



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS
DE LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

**CIENCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGÍA Y
BIODIVERSIDAD**

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL
PEZ DE ARROYO *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**

PAULA ANDREA BELTRÁN VARGAS

Foz do Iguaçu
2023



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS
DE LA VIDA Y LA NATURALEZA (ILACVN)**

**CIENCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGÍA Y
BIODIVERSIDAD**

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DE
ARROYO *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**

PAULA ANDREA BELTRÁN VARGAS

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

Foz do Iguaçu
2023

PAULA ANDREA BELTRÁN VARGAS

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL PEZ DE
ARROYO *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, de la Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira
UNILA

Dra. Same Costa Lima

Dra. Caroline Apolinário da Silva

Foz do Iguaçu, 12 de junho de 2023

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Paula Andrea Beltrán Vargas

Curso: Ciências Biológicas – Ecología y Biodiversidad

| | Tipo de Documento |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> (X..) graduação | <input type="checkbox"/> (.....) artigo |
| <input type="checkbox"/> (.....) especialização | <input checked="" type="checkbox"/> (X) trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> (.....) mestrado | <input type="checkbox"/> (.....) monografía |
| <input type="checkbox"/> (.....) doutorado | <input type="checkbox"/> (.....) dissertação |
| | <input type="checkbox"/> (.....) tese |
| | <input type="checkbox"/> (.....) CD/DVD – obras audiovisuais |
| | <input type="checkbox"/> (.....) _____ |

Título do trabalho acadêmico: Evaluación de la diversidad y estructura genética del pez de arroyo *Ancistrus* sp. (Siluriformes: Loricariidae)

Nome do orientador(a): Luiz Henrique Garcia Pereira

Data da Defesa: 12/06/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 12 de Junho de 2023.

Assinatura do Responsável

*Dedico este trabajo a mis padres y
hermanos, por siempre apoyarme y
estar presentes en esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

En primer lugar, quiero agradecer mi orientador el profesor Luiz Henrique García Pereira, por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo a su lado y de cumplirme uno de mis sueños de trabajar con la genética, gracias inmensamente por su apoyo y paciencia para poder realizar este sueño.

Quiero agradecer también a la UNILA, por darme la oportunidad de realizar este sueño que, en algún momento, de mi vida pensé que nunca podría realizar, además de todo, por darme esa posibilidad conocer este hermoso país.

Agradezco enormemente a Caroline por darme todo su apoyo, paciencia, dedicación y confianza durante todo este periodo, su compañía y su amistad hicieron los momentos difíciles, más fáciles de superar.

También agradezco a la banca por sus orientaciones y contribuciones y primordialmente por haber aceptado ser parte de la banca examinadora.

Agradezco a los compañeros del laboratorio por su compañía y por toda la ayuda.

Extiendo estos agradecimientos a mis amigos Alvi, Hella y Diego por compartir buenos momentos de amistad y locuras. No puedo dejar atrás, a mis dos mejores compañías, Antonella y Gabriela, que desde mi llegada a Brasil fueron las personas que más me impulsaron a seguir adelante y nunca desistir. Agradezco también a Allan por ayudarme en los momentos difíciles y ser parte de los buenos recuerdos.

Por último, quiero agradecer a mi mamá y mi papá, por acompañarme en todo momento y enseñarme a levantar, cuando los momentos se ponen difíciles de superar. Gracias inmensamente, por darme esa luz que me direcciona y me tranquiliza, para seguir adelante.

“Cada logro que valga la pena, grande o pequeño, tiene sus etapas de fracaso y triunfo; un comienzo, una lucha y una victoria.”

Mahatma Gandhi

BELTRÁN VARGAS, PAULA ANDREA. **AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DO PEIXE DE RIACHO *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**. 2023. 54 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

RESUMO

A genética de populações estuda as variações e estruturação genética de populações dos organismos. A diversidade genética é essencial para a adaptação e evolução das populações, enquanto a estruturação populacional pode ser influenciada por fatores como hábitat, fluxo gênico e isolamento geográfico. Compreender esses aspectos é fundamental para a conservação e manutenção das populações de peixes, e para compreender melhor a evolução e adaptação dessas espécies. Barreiras naturais ou artificiais em rios transformam o ambiente, podendo interferir na reprodução, alimentação e conseqüentemente no fluxo gênico entre populações. A construção da represa de Itaipu criou o Reservatório de Itaipu, que modificou a paisagem, inundando uma superfície de 1.460 km² que recebe rios e riachos que desembocavam diretamente no rio Paraná. Nesse contexto, o presente estudo buscou testar a hipótese de que o Reservatório de Itaipu poderia funcionar como barreira no fluxo gênico, intensificando a estruturação genética. Para tanto, o trabalho investigou os níveis de diversidade e estruturação genética entre populações de *Ancistrus* sp. de diferentes microbacias afluentes do Reservatório de Itaipu, a partir do marcador *D-Loop* do DNA mitocondrial. As análises revelaram altos níveis de diversidade genética ($H_d = 0,959$; $\pi = 0,0351$). As análises de estruturação genética entre as populações mostraram também altos níveis de estruturação (Φ_{ST} : 0,219 a 0,751), com um índice de fixação global de 0,136. Esses resultados mostraram que as populações de *Ancistrus* sp. possuem alta diversidade genética e alta estruturação genética entre as microbacias da bacia do rio Paraná. Também evidenciou uma mistura de linhagens devido a um contato secundário entre as microbacias, que deve ter ocorrido durante as alterações hidrológicas causadas pela construção e enchimento do lado de Itaipu. Esse trabalho confirma a hipótese de que grandes rios atuam como barreira efetiva ao fluxo gênico, intensificando a estruturação de espécies de riachos dado que as microbacias analisadas se conectam pelo rio Paraná (hoje, no trecho substituído pela Barragem de Itaipu). Por fim, esses resultados encontrados são um passo importante para elucidar uma questão ainda pouco estudada: como e o quanto um grande rio ou reservatório pode influenciar na estruturação genética entre populações de peixes que habitam os afluentes destas drenagens.

Palavras-chave: diversidade genética populacional; marcador *D-Loop*; Reservatório de Itaipu; ecossistemas aquáticos neotropicais; rio Paraná.

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

RESUMEN

La genética de poblaciones estudia las variaciones y estructuras genéticas de las poblaciones de los organismos. La diversidad genética es esencial para la adaptación y evolución de las poblaciones, mientras que la estructura poblacional puede estar influenciada por factores como el hábitat, el flujo de genes y el aislamiento geográfico. Comprender estos aspectos es fundamental para la conservación y gestión de las poblaciones de peces y para comprender mejor la evolución y adaptación de estas especies. Barreras naturales o artificiales en los ríos transforman el ambiente, logrando interferir en la reproducción, alimentación y consecuentemente lo flujo génico entre poblaciones. La construcción de la represa de Itaipu creó el Embalse de Itaipu, que modificó el paisaje, inundando una superficie de 1.460 km² que recibe los drenajes de ríos y arroyos que desembocan directamente en el río Paraná. En este contexto, el presente estudio buscó testar la hipótesis de que el Embalse podría funcionar como barrera en el flujo génico intensificando la estructuración génica. Para tanto, el trabajo investigó los niveles de diversidad y estructuración genética entre las poblaciones de *Ancistrus* sp. de diferentes microcuencas afluentes del Embalse de Itaipu, a partir del marcador *D-Loop* del ADN mitocondrial. Los análisis revelaron altos niveles de diversidad genética ($H_d = 0,959$; $\pi = 0,0351$). Los análisis de estructuración genética entre las poblaciones mostraron también altos nivel de estructuración (Φ_{ST} : 0,219 a 0,751), con un índice de fijación global de 0,136. Estos resultados mostraron que las poblaciones de *Ancistrus* sp. poseen alta diversidad genética y alta estructuración genética entre las microcuencas de la cuenca del río Paraná. También evidenció una mezcla de linajes debido a un contacto secundario entre microcuencas, probablemente ocurriendo durante las alteraciones hidrológicas provocadas por la construcción y llenado del lago de Itaipu. Este trabajo confirma la hipótesis de que grandes ríos actúan como barrera efectiva para el flujo génico, intensificando la estructuración de especies de arroyos dado que las microcuencas analizadas se conectan por el río Paraná (hoy, en el trecho sustituido por la Barraje de Itaipu). Por fin, los resultados encontrados son un paso importante para dilucidar una cuestión aún hoy poco estudiada: cómo y en qué medida un gran río y embalses pueden influir en la estructura genética de las poblaciones de peces que habitan en los afluentes de estos drenajes.

Palabras clave: diversidad genética poblacional; marcador *D-Loop*; Embalse Itaipu; ecosistemas acuáticos neotropicales; río Paraná.

BELTRÁN VARGAS, PAULA ANDREA. **EVALUATION OF THE DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF THE STREAM FISH *Ancistrus* sp. (SILURIFORMES: LORICARIIDAE)**. 2023. 54 pages. Undergraduate thesis (Graduation in Biological Sciences – Ecology and Biodiversity) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

ABSTRACT

Population genetics studies the genetic variations and structures within populations of organisms. Genetic diversity is essential for the adaptation and evolution of populations, while population structure can be influenced by factors such as habitat, gene flow, and geographic isolation. Understanding these aspects is crucial for the conservation and management of fish populations and for gaining a better understanding of their evolution and adaptation. Natural or artificial barriers in rivers can transform the environment, interfering with reproduction, feeding, and consequently, gene flow between populations. The construction of the Itaipu Dam created the Itaipu Reservoir, which altered the landscape by flooding an area of 1,460 km² that receives drainage from rivers and streams directly flowing into the Paraná River. In this context, the present study aimed to test the hypothesis that the reservoir could function as a barrier to gene flow, intensifying genetic structuring. To do so, the study investigated the levels of diversity and genetic structuring among populations of *Ancistrus* sp. from different micro-watersheds that flow into the Itaipu Reservoir, using the D-Loop marker of mitochondrial DNA. The analyses revealed high levels of genetic diversity ($H_d = 0.959$; $\pi = 0.0351$). The analyses of genetic structuring among populations also showed high levels of differentiation (Φ_{ST} : 0.219 to 0.751), with a global fixation index of 0.136. These results demonstrated that the *Ancistrus* sp. populations exhibit high genetic diversity and significant genetic structuring among the micro-watersheds of the Paraná River Basin. The study also revealed a mixture of lineages due to secondary contacts between micro-watersheds, likely occurring during the hydrological alterations caused by the construction and filling of the Itaipu Reservoir. This work confirms the hypothesis that large rivers act as effective barriers to gene flow, intensifying the structuring of stream-dwelling species, given that the analyzed micro-watersheds are connected through the Paraná River (now replaced by the Itaipu Dam). Ultimately, the findings represent an important step towards understanding a still poorly studied question: how and to what extent can large rivers and reservoirs influence the genetic structure of fish populations inhabiting their tributaries.

Key words: population genetic diversity; D-Loop marker; Itaipu Reservoir; neotropical aquatic ecosystems; Paraná River.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ejemplar de *Ancistrus* sp. **A)** posición lateral **B)** posición dorsal y **C)** posición ventral. 23
- Figura 2** – Mapa de la cuenca hidrográfica del Paraná 3 con los puntos de colecta de *Ancistrus* sp. Los colores delimitan las diferentes microcuencas (M) estudiadas. 26
- Figura 3** – Frecuencias haplotipos en el conjunto total de datos. 29
- Figura 4** – Red de haplotipos obtenida a partir del secuenciamiento parcial de la región *D-loop* (ADNmt) para *Ancistrus* sp. Proveniente de diferentes puntos de colecta en cinco microcuencas afluentes del río Paraná. 31
- Figura 5a** – Primera parte del dendrograma de similaridad entre las secuencias de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. colectados en diferentes arroyos de cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3. 33
- Figura 5b** – Segunda parte del dendrograma de similaridad entre las secuencias de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. colectados en diferentes arroyos de cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3. 34
- Figura 5c** – Tercera parte del dendrograma de similaridad entre las secuencias de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. colectados en diferentes arroyos de cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3. 35
- Figura 6** – Test de Mantel para las poblaciones *Ancistrus* sp. para verificar correlaciones entre distancia genética, obtenidas a partir de Φ_{ST} par a par y distancia geográfica entre las microcuencas estudiadas. 37
- Figura 1 Suplementar** – Dendrograma de similaridad entre las secuencias de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. colectados en diferentes arroyos en cinco microcuencas afluentes del río Paraná. 53

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1** – Número de especímenes *Ancistrus* sp. mostrados por punto. 26
- Tabla 2** – Índices de diversidad genética de *Ancistrus* sp. colectados en cinco microcuencas afluentes del río Paraná. **N**: número de individuos, **S**: sitios de segregación, **Nh** – número de haplotipos encontrados, **Hd** – diversidad haplotípica, π – diversidad nucleotídica. 28
- Tabla 3** – Distribución de los haplotipos de las muestras de *Ancistrus* sp. de las secciones muestreadas. La última columna informa el número total de haplotipos presentes en cada localidad. 30
- Tabla 4** – Diferencia genética par a par entre las poblaciones de *Ancistrus* sp. en las microcuencas afluentes de la cuenca del río Paraná 3, obtenidas a partir del marcador *D-Loop* del ADNmt. Φ ST- parámetros basados en las estadísticas F de Wright. 36
- Tabla 5** – Análisis de variancia molecular (AMOVA) para *Ancistrus* sp. colectados en cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3, a partir del marcador *D-Loop*. Considerando todas las muestras como un único grupo. 37
- Tabla 6** – Análisis de variancia molecular (AMOVA) para *Ancistrus* sp. colectados en cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3, a partir del marcador *D-Loop*. Considerando 4 grupos: Grupo 1: M1; Grupo 2: M2 e M3; Grupo 3: M4; Grupo 4: M5. 37
- Tabla Suplementar 1** – Distancia geográfica en kilómetros entre los puntos de colecta de *Ancistrus* sp. en las microcuencas del río Paraná. 52

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 1.1. GENÉTICA DE POBLACIONES | 12 |
| 1.1.1. Diversidad genética..... | 12 |
| 1.1.2. Genética de poblaciones en peces | 14 |
| 1.1.3. Marcadores moleculares en el estudio de la genética de poblaciones de peces..... | 15 |
| 1.2. ECOSISTEMAS DE AGUA DULCE NEOTROPICAL | 17 |
| 1.2.1. Río Paraná..... | 18 |
| 1.3 SILURIFORMES, LORICARIIDAE..... | 21 |
| 1.3.1. Hypostominae: <i>Ancistrus</i> | 22 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL | 24 |
| 2.2 Objetivos específicos | 24 |
| 3. METODOLOGIA | 25 |
| 3.1. ÁREA DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS | 25 |
| 3.2. MÉTODOS MOLECULARES | 27 |
| 3.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS | 27 |
| 4. RESULTADOS..... | 28 |
| 4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA | 28 |
| 4.2 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL | 36 |
| 5. DISCUSIONES | 38 |
| 5.1 DIVERSIDAD GENÉTICA | 38 |
| 5.2 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL | 39 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 40 |
| REFERENCIAS..... | 41 |
| ANEXOS | 52 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENÉTICA DE POBLACIONES

Los estudios de genética de poblaciones pueden ser clasificados como una sub área de la biología evolutiva que busca comprender cómo la evolución influye en la variación genética a nivel poblacional. Estos estudios tuvieron inicio en el siglo XX, tiempo antes del descubrimiento de la estructura del ADN en los años cuarenta y la disponibilidad de datos genómicos a gran escala en la actualidad. Con relación a los primeros modelos evolutivos, estos fueron publicados de forma independiente en el año 1908 por el médico Weinberg y el matemático Hardy (SANCHEZ,2022).

Por ende, la genética de poblaciones tiene como propósito principal, estudiar las variaciones genéticas de una población para inferir valores de parámetros demográficos que describen tanto los cambios en el tamaño de la población, como en su estructura, mezcla y eventos de migración (SANCHEZ,2022).

A largo plazo, las poblaciones deben ajustarse a los cambios, adaptándose. Las adaptaciones pueden ser fisiológicas, conductuales o genéticas propiamente dichas, moldeadas por la selección natural (FRANKHAM *et al.*, 2010). Estos cambios evolutivos moldeados por la evolución natural se conocen como evolución adaptativa y, para que esto ocurra, se requieren poblaciones genéticamente variables (FRANKHAM *et al.*, 2010) pues, la base de todos los niveles de la biodiversidad y la evolución de la vida en la Tierra está constituida en la variación a nivel genético (LAIKRE *et al.*, 2005).

1.1.1 Diversidad Genética

La diversidad genética es la variedad de alelos y genotipos presentes en especies, poblaciones o grupos de especies (FRANKHAM *et al.*, 2010). Ésta es necesaria para la evolución de las poblaciones y su adaptación a los cambios ambientales, además de contribuir con la diversidad y resiliencia de los ecosistemas (REED & FRANKHAM, 2003; FRANKHAM *et al.*, 2010; PEARMAN; GARNER, 2005). Así, la pérdida de genotipos de poblaciones adaptadas localmente puede ser tan irreversible como la pérdida de especies (CARVALHO & HAUSER, 1994), debido a que, del mismo modo que una especie extinta no aparecerá nuevamente, un linaje tampoco lo hará (MORITZ, 2002).

Los procesos evolutivos influyen directamente los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones, entre estos están la mutación, la migración, la deriva genética y la selección natural

(HUGHES *et al.*, 2008). La mutación y la migración son los principales propulsores de la diversidad genética en las poblaciones, siendo eliminadas, principalmente, por la deriva y la selección natural (FRANKHAM *et al.*, 2010).

Las poblaciones pequeñas y/o aisladas son generalmente de baja diversidad genética, y experimentan una alta consanguinidad, que resulta en un vigor reproductivo reducido (depresión endogámica) y en una menor capacidad evolutiva en respuesta a los cambios ambientales. Así también, la deriva genética tiene consecuencias significativas en poblaciones pequeñas. La diversidad genética en estas poblaciones se pierde como resultado del muestreo aleatorio durante la transmisión de alelos entre generaciones. Existe también la posibilidad de que alelos especialmente raros no sean transmitidos de una generación a otra por simple casualidad. (FRANKHAM *et al.*, 2010).

El sistema de apareamiento, el flujo de los genes y la deriva genética, son factores que pueden influenciar el cómo la diversidad genética está distribuida espacialmente dentro de las especies. En el caso de los peces, que toman como sus hábitats los diferentes tramos de agua existentes a lo largo del curso de un río, la tendencia es a que la diversidad genética intrapoblacional difiera, en escala local incluso. (CARVALHO, 1993).

Las variaciones heredables que suceden en cada uno de los organismos, es lo que denominamos diversidad genética. Cuando las condiciones naturales son más o menos estables, factores como la mutación, recombinación del material genético o migración de individuos son los causantes de que la diversidad genética pueda ocurrir entre los individuos de una población o dentro de las poblaciones de una misma especie (DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2020).

La hipótesis de congruencia espacial explica que, la diversidad genética dentro de una especie (intraespecífica) y entre las especies (interespecífica) es mayor en las regiones cálidas, debido a que altas temperaturas conllevan a mayores tasas de metabolismo y mutaciones; y con eso, tiempo de generaciones más rápidas que promueven el aumento en la tasa de especiación y diversidad de especies (FINE, 2015).

Se debe tener en cuenta, que las fluctuaciones demográficas están asociadas con la inestabilidad ambiental y que está a su vez, limitan la diversidad (DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2020). Frecuentemente esos eventos son seguidos por recolonización estocástica que ocasionan procesos demográficos cuellos de botellas, que provocan una reducción drástica en la diversidad de especies y en la genética local (MITTELBACH *et al.*, 2007)

Con relación a las áreas más productivas, estas van a sustentar poblaciones más grandes, que permitirán producir una mayor diversidad genética e incrementará la presencia de más especies y probablemente, dará paso a tener una mayor tasa de especiación (STORCH *et al.*, 2017; CURRIE *et al.*, 2004). Con respecto a las áreas con mayor complejidad, estas deberán proporcionar más nichos

ecológicos y sustentar una mayor diversidad de especies (GROSBERG *et al.*, 2012; KOVALENKO *et al.*, 2012), incluso, poblaciones más espacialmente estructuradas en un área determinada, tendrán una mayor diversidad genética (BERTIN *et al.*, 2017).

No obstante, la diversidad genética es importante para que las poblaciones evolucionen y se adapten a los ambientes que se encuentran en constante cambio (FRANKHAM, 2002).

1.1.2. Genética de poblaciones en peces

A menudo, las especies son genéticamente heterogéneas y se estructuran en grupos de individuos que pueden estar aislados unos de otros, esto da como resultado un patrón de distribución de la variación genética entre y dentro de las poblaciones denominado estructura genética (LAIKRE *et al.*, 2005). El período de tiempo durante el cual las poblaciones son sometidas a los procesos evolutivos como la mutación, la selección natural, la deriva genética y el flujo de genes, lleva a la diferenciación de estas (HILSDORF & HALLERMAN, 2017).

Carvalho (1993) destaca que, los peces frecuentemente se separan en diferentes grados, estando subdivididos en poblaciones locales. Menciona que, aquellas subpoblaciones que habitan ambientes similares o están conectadas por el flujo de genes, pueden presentar características fenotípicas o genotípicas homogéneas; mientras que, el estar en hábitats diferentes puede generar una estructuración poblacional, lo que a veces también puede ser consecuencia por factores como: el número de fundadores, el tamaño de la población y los niveles de variabilidad genética en rasgos importantes en la ecología. Estas situaciones influyen en el grado de heterogeneidad espacial de las poblaciones.

Además de las características del hábitat, el aislamiento geográfico parece jugar un papel importante en la distribución fragmentada de la diversidad genética. El aislamiento y la existencia de pocas rutas migratorias entre las aguas dulces implican la extensión de la diversidad genética en los peces de estos sistemas acuáticos, lo que puede conducir a un alto grado de divergencia a escala local, produciendo un pool genético fragmentado, aumento de las oportunidades para la diferenciación adaptativa de la población. Esta divergencia puede verse incrementada por la movilidad limitada y la alta fidelidad a lugares específicos, así como por el flujo de genes restringido, lo que implica una baja inmigración natural (CARVALHO, 1993).

Más allá de los procesos históricos y específicos de las especies, la intervención antropogénica, es otro factor importante que afecta la estructura poblacional de las especies. La inserción de barreras o conectividades impuestas, son eventos que conllevan a la variación genética o pérdida de la estructuración genética, respectivamente (HUSEMANN *et al.*, 2012).

La estructura genética de una población puede asumir tres formas básicas, separadas o combinadas, siendo estas: poblaciones distintas; poblaciones con cambio genético continuo; y/o poblaciones sin diferenciación. La estructura genética poblacional de una especie de pez puede asumir las tres formas básicas. Las unidades dentro de cada uno de estos tipos son las poblaciones locales, donde, local se refiere a la ubicación geográfica del sitio de desove. Así, para diferentes poblaciones, se puede percibir algún tipo de límite espacial entre ellas durante la temporada de desove; para poblaciones con cambios genéticos continuos, puede haber o no un límite entre los sitios de desove y; en el caso de poblaciones sin diferenciación, los individuos utilizan una única zona de desove para reproducirse (LAIKRE *et al.*, 2005).

1.1.3. Marcadores moleculares en el estudio de la genética de poblaciones de peces

El ADN mitocondrial (ADNmt) es uno de los marcadores moleculares más estudiados (MCCUSKER & BENTZEN, 2010), por ser una molécula haploide circular de alrededor de unos 15000 a 20000 pares de bases (pb) que se hereda por vía materna en la mayoría de las especies y se transmite sin recombinación (BENTZEN, 2010) y porque la disposición de los genes está muy conservada en el genoma mitocondrial (AVISE & ELLIS, 1986).

Además de sus características biológicas y evolutivas, la facilidad de uso técnico del ADNmt (p. ej., gran cantidad por célula y fácil purificación) hace que esta molécula sea ampliamente utilizada (FRANKHAM *et al.*, 2010; HILSDORF & HALLERMAN, 2017). Se utilizan marcadores neutrales selectivos porque proporcionan una imagen que es independiente de los procesos históricos que dan forma a la distribución de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones (VRIJENHOEK, 1998). Usando secuencias de ADNmt como marcador molecular, es posible analizar la diversidad genética a partir del índice de diversidad haplotípica (H_d), que mide la variabilidad genética dentro de las poblaciones, estimando también el número de haplotipos compartidos entre poblaciones. La divergencia o diversidad de nucleótidos (π) también se utiliza para medir la divergencia promedio entre las secuencias de ADN en una población (HILSDORF & HALLERMAN, 2017). Con el desarrollo de paquetes computacionales para el análisis de secuencias de ADN, se mejoró la cuantificación e interpretación de las diferencias entre poblaciones. El análisis molecular de la varianza (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) permite dividir la variación genética en componentes intra e inter poblacionales. Mientras tanto, la divergencia entre poblaciones de haplotipos se captura en el índice Φ (phi), de manera análoga a la F_{ST} (HILSDORF & HALLERMAN, 2017).

El uso de los marcadores moleculares en peces, ha permitido determinar la diversidad genética de varias especies, mediante diferentes técnicas de biología molecular (WHITMORE, 1990;

OLIVEIRA *et al.*, 2009; GHIGLIOTTI *et al.*, 2010) aplicadas en trabajos de análisis de estructura de la población, monitoreo de variabilidad y condiciones genéticas en poblaciones de peces nativos y en cautiverio, como también en estudios taxonómicos y filogenéticos (BARTFAI *et al.*, 2003; ALAM & ISLAM, 2005; POVH *et al.*, 2008; FERGUSON *et al.*, 2011). Al estudiar regiones de ADN mitocondrial de varias especies de peces marinos, Grant y Bowen (1998) propusieron una interpretación en la correlación entre los valores de diversidad haplotípica (H_d) y de diversidad nucleotídica (π). Según los autores: La alta diversidad haplotípica ($H_d > 0,5$) combinada con la alta diversidad nucleotídica ($\pi > 0.5\%$) indicaría contacto secundario entre diferentes linajes o indicaría una población grande y estable con larga historia evolutiva; Alta diversidad haplotípica ($H_d > 0,5$) combinada con baja diversidad nucleotídica ($\pi < 0.5\%$) indicaría *Bottleneck* seguido de un rápido crecimiento poblacional con acumulo de mutaciones; Baja diversidad haplotípica ($H_d < 0,5$) combinada con alta diversidad nucleotídica ($\pi > 0.5\%$) indican divergencia entre poblaciones geográficamente subdividida; y la baja diversidad haplotípica ($H_d < 0,5$) combinada con baja diversidad nucleotídica ($\pi < 0.5\%$) indicaría un *Bottleneck* reciente o un efecto fundador por uno o pocos linajes de ADN mitocondrial.

Varios autores, han demostrado el excelente uso de los marcadores moleculares para estudiar y evaluar la variabilidad, diversidad, estructura y evolución genética en poblaciones de peces de agua dulce; ejemplo de ello es el trabajo realizado por Terencio *et al.* En 2012, en la especie *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae). Estudiando la región control del ADNmt en individuos colectados en ocho afluentes a lo largo del caudal del río Negro, encontraron una alta diversidad haplotípica y una fuerte estructuración poblacional dentro de uno de los afluentes; además de encontrar una correlación entre diversidad genética y distancia geográfica. Por su parte, Bignotto *et al.* 2020, usando los marcadores mitocondriales *D-Loop*, citocromo b y citocromo c oxidasa I, estudiaron la caracterización genética en las poblaciones de *Serrasalmus maculatus* de las cuencas de los ríos Alto Paraná, Alto Paraguay y Tocantins. El estudio encontró que *S. maculatus* presenta una alta variabilidad genética interespecífica pero una baja variabilidad genética intraespecífica. Apolinário-Silva *et al.* (2021) estudiando la región *D-Loop*, encontró altos valores de estructuración genética entre poblaciones de *Hypostomus ancistroides* en arroyos de una cuenca de Alto Río Paraná, valores significativos fueron encontrados incluso entre poblaciones que se encuentran en el mismo drenaje con menos de 10 km de distancia entre ellos.

De esta manera, observamos que los marcadores moleculares se muestran como una herramienta eficaz para los estudios de diversidad genética, en especial cuando se trata de los ecosistemas de aguas dulce. Estos ecosistemas son considerados a menudo islas en la que la dinámica evolutiva está impulsada por componentes estructurales como la complejidad de la red de ríos o lagos y por los

fuertes gradientes físicos en distancias geográficas relativamente cortas (PAZ-VINAS *et al.*, 2015).

Cuanto, a la complejidad del hábitat horizontal, esta proporciona más la diversidad genética, que la diversidad de especies, debido a que esta puede favorecer la persistencia de poblaciones aisladas dentro de especies en un área restringida, pero no la coexistencia de un gran número de especies en competencia dentro de un mismo segmento de agua (MANEL *et al.*, 2020).

En referencia a las características de paisaje de los sistemas de agua dulce, estos pueden tener efectos bien marcantes sobre los patrones espaciales de la diversidad genética, que en los gradientes ambientales (LABONNE *et al.*, 2008; PAZ-VINAS *et al.*, 2015; THOMAZ *et al.*, 2016).

1.2. ECOSISTEMAS DE AGUA DULCE NEOTROPICAL

Los ríos, riachos, lagunas, reservorios y demás fuentes de agua se constituyen no sólo como elementos que componen el paisaje, sino como parte esencial de la dinámica de este (BARNES, 1980). En ese sentido, los ecosistemas de agua dulce están constituidos por los organismos vivos, las interacciones biológicas y todos los procesos fisicoquímicos que, en conjunto, determinan su funcionamiento y el de su entorno (ALLAN & CASTILHO, 2007).

Las condiciones físicas y químicas de estos sistemas, como el Ph, la temperatura y el volumen de agua vertida, están condicionadas a mudar a lo largo de su curso (TOWNSEND *et al.*, 2010). Particularmente, los arroyos y fuentes de cabecera hasta la cuarta orden poseen dimensiones relativamente pequeñas, lo que las torna más susceptibles a las condiciones locales (MEYER *et al.*, 2007). Así también, debido a su tamaño y aislamiento, estas fuentes brindan espacios de hábitat a especies pequeñas, libres de predadores de grande porte, de competidores y de especies invasoras, constituyéndose como un ambiente ideal para las especies de pequeño porte que allí habitan (MEYER *et al.*, 2007; RICHARDSON, 2019).

Los pequeños espacios de hábitat brindados por estos cuerpos de agua resultan en poblaciones relativamente pequeñas y aisladas, siendo así susceptibles a la diferenciación genética de las poblaciones por selección natural, deriva genética o por ambos mecanismos evolutivos (RICHARDSON, 2019).

La enorme riqueza de especies animales y vegetales que las aguas continentales soportan, hacen que esos ambientes reciban más atención, una vez que son más vulnerables a las actividades humanas y mudanzas ambientales (DUDGEON *et al.*, 2006). Dentro de las principales alteraciones antrópicas que amenazan los ecosistemas de agua dulce están las modificaciones de los regímenes hidrológicos naturales, la destrucción o degradación de hábitats, la invasión por especies exóticas y la contaminación del agua por actividades de origen antrópica (DUDGEON *et al.*, 2006). Esas

alteraciones también impactan la biodiversidad en su nivel genético, afectando la adaptación de las especies y la especiación de los taxones (HUGHES, *et al.*, 1997; TEMPLETON, 2001).

1.2.1 Río Paraná

La cuenca del río Paraná es la segunda cuenca más grande de América del Sur, ocupa aproximadamente 28.000.000 km² y cubre la región centro-sur del continente, desde los Andes hasta la Serra do Mar, cerca del Océano Atlántico. El río Paraná, principal río de la cuenca, está formado por la unión de los ríos Grande y Paranaíba, y tiene su nacimiento en la Meseta Central, separando los estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul y São Paulo y separando también el este último del Estado de Paraná, a su paso pasa por Paraguay y Argentina hasta llegar a su desembocadura en el estuario de La Plata. Este río drena alrededor del 10,5% del territorio brasileño y tiene una longitud de 4.495 km (AGOSTINHO *et al.*, 2018a). En su trecho Paranaense, está localizada la Usina Hidroeléctrica de Itaipu, construida entre el año 1975 a 1982. Su construcción formó el Embalse de Itaipu sobre el río Paraná, que inundó un área de 1.460 km² (AGOSTINHO *et al.*, 2018b), de los cuales 835 km² son brasileños. Con la formación del Embalse, las áreas de algunos municipios del estado de Paraná quedaron inundadas, siendo estas: Guaíra, Terra Roxa, Marechal Cândido Rondon, Santa Helena, Matelândia, Medianeira, São Miguel do Iguçu y Foz do Iguçu (AGOSTINHO *et al.*, 1999). El Embalse de Itaipu recibe los drenajes de ríos y arroyos que desembocan directamente en el río Paraná, en el oeste del estado de Paraná, Brasil, conocida como microcuenca del Paraná 3 (BP3) (PEREIRA & SCROCCARO, 2010) y es destacada por la presencia de corredores de biodiversidad, esenciales para el mantenimiento de muchas especies (PEREIRA & SCROCCARO, 2015).

Con el fin de mitigar la mudanza del ambiente acuático causada por la construcción de la barrera, fue construido el Canal de Piracema que actúa como corredor ecológico permitiendo que las especies migradoras alcancen las áreas de reproducción en la planicie del Alto Río Paraná y el parque Nacional de Ilha Grande (AGOSTINHO *et al.*, 1993; GOMES & AGOSTINHO, 1997; ITAIPU, 2010). Esta canal presenta una extensión de 10,3 km y está construido en la represa de Itaipu, permitiendo la unión del río Paraná con el Embalse de Itaipu, y para conectarlos fueron construidos segmentos de tipo escalera, con canales de concreto y cuatro lagunas artificiales (CAROSFELD, 2004; ITAIPU, 2010)

En ese orden de ideas, una de las alteraciones en la migración de peces en zonas aguas arriba debajo de los ríos, es la construcción de barreras hidroeléctricas (MELDGAARD *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2013; BRINKER *et al.*, 2018; VEGA-RETTTER *et al.*, 2020). Estas construcciones interrumpen la conectividad física fluvial, limitando el flujo genético; inclusive, aceleran la deriva

genética, aumentando de esta forma, la probabilidad de pérdida de alelos raros, que, en efecto, conducirá a la reducción de la variabilidad genética de una población (ALLENDORF *et al.*, 2013; FRANKHAM *et al.*, 2017). Esta situación es vista en la cuenca hidrológica del BP3.

La hipótesis levantada por algunos trabajos investigativos realizados en ambientes marinos y de estuario con diferentes organismos, mencionan que grandes distancias sobre estos cuerpos de agua pueden actuar como barrera física para la dispersión de las especies entre regiones (FLOETER *et al.*, 2008; BARTAKOVA *et al.*, 2015; GIACHINI TOSETTO *et al.*, 2022). Esto puede deberse a la dinámica fluvial de los cuerpos hídricos (LUIZ *et al.*, 2012), como a los cambios físico y químicos del agua, asociadas a la diferenciación de nicho ecológico de las especies o a la estratificación de la columna de agua, también puede ser por la presencia de corrientes dominantes que pueden favorecer el flujo de algunos organismos, pero, puede a su vez, dificultar la dispersión a contracorriente dificultando de esta manera la conectividad entre las poblaciones de, gusano listón (THORNHILL *et al.*, 2008), peces de arrecifes (FRASER *et al.*, 2017), macro invertebrados y peces (GIACHINI TOSETTO *et al.*, 2022). Además, otros estudios han revisado trabajos notablemente relacionados a la genética de paisaje marino destacando temas dominantes y atributos biológicos de especies y características del paisaje marino que afectan los patrones genéticos espaciales en el mar. Pues, la distancia geográfica, las barreras y el aislamiento del hábitat en el mar pueden reducir los intercambios genéticos y, mediante la acción de la deriva genética y, a veces, la selección, esto puede conducir a la divergencia entre poblaciones e individuos (SLATKIN, 1993; ROUSSET, 2000; RIGINOS & LIGGINS, 2013). Por ende, la mayoría de los estudios, como los citados anteriormente, fueron desarrollados en ambientes marítimos. Ahora bien, con relación a estudios con objetivo de comprender como los ríos grandes pueden funcionar como barreras al flujo génico, estos se encuentran escasos. Pues, la mayoría de los estudios que utilizaron este enfoque se han realizado más en organismos terrestres y en organismos marinos (GALINDO *et al.*, 2006; RIGINOS *et al.*, 2013; GIACHINI TOSETTO *et al.*, 2022).

Estudios realizados en esta área, han determinado que la región ha venido sufriendo grandes cambios no solo en su paisaje natural, ocasionadas principalmente por la disminución de la cobertura vegetal, debido a la urbanización y el avance de las actividades agrícolas, el uso intensivo e indiscriminado de agrotóxicos en la agricultura; al uso inadecuado e irracional de los recursos hídricos y el bajo índice de tratamiento de residuos sanitarios (PEREIRA & SCROCCARO, 2010, 2013); Sin embargo, poblaciones con baja capacidad de dispersión, podrían no presentar efectos en la estructura genética de la población, conservando a su vez, el tamaño poblacional y la variabilidad genética (VALENZUELA, 2021). Probablemente, esto se deba a varios factores, por ejemplo: que el tamaño del fragmento sea mayor que el área mínima necesaria para completar el ciclo de vida, como también

el tamaño de la población sea muy grande, o quizás la barrera es muy reciente con respecto al tiempo generacional de la especie en estudio (BLAZEK *et al.*, 2013; VALENZUELA, 2021) inclusive, factores biológicos como, la capacidad de nado y el comportamiento migratorio (WHITELEY *et al.*, 2004).

En el caso de las especies que forman poblaciones pequeñas y tienen baja dispersión, los efectos negativos en la disminución del flujo de genes, sobre el tamaño efectivo de la población y la deriva genética, resultan en menor potencial de adaptación y resistencia de la población para enfrentar los cambios a las condiciones ambientales que afectan directamente en la viabilidad poblacional (FRANKHAM 2005, 2010; HANSKI, 2011; ALLENDORF *et al.*, 2013).

Ambientes de arroyos sin duda abrigan una amplia diversidad de organismos, que tienden a mantenerse en pequeñas poblaciones, lo que contribuye para un alto grado de endemismo en esas regiones (CASTRO, 1999). A pesar de que existen estudios de genética poblacional en arroyos pertenecientes a la cuenca del río Paraná, estos aún son muy pocos, tomando en consideración que tienen una gran diversidad. La falta de conocimiento sobre la ictiofauna en estos ambientes, así como la forma en que las especies interactúan entre sí y responden a la urbanización, sus impactos específicos dificultan establecer estrategias efectivas de conservación en ecosistemas acuáticos que tienen influencias de áreas urbanas (CUNICO; AGOSTINHO; LATINI, 2006). Por ese motivo, los arroyos que rodean el Embalse de Itaipu, deben ser considerados como áreas prioritarias para futuros estudios que aborden la ictiofauna con el objetivo de promover su preservación.

No obstante, estos estudios proporcionan información importante para futuras investigaciones con otras especies de peces, en esta área de Brasil. De hecho, estudios de genética de poblaciones que se centraron en poblaciones de peces de arroyos en la región del río Paraná, han encontrado estructuración genética considerable entre las poblaciones y también una diversidad genética particular de cada población. Ferreira *et al.* (2015) reportó poblaciones estructuradas de *Geophagus brasiliensis* a lo largo del cauce principal del río Laranjinha, Alto Río Paraná, y la presencia de haplotipos particulares a poblaciones de un arroyo afluente. Resultados semejantes fueron obtenidos en un estudio de poblaciones de *Astyanax altiparanae* y *Geophagus brasiliensis* colectados a lo largo de un arroyo del Alto Río Paraná (FERREIRA *et al.*, 2016). Apolinário-Silva *et al.* (2021) analizando poblaciones de cascudo *Hypostomus ancistroides* (IHERING, 1911) en varios arroyos y en el cauce principal de una red dendrítica del Paraná, detectó estructuración genética en cortas escalas geográficas y la presencia de parcelas particulares entre los drenajes. También en este estudio, los autores sugieren la influencia de la estructura ramificada característica de las cuencas hidrográficas de la región, así como el comportamiento biológico de las especies para explicar la diversidad y estructuración genética encontrada.

Estudio con el pez, *Heptaterus mustelinus* en arroyos de microcuencas del entorno del Embalse de Itaipu en Brasil, en relación a la influencia de los factores espaciales en la estructuración genética, mostraron que la diversidad genética aumentaba conforme aumentaba la distancia geográfica, indicando de esta manera un aislamiento por distancia, asociada principalmente a la baja capacidad de dispersión de la especie. Cuanto, a la complejidad entre los puntos, se reflejó también un aumento en la distancia genética entre las muestras y una mezcla de linajes haplotípicas, indicando que la complejidad de la red de drenaje de la cuenca hidrográfica ejercía influencia en la estructura genética de la especie (HUATATOCA, 2017). Aun en esa misma región, estudios de la diversidad genética de poblaciones de *Bryconamericus aff. iheringi* encontraron una alta diversidad genética y alta estructuración poblacional entre la población colectada en arroyos del lado brasilero del reservatorio y del lado paraguayo (OLIVEIRA, 2021).

En este contexto, una de esas especies interesantes para este tipo de estudios sería el género *Ancistrus*, ya que muestra una amplia distribución geográfica, en la región neotropical y en el río Paraná (OTA *et al.*, 2018, FROESE & PAULY. 2023).

1.3. SILURIFORMES, LORICARIIDAE

Los Siluriformes son popularmente conocidos como bagres o cascudos, son peces neotropicales, que presentan una gran diversidad taxonómica y ecológica, por lo cual, llegan a ser peces de gran interés, para muchos estudios. (DE PINNA, 1998; BRITTO, 2003; NEUHAUS *et al.*, 2022). Los Siluriformes presentan un total de 4127 especies válidas y se dividen en 39 familias (FRICKE *et al.*, 2022). Según Ferraris (2007), los peces de esta orden presentan normalmente hábito nocturno y crepuscular, incluso son encontrados habitualmente en el fondo de los lagos o ríos, entre rocas y troncos.

Una de las familias presentes en esta orden son los llamados Loricariidae, conocidos también popularmente como cascudos. Estos peces se caracterizan por tener un escudo óseo que recubre todo su cuerpo, además presenta también estructuras óseas en forma de espinos, conocidos como odontódeos (FISCH-MULLER, 2003). Basados en las informaciones proporcionadas por Geerinckx *et al.* (2011) estos peces tienen su boca en posición ventral, con labios de forma de disco que usan para adherirse a los sustratos sólidos y que a su vez la usan para forrajeo, pues, sus dientes raspadores y boca succionadora le ayudan en su dieta detritívora-iliófaga, alimentándose principalmente de algas y detritos.

Esta familia está distribuida en toda América central y del sur, iniciando desde en el sudeste de costa rica hasta el noreste de Argentina (ARMBRUSTER *et al.*, 2016). De acuerdo con los datos

de Fricke *et al.* (2023) esta familia actualmente incluye 1.042 especies válidas.

En cuanto a sus especies representativas, estas constituyen un grupo monofilético y están distribuidos entre seis subfamilias, reconocidas como: Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Lithogeninae, Delturinae y Rhinelepinae (ESCHEMEYER, 2023).

1.3.1. Hypostominae: *Ancistrus*

Los Hypostominae cuentan actualmente con 45 géneros válidos y 500 especies válidas, y dentro de ellos, se encuentra el género *Ancistrus* abarcando un total de 75 especies válidas (ESCHEMEYER, 2023). Según Sabaj *et al.* (1999), las especies de este género se diferencian de las demás especies de la familia Loricariidae, dado que, no presentan placas, ni odontoides, pero sí presentan pequeños tentáculos carnosos y odontoides interoperculares bien desarrollados. Cuanto a su coloración esta puede variar desde negro a café verdoso, inclusive puede presentar pintas o manchas en su cuerpo (FERRARIS, 2007).

De acuerdo con Francisco *et al.* (2018), en los *Ancistrus* sus tentáculos blandos, a menudo ramificados son más conspicuos en los machos adultos que en los machos jóvenes, mientras que, en las hembras, estas se encuentran presentes en una estrecha franja desnuda en el borde del hocico, con un tamaño más pequeño y en menor cantidad, incluso a menudo, sin ramificación (Figura 1)

Los *Ancistrus* se caracterizan por ser territoriales, presentar poca vagilidad, formar pequeñas poblaciones y por destacarse en el comportamiento de cuidado parental hacia su descendencia (ARMBRUSTER, 2004; CHIACHIO *et al.*, 2008), construyendo nidos y protegiendo sus huevos y alevinos (BURGESS, 1989; ZUANON, 1999). Este género exhibe una amplia distribución geográfica entre las zonas Tropicales y Subtropicales (FROESE & PAULY, 2022, 2023). Son susceptibles a estresores locales (GHISI *et al.*, 2016).

Estas especies comúnmente son asociadas a troncos hundidos (SARMIENTO *et al.*, 2014). Aguas continentales (FROESE & PAULY, 2022), aguas dulces demersales, agua clara correntosas y de flujo libre, hasta aguas muy turbias y estancadas (SEYIDOGLU & YAGCILAR, 2020). Suelen localizarse cerca de las rocas, troncos o entre la vegetación (VAN DER SLEEN & ALBERT, 2017). Algunas especies de *Ancistrus*, se reproducen de noche, principalmente en escondites y áreas sombreadas (DENIZ, 2020).

Las especies de este género presentan una gran diversidad genética y parecen seguir una evolución cariotípica diferenciada, con variación en el número diploide y fórmula cariotípica, presencia de diferentes sistemas cromosómicos sexuales y una tendencia a la reducción del número diploide (DE OLIVEIRA, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2009;

MARIOTTO *et al.*, 2009; MARIOTTO, 2011; NIRCHIO *et al.*, 2023).

A pesar de que este género presenta una gran distribución geográfica en la región neotropical, estudios con marcadores de diversidad intrapoblacional, tales como *D-Loop*, aún son escasos, siendo que hasta el momento la mayoría de los estudios tienen un enfoque en la identificación de especies y análisis de diversidad citogenética.



Figura 1 – Ejemplar de *Ancistrus* sp. **A)** posición lateral **B)** posición dorsal y **C)** posición ventral.
Fuente: BELTRÁN, 2023

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Considerando el comportamiento biológico de *Ancistrus*, así como las características estructurales de los arroyos neotropicales y la hipótesis de que grandes ríos pueden funcionar como una posible barrera para el flujo genético. El presente trabajo estudio la diversidad genética de poblaciones de *Ancistrus* sp. de arroyos afluentes del río Paraná, que desagua en la región del Embalse de Itaipu con objetivo de:

- Investigar la presencia de alta diversidad genética en poblaciones de *Ancistrus* sp.;
- Investigar la presencia de estructuración genética entre poblaciones oriundas de diferentes microcuencas que desaguan en el embalse de Itaipu;
- Testar la hipótesis de que lo Embalse de Itaipu estaría actuando como una barrera efectiva, aumentando la estructuración genética entre las poblaciones.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para testar esas hipótesis fueron delineados los siguientes objetivos específicos:

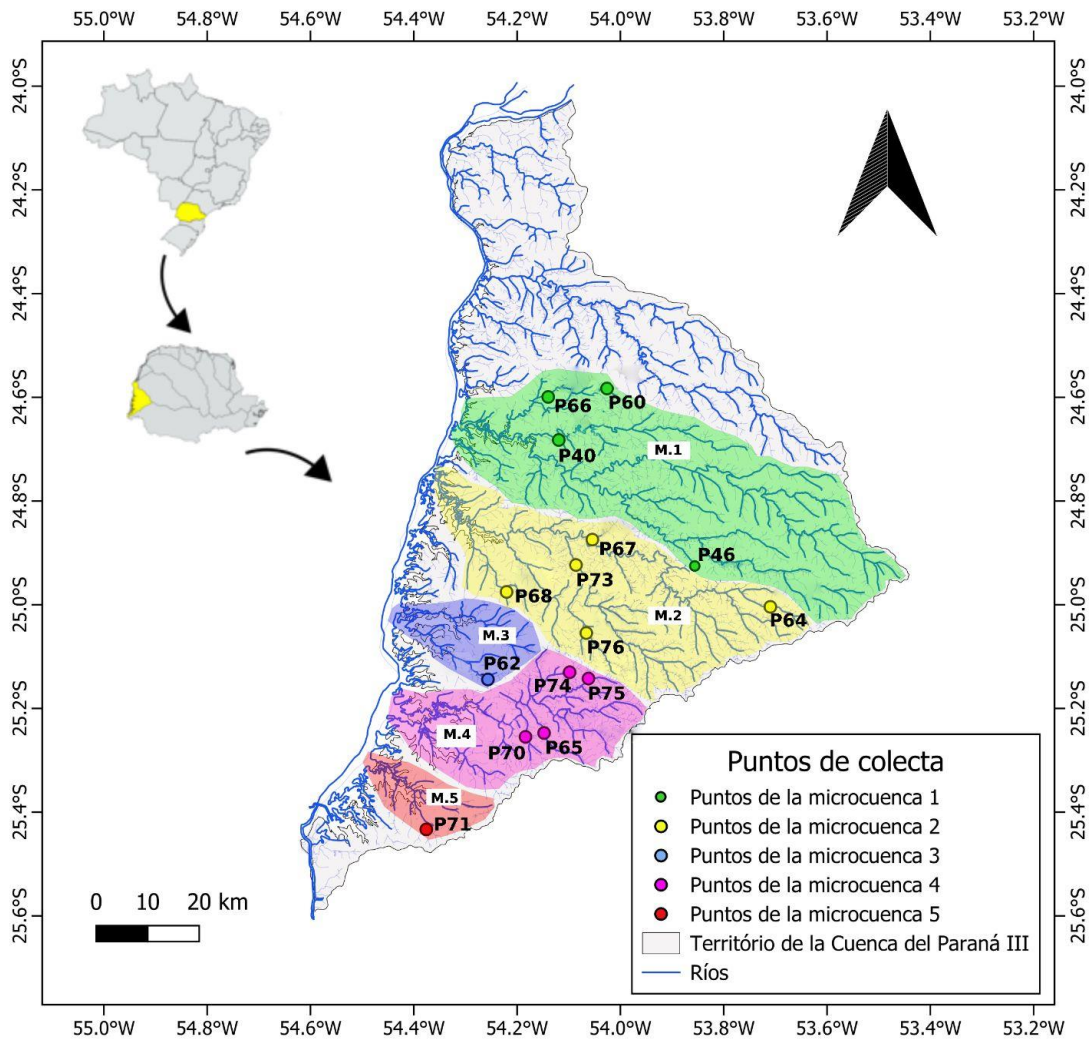
1. Obtener muestras de la especie *Ancistrus* sp. de diferentes microcuencas de la cuenca del Paraná 3, que desaguan en el Embalse de la Itaipú Binacional disponibles en la colección de Ictiología de la UNILA;
2. Extraer ADN de los especímenes;
3. Amplificar y secuenciar, secuencias parciales de la región *D-Loop* como marcador molecular;
4. Obtener los índices de diversidad genética y estructuración poblacional a través del análisis de la secuenciación parcial de la región del ADN mitocondrial, *D-Loop*.

3. METODOLOGÍA

3.1. ÁREA DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Considerando la baja capacidad de desplazamiento de especies de pequeño porte en riachuelo (CASTRO, 1999), el presente estudio seleccionó puntos de colecta en diferentes microcuencas del río Paraná. Microcuenca 1 (M1): afluentes del río San Francisco Verdadero; Microcuenca 2 (M2): afluentes del río San Francisco Falso; Microcuenca 3 (M3): afluentes del río São João; Microcuenca 4 (M4): afluentes del río Ocoí; Microcuenca 5 (M5): afluentes del río Passo-Cuê (Figura 2). La distancia entre los puntos se encuentra en el Anexo 1. Por lo tanto, fueron colectados en 15 puntos diferentes los especímenes del *Ancistrus* sp. a lo largo de cinco microcuencas afluentes del río Paraná, totalizando 83 muestras (Tabla 1).

Figura-2 - Mapa de la cuenca hidrográfica del Paraná 3 con los puntos de colecta de *Ancistrus* sp. los colores delimitan las diferentes microcuencas (M) estudiadas.



Fuente: SUDERHSA 2007.,
Modificado: BELTRÁN, 2023

Tabla 1 – Número de especímenes *Ancistrus* sp. mostrados por punto.

| <i>Ancistrus</i> sp. colectado por punto | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----------|
| M1 = 15 | | | | M2 = 16 | | | | | M3 | M4 = 20 | | | | M5 | Total |
| P40 | P46 | P60 | P66 | P64 | P67 | P68 | P73 | P76 | P62 | P65 | P70 | P74 | P75 | P71 | 15 |
| 3 | 9 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 5 | 6 | 16 | 3 | 5 | 3 | 9 | 14 | 83 |

Fuente: BELTRÁN, 2023.

3.2. MÉTODOS MOLECULARES

Para la obtención del ADN total fue utilizado el kit de extracción comercial GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Seguidamente fue preparado un gel de agarosa al 1,2%, con colorante intercalante UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience) para verificar la integridad del ADN. Para la amplificación de la región *D-Loop* fueron utilizados los *primers* L15774M: 5'-ACATGAATTGGAGGTATACCAGT-3' (Modificado del primer L15774 descrito por IRWIN *et al.*, 1991) y H16498: 5'-CACCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (MEYER *et al.*, 1990).

Las amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizarán en un volumen final de 12,5µl, que contiene 8,5µl de agua, 1,25µl de tampón (10X), 0,5 µl de cada *primer* (10 uM), 2,51 µl de dNTP, 0,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,1µl de Taq Platinum (5U/µl) y 1µl de ADN molde. El programa de amplificación fue según las condiciones descritas por Prioli *et al.* (2002) con modificaciones, siendo desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, seguido por 5 ciclos de 94°C por 15 segundos, 50° C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos y más 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos, con uno paso final de extensión a 72° C por 10 minutos.

Los fragmentos de ADN amplificados se verificarán en gel de agarosa al 1%, teñidos con colorante intercalante UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience). Los productos de PCR fueron usados en la reacción de secuenciación utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, siguiendo las orientaciones del fabricante. El producto de reacción fue purificado por precipitación en EDTA/acetato de sodio/etanol. Las muestras precipitadas recibirán 10ul de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems™) y fueron desnaturalizados a 96°C por 2 minutos seguido de choque térmico y por fin, llevadas al secuenciador ABI 3500 disponible en UNILA.

3.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

El programa DNAsp v.5 201 (LIBRADO & ROZAS, 2009) fue utilizado para identificación de los haplotipos mitocondriales, para el cálculo de la diversidad haplotípica (h), nucleótidos (π). El programa Network v.4.6.1.1 (Fluxus 211 Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>), para la construcción de la red haplotípica basados en algoritmos de unión media (BANDELT *et al.*, 1999). La construcción del dendrograma entre las secuencias de *D-Loop* de las diferentes muestras fue realizada por el programa MEGA v5.0 (TAMURA *et al.*, 2011) utilizando el método *Neighbor-Joining* con base en el modelo de sustitución nucleotídica K2P.

En el programa Arlequin v.3.5.1.3 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) fueron realizados análisis de diferenciación par a par por el índice Φ_{ST} (EXCOFFIER *et al.*, 1992), con significancia testada a partir de 10.000 permutaciones y también análisis AMOVA (Análisis de varianza molecular), estimando la partición de la variación genética dentro y entre poblaciones. A partir de AMOVA también fue calculada la diferencia genética global entre las muestras, utilizando el índice Φ_{ST} (EXCOFFIER *et al.*, 1992) con 10.000 perturbaciones.

La correlación entre diferenciación genética y la distancia geográfica fue testada a partir de la prueba de Mantel (MANTEL, 1967), comparando valores linealizados de Φ_{ST} con valores de distancia geográfica promedio entre microcuencas, usando el programa GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

4. RESULTADOS

4.1 DIVERSIDAD GENÉTICA

Como resultado de secuenciamiento parcial de la región *D-Loop* del ADN mitocondrial, fueron obtenidos fragmentos con 620 pares de bases. El análisis de los 83 especímenes, de las cinco microcuencas, revelo 79 sitios polimórficos y 37 haplotipos diferentes. Los índices de diversidad haplotípica (H_d) total fue de 0,959 y de la diversidad nucleotídica (π) de 0,0351. De una forma general, todas las Microcuencas presentan valores altos de diversidad genética para la región *D-Loop*. Los mayores valores fueron encontrados en la Microcuenca 3 ($H_d = 0,925$ $\pi = 0,0282$) y los valores menores fueron encontrados en la Microcuenca 4 ($H_d = 0,742$ $\pi = 0,0022$) (Tabla 2).

Tabla-2 - Índices de diversidad genética de *Ancistrus* sp. colectados en cinco microcuencas afluentes del río Paraná. **N**: número de individuos, **S**: sitios de segregación, **Nh** – número de haplotipos encontrados, **Hd** – diversidad haplotípica, π – diversidad nucleotídica.

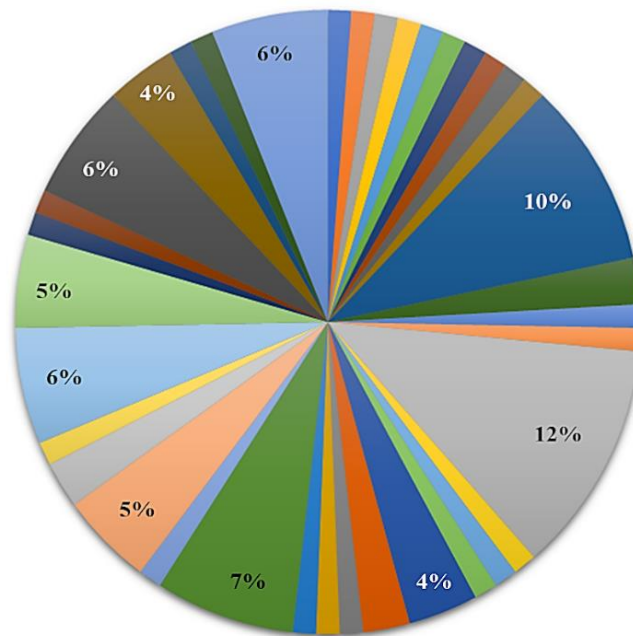
| <i>Ancistrus</i> sp. | | | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|
| | MB1 | MB2 | MB3 | MB4 | MB5 | Total |
| N | 17 | 16 | 16 | 20 | 14 | 83 |
| S | 47 | 37 | 35 | 9 | 12 | 79 |
| Nh | 8 | 10 | 10 | 8 | 6 | 37 |
| Hd | 0,868 | 0,917 | 0,925 | 0,742 | 0,769 | 0,959 |
| π | 0,0251 | 0,0248 | 0,0282 | 0,0022 | 0,0044 | 0,0351 |

Fuente: BELTRÁN, 2023.

El haplotipo 15 fue el más frecuente, estando presente en 10 individuos, seguido por los haplotipos H11 y H24, presentes en 8 y 6 individuos, respectivamente. Aproximadamente 65% de los haplotipos fueron singletons, esto quiere decir, que se presentó en apenas un individuo. De los 37 haplotipos apenas cuatro (H11, H33, H34 y H37) son compartidos por más de una microcuenca y de este solamente el H11 es encontrado en especímenes de microcuenca 1, 2 y 3, los otros tres haplotipos son compartidos apenas por individuos de la microcuenca 2 y 3. Las microcuencas 4 y 5 no tuvieron haplotipos compartidos entre otras microcuencas. La frecuencia de haplotipos por microcuencas vario de seis (Microcuenca 5) y diez (Microcuenca 2 y 3) (Figura 3 y Tabla 3).

Figura 3 - Frecuencias haplotipos en el conjunto total de datos.

Frecuencia de los haplotipos



- H1
- H2
- H3
- H4
- H5
- H6
- H7
- H8
- H9
- H10
- H11
- H12
- H13
- H14
- H15
- H16
- H17
- H18
- H19
- H20
- H21
- H22
- H23
- H24
- H25
- H26
- H27
- H28
- H29
- H30
- H31
- H32
- H33
- H34
- H35
- H36
- H37

Fuente: BELTRÁN, 2023.

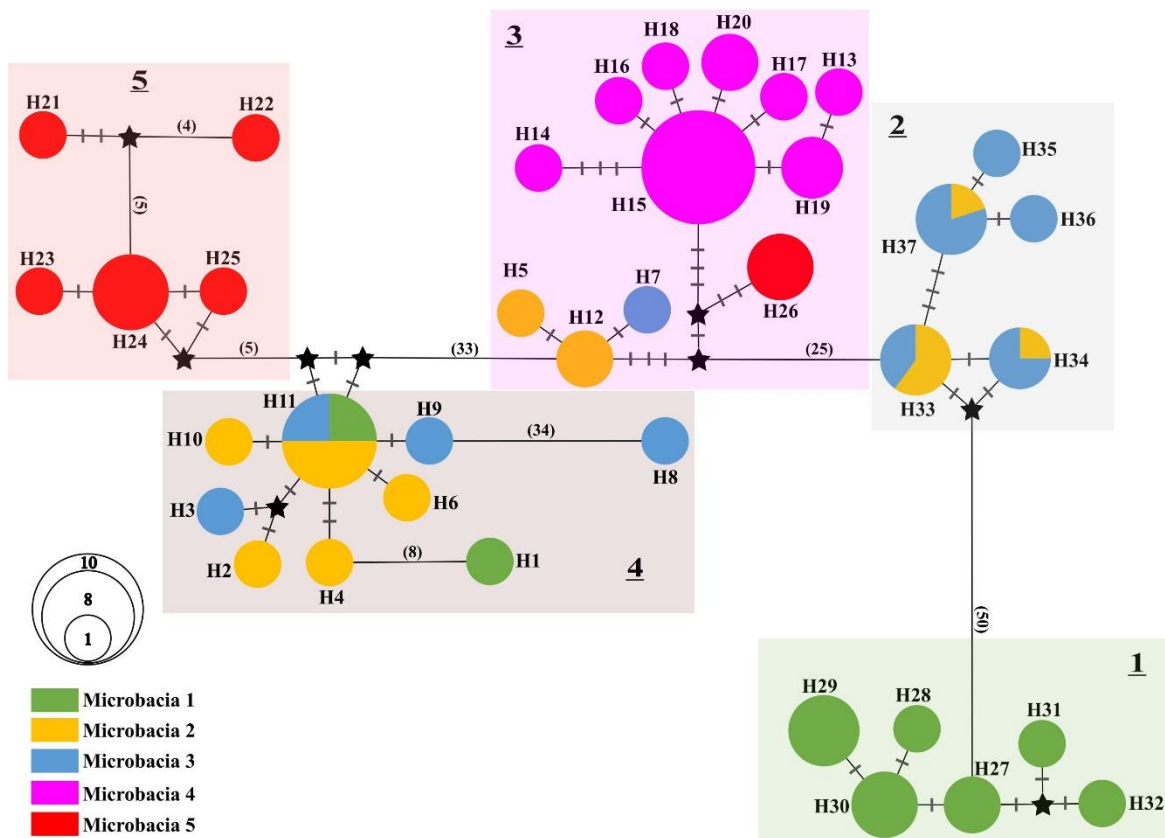
Tabla 3 - Distribución de los haplotipos de las muestras de *Ancistrus* sp. de las secciones muestreadas. La última columna informa el número total de haplotipos presentes en cada localidad.

| <i>Ancistrus</i> sp. | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Frecuencia Absoluta de Haplotipos | | | | | | | | | | | | | | |
| | M 1 | | | | M 2 | | | | M 3 | M 4 | | | M 5 | | |
| | P40 | P46 | P60 | P66 | P64 | P67 | P68 | P73 | P76 | P62 | P65 | P70 | P74 | P75 | P71 |
| H1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| H2 | | | | | | | 1 | | | 1 | | | | | |
| H3 | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| H4 | | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| H5 | | | | | | | | 1 | | | | | | | |
| H6 | | | | | | | 1 | | | | | | | | |
| H7 | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| H8 | | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| H9 | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| H10 | | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| H11 | 2 | | | | | 1 | 1 | 2 | | 2 | | | | | |
| H12 | | | | | 1 | | | | 1 | | | | | | |
| H13 | | | | | | | | | | | | 1 | | | |
| H14 | | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| H15 | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 2 | 6 | |
| H16 | | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| H17 | | | | | | | | | | | | | 1 | | |
| H18 | | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| H19 | | | | | | | | | | | | 3 | | | |
| H20 | | | | | | | | | | | | | | 2 | |
| H21 | | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| H22 | | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| H23 | | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| H24 | | | | | | | | | | | | | | 6 | |
| H25 | | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| H26 | | | | | | | | | | | | | | 4 | |
| H27 | | | 2 | | | | | | | | | | | | |
| H28 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| H29 | | | 4 | 1 | | | | | | | | | | | |
| H30 | 2 | | 2 | | | | | | | | | | | | |
| H31 | | | | 1 | | | | | | | | | | | |
| H32 | | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| H33 | | | | | | | | 3 | 2 | | | | | | |
| H34 | | | | | | | | 1 | 2 | | | | | | |
| H35 | | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| H36 | | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| H37 | | | | | | | | 1 | 4 | | | | | | |
| | 3 | 3 | 9 | 2 | 1 | 2 | 2 | 5 | 6 | 16 | 3 | 5 | 3 | 9 | 14 |

Fuente: BELTRÁN, 2023.

La red de haplotipos sugiere cinco linajes diferentes, variando de 5 a 50 mutaciones de distancia entre linajes (Figura 4). El linaje 1 muestra exclusivamente haplotipos de individuos colectados en puntos de la M1, de la misma manera el linaje 5 también presenta haplotipos de individuos de la M5. Cuanto a los linajes 2, 3 y 4 presentan una mezcla de las microcuencas. El linaje 2 con haplotipos de individuos de la M2 y M3, en el linaje 3 están todos los individuos de la M4 y también individuos de la M2, M3 y M5. Finalmente, el linaje 4 presenta haplotipos provenientes de individuos de la M1, M2 Y M3.

Figura 4- Red de haplotipos obtenida a partir del secuenciamiento parcial de la región *D-loop* (ADNmt) para *Ancistrus* sp. proveniente de diferentes puntos de colecta en cinco microcuencas afluentes del río Paraná. Cada círculo representa un haplotipo con tamaño proporcional a su frecuencia, los colores del círculo indican el punto de colecta donde fueron muestreados, las estrellas en negro representan posibles haplotipos intermediarios no muestreados, los pasos mutacionales esta descrito por número o representados por un trazo (hasta cuatro mutaciones), las manchas atrás de los haplotipos y el número subrayado indican los diferentes linajes haplotípica encontradas.



Fuente: BELTRÁN, 2023.

El dendrograma de las secuencias de *D-Loop* (Figura 5a, 5b y 5c y Figura Suplementar 1) apunta la formación de cinco grupos bien definidos, con baja distancia genética entre las muestras del mismo grupo. De un modo general, los resultados del dendrograma fueron bastante similares al de la

red haplotípica, así como en la red de haplotipos, el dendrograma también mostro la mezcla de haplotipos de individuos de diferentes microcuencas (M1, M2 y M3) y tres grupos constituidos apenas de haplotipos de individuos de una misma microcuenca (M1, M4 y M5). Sin embargo, en el grupo A del dendrograma se consideraron todos los haplotipos encontrados en M4 sin mezclas, a diferencia de lo sugerido por la red de haplotipos de M4 en el mismo linaje que los haplotipos M2, M3 y M5, pero es posible ver en la red que los haplotipos M4 se encuentren, de hecho, más cercanos.

El grupo B consideró todos los haplotipos encontrados en M5 como un solo grupo, mientras que, en la red de haplotipos, los individuos con el haplotipo H26 fueron posicionados en el linaje 3 y no en el linaje 5, que es donde estarían todos los haplotipos M5. El grupo C contiene todos los haplotipos del linaje 4 y también consideró los haplotipos H12, H5 y H7, que en la red de haplotipos están en el linaje 3. El grupo D concuerda completamente con el linaje 5 de la red de haplotipos. Y el grupo E también reunió los mismos haplotipos del linaje 2 de la red de haplotipos.

Figura 5a - Primeira parte do dendrograma de similaridade entre as sequências de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. coletados em diferentes arroyos de cinco microcuencas afluentes do rio Paraná 3. En la parte superior izquierda se encuentra la imagen del dendrograma completo, luego abajo la rede de haplotipos. Los colores de las letras indican las microcuencas de origen de la muestra y los cuadrados indican la parte del dendrograma en destaque.

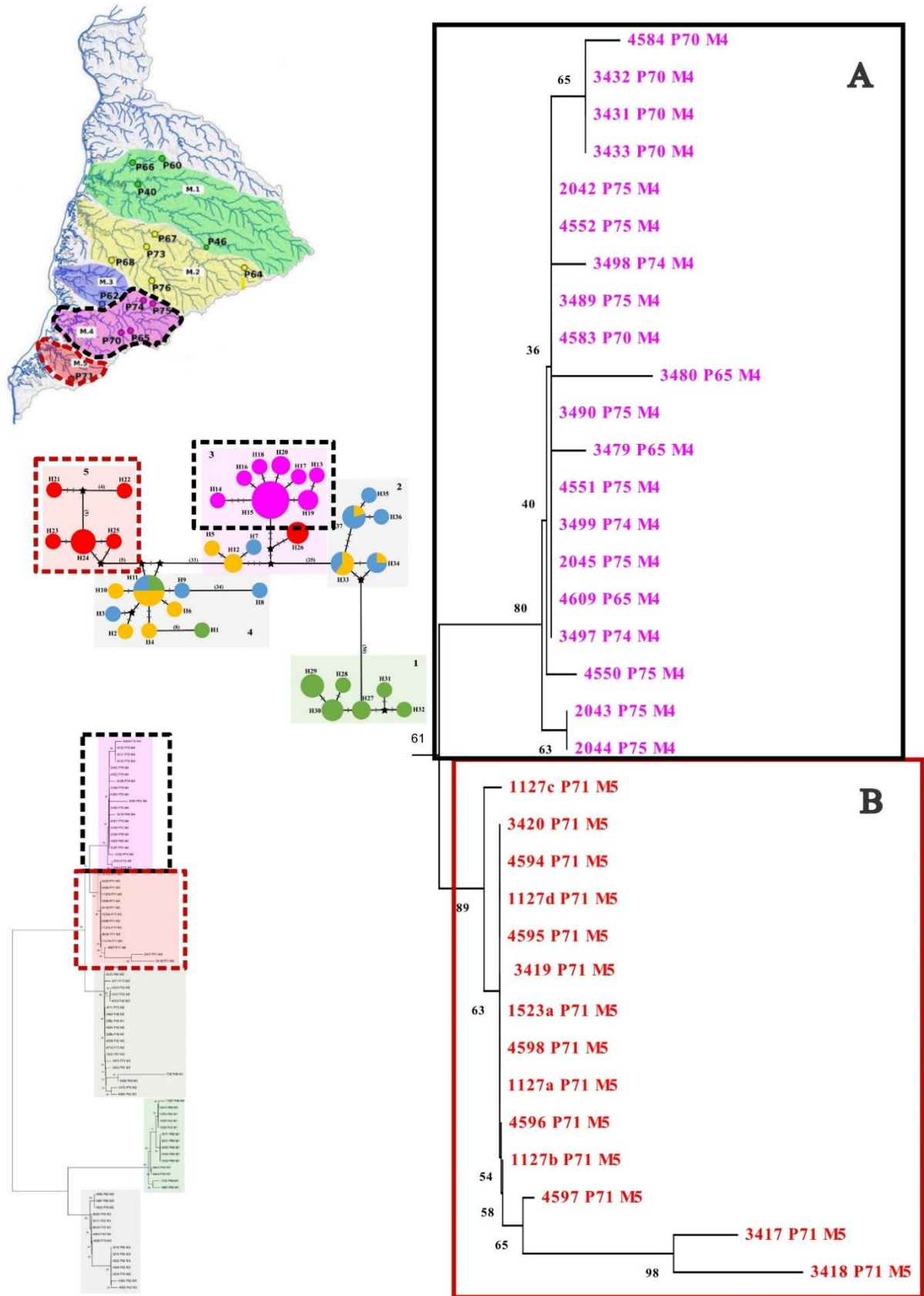


Figura 5b - Segunda parte del dendrograma de similaridad entre las secuencias de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. colectados en diferentes arroyos de cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3. En la parte superior izquierda se encuentra la imagen del dendrograma completo, luego abajo la red de haplótipos. Los colores de las letras indican las microcuencas de origen de la muestra y los cuadrados indican la parte del dendrograma en destaque.

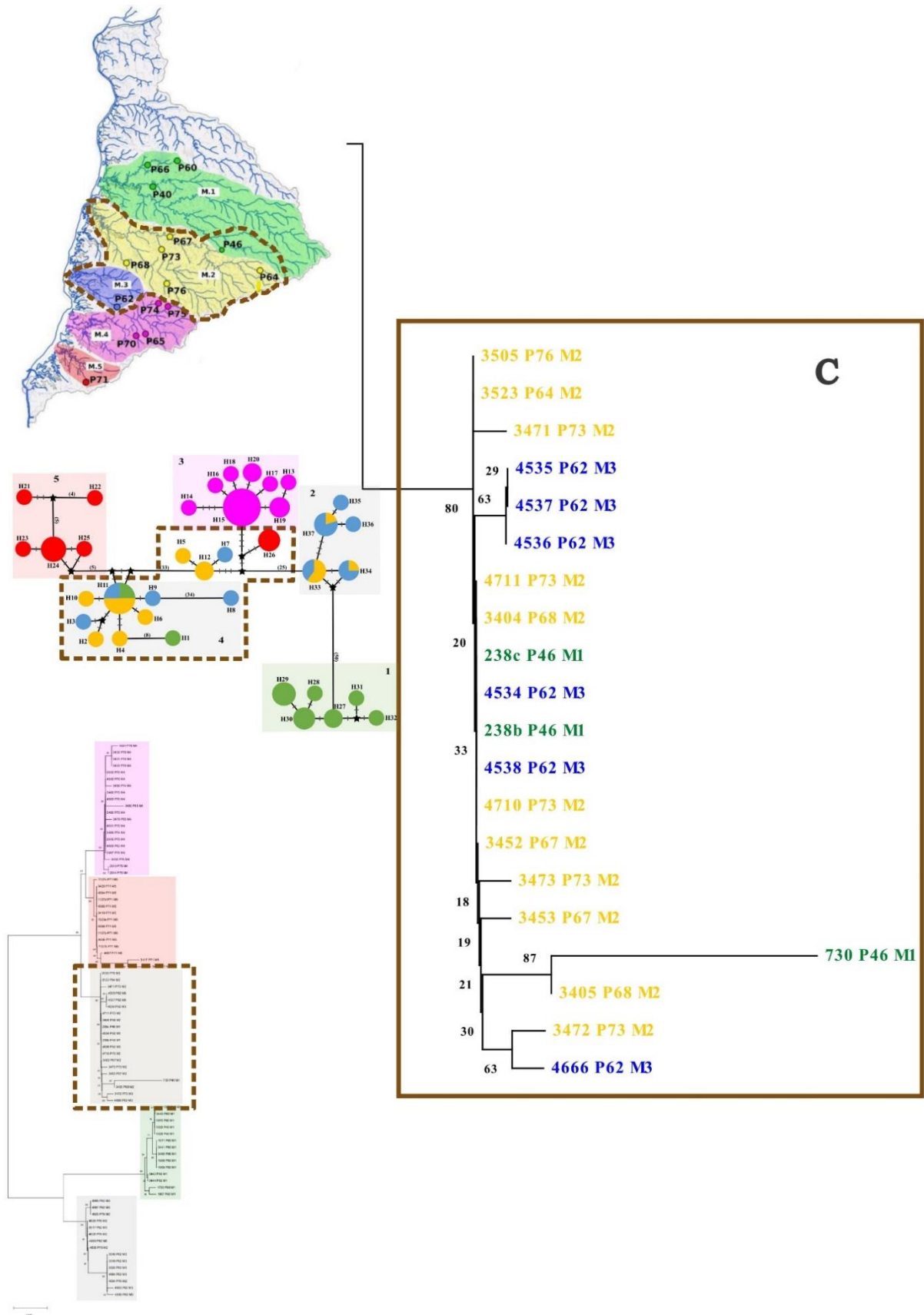
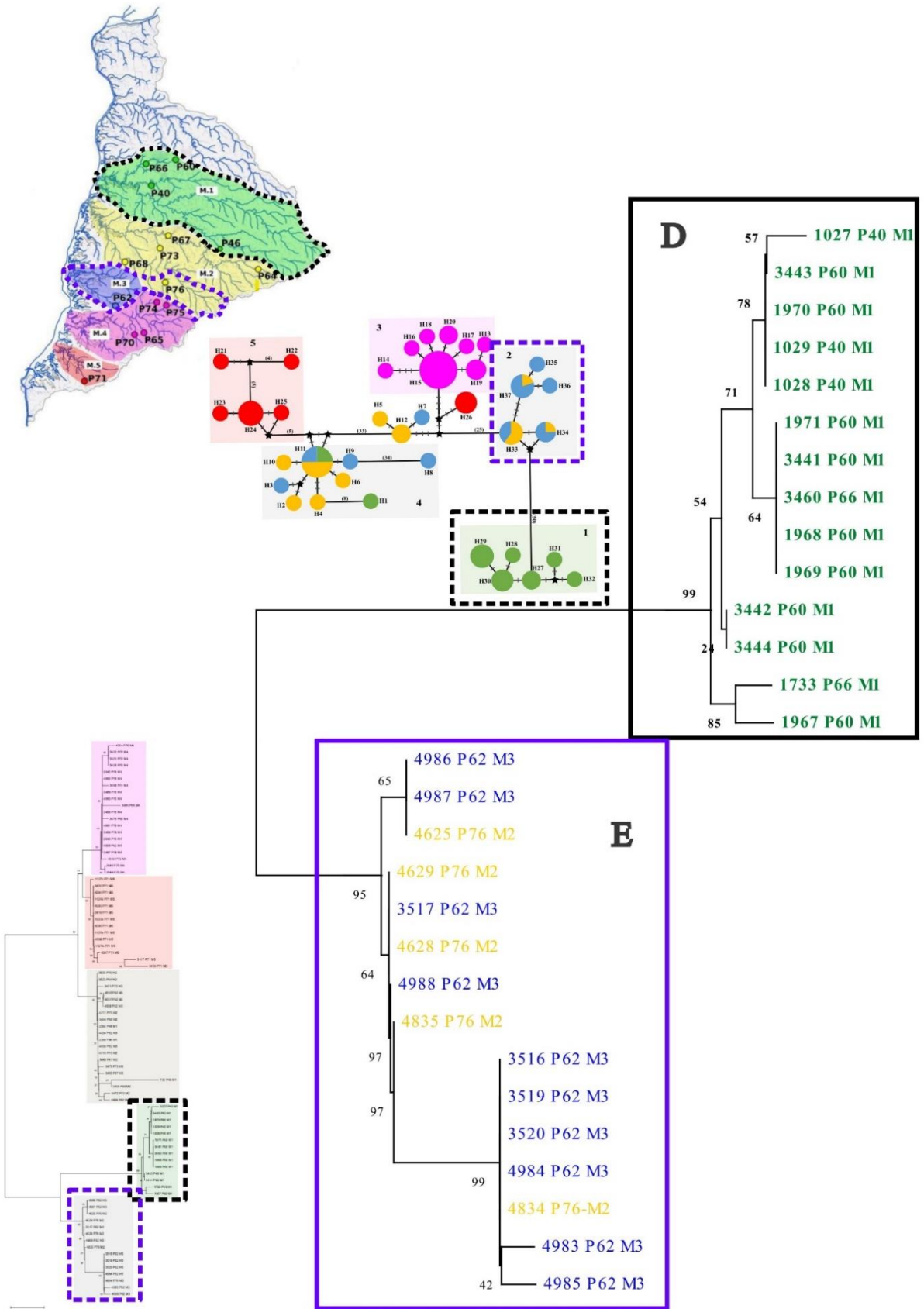


Figura 5c – Tercera parte del dendrograma de similaridad entre las secuencias de *D-Loop* de *Ancistrus* sp. colectados en diferentes arroyos de cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3. En la parte superior izquierda se encuentra la imagen del dendrograma completo, luego abajo la red de haplótipos. Los colores de las letras indican las microcuencas de origen de la muestra y los cuadrados indican la parte de dendrograma en destaque.



4.2 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

El índice de diferenciación (Φ_{ST}) par a par, fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para todas las comparaciones entre las microcuencas, con excepción de M2 x M3. De modo general, los valores de diferenciación genética fueron altos y varían de 0,219 (M2 x M5) a 0,751 (M1 x M4) (Tabla 4).

Tabla-4 - Diferencia genética par a par entre las poblaciones de *Ancistrus* sp. en las microcuencas afluentes de la cuenca del río Paraná 3, obtenidas a partir del marcador *D-Loop* del ADNmt. Φ_{ST} - parámetros basados en las estadísticas F de Wright.

| <i>Ancistrus</i> sp. | | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | M1 | M2 | M3 | M4 |
| M1 | | | | |
| M2 | 0,544* | | | |
| M3 | 0,489* | 0,084 | | |
| M4 | 0,751* | 0,511* | 0,516* | |
| M5 | 0,677* | 0,219* | 0,413* | 0,739* |

*Valor significativo ($p < 0,05$).

Fuente: BELTRÁN, 2023.

El primer agrupamiento testado en AMOVA, considero todas las microcuencas como un único agrupamiento. El AMOVA mostró que la mayor parte de la variación molecular ocurriendo entre poblaciones (microcuencas) (53,29% de la variación), por lo tanto, la variación dentro de poblaciones (microcuencas) también fue considerable. En este agrupamiento, los índices de fijación obtenidos entre poblaciones ($\Phi_{SC} = 0.533$) fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabla 5).

En el caso del segundo agrupamiento testado en AMOVA, que considero cuatro subagrupamientos (Grupo 1: M1; Grupo 2: M2 y M3; Grupo 3: M4; Grupo 4: M5) donde los puntos de la M2 y M3 fueron agrupados por no presentar diferenciación significativa en Φ_{ST} par a par. La mayor parte de la variación molecular ocurre entre los grupos (48,45% de la variación), más nuevamente una considerable variación fue encontrada dentro de poblaciones (44,52%). Para los índices de fijación, fue obtenido un valor estadísticamente significativo ($p < 0,05$) solamente para el Φ_{ST} (0,136) (Tabla 6).

Tabla-5 - Análisis de variancia molecular (AMOVA) para *Ancistrus* sp. colectados en cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3, a partir del marcador *D-Loop*. Considerando todas las muestras como un único grupo.

| <i>Ancistrus</i> sp. | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Fuente de variación | <i>D-Loop</i> |
| Entre microcuencas | 53,29% |
| Dentro de microcuencas | 46,71% |
| Índice de fijación global | Φ_{ST}: 0,533* |

*Valor significativo ($p < 0,05$).

Fuente: BELTRÁN, 2023.

Tabla-6 - Análisis de variancia molecular (AMOVA) para *Ancistrus* sp. colectados en cinco microcuencas afluentes del río Paraná 3, a partir del marcador *D-Loop*. Considerando 4 grupos: Grupo 1: M1; Grupo 2: M2 y M3; Grupo 3: M4; Grupo 4: M5.

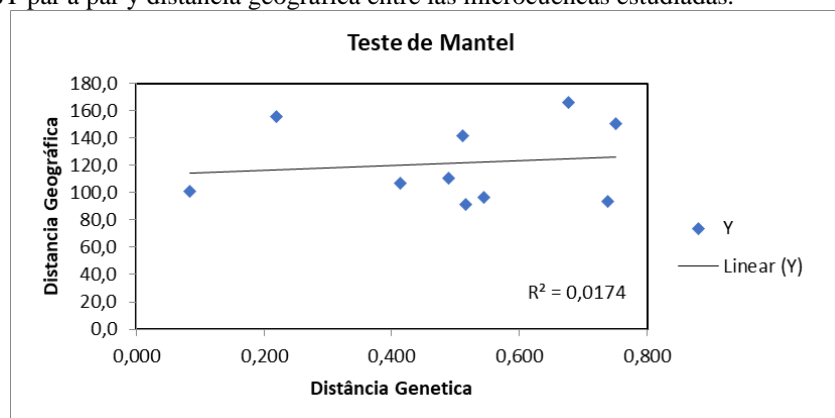
| <i>Ancistrus</i> sp. | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Fuente de variación | <i>D-Loop</i> |
| Entre grupos | 48,45% |
| Entre microcuencas dentro de grupos | 7,03% |
| Dentro de microcuencas | 44,52% |
| Índice de fijación global | Φ_{ST}: 0,136* |
| | Φ_{SC}: 0,555 |
| | Φ_{CT}: 0,485 |

*Valor significativo ($p < 0,05$).

Fuente: BELTRÁN, 2023.

En el análisis de Mantel no se encontró una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica entre las cuencas hidrográficas (Figura 6).

Figura 6 – Test de Mantel para las poblaciones *Ancistrus* sp. para verificar correlaciones entre distancia genética, obtenidas a partir de Φ_{ST} par a par y distancia geográfica entre las microcuencas estudiadas.



*Valor significativo ($p < 0,01$).

Fuente: BELTRÁN, 2023.

5.DISCUSIONES

5.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

A partir de los resultados encontrados es posible observar que las microcuencas 1, 2 y 3 presentan alta diversidad haplotípica ($> 0,5$) combinada con alta diversidad nucleotídica ($> 0,5\%$), que según la hipótesis desarrollada por Grant y Bowen (1998), pueden indicar que se trate de poblaciones grandes y estables o que se trate de poblaciones que pasaron por un contacto secundario reciente (evolutivamente), es decir, poblaciones antes aisladas se mezclaron debido algún evento y por eso presentan una alta variabilidad de haplotipos y mutaciones. Ya las microcuencas 4 y 5 presentan una combinación de alta diversidad haplotípica ($> 0,5$) combinada con baja diversidad nucleotídica ($< 0,5\%$), que sugiere que esas poblaciones pudieron haber pasado por eventos de cuello de botella recientemente seguido de un rápido crecimiento poblacional con acumulo de mutaciones.

Otros estudios de genética poblacional realizados en la región del reservatorio de Itaipu, también encontraron alto nivel de diversidad genética para las especies de arroyos *Heptapterus mustelinus* ($Hd = 0,813$; $\pi = 0,105$) (HUATATOCA, 2017), *Bryconamericus aff. iheringii* ($Hd = 0,880$; $\pi = 0,01633$) (OLIVEIRA, 2021).

La red de haplotipos muestra una mezcla de linajes haplotípica dentro de las microcuencas M1, M2 y M3, y al mismo tiempo muestra la no mezcla de las microcuencas M4 y M5, a pesar de que individuos de la M5 presentan un haplotipo que, según la red de haplotipos, pertenece al linaje 3, en la M5 ocurre solamente haplotipos del linaje cinco. Esos resultados refuerzan la hipótesis de que M1, M2 y M3 hallan pasado por un evento de contacto secundario.

El haplotipo 11, el segundo más frecuente, está presente en los puntos P46 (M1), P63, P68 y P73 (M2) y P62 (M3). Al observar la posición de esos puntos de la colecta en el mapa puede sugerirse que en el caso de P46 y los puntos de M2 parece posible que el compartimiento de esos haplotipos se debe o a una captura de cabecera o, una opción más parsimoniosa, que esa mezcla ocurrió durante el llenado del Embalse de Itaipu. Pues, el P46 se encuentra en una naciente con poca distancia geográfica (menos de 2 km) de un brazo del arroyo en el cual se encuentran los puntos P67 y P73, por lo tanto, el henchimiento habría permitido un flujo lateral más fácil entre esas microcuencas. De la misma manera el punto P62 también tiene estos haplotipos, pero este es un punto que está más distante geográficamente de los puntos, P63, P68 y P73, lo que refuerza la hipótesis de mezcla de linajes debido al llenado del Embalse de Itaipu. El dendrograma generado corrobora con esa mistura, indicando que individuos de puntos diferentes estarían más próximos.

Considerando los valores de diversidad genética encontrados y la posición de red de haplotipos hace sentido que los niveles de diversidad genética de M1, M2 y M3 sean reflejo de un contacto secundario. Al estudiar poblaciones de *Heptapterus mustelinus* en la región del Embalse de Itaipu, Huatatocha (2017) también encontró una mezcla de linajes entre diferentes microcuencas, en cuanto Oliveira, (2021) no encontró esa mistura de linajes para poblaciones de *Bryconamericus aff. iheringii* de arroyos del entorno del Embalse. Por ende, *Ancistrus sp.* y *Heptapterus mustelinus* son especies pertenecientes a grupos de peces que realizan poco o ningún desplazamiento durante la vida (CHIACHIO *et al.*, 2008; ALBRECHT, 2012) en contraste con *Bryconamericus* se dice que realiza desplazamientos cortos (BRITTO *et al.*, 2003), tal vez esa diferencia en el comportamiento sea lo que haga acentuar la estructuración genética y la tornar perceptible al evento de contacto secundario.

5.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Los resultados de Φ_{ST} y AMOVA mostraron una alta estructuración genética para el marcador *D-Loop* entre las microcuencas, resultados similares son reportados para otras especies de arroyos neotropicales. Altos valores de Φ_{ST} (0,054 a 0,992) fue reportado para poblaciones de *Hypostomus ancistroides* en arroyos de Alto Río Paraná (APOLINARIO-SILVA, 2021). Tal como región del presente estudio *Hypostomus ancistroides* que es un siluriforme y presenta comportamiento de bajo desplazamiento (ZAWADZKI *et al.*, 2005; SOFIA *et al.*, 2008). Ferreira *et al* (2015) estudio *Geophagus brasiliensi*, una especie de ciclídeo que posee en común con *Ancistrus* el comportamiento de cuidado parental y bajo desplazamiento (KULLANDER, 2003), también encontró altos valores de Φ_{ST} entre puntos del río con relación al punto del arroyo afluente (0,070 a 0,202) en un arroyo del Alto Río Paraná. Más específicamente en la región de Embalse de Itaipu altos niveles de estructuración genética también fueron encontradas entre las poblaciones de diferentes microcuencas para *Heptapterus mustelinus* (0,01 a 1) (HUATATOCHA, 2017) y *Bryconamericus aff. iheringii* (0,542) (OLIVEIRA, 2021).

Durante los últimos años, ya es bien establecido que a formación ramificada típica de cuencas hidrográficas neotropicales contribuye al aislamiento de poblaciones de especies acuáticas (KELSON *et al.*, 2015), de la misma manera que el comportamiento de baja desplazación de peces de arroyos también contribuye para aumentar la estructuración genética entre poblaciones (CASTRO, 199; ZAWADZKI *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2015; APOLINÁRIO-SILVA *et al.*, 2021). Aún existen pocos estudios que apunten a entender cómo los grandes drenajes y Embalses, que además de ser grandes son ambientes muy lóticos, también inciden en la reducción o bloqueo total del flujo de genes entre poblaciones de peces de una misma especie. Sin embargo, los trabajos muestran esta influencia

para los organismos terrestres y las aves (GALINDO *et al.*, 2006; RIGINOS *et al.*, 2013), por lo que es plausible que lo mismo ocurra dentro del medio acuático.

Por lo tanto, los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que el río funcionaría como una importante barrera para el flujo de genes entre poblaciones, expandiendo su estructura genética. Por lo tanto, fue encontrado que la distancia geográfica entre dos puntos de diferentes microcuencas es menor vía río (ex.: P62 x P68 = 84,3 km; P62 x P76 = 105,7 km), de que entre dos puntos dentro de la misma microcuenca (ex.: P68 x P64 = 107 km; P76 x P64 = 111 km), principalmente en las microcuencas grandes, que engloban São Francisco Falso y Verdadero. Posteriormente, si la distancia geográfica fuera el único factor que influye en la estructuración, los peces de puntos más cercanos, incluso si son de diferentes microcuencas, serían más similares genéticamente que los peces que se encuentran dentro de las mismas microcuencas, pero entre puntos geográficamente más lejanos.

Corroborando esta hipótesis, El test del Mantel no fue significativa, indicando que, si bien existe una fuerte estructura entre las cuencas, esto no ocurriría debido a la distancia geográfica. Además, este resultado refuerza la idea de que algún evento permitió el flujo de genes entre las poblaciones de la microcuenca por un camino diferente al canal principal. Nuevamente, considerando el área de estudio, es muy probable que esta mezcla haya ocurrido durante el período de llenado del Embalse.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que existe una alta diversidad genética y alta estructuración entre las poblaciones de *Ancistrus* sp. de las diferentes microcuencas de la BP3, corroborando nuestra hipótesis inicial para peces de arroyos. Nuestro trabajo confirma también la hipótesis de que grandes ríos actúan como barrera efectiva en la estructuración de especies de arroyos dado que las microcuencas analizadas se conectan por el río Paraná (hoy, en el trecho sustituido por la Barraje de Itaipu). Por otro lado, el presente trabajo también mostro que la alteración hidrológica causada por la construcción y llenado del lago de Itaipu, puede ser el responsable por el contacto secundario observado entre algunas de las microcuencas, evidenciando el impacto de tales obras.

Por fin, los resultados encontrados son un paso importante para dilucidar una cuestión aún hoy poco estudiada: cómo y en qué medida un gran río y embalses pueden influir en la estructura genética de las poblaciones de peces que habitan en los afluentes de estos drenajes.

10. REFERENCIAS

- AGOSTINHO, A. A., A. E. A. M. VAZZOLER, L. C. GOMES & E. K. OKADA. Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus lineatus* em distintas fases del ciclo de vida, em la vida, em la planície de inundación del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. *Revue D'Hydrobiologie Tropicale*, 26(1): 7990, 1993.
- AGOSTINHO, A. A., JÚLIO JÚNIOR, 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, 2018b.
- AGOSTINHO, A. A., THOMAZ, S. M., MINTE-VERA, C. V., & WINEMILLER, K. O. **Biodiversity in the high Paraná River floodplain**, 2018a.
- 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, p. 281-319, 1999.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliações e perspectivas. In: **NOGUEIRA, M.G., HENRY, R., JORCIN, A. (eds.) Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ação de manejo e sistemas em cascata**. Rima, São Carlos. p. 23 - 56, 2005.
- AGUAYO, F. V. V. **Análisis de la variabilidad genética, conectividad y persistencia del género Percilia en las cuencas de los ríos Biobío e Itata: conocimiento genético para la conservación en la gestión ambiental de Chile**. 2021. Tesis (Doctorado en Ciencias Ambientales mención Sistemas Acuáticos – Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción, Concepción.
- 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., LEARY, R. F., SPRUELL, P., & WENBURG, J. K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.
- ALLENDORF, F. W., LUIKART, G. & AITKEN, S. N. **Conservation and the Genetics of Populations**, 2 Ed. Chichester: Wiley-Blackwell Publishing, 2013. ARMBRUSTER, J. W.; LUJAN, N. K. A new species of Peckoltia from the Upper Orinoco (Siluriformes, Loricariidae). **ZooKeys**, v. 569, p. 105–121, 2016.
- APOLINÁRIO-SILVA, C.; GALINDO, B. A.; NASCIMENTO, R. H. C.; FRANTINE-SILVA, W.; KOTELOK-DINIZ, T.; SOFIA, S. H.; FERREIRA, D. G. (2021). Fine-scale genetic structure of suckermouth *Hypostomus ancistroides* populations: the importance of Neotropical streams for fish conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, 2021.
- ARMBRUSTER, JW. Phylogenetic relationships of the sucker- mouth armoured catfishes Loricariidae with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological journal of the linnean society**, v. 141, n. 1, p. 1-80, May. 2004.

- BANDEL, H. J., FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, 16, 37-48, 1999.
- BARNES, R.S.K. **Coastal lagoons: the natural history of a neglected habitat**. Cambridge: Cambridge University Press, 1980.
- BARROSO, C. X., LOTUFO, T. M. C. & MATTHEWS-CASCON, H. Biogeography of Brazilian prosobranch gastropods and their Atlantic relationships. **Journal of Biogeography**. 43, 2477–2488, 2016.
- BARTÁKOVÁ, V., REICHARD, M., BLAŽEK, R., POLAČIK, M., & BRYJA, J. Terrestrial fishes: rivers are barriers to gene flow in annual fishes from the African savanna. *Journal of Biogeography*, v. 42, n. 10, p. 1832-1844, 2015.
- BÁRTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G. H.; *et al.* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture**, v. 219, n. 1-4, p. 157–167, 2003.
- BERTIN, A. *et al.* Genetic variation of loci potentially under selection confounds species-genetic diversity correlations in a fragmented habitat. **Molecular Ecology**, v. 26, p. 431–443, 2017.
- BIGNOTTO, T. S., *et al.* Genetic evidence for a species complex within the piranha *Serrasalmus maculatus* (Characiformes, Serrasalminidae) from three Neotropical river basins based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2020.
- BLAZEK, R., POLACIK, M., REICHARD, M. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. **Evodevo** v. 4, n. 24, Sep. 2013.
- BRINKER, A.; BEHRMANN-GODEL J., BASEN, T.; *et al.* River damming drives population fragmentation and habitat loss of the threatened Danube streber (*Zingel streber*): Implications for conservation. **Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 28, n. 3 p. 587–599, 2018.
- BRITTO, M. R. Phylogeny of the subfamily Corydoradinae Hoedeman, 1952 (Siluriformes: Callichthyidae), with a definition of its genera. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 153, p. 119-154, 2003.
- BURGUESS, W. E. **An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes, A Preliminary Survey of the Siluriformes**. New Jersey: Tfh Publications Inc, 1989.
- CAROLSFELD, J. Evolução da Questão de Passagens para Peixes: Similaridades entre o Canadá e o Brasil. In: Projeto peixes, pessoas e águas. Mecanismos de Transposição de Peixes Brasileiros. World Fisheries Trust, 2004.
- CARVALHO, G. R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology**, v. 43, n. Supplement A, p. 53-73, 1993.
- 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.)**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, PPGE UFRJ. Rio de Janeiro, p. 139-155, 1999.

CHANCHAY, J. R. C. Estrutura genética do dourado (*Salminus brasiliensis*) na área de influência da Itaipu binacional. Dissertação de mestrado apresentada no 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 (UNILA), Foz do Iguaçu, 2019.

CHIACHIO, M. C.; OLIVEIRA, C. & MONTOYA-BURGOS, J. I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 606–617, 2008.

CUNICO, A. M.; AGOSTINHO, A. A. & LATINI, J. D. Influência da urbanização sobre as assembléias de peixes em três córregos de Maringá, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1101-1110, 2006.

CURRIE, D. J. *et al.* Predictions and tests of climate-based hypotheses of broad-scale variation in taxonomic richness. **Ecology Letters**, v. 7, p. 1121–1134, 2004.

DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L. R.; 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.

DENİZ, M., TANRIKUL, T. T., KARADAL, O., DİNÇTÜRK, E., & KARADUMAN, F. R. (2020). A preliminary study on reproduction and development of bushymouth catfish (*Ancistrus dolichopterus*) in aquarium conditions. **Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research**, v. 6, n. 3, p. 231-237, 2020.

DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O., *et al.* La Biodiversidad en Michoacán. **Diversidad Genética**, v. 3, p. 19-29, 2020.

DUDGEON, D. *et al.* Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163-182, 2006.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ESCHMEYER, W. N. **Catalog of fishes**. Electronic publication in “World Wide Web”. Disponible en: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acessado em: 9 de mayo, 2023.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, A.; SCHENEIDER, S. Arlequin ver 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1, 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131, 479-491, 1992.

- FERGUSON, MOIRA & DANZMANN, ROY. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: Useful tools or stamp collecting? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 1553-1563, 2011.
- FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1-628, 2007.
- FERREIRA, D. G.; GALINDO, B. A.; FRANTINE-SILVA, W.; ALMEIDA, F. S.; SOFIA, S. H. Genetic structure of a neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. **Conservation Genetics**, v. 16, p. 1- 16, 2015.
- FERREIRA, D. G.; LIMA, S. C.; FRANTINE-SILVA, W.; SILVA, J. F.; APOLINÁRIO-SILVA, C.; SOFIA, S. H.; CARVALHO, S.; GALINDO, B. A. Fine-scale genetic structure patterns in two freshwater fish species, *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae) and *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) throughout a Neotropical stream. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016.
- FINE, P. V. A. Ecological and evolutionary drivers of geographic variation in species diversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 46, p. 369–392, 2015.
- FISCH-MULLER, S. Subfamily Ancistrinae (Armored catfishes). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. **Edipucrs**, p. 373-400, 2003.
- FLOETER, S. R. et al. Atlantic reef fish biogeography and evolution. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 1, p. 22-47, 2008.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, n. 2, p. 131–140, Nov. 2005.
- FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; RALLS, K., *et al.* **Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations**. Oxford: Oxford University Press, 2017.
- FRASER, C.I., KAY, G.M., PLESSIS, M.D. AND RYAN, P.G. Breaking down the barrier: dispersal across the Antarctic Polar Front. **Ecography**, 40: 235-237. <https://doi.org/10.1111/ecog.02449>.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, Referencias. 2022. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acessado em abril. 2023

GALINDO, B. A., FERREIRA, D. G.; APOLINÁRIO-SILVA, C.; *et al.* Genetic diversity and population structure of *Brycon nattereri* (Characiformes: Bryconidae): a Neotropical fish under threat of extinction. **Neotropical Ichthyology**, v. 17, n. 1, 2019.

GALINDO, H. M., OLSON, D. B., & PALUMBI, S. R. Seascape Genetics: A Coupled Oceanographic-Genetic Model Predicts Population Structure of Caribbean Corals. **Current Biology**, 16(16), 1622–1626. doi:10.1016/j.cub.2006.06.052, 2006.

GEERINCKX, T.; HERREL, A.; ADRIAENS, D. Suckermouth armored catfish resolve the paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of *Pterygoplichthys disjunctivus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 315, n. 3, p. 121-131, 2011.

GHIgliOTTI, L.; NEAR, T. J.; FERRANDO, S.; VACCHI, M.; PISANO, E. Cytogenetic diversity in the *Antarctic plunderfishes* (Notothenioidei: Artedidraconidae). **Antarctic Science**, v. 22, n. 6, p. 805–814, 2010.

GHISI, N. C., *et al.* Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapó River, southern Brazil. **Chemosphere**, v. 161, p. 69–79, 2016.

GIACHINI TOSETTO, Everton *et al.* The Amazon River plume, a barrier to animal dispersal in the Western Tropical Atlantic. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 537, 2022.

GOMES, L. C. & A. A. AGOSTINHO. Influence of the flooding regime on the nutritional state and juvenile recruitment of the curimba, *Prochilodus lineatus* Steindachner, in the Upper Paraná River, Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, 4(4): 263-274, 1997.

GROSBURG, R. K., VERMEIJ, G. J. & WAINWRIGHT, P. C. Biodiversity in water and on land. **Current Biology**, v. 22, n. 21, p. 900–903, 2012.

HANSKI, I. Habitat Loss, the Dynamics of Biodiversity, and a Perspective on Conservation. **AMBIO**, v. 40, n. 3, p. 248–255, Mar. 2011.

HILSDORF, A. W. S; HALLERMAN, E. M. Characterization of Genetic Resources. *In: Genetic Resources of Neotropical Fishes*. Springer, Cham, p. 55-117, 2017.

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

HUGHES, A. R. *et al.* Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology letters**, v. 11, n. 6, p. 609-623, 2008.

INSTITUTO DAS AGUAS DO PARANÁ. **Características Gerais da Bacia**. Disponible en: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=239>. Acceso en: 05 de mayo de 2023.

ITAIPU. **Canal da Piracema. Itaipu Binacional**. Disponible en: <https://www.itaipu.gov.br/print/272>. Acceso el: 6 de junio del 2023.

- KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- KELSON, S. J.; KAPUSCINSKI, A. R.; TIMMINS, D.; ARDREN, W. R. Fine-scale genetic structure of brook trout in a dendritic stream network. **Conservation Genetics**, v. 16, n.1, p. 31-42, 2015.
- KOVALENKO, K. E., THOMAZ, S. M. & WARFE, D. M. Habitat complexity: approaches and future directions. **Hydrobiologia**, v. 685, p. 1–17, 2012.
- KULLANDER, S. O. Family Cichlidae (Cichlids). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (eds) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 605–654, 2003.
- LABONNE, J., RAVIGNÉ, V., PARISI, B. & GAUCHEREL, C. Linking dendritic network structures to population demogenetics: the downside of connectivity. **Oikos**, v. 117, p. 1479–1490, 2008.
- 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.
- LIBRADO, P., & ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25, 1451-1452, 2009.
- LUIZ, O. J. *et al.* Ecological traits influencing range expansion across large oceanic dispersal barriers: insights from tropical Atlantic reef fishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1730, p. 1033-1040, 2012.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed., **Porto Alegre: Artmed**, 2010.
- MALMQVIST, B. & RUNDLE, S. Threats to the running water ecosystems of the world. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 2, p. 134-153, Aug. 2002.
- MANEL, S.; GUERIN, PE.; MOUILLOT, D.; *et al.* Global determinants of freshwater and marine fish genetic diversity. **Nature Communications** v. 11, n. 692, p. 1-9, Feb. 2020.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, CS.; BERTOLLO, LAC.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4 p. 595–600, 2009.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, MR.; ARTONI, RF.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus Kner*, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 4, p. 289-300, 2011.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, 27 (2 Part 1), 209-220, 1967.

- MELDGAARD, T., NIELSEN, E. E., LOESCHCKE, V. Fragmentation by weirs in a riverine system: A study of genetic variation in time and space among populations of *European grayling* (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 735–747, 2003.
- MEYER, J. L. *et al.* The Contribution of Headwater Streams to Biodiversity in River Networks. **Journal of the American Water Resources Association (JAWRA)**, v. 43, n. 1, p. 86–103, 2007.
- MITTELBAACH, G. G.; *et al.* Evolution and the latitudinal diversity gradient: speciation, extinction and biogeography. **Ecology Letters**, v. 10, p. 315–331, 2007.
- NEUHAUS, E. B.; BRITTO, M.; BIRINDELLI, J. L. O.; SOUSA, L. M. A new species of *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from Tapajós and Xingu basins, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, n. 1, 2022.
- NIRCHIO, M., *et al.* Occurrence of Sex Chromosomes in Fish of the Genus *Ancistrus* with a New Description of Multiple Sex Chromosomes in the Ecuadorian Endemic *Ancistrus clementinae* (Loricariidae). **Genes**, v. 14, n. 2, p. 1–13, Jan. 2023.
- NUNES, A. G. **Estruturação genética populacional de *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) na Bacia do Alto Paraná.** Tese de doutorado (Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2016.
- OLIVEIRA, C, F.; FORESTI Y A. W. S. HILSDORF. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 81–100, 2009.
- OLIVEIRA, J. A. *et al.* Secuencias del gen mitocondrial para identificación de especies de animales. **Rev. Colombiana cienc. Anim.**, 396–407, 2013.
- OLIVEIRA, R. R. **Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica.** Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) - Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas, 2006.
- OLIVEIRA, RR.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, MB.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosomes heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 301–306, Sep. 2007.
- OLIVEIRA, RR.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, MB.; ZUANON, J. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 9, p. 2209–2225, 2009.
- PAZ-VINAS, I. & BLANCHET, S. Dendritic connectivity shapes spatial patterns of genetic diversity: a simulation-based study. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 28, p. 986–994, 2015.
- PEAKALL, R. O. D., & SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic

software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6(1), 288-295, 2006.

PEARMAN, P. B.; GARNER, T. W. J. Susceptibility of Italian agile frog populations to an emerging strain of Ranavirus parallels population genetic diversity. **Ecology Letters**, v. 8, n. 4, p. 401–408, 2005.

PEREIRA, M. C. B. & SCROCCARO, J. L. **Bacias hidrográficas do Paraná. Série histórica**. Curitiba: SEMA, 2010.

POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI JR. E.; GOMES, P. C.; & LOPES, T. S. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 1, p. 5-15, 2008.

PROVENZANO R., F., & BARRIGA-SALAZAR, R. Species of *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) from Ecuador, with the description of a new species from the Amazon River Basin. **Zootaxa**, v. 4527, n. 2, p. 211-238, Dec. 2018.

REED, D. H., & FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation biology**, v. 17, n. 1, p. 230-237, 2003.

REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. S. **Phylogeny and Classification**

RICHARDSON, J. S. Biological Diversity in Headwater Streams. **Water**, v. 11, n. 2, p. 366, 2019.

RIGINOS, C., & LIGGINS, L. Seascape Genetics: Populations, Individuals, and Genes Marooned and Adrift. **Geography Compass**, v.7, n. 3, p. 197–216, 2013.

ROBERTS, J. H., ANGERMEIER, P. L., HALLERMAN, E. M. Distance, dams and drift: What structures populations of an endangered, benthic stream fish? **Freshwater Biology**, v. 58, p. 2050–2064, 2013.

ROBERTS, J. H., ANGERMEIER, P. L., HALLERMAN, E. M. Distance, dams and drift: What structures populations of an endangered, benthic stream fish? **Freshwater Biology**, v. 58, p. 2050–2064, 2013.

ROCHA, L. A. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. **Journal of Biogeography**. v. 30, n. 8, p. 1161-1171, 2003.

ROUSSET, F. Genetic differentiation between individuals. **Journal of Evolutionary Biology**, pp. 58–62, 2000.

SABAJ, M. H.; ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with comments on the evolution of the snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 10, p. 217–229, 1999.

SAENZ-AGUDELO, S.; JONES, G. P.; THORROLD, S. R. AND PLANES, S. Connectivity dominates larval replenishment in a coastal reef fish metapopulation. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, pp. 2954–2961, 2011.

SANCHEZ., T. Reconstructing our past: deep learning for population genetics. *Neural and Evolutionary Computing [cs.NE]*. **Université Paris-Saclay**, Jun. 2022SARMIENTO J., et al. *Peces de Bolivia*. 1 Ed. La Paz: Plural editores, 2014.

SERRA, E. **Colonização, uso da terra e conflitos rurais no Paraná**. 12º Encontro de Geógrafos de América Latina, Montevideú, v. 1, p. 1-26, 2009.

SEYIDOGLU, N.; YAGCILAR, C. Evaluation of the gender differences and reproductive physiology of catfish (*Ancistrus cirrhosus*). **The Online Journal of Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 140-144, Oct. 2020.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution**, pp. 264–279, 1993.

SOFIA, S. H.; GALINDO, B. A.; PAULA, F. M.; SODRÉ, L. M. K.; MARTINEZ C. B. R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 317-323, 2008.

STORCH, D.; BOHDALKOVÁ, E.; OKIE, J. The more-individuals hypothesis revisited: The role of community abundance in species richness regulation and the productivity-diversity relationship. **Ecology Letters**, v. 21, p. 920–937, 2017.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., & KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10), 2731-2739, (2011).

TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; & PORTO, J. I. R. Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 81, n. 1, p. 110–124, 2012.

THOMAZ, A. T., CHRISTIE, M. R. & KNOWLES, L. L. The architecture of river networks can drive the evolutionary dynamics of aquatic populations. **Evolution**, v. 70, p. 731–739, 2016.

THORNHILL, D. J. *et al.* Open-ocean barriers to dispersal: A test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). **Molecular ecology**, v. 17, n. 23, p. 5104-5117, 2008.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. P. **Fundamentos em ecologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

VAN DER SLEEN, P. & ALBERT, J.S. **Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas (Princeton Field Guides)**. New Jersey: Princeton University Press, 2017.

VEGA-RETTOR, C. & VÉLIZ, D. Liver transcriptome characterization of the endangered freshwater silverside *Basilichthys microlepidotus* (Teleostei: Atherinopsidae) using next generation sequencing. **Marine Genomics**, v. 18, p. 147–150, Dec. 2014.

WHITELEY, A. R.; SPRUELL, P. & ALLENDORF, F. W. Ecological and life history characteristics predict population genetic divergence of two salmonids in the same landscape. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 3675–3688, 2004.

WHITMORE, D. H. **Electrophoretic and Isoelectric focusing techniques in fishery management**. Arlington: CRC Press, 1990.

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; DOS REIS, R. E.; MOURA, M. O.; MATEUS, R. P. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetica** v. 123, p. 271-283, 2005.

ZUANON, J.A.S. **História Natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira, Pará**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Ecologia). Ciências de Florestas Tropicais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

ANEXOS

Tabla Suplementar 1 – Distancia geográfica en kilómetros entre los puntos de colecta de *Ancistrus* sp. en las microcuencas del río Paraná.

| | P60 | P66 | P40 | P46 | P67 | P73 | P68 | P76 | P64 | P62 | P74 | P75 | P70 | P65 | P71 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|
| P60 | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| P66 | 24,3 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| P40 | 47,6 | 32,7 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| P46 | 99 | 84,2 | 63,2 | 0 | | | | | | | | | | | |
| P67 | 97,7 | 83,7 | 79,7 | 131,7 | 0 | | | | | | | | | | |
| P73 | 96,2 | 82,2 | 78,2 | 130,2 | 15 | 0 | | | | | | | | | |
| P68 | 82,3 | 36,9 | 64,3 | 116,3 | 49,6 | 49 | 0 | | | | | | | | |
| P76 | 103,9 | 89,9 | 85,9 | 137,9 | 52,2 | 52 | 53,6 | 0 | | | | | | | |
| P64 | 158 | 144 | 140 | 192 | 62,4 | 72,6 | 107 | 111 | 0 | | | | | | |
| P62 | 110,5 | 95,6 | 92 | 144 | 102,6 | 101,1 | 84,3 | 105,7 | 160 | 0 | | | | | |
| p74 | 161,7 | 147,7 | 142,7 | 194,7 | 153,7 | 152,7 | 135,7 | 156,7 | 210,7 | 102,7 | 0 | | | | |
| P75 | 167,5 | 153,5 | 148,5 | 200,5 | 159,5 | 158,5 | 141,5 | 162,5 | 216,5 | 108,5 | 26,3 | 0 | | | |
| P70 | 154 | 140 | 135 | 187 | 146 | 145 | 128 | 149 | 203 | 95 | 23 | 28,8 | 0 | | |
| P65 | 150,6 | 136,6 | 131,6 | 183,7 | 142,6 | 141,6 | 124,6 | 145,6 | 199,6 | 91,6 | 19,6 | 25,5 | 17,6 | 0 | |
| P71 | 166 | 151 | 147 | 199 | 158 | 156 | 139 | 161 | 215 | 107 | 99,3 | 105 | 86 | 93,7 | 0 |

