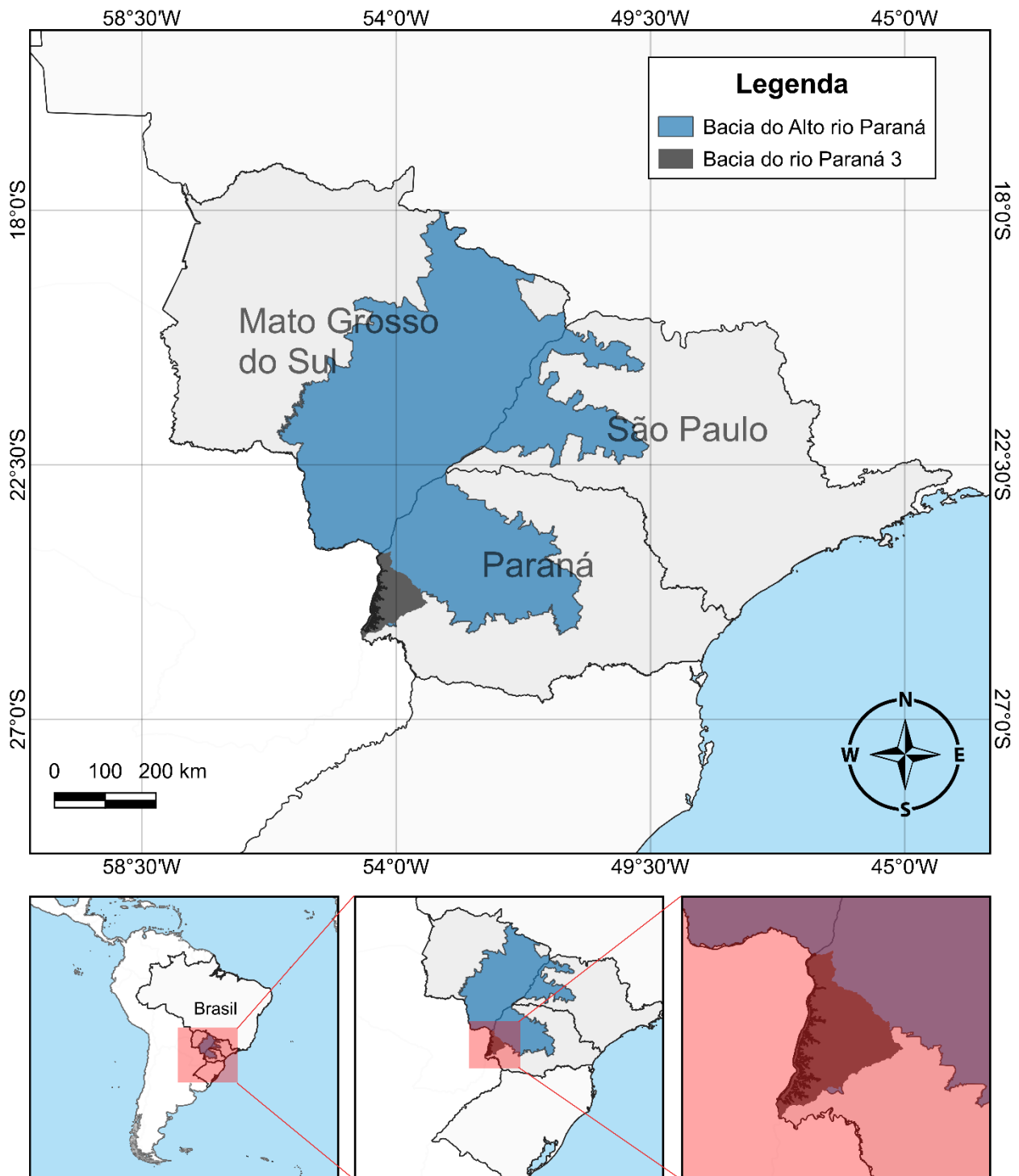
### **1.3 Bacias hidrográficas do Alto rio Paraná e Paraná 3**

O rio Paraná, formado pela confluência dos rios Grande e Paranaíba, é o segundo maior rio da América do Sul. Percorre 4.695 km, da sua nascente, no planalto central (Brasil), até a sua foz, no estuário do Prata (Argentina). É o décimo maior rio do mundo em vazão ( $5,0 \times 10^8 \text{m}^3/\text{ano}$ ) e o quarto em área de drenagem ( $2,8 \times 10^6 \text{km}^2$ ) (AGOSTINHO; VAZZOLER; THOMAZ, 1995). Sua bacia, formada pelos rios Paraná e Paraguai, é a segunda maior bacia da América do Sul, ocupando grande parte de sua porção centro-sul, das encostas dos Andes até a Serra do Mar, nas proximidades do Oceano Atlântico (AGOSTINHO; VAZZOLER; THOMAZ, 1995).

A bacia hidrográfica do Alto rio Paraná (Figura 2) abrange aproximadamente um terço da bacia do rio Paraná. Com exceção do trecho ao longo do

reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, que faz fronteira com o Paraguai, a bacia está totalmente em território brasileiro. Ela possui uma área de 891.000 km<sup>2</sup> (10,5% do território brasileiro) e compreende a região de maior densidade populacional (cerca de 65 milhões de habitantes) (RUDKE et al., 2022), os principais centros industriais e a agricultura mais intensiva do Brasil (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2004). Além disso, a região é altamente represada, com mais de 145 grandes barragens, a interferência antrópica que mais afeta a fisiografia da bacia (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE, 2007), pois somente cerca de 43,19% de seus cursos d'água estão livres de barramentos (LIERMANN et al., 2012). O único trecho da calha do rio Paraná livre de represamentos é a planície de inundação localizada entre a barragem de Porto Primavera e o reservatório da Itaipu, com cerca de 230 km (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2004). Antes da formação do reservatório de Itaipu, a bacia do Alto rio Paraná era delimitada da nascente do rio Paraná até a antiga cachoeira de Sete Quedas (com 619 km), sendo a bacia do Médio rio Paraná, da cachoeira de Sete Quedas até a foz do rio Iguaçu (190 km), e a bacia do Baixo rio Paraná, da foz do rio Iguaçu até a foz do rio Paraná, no estuário do La Plata (AGOSTINHO & ZALEWSKI, 1996). Com a criação do reservatório, a cachoeira de Sete Quedas ficou submersa, sendo então denominado Alto rio Paraná as drenagens a montante da barragem da Usina Hidrelétrica de Itaipu, incluindo a porção antes tida como médio rio Paraná (AGOSTINHO et al., 2000).

**Figura 2** - Bacia do Alto rio Paraná e bacia do rio Paraná 3.



Fonte: O autor (2024).

O reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, maior usina hidrelétrica do Brasil (14.000 MW de capacidade instalada) (DIAS et al., 2018), possui área inundada de

1.460 km<sup>2</sup>, dos quais 835 km<sup>2</sup> são brasileiros e 625 km<sup>2</sup> são paraguaios. Sua extensão, em seu eixo longitudinal, é de 151 km, entre as cidades de Foz do Iguaçu-Ciudad del Este e Guaíra-Salto del Guairá (AGOSTINHO; JÚLIO JR.; BORGHETTI, 1992). Ao submergir os baixos cursos dos rios locais, corredeiras e cachoeiras, como as Sete Quedas, o enchimento do reservatório provocou considerável alteração na composição ictiofaunística da região (AGOSTINHO & ZALEWSKI, 1995, 1996). Por exemplo, houve uma redução dos estoques de grandes peixes migradores, de alto valor comercial e um aumento na abundância de pequenas espécies sedentárias e baixo valor comercial (AGOSTINHO & ZALEWSKI, 1996; AGOSTINHO; OKADA; GREGORIS, 1999). Adicionalmente, pelo menos 60 espécies de peixes que ocorriam naturalmente na bacia do Baixo e Médio rio Paraná (ex.: *Heptapterus mustelinus* (Valenciennes, 1835)), puderam dispersar para a bacia do Alto rio Paraná, como resultado da criação do reservatório da Itaipu e da submersão da barreira natural das Sete Quedas (LANGGANI et al., 2007; DAGOSTA et al., 2024).

A bacia hidrográfica do Paraná 3 (BP3) (Figura 2) compreende a drenagem de rios e riachos que desembocam diretamente no rio Paraná, estando localizada entre as bacias dos rios Piquiri e Iguaçu, no Oeste do Estado do Paraná (INSTITUTO ÁGUA E TERRA, 2014a). Seus principais afluentes são os rios São Francisco que nasce na cidade de Cascavel, o Guaçu que nasce na cidade de Toledo, o São Francisco Falso que nasce na cidade de Céu Azul e o Ocoí que nasce na cidade de Matelândia (PEREIRA & SCROCCARO, 2013). Esta bacia drena uma área total de 8.389,31 km<sup>2</sup> e abrange 28 municípios (INSTITUTO ÁGUA E TERRA, 2014c), presente em uma região com intensa atividade agrícola, habitada por aproximadamente 700 mil pessoas (INSTITUTO ÁGUA E TERRA, 2014b). Está inserida na Ecorregião Florestas do Alto Paraná do Complexo Mata Atlântica, e a vegetação natural da região é caracterizada pela floresta estacional semidecidual. A topografia da região varia desde áreas relativamente planas, com solos profundos, em altitudes entre 150 e 250 m acima do nível do mar (próximas ao rio Paraná e a outros rios principais), a planaltos relativamente planos, com altitudes entre 550 e 800 m acima do nível do mar. Entre os rios principais e o planalto, as áreas tem altitudes entre 300 e 600 m acima do nível do mar, escarpas relativamente íngremes e são expostas à erosão do solo quando a cobertura florestal é removida (LIGIER, 2000). Apesar da grande variação de tipos de solos, com relação à textura, composição química e acidez, os solos da região são parcialmente ricos em nutrientes, geralmente profundos e de cor avermelhada, quando próximos aos rios principais, tornando-se menos profundos e mais pedregosos em altitudes maiores (LIGIER, 2000). Considerando o clima subtropical, a

precipitação fica na faixa de 1.000 a 2.200 mm por ano e não é distribuída uniformemente, podendo ocorrer períodos secos, normalmente no inverno. A temperatura média anual varia de 16 a 22°C com alta amplitude anual (DI BITETTI; PLACCI; DIETZ, 2003).

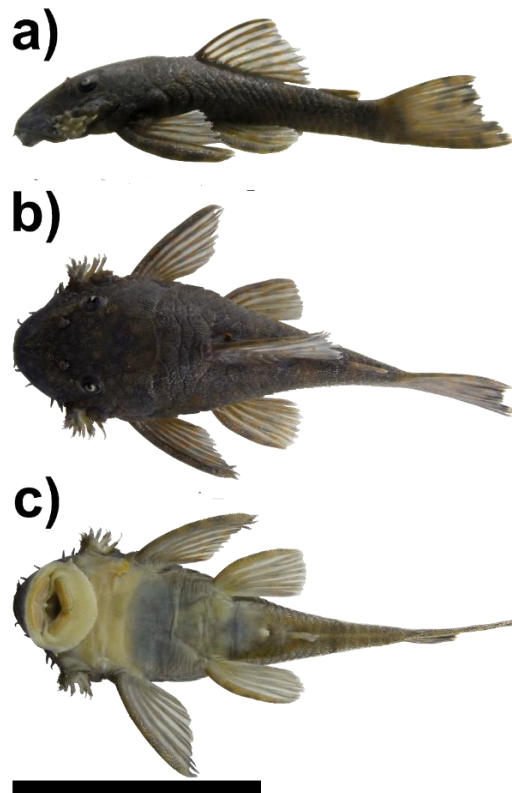
A BP3 apresenta diversas áreas de Corredores de Biodiversidade e é delimitada ao sul pelo limite do Parque Nacional do Iguaçu, onde se registra grande diversidade de organismos (PEREIRA & SCROCCARO, 2013). No entanto, a região vem sofrendo com diversas ameaças à conservação de sua biodiversidade. Existem as ameaças relacionadas ao uso da terra, como a forte expansão agrícola das últimas décadas; as relacionadas à infraestrutura, como a criação de diversas represas e estradas, todas causando a fragmentação, o isolamento e a degradação dos fragmentos florestais; além das relacionadas à caça predatória e ao uso insustentável das florestas nativas, que também vem empobrecendo e degradando os remanescentes florestais (DI BITETTI; PLACCI; DIETZ, 2003). Adicionalmente, temos ameaças à conservação da bacia do ponto de vista hídrico. Existe a possibilidade de contaminação das águas por efluentes agrícolas (PEREIRA & SCROCCARO, 2013): a BP3 apresenta um consumo de agrotóxicos acima da média do estado do Paraná (INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2013); por efluentes urbanos domésticos, pois o índice de tratamento de resíduos sanitários na região é baixo (PEREIRA & SCROCCARO, 2013), além da perda do regime de fluxo natural causada pelos represamentos (AGOSTINHO; PELICICE; GOMES, 2008).

A ictiofauna da BP3 é composta por 48 espécies de peixes, pertencentes a seis ordens, 13 famílias e 37 gêneros (PEREIRA et al., 2021). Confirmando o padrão encontrado na região (LOWE-MCCONNEL, 1999; LANGEANI et al., 2007), as ordens mais representativas foram Siluriformes, com 19 espécies (39,6%), e Characiformes, com 17 espécies (35,4%), totalizando 75% das espécies encontradas. Quatro foram as famílias dominantes: Characidae com 10 espécies (20,8%), Loricariidae com nove espécies (18,7%), Heptapteridae com seis espécies (12,5%), e Cichlidae, também com seis espécies (12,5%). A espécie *Heptapterus mustelinus* foi a mais abundante em número de indivíduos e uma das mais prevalentes em distribuição dentro da BP3, juntamente com *Ancistrus* sp., a terceira espécie mais abundante e prevalente (PEREIRA et al., 2021). Esses dados demonstram a importância dessas espécies para a biodiversidade da região, a qual se configura numa região altamente impactada pelas ações antrópicas.

#### 1.4 Caracterização das espécies *Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus*

A espécie *Ancistrus* sp. (Figura 3) é conhecida popularmente como “cascudinho” ou “cascudo-barbudo” (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007). Pertencente à ordem Siluriformes e à família Loricariidae, a espécie distribui-se pelo rio São Francisco Verdadeiro e bacia do alto rio Paraná (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007). A espécie pode chegar ao comprimento máximo de 14 cm, possui corpo escuro com algumas manchas claras, sobretudo sobre a cabeça, e nadadeiras claras com manchas escuras (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007). Trata-se de uma espécie ainda não descrita, pertencente a um complexo de espécies difíceis de distinguir pelos caracteres morfológicos tradicionais. Segundo Zawadzki (2004), é provável que exista outras espécies desse gênero na região do alto rio Paraná. Já Prizon (2018), com base em marcadores citogenéticos e moleculares, sugere a existência de pelo menos quatro espécies candidatas de *Ancistrus*, além da conhecida *A. cirrhosus*, para a bacia do Paraná. É sabido que as espécies do gênero *Ancistrus* são algívoras e detritívoras (POWER, 1983; ABELHA; AGOSTINHO; GOULART, 2001), se alimentando principalmente de algas que raspam das superfícies subaquáticas, como pedras e troncos, usando seus dentes especializados, além de matéria orgânica em decomposição. Por seu hábito alimentar específico, que os mantém próximos a superfícies, hábito bentônico, comportamento territorial e por cuidarem de seus ninhos na época reprodutiva (BALON, 1975; POWER, 1983), as espécies do gênero *Ancistrus* apresentam baixa vagilidade.

**Figura 3** - Espécime de *Ancistrus* sp. coletado em um riacho situado na bacia hidrográfica do Paraná 3. a) Vista lateral. b) Vista dorsal. c) Vista ventral. Barra de escala: 3 cm.



Fonte: O autor (2024).

A espécie *Heptapterus mustelinus* (Valenciennes, 1835) (Figura 4) é conhecida popularmente como “bagrinho” ou “bagre-pedra” (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007). Pertencente à ordem Siluriformes e à família Heptapteridae, a espécie distribui-se pelas bacias do Prata e sul do Brasil (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007) e pode chegar ao comprimento total máximo de 28 cm (MONTERO & AUTINO, 2009). É caracterizada como uma espécie de hábitos gregários (MONTERO & AUTINO, 2009), que prefere águas rápidas e vive associada ao substrato, próximo à vegetação ripária (BUCKUP, 1988; ALBRECHT, 2012). Possui hábitos alimentares carnívoros oportunistas (RINGUELET, 1975), alimentando-se principalmente de insetos aquáticos (ALBRECHT, 2012). Possui coloração castanha, com algumas faixas transversais escuras sobre o dorso e nadadeiras claras (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007). É uma espécie ovípara com fertilização externa (MALABARBA et al., 2013). Na literatura é discutido se a espécie é tolerante ou não à contaminação ambiental. Por exemplo, Vreys et al. (2019) recentemente testaram se as alterações antrópicas no ambiente afetam o estado de saúde de *H. mustelinus*, utilizando

em sua avaliação biomarcadores enzimáticos e análises histológicas, encontrando que o peixe é um bom bioindicador da qualidade do ambiente.

**Figura 4** - Espécime de *Heptapterus mustelinus* coletado em um riacho situado na bacia hidrográfica do Paraná 3. a) Vista lateral. b) Vista dorsal. Barra de escala: 3 cm.



Fonte: O autor (2024).

Estas duas espécies de peixes habitantes de riachos foram selecionadas para o presente trabalho por serem abundantes e amplamente distribuídas na bacia hidrográfica do Paraná 3 (BP3), permitindo a análise de diferentes microbacias da BP3.

## 1.5 Genética de populações

Dentro do conceito de diversidade biológica ou biodiversidade utilizado na biologia da conservação, a biodiversidade deve ser considerada em três níveis: diversidade de ecossistemas, diversidade de espécies e diversidade genética. A diversidade genética é considerada o nível basal de diversidade entre os três e um pré-requisito para a diversidade de populações, espécies e ecossistemas (PRIMACK, 2010; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Ela é um componente da variação genética encontrada dentro e entre indivíduos de uma população e entre populações de uma espécie, sendo em si, a variedade de alelos e genótipos presentes nas populações, espécies ou grupos de espécies

(FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). A diversidade genética é necessária para que uma espécie mantenha a sua vitalidade reprodutiva, a resistência às doenças e para a adaptação a um ambiente em mudança, por meio do processo de seleção natural (PRIMACK, 2010). O estudo da genética de populações tenta compreender quanta variação genética está presente em uma população, como essa variação genética muda ao longo do tempo e o padrão de variação genética que pode ser perdido por processos que atuam no tempo ou no espaço. Para tanto, é necessário entender os mecanismos básicos da herança mendeliana e processos como mutação, padrões de acasalamento, fluxo gênico e seleção natural que moldam a variabilidade genética (HAMILTON, 2009).

É sabido que a diversidade biológica do planeta está diminuindo devido às consequências diretas e indiretas das atividades antrópicas. Além disso, estima-se que a diversidade genética esteja diminuindo ainda mais rapidamente do que a diversidade de espécies, pois populações locais geneticamente distintas se extinguem antes de toda a espécie, resultando na diminuição do potencial adaptativo (MANEL et al., 2020), aumento da endogamia e na redução da sobrevivência e reprodução das espécies (redução do *fitness*) (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Assim, a perda ou diminuição da diversidade genética é um dos primeiros indícios de que uma população e/ou espécie possa estar sob ameaça.

A diversidade genética frequentemente está distribuída de maneira desuniforme, em um padrão dentro e entre as populações que é conhecido como estrutura genética populacional (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005, FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). A estrutura genética populacional pode ser entendida como a heterogeneidade em uma população nas chances de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente se acasalarem (HAMILTON, 2009). Essa estruturação pode ocorrer quando uma barreira geográfica, comportamental ou temporal separa uma população antes panmítica, e a taxa de fluxo gênico entre as subpopulações agora separadas é reduzida. A redução no fluxo gênico permite a atuação independente das subpopulações, podendo resultar numa diferenciação populacional das frequências alélicas. Outra causa de estruturação genética populacional é o isolamento por distância, onde a chance de acasalamento ou fluxo gênico é diminuída com o aumento da distância geográfica entre indivíduos ou populações (HAMILTON, 2009). As atividades antrópicas também interrompem o fluxo gênico natural entre populações, causando diferenciação genética e reduzindo a diversidade genética dentro de cada população (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; PRIMACK, 2010), dado que as

populações menores experimentam com maior intensidade os efeitos da deriva genética (HAMILTON, 2009; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; PRIMACK, 2010).

A estrutura genética populacional de uma espécie pode assumir três formas básicas separadas ou combinadas, sendo elas: I. populações distintas, onde o fluxo gênico entre populações locais é pequeno e permite a divergência genética, II. populações com mudança genética contínua, onde o fluxo gênico entre populações próximas resulta em uma mudança genética contínua sobre a área de distribuição como um todo e/ou, III. populações sem diferenciação, onde há a prevalência da homogeneidade genética sobre grandes áreas geográficas e extenso fluxo gênico (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

## 1.6 Genômica de populações e Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP)

Durante a década de 1990, o código genético completo de vários organismos-modelo foi desvendado, marcando o início da genômica, que se trata do estudo de genomas inteiros (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; ELLEGREN, 2014). As novas abordagens genômicas possibilitaram avanços em diversas análises, como estimativas da taxa de recombinação, estimativas de parentesco e reconstrução de linhagens, estimativas de fluxo gênico entre populações e taxas de migração, avaliação da quantidade de divergência adaptativa entre populações e da adaptação local, distinção entre hibridização natural e antropogênica e efeitos da hibridização na aptidão (*fitness*), estimativas dos efeitos da depressão endogâmica e exogâmica, influência da deriva genética e da seleção natural na evolução e persistência das populações, identificação de unidades populacionais, e manejo de populações *ex situ* e reintroduções (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; ELLEGREN, 2014). De fato, o que possibilitou esses avanços foi a junção das novas tecnologias de sequenciamento em larga escala, o sequenciamento de próxima geração (do inglês, *next-generation sequencing* – NGS), com as ferramentas computacionais de análise genômica recentes, permitindo o estudo de polimorfismos em todo o genoma também de organismos não-modelo. Nesse contexto, foi descrito o método de sequenciamento com dupla digestão enzimática associada à sítios de restrição (do inglês, *double digest Restriction-Associated-DNA sequencing* – ddRADseq) por Peterson et al. (2012). O ddRADseq é uma abordagem eficiente e econômica para a descoberta e genotipagem de Polimorfismos de Nucleotídeo

Único (SNPs). Ele envolve a dupla digestão do DNA com enzimas de restrição que diferem quanto a frequência do corte (geralmente uma de corte raro e uma de corte frequente), seguida pelo sequenciamento das regiões flanqueadas por essas enzimas, permitindo a detecção de milhares de polimorfismos ao longo do genoma. O intuito é sequenciar as mesmas diferentes regiões em diferentes indivíduos. A principal vantagem do ddRADseq é a sua capacidade de gerar um grande número de marcadores genéticos com alta precisão, mesmo em espécies sem genomas de referência.

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular derivado de um gene expresso ou de um fragmento de DNA específico. Para ser adicionalmente definido como marcador genético, o marcador molecular deve se comportar de acordo com as leis básicas da herança mendeliana (SODRÉ; ALMEIDA; CHIARI, 2002). O polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphism* – SNP), como sugere o nome, é uma mudança de base única em uma sequência de DNA (VIGNAL et al., 2002), abundante e difundido na maioria dos genomas (em muitas espécies, um SNP é encontrado a cada 200 a 500 pares de base), presente em regiões codificantes e não codificantes (MORIN et al., 2004), sendo este um marcador genético bastante utilizado atualmente. Os SNPs são marcadores codominantes e geralmente bi-alélicos (dois nucleotídeos alternativos possíveis para uma determinada posição), onde o alelo menos abundante deve ter frequência igual ou superior a 1% (VIGNAL et al., 2002). Eles possuem potencial para detecção de seleção/adaptação e são úteis no estudo de organismos não-modelo (organismos não sujeitos a grandes projetos genômicos) (MORIN et al., 2004), como é o caso das diversas espécies de peixes sul-americanos (MARTÍNEZ et al., 2017), que na sua maioria não possuem seus genomas sequenciados.

## **1.7 Genética/genômica de populações em peixes de água doce**

Os peixes são animais de grande diversidade morfológica, ecológica, comportamental e genômica, além de possuírem grande capacidade de adaptação, sendo assim, excelentes modelos para estudos evolutivos e genéticos (VOLFF, 2005; HOHENLOHE et al., 2010). Algumas das regiões do DNA que são amplamente utilizadas para estudos populacionais de peixes são: a região *barcode*, um fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) e a região *D-loop*, ambos do DNA mitocondrial,

sendo a primeira região utilizada para fins de identificação de espécies (HERBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003) e a segunda região utilizada no delineamento da genealogia e/ou filogenia materna e ainda em análises populacionais e evolutivas (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2012). Outro marcador bastante utilizado em estudos populacionais de peixes são os microssatélites, que são pequenas regiões repetitivas do DNA nuclear altamente polimórficos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010); e mais recentemente, com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de próxima geração, os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) tem sido bastante empregados em estudos de genômica populacional por permitir a análise de centenas à milhares de marcadores/polimorfismos simultaneamente ao longo de todo o genoma (HANSEN et al., 2017).

Atualmente, a utilização de marcadores moleculares SNPs está cada vez mais difundida, permitindo uma análise genômica em larga escala, com alta resolução (TAUTZ; ELLEGREN; WEIGEL, 2010). Esses marcadores têm sido aplicados em estudos de diversidade genética, estrutura populacional, adaptação local, evolução e manejo de populações naturais de peixes de água doce neotropicais (WILLING et al., 2010; RÍOS et al., 2020; GARCIA, 2022; AMERICO, 2022).

Ríos et al. (2020), investigaram a genômica populacional do peixe *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), uma espécie de bagre encontrada no sistema da bacia Neotropical do Sul, que inclui a Bacia do Prata, a bacia das lagoas de Patos-Mirim e as lagoas costeiras que drenam para o sudoeste do Oceano Atlântico. O estudo realizado a partir de marcadores SNPs revela uma profunda divergência genética entre os dois principais grupos analisados, sugerindo que estas populações se separaram há bastante tempo. Além disso, são identificados sinais de adaptação local a um ambiente lagunar costeiro, adaptação que pode ser resposta às condições ambientais específicas deste ambiente. Também foram revelados alguns genes candidatos interessantes para estudos funcionais adicionais. O estudo proporcionou uma melhor compreensão da complexa história evolutiva de *R. quelen*.

Garcia (2022) ao considerar a importância das espécies migradoras para o ecossistema, objetivou desenvolver marcadores moleculares do tipo SNPs para a espécie migradora de longas distâncias *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), coletada no Rio Mogi-Guaçu. Esses marcadores foram aplicados através de metodologias de genética populacional em cardumes migradores e residentes, com o intuito de identificar a possível

existência de estruturação e analisar a variabilidade genética desses organismos. Os resultados indicaram sinais iniciais de estruturação genética para os residentes e um possível aumento da endogamia. Esses achados sugerem a necessidade de monitoramento dos curimatás do rio Mogi-Guaçu para preservar a variabilidade genética nos cardumes da espécie.

Américo (2022) objetivou caracterizar geneticamente indivíduos da espécie *Parancistrus aurantiacus* (Castelnau, 1855) que ocorrem no rio Tocantins e avaliar a distribuição e conexões existentes entre eles, por meio de marcadores SNPs. Foi apontada a existência de uma única unidade panmítica entre os pontos amostrados e ausência de estruturação genética, mostrando a importância da realização conjunta de planos de gestão e manejo. O estudo também fornece recomendações para a preservação da diversidade genética da espécie e de seus habitats naturais nas corredeiras do rio Tocantins.

Os trabalhos acima destacam a importância e as inúmeras possibilidades de análises dos estudos em genômica populacional e do uso de marcadores SNPs, seja para compreender a história evolutiva das espécies, analisar a variabilidade e estrutura genéticas, ou para caracterizar geneticamente as espécies com fins de conservação. Contudo, apesar de sua relevância, pesquisas com espécies de peixes de pequeno porte ou de baixo valor comercial ainda são escassas, especialmente as espécies Neotropicais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Dentro do contexto apresentado, este trabalho tem por objetivo geral avaliar a influência do reservatório da Itaipu nos índices de diversidade e estrutura genética de peixes de riachos (*Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus*), com base em marcadores moleculares SNPs.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Estimar os índices de diversidade genética de *Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus* para compreender os padrões de diversidade nas populações avaliadas;
2. Estimar os índices de estruturação populacional e de endogamia entre as populações dessas espécies para entender o padrão de distribuição da diversidade genética dentro e entre suas populações;
3. Avaliar se o rio Paraná pode atuar como barreira à dispersão de peixes de pequeno porte que habitam riachos entre microbacias de uma mesma margem, as quais são conectadas pelo próprio rio Paraná.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das amostras

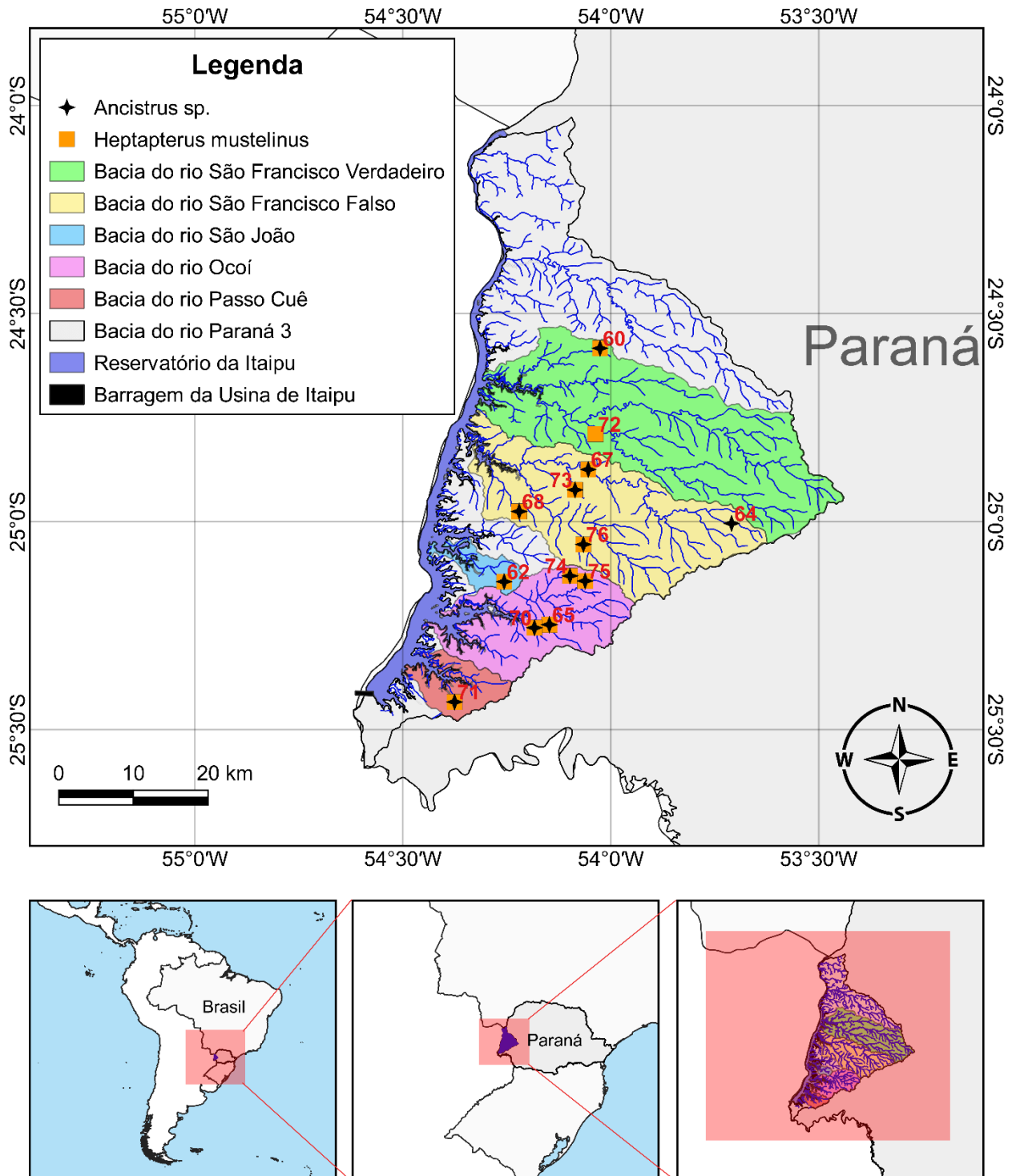
Para o presente trabalho, foram analisadas duas espécies de peixes de riacho: *Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus*, espécies abundantes e amplamente distribuídas na BP3, permitindo a análise de diferentes microbacias (Figura 5). Os espécimes de *Ancistrus* sp. e *H. mustelinus* estavam disponíveis na coleção de tecidos da coleção de ictiologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Os animais foram coletados sob licença permanente para obtenção de material zoológico obtida junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), em nome do orientador, de número 39135-1. No caso específico de *Ancistrus* sp., uma espécie ainda não descrita, foi testada a sua validade como espécie realizando o seu *barcode*, resultando que os indivíduos disponíveis na coleção de ictiologia da UNILA, realmente pertencem a uma única espécie (PEREIRA, L. H. G., comunicação pessoal). Para a obtenção dos dados de diversidade genética foram utilizadas amostras de tecido muscular de 76 indivíduos, 39 espécimes de *Ancistrus* sp. e 37 espécimes de *H. mustelinus*, sendo de um a dez indivíduos por microbacia (Tabela 1). Os pontos e espécimes foram selecionados de modo a representar o maior número de microbacias da BP3. Aqui serão consideradas como microbacias, as drenagens que confluem para o rio maior que desagua direto no reservatório da Itaipu, sendo o reservatório (rio Paraná) o único meio de ligação entre elas. Foram analisadas cinco microbacias, contendo cada microbacia, para *Ancistrus* sp., os pontos: Microbacia 1 (MB1) = microbacia do rio São Francisco Verdadeiro (P60), Microbacia 2 (MB2) = microbacia do rio São Francisco Falso (P64, P67, P68, P73 e P76), Microbacia 3 (MB3) = microbacia do rio São João (P62), Microbacia 4 (MB4) = microbacia do rio Ocoí (P65, P70, P74 e P75) e Microbacia 5 (MB5) = microbacia do rio Passo Cuê (P71), e para *H. mustelinus*, os pontos: Microbacia 1 (MB1) = microbacia do rio São Francisco Verdadeiro (P60 e P72), Microbacia 2 (MB2) = microbacia do rio São Francisco Falso: (P67, P68, P73 e P76), Microbacia 3 (MB3) = microbacia do rio São João (P62), Microbacia 4 (MB4) = microbacia do rio Ocoí (P65, P70, P74 e P75) e Microbacia 5 (MB5) = microbacia do rio Passo Cuê (P71) (Figura 5).

**Tabela 1** - Espécies e números de indivíduos analisados (**N**), além das microbacias e seus pontos de coleta com coordenadas (latitude e longitude), lote onde os espécimes foram depositados e seus *voucher*.

Espécie	Microbacias	Pontos	Latitude	Longitude	Lote	Voucher	N				
<i>Ancistrus</i> sp.	São Francisco Verdadeiro (MB1)	P60	24°34'59.29"S	54°1'33.43"W		3441	7				
					1132	3442					
						3443					
						1967					
					632	1969					
						1970					
						1971					
	São Francisco Falso (MB2)	P67	24°52'28.51"S	54°3'15.58"W	1135		3451	10			
							3452				
						P73	24°55'24.80"S		54°5'9.84"W	S/D	3472
							3473				
						P68	24°58'31.70"S		54°13'13.53"W	1124	3404
							3405				
		1148	3505								
	P76	25°3'17.03"S	54°3'57.64"W	1537		4834					
						4835					
	P64	25°0'15.34"S	53°42'34.78"W	S/D	3523						
	Rio São João (MB3)	P62	25°8'39.30"S	54°15'23.55"W	1509	S/D	3519	7			
							4534				
						4536					
						4537					
						4538					
						4666					
						1625	4983				
Rio Ocoí (MB4)	P74	25°7'49.44"S	54°5'53.93"W	1146		3496	8				
						3489					
						3490					
						3431					
						3432					
P70	25°15'18.05"S	54°11'1.48"W	1130	3433							
P65	25°14'51.42"S	54°8'52.22"W	1142		3479						
				1526	4609						
Rio Passo Cuê (MB5)	P71	25°26'0.52"S	54°22'32.86"W	1127		3416	7				
						3417					
						3418					
						3419					
						1523		4594			

<i>Heptapterus mustelinus</i>						4597	
						4598	
	<b>São Francisco Verdadeiro (MB1)</b>	<b>P60</b>	24°34'59.29"S	54°1'33.43"W	1511	4677	7
						4679	
						4680	
						4519	
						4521	
		<b>P72</b>	24°47'22.00"S	54°2'12.68"W	1506	4522	
						4523	
	<b>São Francisco Falso (MB2)</b>	<b>P67</b>	24°52'28.51"S	54°3'15.58"W	1134	3447	8
						3448	
		<b>P73</b>	24°55'24.80"S	54°5'9.84"W	1516	4704	
						4706	
		<b>P68</b>	24°58'31.70"S	54°13'13.53"W	1123	3406	
						3407	
		<b>P76</b>	25°3'17.03"S	54°3'57.64"W	1536	3408	
						4621	
	<b>Rio São João (MB3)</b>	<b>P62</b>	25°8'39.30"S	54°15'23.55"W	S/D	4531	7
						4532	
						4533	
					4667		
					4668		
					4669		
					4670		
<b>Rio Ocoí (MB4)</b>	<b>P74</b>	25°7'49.44"S	54°5'53.93"W	1145	3494	8	
				1504	4513		
	<b>P75</b>	25°8'33.29"S	54°3'42.73"W	1514	4555		
					4556		
					4557		
	<b>P70</b>	25°15'18.05"S	54°11'1.48"W	1519	4580		
					4581		
	<b>P65</b>	25°14'51.42"S	54°8'52.22"W	1525	4782		
<b>Rio Passo Cuê (MB5)</b>	<b>P71</b>	25°26'0.52"S	54°22'32.86"W	S/D	4590	7	
					4591		
					4593		
					4745		
					4746		
					4747		
					4748		

**Figura 5** - Pontos de amostragem das espécies *Ancistrus* sp. e *Heptapterus mustelinus* (números em vermelho) e suas localizações nas cinco microbacias analisadas dentro da bacia hidrográfica do Paraná 3.



Fonte: O autor (2024).

### 3.2 Da extração de DNA à construção de biblioteca genômica

As amostras tiveram seu DNA total extraído, a partir da musculatura, com o uso de kit de extração comercial Promega, seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi confirmada em gel de agarose e a quantificação foi realizada em aparelho de fluorimetria Quantus™ Fluorometer da Promega. Cada amostra foi padronizada para uma concentração final de 5,88 ng/μl por meio de diluições com água milli-Q, sendo utilizados 200 ng de DNA total (34 μl de solução) na etapa de digestão enzimática. A partir disso, a biblioteca genômica foi construída por meio da técnica de sequenciamento com dupla digestão enzimática associada à sítios de restrição (ddRADseq), utilizando o protocolo adaptado por Campos et al. (2017), seguindo as diretrizes de Peterson et al. (2012).

Para a reação de dupla digestão enzimática foram utilizadas 34 μl de DNA total (5,88 ng/μl), 1,0 μl de cada enzima EcoRI (corte raro) e MspI (corte frequente) e 4 μl *TANGO buffer (Cut Smart)* para um volume final de 40 μl, por amostra. A solução foi posteriormente incubada a uma temperatura de 37°C por três horas. Após a digestão do genoma pelas enzimas, foi realizada a reação de purificação, que teve a finalidade de eliminar os restos de enzimas e remover fragmentos menores que 100 pares de bases. Para a purificação, foram utilizadas o kit de *beads* (esferas magnéticas) Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os fragmentos amplificados restantes foram diluídos em 50 μl de água. Depois da purificação do DNA, foi realizada a ligação dos adaptadores.

Para cada enzima utilizada na digestão do DNA foi adicionado um determinado adaptador. Um par de adaptadores hibridizados P1 correspondente à enzima EcoRI e P2 correspondente à enzima MspI foram ligados aos fragmentos digeridos, por meio de uma reação de volume final de 40 μl, constituída de 2,0 μl do adaptador específico de cada uma das enzimas, 4 μl de T4 Ligase Buffer 10X (Promega), 0,5 μl da enzima T4 Ligase (Promega) e 31,5 μl do material digerido. Em seguida, as amostras foram incubadas a uma temperatura de 23°C por 30 minutos, 65°C por 10 minutos, 63°C por 90 segundos, sendo então, a temperatura diminuída 2°C a cada 90 segundos, até alcançar 23°C. Após essa etapa, as amostras da reação de ligação foram purificadas novamente, utilizando o kit de *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os fragmentos amplificados restantes foram diluídos em 30 μl de água.

Para a reação de indexação, foram inseridas em cada amostra a sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) i5 e i7 (Nextera DNA CD Indexes – 96 indexes, 96 samples), nos incertos ligados aos adaptadores. Para a reação foram utilizados 15 µl do produto de ligação, 25 µl de Go Taq® Master Mixes (Promega) e 5 µl de cada index i5 e i7, a fim de obter um volume final de 50 µl. Para a correta identificação, são indexadas amostra por amostra, com uma combinação única de index, com os respectivos *barcode*. A reação de PCR para indexação foi realizada de acordo com as seguintes condições de ciclo: um ciclo inicial a 95°C por 30 s, seguidas de 16 ciclos a 95°C por 10 s, um passo de anelamento a 55°C por 30 s, um passo de extensão a 72°C por 30 s, finalizando com um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. Após a reação de PCR de indexação, os fragmentos foram purificados utilizando o kit de *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para verificar se as amostras haviam indexado, elas foram aplicadas em um gel de agarose 1% e após a confirmação positiva, foram quantificadas em um aparelho Quantus Fluorometer (Promega), apresentando concentrações que variaram de 71,6 ng/µl a 138 ng/µl.

Para a etapa de sequenciamento NGS foi obtido um *pool* das amostras, sendo que cada amostra foi diluída para uma concentração de 30 ng/µl, a fim de obter as mesmas concentrações finais de DNA por amostra na confecção do *pool*. O *pool* foi composto de 5 µl de cada amostra normalizada em um volume final de 385 µl. Em seguida, foi realizada a purificação do *pool* utilizando o kit de *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os fragmentos amplificados restantes foram diluídos em 40 µl de água.

Para a realização do *size-selection*, que objetiva selecionar o tamanho dos fragmentos de interesse, o *pool* de amostras foi aplicado em gel de agarose 1%. Ao final da eletroforese, uma parcela do gel com os fragmentos de tamanho entre 300 e 500 pb foi excisada. Em seguida, foi realizada a purificação com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após, foi realizada a quantificação do DNA em um aparelho Quantus Fluorometer (Promega), tendo sido obtido um valor de concentração final de 16,4 ng/µl.

Para verificar e confirmar a concentração da biblioteca para o sequenciamento, foi realizada uma PCR em tempo real (qPCR), que foi posteriormente normalizada. A biblioteca foi sequenciada com leituras de extremidade única (*single end*) de 150 pb, em uma célula de fluxo (*flow cell*) High Output, na plataforma NGS Illumina

NextSeq550 Series, no Laboratório de Pesquisa em Análises Genéticas no Instituto de Biotecnologia (IBTEC – UNESP, campus Botucatu/SP).

### 3.3 Análises de bioinformática

Após o sequenciamento da biblioteca, foram obtidas as leituras das *reads* (sequências). A acurácia da qualidade das *reads* foi verificada utilizando dois programas: o FastQC (ANDREWS, 2010) (disponível em <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), que verifica diferentes parâmetros de qualidade das *reads* de cada amostra e o MultiQC (EWELS et al., 2016) (disponível em <https://github.com/ewels/MultiQC>) que sumariza os resultados do FastQC e aplica para todas as *reads* das amostras. Os dados obtidos por meio destes programas ilustram, por meio de gráficos, o grau de qualidade das amostras, como a presença de sequências dos adaptadores usados na construção da biblioteca, índices de qualidade *Phred Quality Score*, tamanhos das *reads* em pares de base (pb), etc. Posteriormente, o programa TRIMMOMATIC v.o.32 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) foi utilizado para realizar etapas de controle de qualidade: remoção de adaptadores, de *reads* de baixa qualidade (*Phred Quality Score* <Q20) e padronização de *reads* em um tamanho de 144 pb.

Como ambas as espécies não apresentam genomas de referência nos bancos de dados públicos, foi realizada a montagem do catálogo de marcadores utilizando amostras que apresentaram um maior número de *reads*, ou seja, com melhor representatividade. Deste modo, o rastreamento de SNPs foi feito utilizando a pipeline *de novo* do STACKS (Catchen et al., 2011). Os parâmetros finais para a montagem dos loci no *software* USTACKS foram: M=2, que controla o número de incompatibilidades permitidas entre os alelos de um determinado loci e m=3, que controla o número de *reads* idênticas mínimas necessárias para iniciar um possível alelo. Foram utilizados também o *software* CSTACKS para a construção do catálogo a partir de amostras processadas pelo USTACKS, e o *software* SSTACKS para comparar todas as amostras com o catálogo. Por fim, foi utilizada a pipeline *ref map* do STACKS (Catchen et al., 2011) para construir o índice de referência, utilizando como alinhador de cada amostra o *software* Bowtie2. Ao final do processo, foi utilizado o *software* Populations v.1.2.28 (LANGELLA, 1999), implementado

do STACKS, para a realização dos filtros de SNPs a nível populacional. Assim, primeiramente foram selecionados SNPs que genotiparam em pelo menos 80% dos indivíduos de cada população ( $r = 0,80$ ) e, em seguida, foi aplicado um filtro com o qual foram excluídos SNPs que apresentaram valor de MAF (Minor allele frequency)  $<0,05$ .

### 3.4 Análises de diversidade e estruturação genéticas

O conjunto final de SNPs identificados foi submetido ao *software* Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) com 1023 permutações para a investigação da diversidade genética, onde foram estimadas a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). Para a diferenciação genética entre as populações, foram estimados os índices de fixação interpopulacionais ( $F_{ST}$ ), o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e a Análise de Variância Molecular (do inglês, *Analysis of Molecular Variance* - AMOVA). Para a AMOVA foram testados três cenários hipotéticos de agrupamentos. Inicialmente, foi utilizado um cenário considerando todas as amostras como um único grupo. No segundo cenário, foi usado o agrupamento por microbacias, que considerou cada microbacia como uma população. No terceiro cenário, foram testados três grupos: o primeiro contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5 (este terceiro cenário foi baseado em uma análise prévia de  $F_{ST}$  par a par que evidenciou ausência ou baixa estruturação entre as microbacias 1, 2 e 3). Para a interpretação dos valores de  $F_{ST}$ , foi utilizado como referência Nei (1978), que indica que valores de  $F_{ST}$  até 0,05 são baixos, valores acima de 0,05 até 0,15 são moderados, valores acima de 0,15 até 0,25 são fortes e valores acima de 0,25 são altos valores de estruturação genética.

Para avaliar a estrutura populacional e a mistura entre os indivíduos e as populações foi realizada a análise bayesiana através do *software* STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), com o objetivo de estimar o número de *clusters* genéticos ( $k$ ) existentes, com  $k=1$  a  $k=10$  e com 100.000 de MCMC e *burn-in* de 10%, com 10 interações para cada  $K$ . A identificação do número de *clusters* genéticos ( $k$ ) foi feita através do método Evanno ( $\Delta K$ ) (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) e MedMed  $K$  do método de Puechmaille (PUECHMAILLE, 2016), utilizando a ferramenta *online* Structure Selector (LI & LIU, 2018) e os gráficos foram sumarizados e visualizados no

CLUMPAK (KOPELMAN et al., 2015). Com o objetivo de complementar este resultado, foi realizada uma Análise Discriminante de Componentes Principais (do inglês, *Discriminant Analysis of Principal Components* - DAPC) (JOMBART & AHMED, 2011) pelo pacote *adegenet* do *R* para estimar os números de *clusters* genéticos. O número apropriado de *clusters* genéticos foi determinado utilizando o Critério de Informação Bayesiana (do inglês, *Bayesian Information Criterion* - BIC). A Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) possui uma metodologia que permite atribuir os indivíduos a suas populações ou pontos de origem. Foram testadas duas configurações: uma com atribuição prévia das populações e outra sem essa atribuição, permitindo que a análise formasse os *clusters* livremente. Como os *clusters* obtidos foram idênticos para ambas as configurações, optou-se por apresentar apenas uma delas nos resultados.

Por fim, foram analisados dados espaciais de distância geográfica, que foram obtidos com o auxílio do *software* QGIS v.3.28.8-Firenze (Quantum GIS Development Team, [www.qgis.org](http://www.qgis.org)). Foi feita uma correlação entre a distância genética e a distância geográfica (em quilômetros) de um ponto médio de uma microbacia a outra, pelos leitos dos rios, sob a hipótese de isolamento por distância, utilizando o teste de Mantel no *software* Arlequin v.3.5.2.2 com 10.000 permutações.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 *Ancistrus* sp.

#### 4.1.1 Identificação de SNPs

A identificação de SNPs para a espécie *Ancistrus* sp. a partir do sequenciamento de ddRADseq para as 39 amostras obtidas, resultou no total de 26.444.470 sequências (*reads*) que apresentaram uma variação de 109.143 a 813.675 *reads* por amostra. Após as filtrações de qualidade, foram mantidas 25.870.113 *reads* que apresentaram uma variação de 106.527 a 788.023 *reads* por amostra, sendo obtido 97,82% de aproveitamento. Todas as sequências foram padronizadas com 144 pb. Ao fim das etapas de filtração, a biblioteca resultou em uma média de 361.207 *reads* por amostra para *Ancistrus* sp. O processo final de filtração de SNPs resultou em um conjunto final com 11.240 marcadores SNPs (Tabela 2).

**Tabela 2** - Amostras de *Ancistrus* sp. utilizados para técnica de ddRADseq. Ao final da tabela consta a quantidade de SNPs e sítios polimórficos obtidos para todas as amostras. **Amostras:** corresponde ao número de *voucher* seguido do nome do ponto de coleta; **Microbacias:** conjunto de riachos que se unem a um rio principal e desaguam direto no reservatório de Itaipu; **Reads:** corresponde as *reads* remanescentes após processo de filtragem.

Amostras	Microbacias	Reads	Amostras	Microbacias	Reads
3441P60		323.944	4537P62	MB3	364.572
3442P60		395.845	4538P62		368.727
3443P60		331.809	4666P62		381.068
1967P60	MB1	374.916	4983P62		388.515
1969P60		342.763	3496P74		407.960
1970P60		384.374	3489P75		374.886
1971P60		343.295	3490P75		337.477
3451P67		378.401	3431P70	MB4	405.854
3452P67		402.550	3432P70		346.042
3472P73		402.964	3433P70		246.451
3473P73		390.734	3479P65		337.119
3404P68	MB2	273.174	4609P65		58.523
3405P68		362.507	3416P71		323.546
3505P76		369.296	3417P71		343.163
4834P76		425.739	3418P71		329.717
4835P76		403.138	3419P71	MB5	407.264
3523P64		445.090	4594P71		367.636
3519P62		410.844	4597P71		390.459
4534P62		417.698	4598P71		399.207
4536P62		351.809			
<b>N total</b>		<b>SNPs total</b>	<b>Sítios polimórficos</b>		
39		11.240	8.738		

Fonte: O autor (2024).

#### 4.1.2. Diversidade genética de *Ancistrus* sp.

Os índices de diversidade genética total para *Ancistrus* sp. foram: heterozigiosidade esperada ( $H_e$ ) = 0,342, heterozigiosidade observada ( $H_o$ ) = 0,096, índice de fixação ou coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) = 0,788, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) = 0,199 (Tabela 3). Somente para a MB5 a  $H_o$  apresentou um valor superior ao da  $H_e$ , sendo que o  $F_{IS}$  só se apresentou negativo também para MB5, indicando ausência de endogamia somente para esta microbacia em relação às demais microbacias analisadas.

**Tabela 3** - Índices de diversidade genética para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias (MB1 – MB5) situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3. **N**: número de indivíduos; **S**: sítios polimórficos; **He**: heterozigosidade esperada; **Ho**: heterozigosidade observada;  **$\pi$** : diversidade nucleotídica; **F<sub>IS</sub>**: coeficiente de endogamia.

	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>F<sub>IS</sub></b>
<b>MB1</b>	7	3.076	0.438	0.238	0.102	0.558*
<b>MB2</b>	10	4.901	0.385	0.152	0.137	0.689*
<b>MB3</b>	7	4.228	0.437	0.158	0.145	0.711*
<b>MB4</b>	8	6.478	0.381	0.125	0.190	0.791*
<b>MB5</b>	7	2.202	0.383	0.458	0.072	-0.212*
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>8.738</b>	<b>0.342</b>	<b>0.096</b>	<b>0.199</b>	<b>0.788*</b>

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

#### 4.1.3 Estrutura genética populacional de *Ancistrus* sp.

Para a Análise de Variância Molecular (AMOVA), foram consideradas, inicialmente, todas as amostras pertencentes a uma única população, a qual demonstrou que a maior parte da variação genética se encontrava entre os indivíduos (78,78%), sendo obtido um valor significativo de  $F_{IS}$  de 0,788 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Em uma segunda análise, cada microbacia foi considerada uma população distinta, formando um grupo com cinco populações. O valor de  $F_{ST}$  observado foi de 0,361 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5), com a análise mostrando haver 36,08% da variação genética entre as microbacias e 39,80% da variação entre os indivíduos dentro de microbacias. Na terceira análise, com três grupos testados, o primeiro contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5, o valor de  $F_{ST}$  observado foi de 0,271 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6), com a análise mostrando haver 22,53% da variação genética entre microbacias dentro de grupos e 37,69% da variação genética entre indivíduos dentro de microbacias e 16,96% entre os grupos, porém, este último não foi significativo ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando uma única população.

Fonte da variação	% de variação
Entre indivíduos dentro da população	78.78%
Dentro dos indivíduos	21,11%
Índice de fixação global	$F_{IS}$ : 0.788*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

**Tabela 5** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando cada microbacia uma população.

Fonte da variação	% de variação
Entre microbacias	36.08%
Entre indivíduos dentro de microbacias	39.80%
Dentro dos indivíduos	24.12%
Índice de fixação global	$F_{ST}$ : 0.361*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

**Tabela 6** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando três grupos: o primeiro grupo juntando as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5.

Fonte da variação	% de variação
Entre grupos	16.96%
Entre microbacias dentro de grupos	22.53%
Entre indivíduos dentro de microbacias	37.69%
Dentro dos indivíduos	22.84%
Índice de fixação global	$F_{ST}$ : 0.271*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ )

Fonte: O autor (2024).

A análise de diferenciação genética par a par com base nos valores  $F_{ST}$  entre as amostras das diferentes localidades, identificou valores altos e significativos

( $p < 0,05$ ) que variaram de 0,311 a 0,622 (Tabela 7), confirmando a estruturação populacional entre a maioria das microbacias. A exceção foi encontrada entre as microbacias MB2 e MB3, onde foi obtido um valor não significativo e baixo de 0,014.

**Tabela 7** - Diferenciação genética ( $F_{ST}$  par a par) obtida para amostras de *Ancistrus* sp. coletadas em microbacias (MB1 – MB5) situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3.

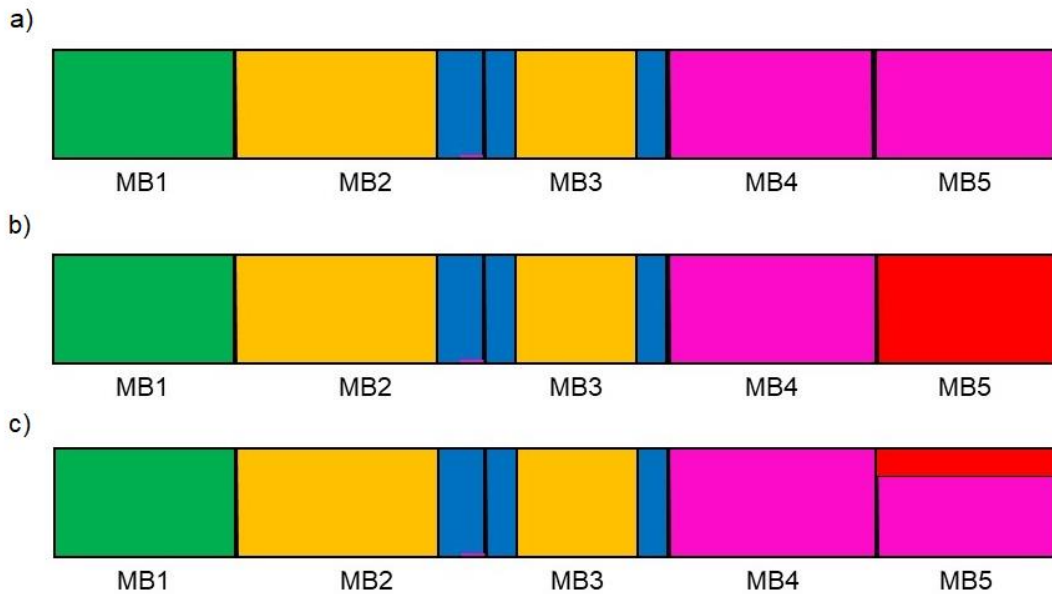
	MB1	MB2	MB3	MB4
<b>MB1</b>				
<b>MB2</b>	0.423*			
<b>MB3</b>	0.420*	0.014		
<b>MB4</b>	0.437*	0.327*	0.311*	
<b>MB5</b>	0.622*	0.479*	0.484*	0.320*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

A análise bayesiana realizada no STRUCTURE demonstrou que a maior probabilidade de *clusters* foi  $k = 4$ , suportado pelos critérios Delta K ( $\Delta K$ ) e MedMed K do método de Puechmaille. De acordo com a estimativa do K mais provável, observamos quatro grupos genéticos representados pelas cores verde, amarelo, azul e roxo (Figura 6-a). Segundo os resultados dessa análise, todos os indivíduos da MB1 compõem um único *cluster* (verde), alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3 compõem o *cluster* amarelo, dois indivíduos da MB2 e dois indivíduos da MB3 compõem o *cluster* azul e todos os indivíduos da MB4 e da MB5 juntos compõem o *cluster* roxo. Uma segunda configuração de *clusters* de  $k = 5$  foi considerada, mas descartada pelo *software*, o qual considerou essa estruturação como ruído, o que pode ser devido ao baixo número de réplicas MCMC utilizado. Com  $k = 5$ , podemos observar cinco grupos genéticos representados pelas cores verde, amarelo, azul, roxo e vermelho (Figura 6-b). Segundo os resultados dessa análise, todos os indivíduos da MB1 compõem um único *cluster* (verde), alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3 compõem o *cluster* amarelo, dois indivíduos da MB2 e dois indivíduos da MB3 compõem o *cluster* azul, todos os indivíduos da MB4 compõem o *cluster* roxo e todos os indivíduos da MB5 compõem o *cluster* vermelho. Contudo, ao sumarizar as 10 réplicas obtidas para  $k=5$ , vemos que há maior probabilidade das MB4 e MB5 comporem um único *cluster* (roxo) (Figura 6-c).

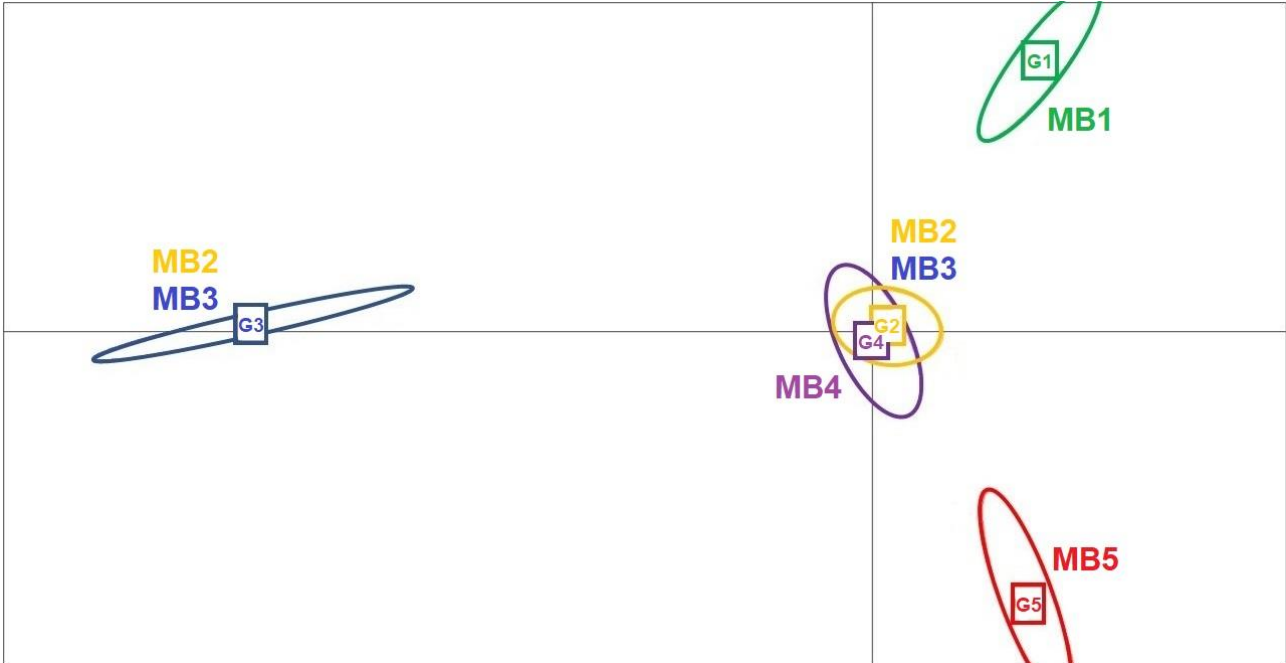
**Figura 6** - Gráfico STRUCTURE para os 39 indivíduos de *Ancistrus* sp. demonstrando: (a) os quatro *clusters* genéticos representados pelas quatro cores (verde, amarelo, azul e roxo) para  $k = 4$ . (b) os cinco *clusters* genéticos representados pelas cinco cores (verde, amarelo, azul, roxo e vermelho) para  $k = 5$ . (c) Réplicas sumarizadas para  $k = 5$ . MB1 a MB5 representam as microbacias as quais pertencem os indivíduos.



Fonte: O autor (2024).

Já a Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) identificou cinco *clusters* (Figura 7 e Tabela 8), no qual três *clusters* estão bem estruturados: G1 (contendo todos os indivíduos da MB1), G4 (contendo todos os indivíduos da MB4) e G5 (contendo todos os indivíduos da MB5). Assim como foi evidenciado pelo STRUCTURE, os *clusters* G2 e G3 possuem indivíduos tanto da microbacia MB2 como da microbacia MB3 (mesmos indivíduos dentro de cada *cluster*), evidenciando uma não estruturação genética entre essas microbacias, como já mostrado também na análise  $F_{ST}$  (Tabela 7). No entanto, tanto o STRUCTURE como a DAPC mostram que essas duas microbacias formam dois *clusters* geneticamente distintos (diferentes linhagens genéticas), onde cada microbacia, contém indivíduos de ambas as linhagens identificadas (Figura 7 e Tabela 8).

**Figura 7** - Gráfico DAPC demonstrando os cinco *clusters* para os 39 indivíduos de *Ancistrus* sp., onde G1 = *cluster* 1, que possui todos os indivíduos da MB1, G2 = *cluster* 2, que possui alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3, G3 = *cluster* 3, que possui alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3, G4 = *cluster* 4, que possui todos os indivíduos da MB4 e G5 = *cluster* 5, que possui todos os indivíduos da MB5.



Fonte: O autor (2024).

**Tabela 8** - Tabela de atribuição de associação para os 39 indivíduos de *Ancistrus* sp. calculada por meio de análise DAPC. Estão representados os *clusters* (colunas) aos quais cada amostra (linhas) pertencem.

1967P60MB1	+				
1969P60MB1	+				
1970P60MB1	+				
1971P60MB1	+				
3441P60MB1	+				
3442P60MB1	+				
3443P60MB1	+				
3404P68MB2		+			
3405P68MB2		+			
3451P67MB2		+			
3452P67MB2		+			
3472P73MB2		+			
3473P73MB2		+			
3505P76MB2		+			
3523P64MB2		+			
4834P76MB2			+		
4835P76MB2			+		
3519P62MB3			+		
4534P62MB3		+			
4536P62MB3		+			
4537P62MB3		+			
4538P62MB3		+			
4666P62MB3		+			
4983P62MB3			+		
3489P75MB4				+	
3490P75MB4				+	
3496P74MB4				+	
3431P70MB4				+	
3432P70MB4				+	
3433P70MB4				+	
3479P65MB4				+	
4609P65MB4				+	
4594P71MB5					+
4597P71MB5					+
4598P71MB5					+
3416P71MB5					+
3417P71MB5					+
3418P71MB5					+
3419P71MB5					+
	G1	G2	G3	G4	G5

**Clusters**

Fonte: O autor (2024).

A análise de correlação das matrizes de distância geográfica e distância genética por Teste de Mantel no Arlequin v.3.5.2.2 evidenciou um coeficiente de determinação de 7,8% ( $r^2 = 0,078$ ) e um P-valor de 0,34 não significativo. Portanto, para as populações de *Ancistrus* sp. das microbacias aqui analisadas não temos evidência de isolamento por distância.

## 4.2 *Heptapterus mustelinus*

### 4.2.1 Identificação de SNPs

Para as 37 amostras da espécie *Heptapterus mustelinus* foram obtidas um total de 19.536.220 sequências (*reads*) que apresentaram uma variação de 404.070 a 771.906 *reads* por amostra. Após as filtragens de qualidade, foram mantidas 19.064.119 *reads* que apresentaram uma variação de 391.112 a 753.939 *reads* por amostra, sendo obtido 97,58% de aproveitamento. Todas as sequências foram padronizadas com 144 pb. Ao fim das etapas de filtragem, a biblioteca resultou em uma média de 296.164 *reads* por amostra para *H. mustelinus*. O processo final de filtragem de SNPs resultou em um conjunto final com 9.647 marcadores SNPs (Tabela 9).

**Tabela 9** - Amostras de *Heptapterus mustelinus* utilizados para técnica de ddRADseq. Ao final da tabela consta a quantidade de SNPs e sítios polimórficos obtidos para todas as amostras. **Amostras:** corresponde ao número de *voucher* seguido do nome do ponto de coleta; **Microbacias:** conjunto de riachos que se unem a um rio principal e desaguam direto no reservatório de Itaipu; **Reads:** corresponde as *reads* remanescentes após processo de filtragem.

Amostras	Microbacias	Reads	Amostras	Microbacias	Reads
4677P60		311.458	4668P62		311.473
4679P60		300.644	4669P62		259.198
4680P60		316.086	4670P62		286.034
4519P72	MB1	309.545	3494P74	MB4	257.410
4521P72		305.118	4513P74		271.226
4522P72		275.091	4555P75		246.284
4523P72		262.628	4556P75		273.586
3447P67		317.024	4557P75		272.859
3448P67		298.088	4580P70		261.028
4704P73		320.401	4581P70		266.061
4706P73	MB2	358.091	4782P65		263.249
3406P68		434.298	4590P71	MB5	312.676
3407P68		313.653	4591P71		306.789
3408P68		303.761	4593P71		332.699
4621P76		307.591	4745P71		314.289
4531P62		269.650	4746P71		326.416
4532P62		273.270	4747P71		326.864
4533P62		277.937	4748P71		226.499
4667P62	MB3	289.140			
<b>N total</b>		<b>SNPs total</b>	<b>Sítios polimórficos</b>		
37		9.647	6.128		

Fonte: O autor (2024).

#### 4.2.2 Diversidade genética de *Heptapterus mustelinus*

Os índices de diversidade genética total para *Heptapterus mustelinus* foram: heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) = 0,386, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) = 0,112, índice de fixação ou coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) = 0,775, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) = 0,197 (Tabela 10). Em nenhuma das localidades a  $H_o$  apresentou um valor superior ao da  $H_e$ . Além disso, os valores encontrados para o  $F_{IS}$  foram positivos para todas as localidades amostradas, indicando populações endogâmicas para todas as microbacias analisadas.

**Tabela 10** - Índices de diversidade genética para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias (MB1 – MB5) situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3. **N**: número de indivíduos; **S**: sítios polimórficos; **He**: heterozigosidade esperada; **Ho**: heterozigosidade observada;  **$\pi$** : diversidade nucleotídica;  **$F_{IS}$** : coeficiente de endogamia.

	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>
<b>MB1</b>	7	1.577	0.416	0.352	0.059	0.210*
<b>MB2</b>	8	1.946	0.354	0.301	0.063	0.209*
<b>MB3</b>	7	2.127	0.365	0.317	0.070	0.190*
<b>MB4</b>	8	1.877	0.369	0.236	0.061	0.464*
<b>MB5</b>	7	1.392	0.380	0.296	0.048	0.287*
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>6.128</b>	<b>0.386</b>	<b>0.112</b>	<b>0.197</b>	<b>0.775*</b>

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

#### 4.2.3 Estrutura genética populacional de *Heptapterus mustelinus*

Para a Análise de Variância Molecular (AMOVA), foram consideradas, inicialmente, todas as amostras pertencentes a uma única população, a qual demonstrou que a maior parte da variação genética se encontrava entre os indivíduos (77,54%), sendo obtido um valor de  $F_{IS}$  significativo de 0,775 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 11). Em uma segunda análise, cada microbacia foi considerada uma população distinta, formando um grupo com cinco populações. O valor de  $F_{ST}$  observado foi de 0,731 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12), com a análise mostrando que a maior porcentagem da variação genética está entre as microbacias

(73,10%), indicando novamente que cada microbacia representa uma população estruturada. Na terceira análise, com três grupos testados, o primeiro contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5, o valor de  $F_{ST}$  observado foi de 0,323 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13), com a análise mostrando haver 10,24% da variação genética entre microbacias dentro de grupos e 68,27% da variação genética entre grupos, porém essa variação genética entre grupos não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 11** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando uma única população.

Fonte da variação	% de variação
Entre indivíduos dentro da população	77.54%
Dentro dos indivíduos	22.46%
Índice de fixação global	$F_{IS}$ : 0.775*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

**Tabela 12** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando cada microbacia uma população.

Fonte da variação	% de variação
Entre microbacias	73.10%
Entre indivíduos dentro de microbacias	7.37%
Dentro dos indivíduos	19.53%
Índice de fixação global	$F_{ST}$ : 0.731*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

**Tabela 13** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3 considerando três grupos: o primeiro grupo juntando as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5.

Fonte da variação	% de variação
Entre grupos	68.27%
Entre microbacias dentro de grupos	10.24%
Entre indivíduos dentro de microbacias	5.89%
Dentro dos indivíduos	15.61%
Índice de fixação global	$F_{ST}$ : 0.323*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

A análise de diferenciação genética par a par com base nos valores  $F_{ST}$  entre as amostras das diferentes localidades, identificou valores altos e significativos ( $p < 0,05$ ) que variaram de 0,314 a 0,828 (Tabela 14), corroborando com a estruturação sugerida.

**Tabela 14** - Diferenciação genética ( $F_{ST}$  par a par) obtida para amostras de *Heptapterus mustelinus* coletadas em microbacias situadas na bacia hidrográfica do Paraná 3.

	MB1	MB2	MB3	MB4
<b>MB1</b>				
<b>MB2</b>	0.325*			
<b>MB3</b>	0.329*	0.314*		
<b>MB4</b>	0.827*	0.821*	0.811*	
<b>MB5</b>	0.732*	0.718*	0.708*	0.828*

\*: Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor (2024).

A análise bayesiana realizada no STRUCTURE demonstrou que a maior probabilidade de *clusters* segundo o critério Delta K ( $\Delta K$ ) foi  $k = 2$ , e segundo o critério MedMed K do método de Puechmaille foi  $k = 3$ . Sumarizando os resultados, o *software Structure Selector* indicou como o mais provável o  $k = 3$ . Assim, foram observados três grupos genéticos representados pelas cores azul, roxo e vermelho (Figura 8). Segundo os resultados dessa análise, todos os indivíduos da MB1, MB2 e MB3 juntos compõem o

*cluster* azul, todos os indivíduos da MB4 compõem o *cluster* roxo e todos os indivíduos da MB5 compõem o *cluster* vermelho.

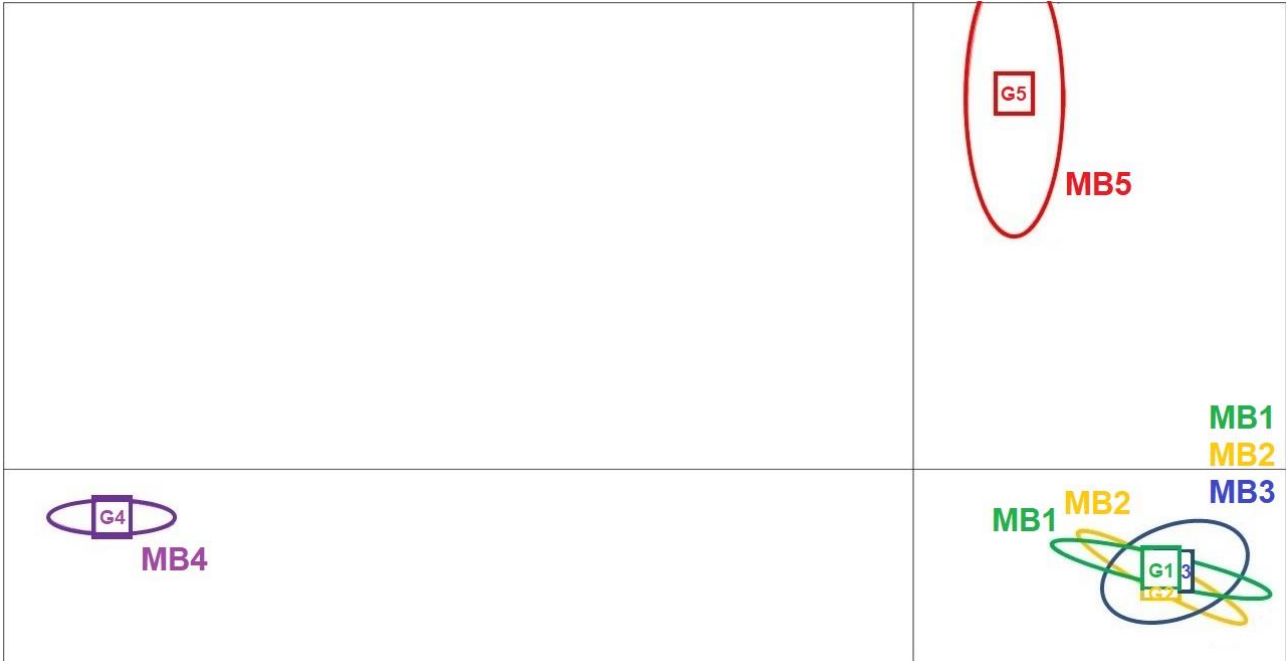
**Figura 8** - Gráfico STRUCTURE para os 37 indivíduos de *Heptapterus mustelinus* demonstrando os três clusters genéticos representados pelas três cores (azul, roxo e vermelho) para  $k = 3$ . MB1 a MB5 representam as microbacias as quais pertencem os indivíduos.



Fonte: O autor (2024).

A Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) também identificou três *clusters* (Figura 9 e Tabela 15), no qual os *clusters* G4 (contendo todos os indivíduos da MB4) e G5 (contendo todos os indivíduos da MB5) estão bem estruturados, assim como encontrado pelo STRUCTURE. De forma semelhante ao encontrado pelo STRUCTURE, os *clusters* G1, G2 e G3 estão sobrepostos, onde o *cluster* G3 possui todos os indivíduos da MB3, alguns indivíduos da MB1 e alguns indivíduos da MB2. No *cluster* G1, estão presentes alguns indivíduos da MB1, e no G2, alguns indivíduos da MB2 (Tabela 15). Tais resultados não corroboram totalmente os resultados apresentados na análise  $F_{ST}$ , onde houve diferença alta e significativa entre todas as microbacias, apesar de que os valores de  $F_{ST}$  par a par entre G1, G2 e G3 serem consideravelmente menores.

**Figura 9** - Gráfico DAPC demonstrando os cinco *clusters* para os 37 indivíduos de *Heptapterus mustelinus*, com sobreposição entre os *clusters* G1, G2 e G3, onde G1 = *cluster* 1, que possui alguns indivíduos da MB1, G2 = *cluster* 2, que possui alguns indivíduos da MB2, G3 = *cluster* 3, que possui todos os indivíduos da MB3, alguns indivíduos da MB1 e alguns indivíduos da MB2, G4 = *cluster* 4, que possui todos os indivíduos da MB4 e G5 = *cluster* 5, que possui todos os indivíduos da MB5.



Fonte: O autor (2024).

**Tabela 15** - Tabela de atribuição de associação para os 37 indivíduos de *Heptapterus mustelinus* calculada por meio de análise DAPC. Estão representados os *clusters* (colunas) aos quais cada amostra (linhas) pertencem.

4519P72MB1	+				
4521P72MB1	+				
4522P72MB1	+				
4523P72MB1	+				
4677P60MB1			+		
4679P60MB1			+		
4680P60MB1			+		
3406P68MB2		+			
3407P68MB2		+			
3408P68MB2		+			
3447P67MB2			+		
3448P67MB2			+		
4621P76MB2			+		
4704P73MB2			+		
4706P73MB2			+		
4531P62MB3			+		
4532P62MB3			+		
4533P62MB3			+		
4667P62MB3			+		
4668P62MB3			+		
4669P62MB3			+		
4670P62MB3			+		
3494P74MB4				+	
4513P74MB4				+	
4555P75MB4				+	
4556P75MB4				+	
4557P75MB4				+	
4580P70MB4				+	
4581P70MB4				+	
4782P65MB4				+	
4590P71MB5					+
4591P71MB5					+
4593P71MB5					+
4745P71MB5					+
4746P71MB5					+
4747P71MB5					+
4748P71MB5					+
	G1	G2	G3	G4	G5

**Clusters**

Fonte: O autor (2024).

A análise de correlação das matrizes de distância geográfica e distância genética por Teste de Mantel no Arlequin v.3.5.2.2 evidenciou um coeficiente de determinação de 4,3% ( $r^2 = 0,043$ ) e um P-valor de 0,31 não significativo. Portanto, para as populações de *Heptapterus mustelinus* das microbacias aqui analisadas não temos evidência de isolamento por distância.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade genética

Os valores de diversidade genética encontrados foram baixos para *Ancistrus* sp., enquanto para *Heptapterus mustelinus* foram moderados (*Ancistrus* sp.: valores máximos de  $H_o = 0,458$  e de  $H_e = 0,383$  para a MB5 e mínimos de  $H_o = 0,125$  e de  $H_e = 0,381$  para a MB4; *Heptapterus mustelinus*: valores máximos de  $H_o = 0,352$  e de  $H_e = 0,416$  para a MB1 e mínimos de  $H_o = 0,236$  e de  $H_e = 0,369$  para a MB4) (Tabelas 3 e 9). Nota-se que as estimativas de  $H_o$  apresentaram valores abaixo das estimativas de  $H_e$  para as duas espécies em quase todas as localidades, com exceção da população de *Ancistrus* sp. da Microbacia do rio Passo Cuê (MB5). Tais dados resultaram em valores de  $F_{IS}$  positivos e significativos (exceto para a população de *Ancistrus* sp. da MB5) revelando a existência de parentesco intrapopulacional para as duas espécies em quase todas as localidades (Tabelas 3 e 9). No entanto, os valores de  $F_{IS}$  encontrados em *Ancistrus* sp. nas localidades MB1 a MB4 são bem mais altos quando comparados aos de *H. mustelinus* dessas mesmas microbacias, refletindo maior endogamia para as populações de *Ancistrus* sp. Tal resultado pode ser reflexo da baixa capacidade de dispersão das espécies, que vivem isoladas dentro das microbacias, as quais, por sua vez, representam pequenas áreas, favorecendo a endogamia. Isso ocorre especialmente para espécies como as do gênero *Ancistrus*, espécies algívoras e detritívoras de hábito bentônico (POWER, 1983), com baixa vagilidade.

Garcia (2022) encontrou para *Prochilodus lineatus*, residentes e migrantes, valores de  $H_o$  ligeiramente menores do que os de  $H_e$  em todos os anos amostrados, com valores máximos de  $H_o = 0,321$  e de  $H_e = 0,329$  e mínimos de  $H_o = 0,299$  e de  $H_e = 0,325$ , com valores de  $F_{IS}$  indicando incidência de endogamia, ainda que baixa, ao se apresentarem todos positivos, o que pode ser reflexo da modificação de habitats por ações antrópicas que pode impactar até mesmo espécies de peixes migradores. Américo (2022) encontrou para *Parancistrus aurantiacus* valores de  $H_o$  superiores aos de  $H_e$  em todas as localidades, com valores máximos de  $H_o = 0,614$  e de  $H_e = 0,440$  e mínimos de  $H_o = 0,338$  e de  $H_e = 0,246$ , com valores de  $F_{IS}$  todos negativos, indicando ausência de endogamia nos grupos estudados. Magalhães (2023) encontrou para o complexo de espécies *Rhamdia*

*quelen*, selvagens e de cultivo, dos estados brasileiros de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e do norte da Argentina, valores de  $H_o$  menores do que os de  $H_e$  para praticamente todas as localidades, com valores máximos de  $H_o = 0,744$  e de  $H_e = 0,885$  e mínimos de  $H_o = 0,414$  e de  $H_e = 0,527$ , com valores de  $F_{IS}$  não significativos em geral, mas alto e significativo em pelo menos uma população selvagem. A autora discute, ainda, que indivíduos ou espécies não migradoras são mais propensas aos efeitos do “gargalo-de-garrafa” e deriva genética, que conseqüentemente, podem aumentar a endogamia resultando em baixa variabilidade genética, além de que as próprias ações antrópicas, como a construção de barramentos, podem também estar influenciando nesse processo.

Os resultados aqui obtidos a partir de marcadores SNPs apontam para uma baixa a moderada diversidade genética para ambas as espécies, principalmente para *Ancistrus* sp., em que quatro das cinco populações apresentaram baixos valores se comparados com os resultados obtidos por Garcia (2022), Américo (2022) e Magalhães (2023). No entanto, os estudos de Garcia (2022) e Américo (2022) foram feitos com espécies migradoras, e as espécies analisadas pelo presente estudo, são peixes de pequeno porte que habitam riachos, conhecidas por terem menor capacidade de deslocamento (CASTRO, 1999), o que resulta em menor fluxo gênico, maior estruturação populacional e, possivelmente, menor diversidade genética. Já é discutido na literatura (ex.: FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; PRIMACK, 2010) que a baixa diversidade genética resulta em prejuízos para as populações, como o aumento do risco de endogamia e baixa sobrevivência a longo prazo. Contudo, deve-se levar em consideração a biologia da espécie, que pode ter moderada a alta diversidade genética quando se analisa a espécie como um todo (diferentes populações/localidades), mas que pode estar estruturada em populações menores que representam diferentes linhagens e que internamente apresentam menor diversidade genética. Logo, para que as espécies mantenham o seu potencial evolutivo, são necessários programas de conservação que promovam a preservação e/ou aumento da variabilidade genética, mitiguem a degradação do habitat e implementem estratégias de manejo adaptativo, conservando as diferentes populações/linhagens genéticas existentes. Esses programas devem incluir monitoramento contínuo, uso de novas tecnologias e colaboração entre todas as partes interessadas (cientistas, gestores e comunidades locais).

## 5.2 Estrutura genética populacional

Os resultados da AMOVA,  $F_{ST}$  par a par, STRUCTURE e DAPC mostram evidências de estruturação genética entre as microbacias para as duas espécies. Para *Ancistrus* sp., a AMOVA realizada considerando todos os indivíduos como sendo de uma única população, evidenciou a maior parte da variação genética ocorrendo entre indivíduos dentro da população (78,78%), com um  $F_{IS}$  significativo de 0,788 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4), evidenciando a existência de diferentes populações. Considerando cada microbacia como uma população distinta, foi encontrada 39,80% de variação entre indivíduos dentro de microbacias, mostrando uma possível subestruturação genética entre riachos de uma mesma microbacia, e 36,08% de variação entre as microbacias, com índice de fixação global alto e significativo,  $F_{ST} = 0,361$  (Tabela 5), evidenciando o padrão de estruturação genética. Resultado semelhante foi encontrado ao considerar três agrupamentos, o primeiro contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5. Foi encontrada 37,69% da variação genética entre indivíduos dentro de microbacias e 22,53% da variação genética entre microbacias dentro de grupos, com índice de fixação global alto e significativo,  $F_{ST} = 0,271$  (Tabela 6). O  $F_{ST}$  par a par indicou níveis de estruturação entre quase todos os grupos com valores altos e significativos, exceto entre as microbacias MB2 e MB3 (Tabela 7). A análise realizada no STRUCTURE identificou com maior probabilidade 4 *clusters*, com todos os indivíduos da MB1 compondo um único *cluster* (verde), alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3 compondo o *cluster* amarelo, dois indivíduos da MB2 e dois indivíduos da MB3 compondo o *cluster* azul e todos os indivíduos da MB4 e MB5 compondo um único *cluster* (roxo) (Figura 6-a). Porém, a análise também considerou (mas descartou, talvez por questões metodológicas) a configuração de cinco *clusters*, onde todos os indivíduos da MB1 compõem um único *cluster* (verde), alguns indivíduos da MB2 e alguns indivíduos da MB3 compõem o *cluster* amarelo, dois indivíduos da MB2 e dois indivíduos da MB3 compõem o *cluster* azul, todos os indivíduos da MB4 compõem o *cluster* roxo e todos os indivíduos da MB5 compõem o *cluster* vermelho (Figura 6-b). Contudo, ao sumarizar as réplicas obtidas para  $k = 5$ , vemos que há maior probabilidade das MB4 e MB5 comporem um único *cluster* (roxo) (Figura 6-c). A DAPC identificou cinco *clusters* (Figura 7 e Tabela 8), no qual três *clusters* estão bem estruturados: G1 (contendo todos os indivíduos da MB1), G4 (contendo todos os indivíduos da MB4) e G5 (contendo todos os indivíduos da MB5). Podemos observar alguma sobreposição entre G4 e G2 (Figura 7), provavelmente por

haver certo compartilhamento de SNPs semelhantes entre esses grupos, mesmo G4 sendo um *cluster* bem estruturado, contendo todos os indivíduos da MB4 (Tabela 8). Podemos observar os valores de  $F_{ST}$  par a par para as microbacias MB1, MB4 e MB5 (Tabela 7), em que todas as comparações resultam em valores altos e significativos. Os *clusters* G2 e G3 formados pela DAPC, assim como evidenciado pelo STRUCTURE, possuem indivíduos tanto da microbacia MB2 como da microbacia MB3, no entanto, são dois *clusters* geneticamente distintos (Figura 6, 7 e Tabela 8). Podemos observar também, o valor de  $F_{ST}$  par a par que foi baixo e não significativo para a comparação entre MB2 e MB3 (Tabela 7). Esse resultado pode indicar um possível contato secundário entre linhagens previamente distintas, que pode ser resultado do enchimento do reservatório da Itaipu. O restante das comparações entre essas microbacias resultou em valores altos e significativos. Assim, considerando as análises realizadas, optamos por adotar neste estudo a existência de cinco *clusters* distintos, considerando MB4 e MB5 duas populações estruturadas, como evidenciado pela maior parte das análises realizadas (AMOVA,  $F_{ST}$  par a par e DAPC). Por fim, a análise de correlação das matrizes de distância geográfica e distância genética por Teste de Mantel não evidenciou isolamento por distância, o que reforça que a estrutura genética encontrada entre as microbacias é causada pelo rio Paraná/reservatório da Itaipu que funciona como uma barreira para tais populações.

Beltrán Vargas (2023) estudando a espécie *Ancistrus* sp. proveniente das mesmas cinco microbacias do presente estudo, porém utilizando marcadores *D-loop*, relatou a existência de quatro haplótipos compartilhados entre MB2 e MB3 e nenhum haplótipo compartilhado entre MB4 e MB5 e outras microbacias, reforçando sua estruturação. A MB1 compartilhou um haplótipo com MB2 e MB3. Em uma AMOVA que considerou, para as cinco microbacias, quatro grupos, em que G1 = MB1, G2 = MB2 e MB3, G3 = MB4 e G4 = MB5, a maior parte da variação genética foi encontrada ocorrendo entre grupos (48,45%). A autora optou por utilizar quatro agrupamentos, pois em seu trabalho, MB2 e MB3 também não apresentaram diferenciação significativa no  $\Phi_{ST}$  par a par. De fato, a autora encontrou valores de  $\Phi_{ST}$  estruturados de uma forma muito parecida aos valores de  $F_{ST}$  do presente trabalho, com níveis de estruturação entre quase todas as microbacias com valores altos e significativos, exceto entre as microbacias MB2 e MB3, em que o valor também foi baixo e não significativo. A partir de seus resultados de diversidade e estrutura genética, a autora cria a hipótese de que as populações de *Ancistrus* sp. das microbacias MB1, MB2 e MB3 passaram por um evento de contato secundário recente, devido a distância genética entre os haplótipos compartilhados, como provável resultado do

enchimento do reservatório da Itaipu. O Teste de Mantel realizado também não evidenciou isolamento por distância para as populações de *Ancistrus* sp. destas microbacias a partir de marcadores D-loop, reforçando que a estruturação entre as microbacias é causada pelo rio Paraná/reservatório da Itaipu funcionar como barreira, não pela distância geográfica.

Para *Heptapterus mustelinus*, a AMOVA realizada considerando todos os indivíduos como sendo de uma única população evidencia a maior parte da variação genética ocorrendo entre indivíduos dentro da população (77,54%), com um  $F_{IS}$  significativo de 0,775 ( $p < 0,05$ ), evidenciando a existência de diferentes populações (Tabela 11). Considerando cada microbacia como uma população distinta, a maior parte da variação genética foi encontrada entre microbacias (73,10%), com um  $F_{ST}$  alto e significativo de 0,731 (Tabela 12), confirmando a existência de estruturação entre as microbacias analisadas. Ao considerar três agrupamentos, o primeiro contendo as microbacias MB1, MB2 e MB3, o segundo contendo a microbacia MB4 e o terceiro contendo a microbacia MB5, foi encontrada 68,27% da variação genética entre grupos, o que poderia justificar a estruturação das microbacias MB4 e MB5 e a junção das microbacias MB1, MB2 e MB3, no entanto, não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Essas três microbacias não formam um grupo verdadeiro. Mesmo havendo fluxo gênico, ainda existem variações entre essas microbacias. Isso é corroborado pela porcentagem da variação genética de 10,24% entre microbacias dentro de grupos, com um  $F_{ST}$  alto e significativo de 0,323 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13). A análise de diferenciação genética par a par com base nos valores  $F_{ST}$  indicou níveis de estruturação entre todos os grupos, com valores altos e significativos (Tabela 14). A análise bayesiana realizada no STRUCTURE identificou três *clusters* (Figura 8), com todos os indivíduos da MB1, MB2 e MB3 compondo um único *cluster* (azul), todos os indivíduos da MB4 compondo o *cluster* roxo e todos os indivíduos da MB5 compondo o *cluster* vermelho. De maneira semelhante, a DAPC também identificou três *clusters* (Figura 9 e Tabela 15), no qual os *clusters* G4 (contendo todos os indivíduos da MB4) e G5 (contendo todos os indivíduos da MB5) estão bem estruturados, assim como encontrado pelo STRUCTURE. Podemos observar também os valores de  $F_{ST}$  par a par para as microbacias MB4 e MB5, em que todas as comparações resultam em valores bastante altos e significativos (nenhum valor abaixo de 0,708) (Tabela 14). Semelhantemente ao encontrado pelo STRUCTURE, os *clusters* G1, G2 e G3 estão sobrepostos (Figura 9), onde o *cluster* G3 possui todos os indivíduos da MB3, alguns indivíduos da MB1 e alguns indivíduos da MB2. No *cluster* G1, estão presentes alguns indivíduos da MB1, e no G2, alguns indivíduos da MB2 (Tabela 15). O  $F_{ST}$  par a par para as microbacias MB1, MB2 e

MB3, resultou em comparações com valores altos e significativos, porém menores que as comparações com MB4 e MB5 (nenhum valor acima de 0,329, Tabela 14). Por fim, a análise de correlação das matrizes de distância geográfica e distância genética por Teste de Mantel não evidenciou isolamento por distância, o que reforça que a estrutura genética encontrada entre as microbacias é causada pelo rio Paraná/reservatório da Itaipu que vem funcionando como uma barreira para tais populações.

Huatatoca (2017) estudando a espécie *H. mustelinus* da região da BP3, a partir de marcadores *D-loop*, encontrou resultados de AMOVA que evidenciam a maior parte da variação genética ocorrendo também entre microbacias (44,29%). A autora relatou a existência de uma significativa diferença genética nas amostras da espécie com relação aos valores de  $\Phi_{ST}$ , (com um  $\Phi_{ST}$  global de 0,70), mas também encontrou o compartilhamento de haplótipos entre duas microbacias vizinhas (um haplótipo) e inclusive entre duas microbacias separadas por outra microbacia (dois haplótipos), com a formação de agrupamentos naturais entre elas. Isso evidencia para a espécie um padrão de agrupamento complexo determinando a conexão entre as amostras de diferentes microbacias. A autora também levanta a hipótese de que as populações de *H. mustelinus* estudadas passaram por um evento de contato secundário recente, provável resultado do enchimento do reservatório da Itaipu, que pode estar permitindo o fluxo gênico entre populações antes isoladas. É discutido que a distância geográfica entre os pontos de coleta e a complexidade da rede de drenagem também parecem estar influenciando a diversidade e a estrutura genética da espécie na BP3, visto que a autora encontrou uma forte correlação entre eles com a distância genética ( $\Phi_{ST}$  par a par), evidenciando, neste caso, um padrão de isolamento por distância.

Garcia (2022), a partir de marcadores SNPs, encontrou para *Prochilodus lineatus* residentes e migrantes maior parte da variação entre os indivíduos (88,13%), o que pode ser explicado por essa espécie possuir indivíduos migradores de longas distâncias. A autora encontrou valores de  $F_{ST}$  que indicam um nível de estruturação entre alguns grupos (0.00522 a 0.01719) ( $p < 0,05$ ), sendo que a maior diferenciação é encontrada entre *P. lineatus* migradores e residentes. A autora encontrou pela análise do STRUCTURE maior estruturação entre indivíduos residentes e uma maior distribuição nas variações de indivíduos migradores, indicando menor estruturação. Espécies migradoras tendem a ter o fluxo gênico restabelecido durante o período reprodutivo, onde ocorre o cruzamento entre indivíduos residentes e migrantes, no entanto, a autora encontrou evidências de um princípio de estruturação (pelo excesso de homozigotos, pelo índice positivo de endogamia

e pela redução do  $N_e$  ao longo das gerações), sendo então levado em conta o fato de que mesmo espécies panmíticas podem sofrer uma diminuição da diversidade genética.

Américo (2022) encontrou valores de  $F_{ST}$  significativos, porém baixos, para todos os locais analisados, o que indica que pode não haver estruturação genética entre as amostras da espécie migratória *Parancistrus aurantiacus*. A não estruturação foi corroborada pela análise bayesiana realizada no STRUCTURE, que evidenciou panmixia entre os espécimes das diferentes localidades, ao obter somente um *cluster*. A autora sugere que as regiões amostradas sejam consideradas um único estoque genético, devendo ser realizados de forma conjunta os planos de manejo e gestão.

Magalhães (2023) encontrou para o complexo de espécies *Rhamdia quelen* selvagens e de cultivo maior parte da variação entre os indivíduos (53,88%). Os resultados da DAPC mostraram diferentes grupos que em geral separaram indivíduos selvagens e de piscicultura (mas ainda mantendo certa proximidade), com os resultados do STRUCTURE sendo parcialmente concordantes. Os resultados do  $F_{ST}$  par a par foram significativos para a maioria das comparações testadas, com alta diferenciação entre os grupos, principalmente para os indivíduos selvagens. A autora discute que esses altos valores de diferenciação refletem a ausência de fluxo gênico vivenciada por espécies não-migradoras, que podem estar relacionados também à redução da heterozigosidade em razão da deriva genética e do aumento do endocruzamento.

Os dados obtidos por Beltrán Vargas (2023), que analisou a espécie *Ancistrus* sp. das mesmas cinco microbacias do presente estudo, a partir de marcadores *D-loop*, reforçam uma hipótese também levantada por este estudo: as populações da MB2 e da MB3 de *Ancistrus* sp. eram previamente isoladas e estamos presenciando um contato secundário entre elas. Esse contato secundário pode ter sido recente, não tendo tido tempo suficiente ainda para a homogeneização das populações. Ao olhar para a história da região, esse contato secundário pode ter sido resultado da criação do reservatório da Itaipu, que pode ter conectado as microbacias MB2 e MB3 que são adjacentes, facilitando a travessia de indivíduos, que antes poderiam estar separados por alguma barreira natural. Já para MB4 e MB5, o enchimento do reservatório parece não ter conectado estas populações, as quais permanecem estruturadas (como evidenciado pela AMOVA,  $F_{ST}$  e DAPC), mantendo o rio Paraná/reservatório da Itaipu como possível barreira. Este padrão foi observado tanto com os marcadores *D-loop* como para os SNPs, mostrando uma estruturação bem definida.

A sobreposição dos *clusters* G1, G2 e G3 em *H. mustelinus* a partir da DAPC reflete a existência de sequências genéticas semelhantes entre os indivíduos das microbacias MB1, MB2 e MB3, o que sugere que os indivíduos dessas três microbacias representam uma única população natural, como indicado pelo STRUCTURE. Contudo, a estruturação apontada pela análise de  $F_{ST}$  par a par (Tabela 14) e a existência de variabilidade entre indivíduos dentro das microbacias mostrada na AMOVA (Tabela 12), podem evidenciar a existência de uma subestruturação com a presença de diferentes linhagens genéticas que podem ser reflexo de um fluxo gênico baixo, mas existente, ou de um contato secundário propiciado pelo enchimento do reservatório da Itaipu. Analogamente ao observado para *Ancistrus* sp. neste estudo e no de Beltrán Vargas (2023), e aos dados obtidos por Huatatocha (2017), é levantada a hipótese de que as populações de *H. mustelinus* passaram por um evento de contato secundário recente, resultado provável do enchimento do reservatório da Itaipu. No entanto, provavelmente para a MB4 e a MB5, o enchimento do reservatório parece não ter conectado estas populações, as quais permanecem estruturadas (o que foi evidenciado pela AMOVA,  $F_{ST}$ , STRUCTURE e DAPC), mantendo o rio Paraná/reservatório da Itaipu como uma barreira, pois assim como obtido neste estudo para *Ancistrus* sp., MB4 e MB5 mostram estruturação bem definida.

É sabido que peixes de pequeno porte habitantes de riachos neotropicais possuem baixa capacidade de deslocamento (CASTRO, 1999), sendo suscetíveis à estruturação de suas populações. Foi relatado por Apolinário-Silva (dados não publicados) populações distintas da espécie *Bryconamericus* aff. *iheringii* ocorrendo entre riachos de uma mesma microbacia, ou mesmo entre seções de um riacho. No presente estudo, também foi encontrada para *Ancistrus* sp. estruturação genética entre riachos de uma mesma microbacia, além da estruturação encontrada entre microbacias, para esta espécie e para *H. mustelinus*. De forma contrária, ao considerar peixes migradores de grande porte, populações únicas e panmíticas são comumente relatadas (AMÉRICO, 2022; GARCIA, 2022).

Diversos fatores podem influenciar a estrutura genética-populacional de uma espécie, como a mobilidade dos indivíduos, a presença de barreiras físicas ou químicas, as características comportamentais, a história de vida do organismo, a história evolutiva e a distância geográfica entre subpopulações (AVISE, 1994). A mobilidade dos indivíduos, por exemplo, pode facilitar ou dificultar o fluxo gênico entre subpopulações, enquanto barreiras físicas, como montanhas ou canais de grandes rios, podem restringir esse fluxo (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; FITZGERALD et al., 2018),

principalmente, no caso das espécies de pequeno porte, que possuem baixa mobilidade. Grandes reservatórios, possuem características específicas que afetam de forma negativa o comportamento dos peixes, se tornando um obstáculo comportamental aos movimentos a jusante de peixes jovens e adultos. Isso porque, ao apresentarem gradientes de condições hidrológicas e limnológicas que criam uma transição gradual de ambiente lóticos, semilênticos e lênticos entre trechos a montante e a jusante, diferem muito do regime fluvial original, constituindo-se em uma forte barreira ecológica à livre circulação ao longo do rio, preferindo os peixes permanecerem em áreas a montante que mantêm as condições ribeirinhas. É importante salientar que a troca genética também é afetada, porque o fluxo gênico é significativamente reduzido pelo reservatório (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2014). Assim, a alta estruturação encontrada entre as microbacias para as duas espécies analisadas no presente estudo, especialmente MB4 e MB5, pode ser devida ao rio Paraná/reservatório da Itaipu funcionar como uma barreira que impede o fluxo gênico entre elas.

Por outro lado, represamentos podem ampliar a conectividade hidrológica, permitindo a dispersão de peixes em sistemas fora de seu alcance natural, ao remover barreiras geográficas naturais e promover a homogeneização biótica por meio da homogeneização de habitat (VITULE; SKÓRA; ABILHOA, 2012). Para as duas espécies analisadas no presente estudo, algumas microbacias não se mostraram fortemente estruturadas, indicando a ocorrência de fluxo gênico entre elas, com agrupamentos genéticos formados por indivíduos de diferentes microbacias. Desta maneira, o reservatório da Itaipu, ao submergir algumas áreas após o seu enchimento, pode ter permitido um novo contato entre microbacias antes estruturadas, ocorrendo agora fluxo gênico entre suas populações, hipótese que já vem sendo levantada por outros trabalhos recentes para a BP3 (HUATATOCA, 2017; BELTRÁN VARGAS, 2023). A hipótese de contato secundário é sustentada pela presença de diferentes linhagens genéticas encontradas entre as MB1, MB2 e MB3, características de contato secundário, fato também observado nos trabalhos com *D-loop* de Huatatoaca (2017) e Beltrán Vargas (2023), onde se observa o compartilhamento de haplótipos distintos.

Por fim, o uso de marcadores SNPs que possui características únicas, como alta abundância no genoma e facilidade de automação em larga escala, é de extrema importância na complementação de estudos que utilizaram outros marcadores moleculares, como os marcadores *D-loop* abordados por Huatatoaca (2017) e Beltrán Vargas (2023) para as mesmas espécies do presente estudo. Aqui, obtivemos dados de confiança para

compreender os padrões de diversidade nas populações avaliadas e sua distribuição dentro e entre populações, além de entender como o rio Paraná/reservatório da Itaipu pode atuar como barreira à migração de peixes de pequeno porte, ou ainda, no caso da mudança de um sistema lótico (rio Paraná) para um sistema lêntico (reservatório da Itaipu) conectá-las.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de diversidade genética apontam para uma baixa a moderada diversidade para ambas as espécies, sendo mais baixa para *Ancistrus* sp. O coeficiente de endogamia revelou a existência de parentesco intrapopulacional para as duas espécies, especialmente para *Ancistrus* sp. Os resultados da AMOVA,  $F_{ST}$  par a par, STRUCTURE e DAPC mostram evidências de estruturação genética entre a maioria das microbacias para ambas as espécies. Além disso, pode ser sugerida a diferenciação populacional entre riachos de uma mesma microbacia para *Ancistrus* sp. O rio Paraná/reservatório da Itaipu parece atuar como uma barreira ao fluxo gênico entre as diferentes microbacias. O Teste de Mantel não evidenciou isolamento por distância para nenhuma das espécies, o que reforça que a estrutura genética encontrada entre as microbacias é causada pelo rio Paraná/reservatório da Itaipu. Por outro lado, algumas microbacias não se mostraram fortemente estruturadas ao compartilharem diferentes linhagens genéticas, o que sugere que o reservatório da Itaipu, ao submergir algumas áreas após o seu enchimento, pode ter propiciado um novo contato entre microbacias antes estruturadas e um contato secundário entre linhagens genéticas previamente distintas, o que já vem sendo discutido por outros autores.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABELHA, M. C. F.; AGOSTINHO, A. A.; GOULART, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 425-434, 2001.
- AGOSTINHO, A. A. *et al.* Biodiversity in the high Paraná River floodplain. **Biodiversity in wetlands: assessment, function and conservation**, v. 1, p. 89-118, 2000.
- AGOSTINHO, A. A. *et al.* Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 10, n. 2, p. 174-186, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. A ictiofauna de reservatórios. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. EDUEM, Maringá, p. 70-105, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR., H. F.; BORGHETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, v. 14, n. Suplemento, p. 89-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; OKADA, E. K.; GREGORIS, J. A pesca no reservatório de Itaipu: aspectos socioeconômicos e impactos do represamento. *In*: HENRY, R. **Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais**. Botucatu: FUNDIBIO, 1999. p. 281-319.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian journal of biology**, v. 68, p. 1119-1132, 2008.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. **International Journal of Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 4, n. 3, p. 267-280, 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M.; THOMAZ, S. M. The high River Paraná Basin: limnological and ichthyological aspects. **Limnology in Brasil**, Maringá. p. 59-103. 1995.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALEWSKI, M. **A planície alagável do alto rio Paraná: importância e preservação (Upper Paraná River floodplain: importance and Preservation)**. Maringá: EDUEM, 1996.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALEWSKI, M. The dependence of fish community structure and dynamics on floodplain and riparian ecotone zone in Parana River, Brazil. *In*: **The Importance of Aquatic-Terrestrial Ecotones for Freshwater Fish**. Springer, Dordrecht, 1995. p. 141-148.
- ALBRECHT, M. **Influência da mata ciliar em parâmetros da ictiocenose e em aspectos populacionais de quatro espécies de peixes em riachos no sul do Brasil**. 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado em Biologia - Diversidade e Manejo da Vida Silvestre) - Unidade Acadêmica de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, 2012.

ALLAN, J. D. Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, p. 257-284, 2004.

ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. An introduction to fluvial ecosystems. *In: Stream Ecology: structure and function of running waters*: 2nd. ed. Netherlands: Springer, 2007. p. 1-12.

ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 10, p. 697-709, 2010.

AMERICO, F. **Diversidade genética de *Parancistrus aurantiacus* (Siluriformes, Loricariidae) em corredeiras do rio Tocantins**. 2022. 31 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2022.

ANDREWS, S. **Babraham bioinformatics-FastQC a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 20 out. 2023.

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos de DNA. **Biologia molecular e evolução**, 2012.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Springer-Science+Business Media, 1994.

BALON, E. K. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 32, n. 6, p. 821-864, 1975.

BELTRÁN VARGAS, P. A. **EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DE ARROYO *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**. 2023. 54 f. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BROWN, B. L.; SWAN, C. M. Dendritic network structure constrains metacommunity properties in riverine ecosystems. **Journal of Animal Ecology**, v. 79, n. 3, p. 571-580, 2010.

BUCKUP, P. A. The genus *Heptapterus* (Teleostei, Pimelodidae) in southern Brazil and Uruguay, with the description of a new species. **Copeia**, n. 3, p. 641-653, 1988.

CAMPBELL GRANT, E. H.; LOWE, W. H.; FAGAN, W. F. Living in the branches: population dynamics and ecological processes in dendritic networks. **Ecology letters**, v. 10, n. 2, p. 165-175, 2007.

CAMPOS, M. *et al.* Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-8, 2017.

- CASTRO, R. M. C. Evolução da ictiofauna de riachos sul americanos: padrões gerais e possíveis processos. *In*: CARAMASCHI, E. P. R.; MAZZONI, R.; PERES NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de peixes de riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, PPGE UFRJ. Rio de Janeiro, 1999. p. 139-155.
- CATCHEN, J. M. *et al.* Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes|genomes|genetics**, v. 1, n. 3, p. 171-182, 2011.
- DAGOSTA, F. C. P. *et al.* Fishes of the upper rio Paraná basin: diversity, biogeography and conservation. **Neotropical Ichthyology**, v. 22, n. 1, p. e230066, 2024.
- DA GRACA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007.
- DIAS, V. de S. *et al.* An overview of hydropower reservoirs in Brazil: Current situation, future perspectives and impacts of climate change. **Water**, v. 10, n. 5, p. 592, 2018.
- DI BITETTI, M. S.; PLACCI, G.; DIETZ, L. A. **Uma visão de Biodiversidade para a Ecorregião Florestas do Alto Paraná–Bioma Mata Atlântica**: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. Washington, DC: WWF, 2003.
- DUDGEON, D. *et al.* Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological reviews**, v. 81, n. 2, p. 163-182, 2006.
- ELLEGREN, H. Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 1, p. 51-63, 2014.
- ESTEVES, F. **Fundamentos de limnologia**. Interciência, Rio de Janeiro, 3. ed. 2011. 790 p.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EWELS, P. *et al.* MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047-3048, 2016.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FISHBASE. **List of Freshwater Fishes reported from Brazil**. Disponível em: <[https://fishbase.de/country/CountryChecklist.php?what=list&trpp=50&c\\_code=076&csub\\_code=&cpresence=present&sortby=alpha2&vhabitat=fresh](https://fishbase.de/country/CountryChecklist.php?what=list&trpp=50&c_code=076&csub_code=&cpresence=present&sortby=alpha2&vhabitat=fresh)>. Acesso em: 23 abr. 2024.
- FITZGERALD, D. B. *et al.* **Diversidade e estrutura das comunidades de peixes que habitam as corredeiras do Rio Xingu**: implicações para a conservação diante do desenvolvimento de uma hidrelétrica de grande escala. [sl: sn]. 2018.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

GARCIA, Y. **Identificação de SNPs e genética populacional de cardumes migradores e residentes de *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae)**. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2022.

HAMILTON, M. B. **Population genetics**. John Wiley & Sons, 2009.

HANSEN, A. K. *et al.* Genomic population structure and conservation of the red listed *Carabus arcensis* (Coleoptera: Carabidae) in island–mainland habitats of Northern Europe. **Insect Conserv. Diver.**, v. 11, p. 255-266, 2018.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. suppl\_1, p. S96-S99, 2003.

HOHENLOHE, P. A. *et al.* Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. **PLoS genetics**, v. 6, n. 2, p. e1000862, 2010.

HUATATOCA, P. **Influencia de factores espaciales en la estructuración genética de *Heptapterus mustelinus* (Siluriforme: Heptapteridae) de la Cuenca del Paraná III**. 2017. 46 f. Trabajo de Conclusión de Curso (Ciencias Biológicas: Ecología y Biodiversidad) – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguazu, 2017.

INSTITUTO ÁGUA E TERRA. **PLANO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA BACIA (Produto 1)**. Cascavel, 2014a. Disponível em: <<https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Comite-da-Bacia-do-Parana-3>>. Acesso em: 17 de agosto de 2023.

INSTITUTO ÁGUA E TERRA. **PLANO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3. USO E OCUPAÇÃO DO SOLO (Produto 6)**. Cascavel, 2014b. Disponível em: <<https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Comite-da-Bacia-do-Parana-3>>. Acesso em: 17 de agosto de 2023.

INSTITUTO ÁGUA E TERRA. **PLANO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3. SISTEMA DE GESTÃO DE RECURSOS HÍDRICOS - AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE GESTÃO (Produto 7)**. Cascavel, 2014c. Disponível em: <<https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Comite-da-Bacia-do-Parana-3>>. Acesso em: 17 de agosto de 2023.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná**. Paraná. 2013, 245 p.

JOMBART, T.; AHMED, I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 3070-3071, 2011.

- KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**, v. 56, n. 4, p. 453-461, 2003.
- KELSON, S. J. *et al.* Fine-scale genetic structure of brook trout in a dendritic stream network. **Conservation genetics**, v. 16, p. 31-42, 2015.
- KOPELMAN, N. M. *et al.* Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.
- LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 34, n. 2, p. 111-120, 2005.
- LAKE, P. S. Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. **Freshwater biology**, v. 48, n. 7, 2003.
- LANGGANI, F. *et al.* Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 181-197, 2007.
- LANGELLA, O. **Populations**, 1.2.28. <http://www.cnrs-gif.fr/pge>, 1999.
- LIERMANN, Catherine Reidy *et al.* Implications of dam obstruction for global freshwater fish diversity. **BioScience**, v. 62, n. 6, p. 539-548, 2012.
- LI, Y. L.; LIU, J. X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. **Molecular ecology resources**, v. 18, n. 1, p. 176-177, 2018.
- LIGIER, H. D. **Caracterización geomorfológica y edáfica de la provincia de Misiones**. Informe para Fundación Vida Silvestre Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Corrientes, 2000.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. *In*: **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. 1999. p. 534-534.
- MAGALHÃES, C. O. **Genômica populacional no estudo da diversidade genética do gênero *Rhamdia*, com foco no complexo *Rhamdia* que len de populações de cultivo e selvagens**. 2023. 74 f. Tese (Doutorado em Genética) Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2023.
- MALABARBA, L. R. *et al.* **Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí**. Porto Alegre, Via Sapiens, 2013. 140 p.
- MANEL, S. *et al.* Global determinants of freshwater and marine fish genetic diversity. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2020.
- MARTÍNEZ, J. G. *et al.* SNPs markers for the heavily overfished tambaqui *Colossoma macropomum*, a Neotropical fish, using next-generation sequencing-based de novo genotyping. **Conservation genetics resources**, v. 9, n. 1, p. 29-33, 2017.

MONTERO, R.; AUTINO, A. G. **Sistemática y filogenia de los vertebrados, con énfasis en la fauna argentina**. 3 ed. Versión optimizada para celular. Editorial independiente, San Miguel de Tucumán, Argentina, 2018. 1580 p.

MORIN, P. A. *et al.* SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 4, p. 208-216, 2004.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

PELICICE, F. M.; POMPEU, P. S.; AGOSTINHO, A. A. Large reservoirs as ecological barriers to downstream movements of Neotropical migratory fish. **Fish and Fisheries**, v. 16, n. 4, p. 697-715, 2014.

PEREIRA, L. H. G. *et al.* The use of an integrative approach to improve accuracy of species identification and detection of new species in studies of stream fish diversity. **Genetica**, v. 149, n. 2, p. 103-116, 2021.

PEREIRA, M. C. B.; SCROCCARO, J. L. Bacias hidrográficas do Paraná. **Série histórica**. Curitiba: SEMA, 2ed. 2013.

PETERSON, B. K. *et al.* Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37135, 2012.

POWER, M. E. Grazing responses of tropical freshwater fishes to different scales of variation in their food. **Environmental Biology of fishes**, v. 9, p. 103-115, 1983.

PRIMACK, R. B. **Essentials of conservation biology**. 5 ed. Sinauer Associates, Inc. 2010. 601 p.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRIZON, A. C. **Contribuições ao status taxonômico de Ancistrus Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) da bacia do Rio Paraná, Brasil baseados em marcadores citogenéticos e moleculares**. 2018. 45 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

PUECHMAILLE, S. J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. **Molecular ecology resources**, v. 16, n. 3, p. 608-627, 2016.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

RINGUELET, R. A. Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur. **Ecosur**, v. 2, p. 1-122, 1975.

RÍOS, N. *et al.* Population genomics in *Rhamdia quelen* (Heptapteridae, Siluriformes) reveals deep divergence and adaptation in the Neotropical region. **Genes**, v. 11, n. 1, p. 109, 2020.

RUDKE, A. P. *et al.* Landscape changes over 30 years of intense economic activity in the upper Paraná River basin. **Ecological Informatics**, v. 72, p. 101882, 2022.

SODRÉ, L. M. K.; ALMEIDA, F. S.; CHIARI, L. Estudos sobre a variabilidade genética de peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares. *In*: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds). **A bacia do rio Tibagi**. 1ed. Londrina: Edição dos Editores, p. 531-550, 2002.

TAUTZ, D.; ELLEGREN, H.; WEIGEL, D. Next generation molecular ecology. **Molecular ecology**, v. 19, p. 1-3, 2010.

VIGNAL, A. *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics selection evolution**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

VITULE, J. R. S.; SKÓRA, F.; ABILHOA, V. Homogenization of freshwater fish faunas after the elimination of a natural barrier by a dam in Neotropics. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 2, p. 111-120, 2012.

VOLFF, J. N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. **Heredity**, v. 94, n. 3, p. 280-294, 2005.

VREYS, N. *et al.* Effect of Landscape Changes on Water Quality and Health Status of *Heptapterus mustelinus* (Siluriformes, Heptapteridae). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 76, n. 3, p. 453-468, 2019.

WILLING, E. *et al.* Genome-wide single nucleotide polymorphisms reveal population history and adaptive divergence in wild guppies. **Molecular ecology**, v. 19, n. 5, p. 968-984, 2010.

ZAWADZKI, C. H. **Loricariidae do alto rio Paraná**. Maringá, 2004.