



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN
BIODIVERSIDAD NEOTROPICAL**

**ESTRUCTURA GENÉTICA DEL DORADO (*Salminus brasiliensis*) EN EL ÁREA DE
INFLUENCIA DEL ITAIPÚ BINACIONAL**

JERSON ROGELIO CHANCHAY CASTRO

Foz do Iguaçu

2019



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN
BIODIVERSIDAD NEOTROPICAL**

**ESTRUCTURA GENÉTICA DEL DORADO (*Salminus brasiliensis*) EN EL ÁREA DE
INFLUENCIA DEL ITAIPÚ BINACIONA.**

JERSON ROGELIO CHANCHAY CASTRO

Disertación de maestría presentada en el Programa de Posgrado en Biodiversidad Neotropical, del Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, en la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA), como requisito para la obtención del título en Master.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

Foz do Iguaçu

2019

**ESTRUCTURA GENÉTICA DEL DORADO (*Salminus brasiliensis*) EN EL ÁREA DE
INFLUENCIA DEL ITAIPÚ BINACIONAL**

Disertación de maestría presentada en el Programa de Posgrado en Biodiversidad Neotropical, del Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, en la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA), como requisito para la obtención del título en Master.

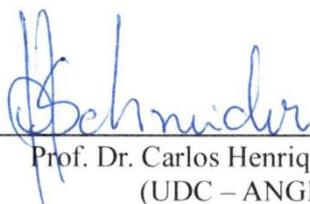
BANCA EVALUADORA



Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira
Orientador
(UNILA)



Prof. Dr. Hermes José Schmitz
(UNILA)



Prof. Dr. Carlos Henrique Schneider
(UDC – ANGLO)

Catálogo elaborado pela Divisão de Apoio ao Usuário da Biblioteca Latino-Americana
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

C355

Castro Chanchay, Jerson Rogelio.

Estructura genética del Dorado (*Salminus brasiliensis*) en el área de influencia del Itaipú Binacional. / Jerson Rogelio Chanchay Castro. - Foz do Iguaçu, PR, 2019.

71 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical. Foz do Iguaçu-PR, 2019.

Orientador: Luiz Henrique Garcia Pereira.

1. Diversidade genética. 2. Dourado (Peixe). 3. Genética animal. 4. Peixes - Migração. I. Pereira, Luiz Henrique Garcia. II. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. III. Título.

CDU 575:597.551.2(816.2)

Dedico este trabajo a mi Padre Mateo Chanchay, por el cuidado y apoyo incondicional durante toda mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi Orientador Luiz, por la amistad ofrecida y la oportunidad de desenvolver proyectos en el área de genética molecular de peces, además por la extrema paciencia y la constante ayuda en la orientación de este y otros trabajos.

A mis compañeros que conformaron un equipo conmigo durante estos últimos años: Alejandro, Diego, Pilar, Rodrigo.

A mi familia que a la distancia siempre está apoyándome. Mi padre Mateo y mis hermanas Deysi, Britney y Gisely.

A mi novia Jasleidy, por el apoyo constante durante mis años en la universidad y sobre todo porque ha sido la persona que más ha creído en mí y me ha sabido escuchar y aconsejar cuando más lo necesité.

A Caroline Henn por gestionar con Itaipú, la obtención de las muestras de la especie foco de este trabajo.

A los pescadores y dueños de pescaderías en Ciudad del Este que, amablemente, me cedieron un fragmento de tejido de la especie estudiada.

CHANCHAY, Jerson Rogelio Castro. **Estructura genética del dorado (*Salminus brasiliensis*) en el área de influencia del Itaipú binacional**. 2019. 68. Disertación de maestría presentada en el Programa de Posgrado en Biodiversidad Neotropical, del Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, en la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA), Foz do Iguaçu, 2019.

RESUMEN

En la región Neotropical los ambientes acuáticos se han tornado cada vez más fragmentados por la construcción de grandes hidroeléctricas. Para amenizar los impactos causados por estas estructuras, se han creado sistemas de transferencia de peces (STP). En ambientes fragmentados los STP pueden favorecer la conexión de las poblaciones. No en tanto, en ambientes que históricamente fueron aislados, este tipo de estructura puede homogenizar las poblaciones y comunidades de peces. La cuenca del Paraná presenta dos eco-regiones de agua dulce (Alto y Bajo Paraná), con especies y poblaciones estructurados por vicariância, debido a las cascadas de Sete Quedas. Posterior a la construcción de Itaipú (1983), la barrera natural fue eliminada por el reservorio, además, en 2002 se construyó el Canal de Piracema con el fin de conectar las poblaciones aguas arriba y aguas debajo de la represa. En este sentido, hasta el momento se ha registrado la invasión de especies y poblaciones en las diferentes cuencas. Partiendo de la hipótesis de que existirían poblaciones diferenciadas en el Alto y Bajo Paraná, el objetivo del trabajo fue analizar la diversidad y estructuración genéticas y las tasas de migración de *Salminus brasiliensis*, aguas arriba y aguas debajo de la represa de Itaipú, además, de identificar las poblaciones de origen a los individuos en tránsito (migrantes) colectados durante la época de migración. Para medir la diversidad y estructuración genéticas en las poblaciones se utilizaron los marcadores D-Loop y microsátélites. La estructuración genética se realizó utilizando un enfoque clásico con los índices de Φ_{ST} y F_{ST} y un enfoque basado en estadística Bayesiana utilizando el hierBAPS, para secuencias D-Loop, y agrupamientos bayesianos en el STRUCTURE, para microsátélites. Las secuencias D-Loop presentaron 59 haplotipos, diversidad nucleotídica de 0,35 y diversidad haplotípica de 0,96. Los microsátélites mostraron un total de 97 alelos, con un promedio de 8,8 alelos por locus. La heterocigosidad observada varió de 0,154 a 0,900 y la heterocigosidad esperada de 0,204 a 0,840. Los análisis en el STRUCTURE y hierBAPS mostraron la presencia de dos *clústeres* correspondientes a las dos eco regiones del Alto y Bajo Paraná, así corroborando la hipótesis de la existencia de estructuración poblacional. De igual manera, los valores de Φ_{ST} y F_{ST} , mostraron una estructuración genética moderada. Las tasas de migración recientes fueron cerca 10 veces más altas que las tasas de migración histórica, siendo más intensa en el sentido del Bajo al Alto Paraná. Además, se registran migrantes tanto en el Bajo como en Alto Paraná, lo que evidencia la conexión entre las dos poblaciones y así la efectividad del canal de Piracema como corredor biológico. Por su vez, esta conexión reciente puede resultar en la homogenización genética de las dos poblaciones llevando a una pérdida de diversidad genética y adaptación local. Llevando en consideración los resultados obtenidos, las estrategias de conservación de *S. brasiliensis* deben llevar en consideración su historia evolutiva, para mantener la integridad genética y el potencial evolutivo de la especie y de cada población del Bajo y Alto Paraná.

Palabras clave: Diversidad genética; Homogeneización genética; Peces migratorios; Cuenca del Paraná; Flujo génico.

CHANCHAY, Jerson Rogelio Castro. **Estrutura genética do dourado (*Salminus brasiliensis*) na área de influência da Itaipu binacional**. 2019. 68. 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.

RESUMO

Na região neotropical, os ambientes aquáticos se tornaram cada vez mais fragmentados pela construção de barragens hidroelétricas. Para amenizar estes impactos, constroem-se sistemas de transposição de peixes (STP). Os STPs em ambientes historicamente conectados podem favorecer a conexão da biodiversidade. No entanto, em ambientes que historicamente eram separados, os STPs podem homogeneizar as populações e comunidades de peixes. A bacia do Paraná apresenta duas ecorregiões de água doce (Alto e Baixo Paraná) com espécies e populações estruturadas por vicariância, devido as cascatas de Sete Quedas. Após a construção da Itaipu (1983), a barreira natural foi eliminada pelo reservatório e, anos mais tarde (2002), foi construído o canal de piracema com a finalidade de conectar as populações acima e abaixo da represa. Deste então, vem se reportando a presença de espécies e populações de peixes do Baixo no Alto Paraná. Partindo da hipótese da existência de populações estruturadas no Alto e Baixo Paraná, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade e estruturação genéticas e as taxas de migração de *Salminus brasiliensis*, a montante e a jusante da barragem do Itaipu, além de identificar as populações de origem dos indivíduos coletados em trânsito (migrantes), durante a época de piracema. Para mensurar a diversidade e estruturação genéticas nas populações foram utilizados os marcadores D-Loop e microssatélites. A estruturação genética foi obtida utilizando os índices clássicos de Φ_{ST} e F_{ST} e um enfoque baseado em estatística bayesiana utilizando os métodos hierBAPS, para as sequências D-Loop, e de agrupamentos bayesianos com o software STRUCTURE, para os microssatélites. As sequências D-Loop apresentaram 59 haplotipos, diversidade nucleotídica de 0,35 e diversidade haplotípica de 0,96. Os marcadores microssatélites apresentaram um total de 97 alelos com uma média de 8,8 alelos por locus. A heterozigosidade observada variou de 0,154 a 0,900 e a heterozigosidade esperada de 0,204 a 0,840. As análises de hierBAPS e STRUCTURE mostraram a presença de dois *clusteres* correspondentes as duas ecorregiões do Alto e Baixo Paraná, corroborando assim a hipótese de estruturação genética. Do mesmo modo, os valores de Φ_{ST} e F_{ST} mostraram uma estruturação genética moderada. As taxas de migração recente foram cerca de 10 vezes maiores que as taxas de migração histórica, sendo mais intensa no sentido do Baixo ao Alto Paraná. Além disso, foram identificados migrantes tanto no Baixo como no Alto Paraná, o que evidencia a conexão recente entre essas duas populações e a efetividade do canal de Piracema como corredor biológico. Por sua vez, esta conexão recente pode resultar na homogeneização genética das duas populações levando a perda de diversidade genética e adaptação local. Assim, considerando a estruturação genética da espécie, as estratégias de conservação de *S. brasiliensis* devem levar em consideração sua história evolutiva, a fim de se manter a integridade genética e o potencial evolutivo da espécie e de cada população do Baixo e Alto Paraná.

Palavras chave: Diversidade genética; Homogeneização genética; Peixes migradores; Bacia do Paraná; Fluxo gênico.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 .** Mapa de la región Neotropical presentando las diferentes eco-regiones de agua dulce. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de la división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008). 11
- Figura 2.** Modificación de la barrera entre el alto y bajo Paraná. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008) y división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008). 16
- Figura 3.** Mapa de la cuenca del Paraná con las principales represas hidroeléctricas. Los triángulos rojos muestran las hidroeléctricas con sistemas de transferencia de peces (STP) y los círculos negros las hidroeléctricas sin STP. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008), división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008), ubicación de usinas Hidroeléctricas de (SIGEL/ANEEL, 2019) e información de los STP de (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). 17
- Figura 4.** Mapa de la distribución de la especie *S. brasiliensis*. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008) y división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008). 18
- Figura 5.** Estructuración poblacional. A- Grupos no conectados, B- baja conectividad, C- conectividad significativa, y D- panmixia. (Traducido de (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006)) 21
- Figura 6.** Ubicación de muestras de individuos de *S. brasiliensis* y el tipo de marcador molecular obtenido. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008), y la división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008). 25
- Figura 7.** Análisis de estructuración genética para los marcadores D-Loop y microsátélites. 1A- DAPC para las secuencias D-Loop (la numeración corresponde a las muestras presentadas en la Tabla 2). 2A- DAPC para los datos de microsátélites. 1B- Análisis de hierBAPS para las secuencias D-Loop, mostrando la frecuencia de individuos de cada muestra en cada cluster. 2B- Análisis de agrupaciones Bayesianas del STRUCTURE, mostrando la probabilidad de pertinencia de los individuos de cada muestra a cada cluster (K = 2 determinado por el STRUCTURE HARVESTER); cluster azul = Bajo Paraná y cluster rojo = Alto Paraná. 36
- Figura 8.** Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) para los marcadores D-Loop y microsátélites. A - DAPC para las secuencias D-Loop sin CE, CP y R. La numeración de la figura 1A corresponde a las muestras presentadas en la Tabla 2. B – DAPC para los datos de microsátélites excluyendo CE, CP, y R. En las figuras, el círculo azul representa las muestras del Bajo Paraná y el círculo rojo a las muestras del Alto Paraná. 37
- Figura 9.** Resultados de la estructuración genética para las muestras del Alto y Bajo Paraná. En la figura 1A se muestra el resultado del análisis de hierBAPS en un dendrograma. La figura 2A muestra los resultados del hierBAPS en una red de haplotipos (derecha) y de la ubicación de captura de cada individuo en las diferentes eco-regiones de agua dulce (izquierda). En la figura B se presenta el resultado del análisis de agrupación Bayesiana del STRUCTURE (K = 2 determinado por el STRUCTURE HARVESTER). 38

Figura 10. Tasas de migración histórica y reciente de *S. brasiliensis* entre el Alto y Bajo Paraná. M corresponde a la tasa migración escalonada por mutación (m/μ), y m a la tasa de migración. El ancho de las flechas son proporcionales a las tasas de migración... 40

Figura 11. Asignación de población de origen a las muestras encontradas en Ciudad del Este (CE), canal de piracema (CP) y reservorio de Itaipu (R), utilizando las secuencias D-Loop y datos de microsatélites. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de (ABELL et al., 2008; LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008). 41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen metodológicos en la obtención de datos de microsatélites.	27
Tabla 2. Diversidad genética de <i>Salminus brasiliensis</i> obtenidas a partir de ADNmt. NSb – número de individuos de <i>S. brasiliensis</i> , H – número de haplotipos, π – Diversidad nucleotídica, Hd – diversidad haplotípica.	33
Tabla 3. Resumen de datos de microsatélite para las muestras de <i>S. brasiliensis</i> . Las siglas corresponden a cada población siendo estas A- Ayolas, Y - Yacyretá, CE - Ciudad del Este, CP - Canal de Piracema, R - Reservorio, G - Guaira, IG - Ilha Grande y PP - Porto Primavera...	34
Tabla 4. Matriz de distancias genética en pares, F_{ST} con corrección ENA para microsatélites y Φ_{ST} para D-loop.....	39
Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las muestras de <i>S. brasiliensis</i> , entre grupos (Alto y Bajo Paraná), entre muestras dentro de los grupos y dentro de las muestras. Φ_{CT} – Diferencia genética entre grupos, Φ_{SC} - diferencia genética entre muestras dentro de los grupos, Φ_{ST} - dentro de las muestras.....	39

ANEXOS

Anexo 1. Muestras de <i>S. brasiliensis</i> utilizadas	65
---	----

SUMARIO

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	ICTIO-FAUNA NEOTROPICAL	11
1.2	PECES MIGRATORIOS	12
1.3	IMPACTOS POR BARRERAS	13
1.4	FORMAS DE MINIMIZAR LOS IMPACTOS POR LAS BARRERAS	15
1.5	CUENCA DEL PARANÁ	15
1.6	<i>SALMINUS BRASILIENSIS</i>	18
1.7	GENÉTICA DE POBLACIONES	19
1.8	ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES	20
1.9	TASAS DE MIGRACIÓN EN AMBIENTES FRAGMENTADOS	23
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GENERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	METODOLOGÍA	25
3.1	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	25
3.2	OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES	26
3.2.1	<i>Extracción de ADN</i>	26
3.2.2	<i>Marcador de ADNmt (D-loop)</i>	26
3.2.3	<i>Marcadores de microsatélites</i>	27
3.3	ANÁLISIS GENÉTICOS INTRA-POBLACIONES	28
3.3.1	<i>Variación genética en las secuencias D-Loop</i>	28
3.3.2	<i>Variación genética en microsatélites</i>	29
3.4	ANÁLISIS GENÉTICOS INTER-POBLACIONALES	29
3.4.1	<i>Análisis de agrupamientos naturales</i>	29
3.4.2	<i>Estructura genética entre el Alto y Bajo Paraná</i>	30
3.4.3	<i>Migración histórica y reciente entre el Alto y Bajo Paraná</i>	31
3.4.4	<i>Identificación de migrantes</i>	32
4	RESULTADOS	32
4.1	ANÁLISIS GENÉTICOS INTRA-POBLACIONES	32
4.1.1	<i>Variación genética en las secuencias D-Loop</i>	32
4.1.2	<i>Variación genética en microsatélites</i>	33
4.2	ANÁLISIS GENÉTICOS INTER-POBLACIONALES	35
4.2.1	<i>Análisis de agrupamientos naturales</i>	35
4.2.2	<i>Estructura genética entre el Alto y Bajo Paraná</i>	37
4.2.3	<i>Migración histórica y reciente entre el Alto y Bajo Paraná</i>	39
4.2.4	<i>Evaluación del Canal de Piracema como corredor biológico.</i>	41
5	DISCUSIÓN	42
5.1	ANÁLISIS GENÉTICOS INTRA-POBLACIONALES	42
5.1.1	<i>Variación genética en las secuencias D-Loop y de los microsatélites</i>	42
5.2	ANÁLISIS GENÉTICOS INTER-POBLACIONALES	44
5.2.1	<i>Análisis de agrupamientos y estructuración genética</i>	44
5.2.2	<i>Migración histórica y reciente entre el alto y bajo Paraná</i>	46

5.3	EVALUACIÓN DEL CANAL DE PIRACEMA COMO CORREDOR BIOLÓGICO.....	48
6	CONCLUSIÓN	50
7	BIBLIOGRAFÍA	52
8	ANEXOS	65

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Ictio-fauna Neotropical

La región neotropical abarca diferentes subregiones que van desde México hasta Sudamérica (BALIAN et al., 2008; MORRONE, 2014) (Fig. 1). La composición y estructura de su biodiversidad son el resultado de eventos de dispersión y vicarianza producidos desde el cretáceo tardío hasta el mioceno, debido a eventos geológicos como trasgresiones marinas, deformaciones tectónicas, levantamiento de la región Andina y configuración del área amazónica (HUBERT; RENNO, 2006; LUNDBERG et al., 1998; MORRONE, 2014).

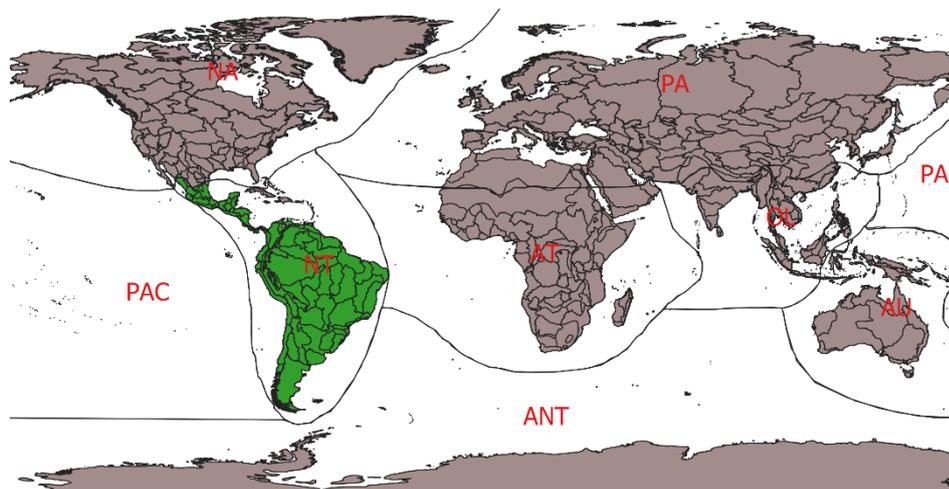


Figura 1 . Mapa de la región Neotropical presentando las diferentes eco-regiones de agua dulce. El mapa fue elaborado en el *software QGis* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de la división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008).

Los ríos de la región neotropical poseen la diversidad de peces de agua dulce más alta del planeta, existiendo alrededor de 5.700 especies descritas formalmente (ALBERT; BART; REIS, 2011) y estimativas predicen una riqueza superior a 7.000 (ALBERT; REIS, 2011). Los principales órdenes de la región neotropical son: Characiformes (1.500 especies), Siluriformes (1.400 especies), Gymnotiformes (180 especies), Cyprinodontiformes (400 especies) y Cichliformes (450 especies) (LÉVÊQUE et al., 2008). La alta riqueza de la región es explicada por varias hipótesis, siendo estas: hipótesis de gradiente, hipótesis paleogeográfica, hipótesis de ríos, hipótesis de disturbio y vicarianza, hipótesis de refugio, hipótesis de río-refugio e hipótesis de museo (HUBERT; RENNO, 2006). No obstante, para Lundberg y colaboradores (1998), esta diversidad se debe al alto grado de especiación, debido a eventos alopátricos por

vicarianza, ocurridos, principalmente, por modificaciones de los drenajes neotropicales. En términos de función, los órdenes neotropicales son funcionalmente diversas con atributos únicos, albergando más del 75% de la diversidad funcional del planeta (TOUSSAINT et al., 2016). En este sentido, esta región posee características únicas que la hacen especial e importante desde el punto de vista científico, además, de interés de la perspectiva de la conservación.

Además, los peces neotropicales evolucionaron para utilizar los hábitats transitorios resultantes de las inundaciones, los cuales ofrecen un ambiente idóneo para el desarrollo de larvas y jóvenes de un gran número de especies (HARVEY; CAROLSFESD, 2003, p. 8). En este sentido, el traslado de adultos hacia lugares propicios para desovar, es un elemento clave en la historia evolutiva de los peces de la región. Por estos motivos, la presencia de varios taxones de peces con estrategias migratorias, sugiere que este comportamiento apareció antes de la fragmentación de las cuencas, como característica permanente del continente (LÓPEZ-FERNÁNDEZ, 2011, p. 116). En la región, el orden Characiformes se destaca por presentar mayor abundancia de peces con estilo de vida migratorio (HARVEY; CAROLSFESD, 2003).

En la actualidad, la diversidad de peces neotropicales se encuentra comprometida por diferentes acciones antrópicas, tales como agricultura, deforestación, fragmentación de ríos por represas, urbanización, canalización de los ríos, sobre pesca, contaminación e introducción de especies exóticas (HILSDORF; HALLERMAN, 2017a). Por lo que, estudios acerca de su diversidad son de vital importancia a la hora de direccionar planes de manejo y conservación de especies de interés.

1.2 Peces migratorios

La migración en peces corresponde al movimiento sincrónico y dirigido de individuos de una población o la totalidad de ellos entre hábitats discretos, esto con el fin de mejorar las aptitudes (en forrajeo o reproducción), las cuales no pueden ser suplidas en un solo hábitat (BINDER; COOKE; HINCH, 2011). En peces, existe tres tipos de migraciones, las cuales son: oceanódromos (desplazamiento únicamente en océanos), potamódromos (migración únicamente en agua dulce) y diádromos (migración entre agua dulce y salada) (BINDER; COOKE; HINCH, 2011; MYERS, 1949). A pesar de la utilización histórica del término potamódromos en la bibliografía, también se utiliza las palabras: peces no anádromos, peces

residentes y peces del interior (en inglés '*non-anadromous*', '*resident*', y '*inland*') (THUROW, 2016). En América del Sur, existe gran variedad de especies con el estilo de vida potamódromo, los cuales poseen diferentes estrategias para moverse aguas arriba o aguas abajo (HARVEY; CAROLSFESD, 2003, p. 8; WELCOMME, 1985). La distancia y velocidad de migración depende mucho de la especie, en algunos casos llegan a migrar más de 1.000 km en un promedio de 16 km por día (WELCOMME, 1985). A pesar de los distintos patrones de migración, el movimiento aguas arriba con el fin de reproducción es más común durante la estación lluviosa, seguido de la dispersión de larvas aguas abajo (AGOSTINHO et al., 2003). Por otro lado, estudios han demostrado que los peces potamódromos neotropicales parecen tener menos necesidad de volver a sus lugares de desova, por lo que, al encontrar algún obstáculo durante su migración aguas arriba, buscan otros sitios para desovar (AGOSTINHO et al., 2003). En los peces migratorios, el inicio del traslado aguas arriba es mediado por las condiciones ambientales como temperatura y flujo del agua (WELCOMME, 1985). En algunos peces, la migración no se da únicamente con el fin de desova, sino también para desarrollar sus gónadas y poder engendrar, ya que existe una relación entre estas dos variables (AGOSTINHO et al., 2003). En este contexto, la fragmentación de hábitat, mediante barreras en los ríos, provoca impactos serios a los peces con estilo de vida potamódromo, no solo en la búsqueda de ambientes propicios para desovar, sino también para madurar sexualmente.

1.3 Impactos por barreras

Las barreras en los cauces de los ríos son continuamente implantadas a nivel mundial, principalmente aquellas destinadas a la generación de energía eléctrica (ZARFL et al., 2014). En Sudamérica, la mayoría de los grandes ríos están fragmentados por grandes represas hidroeléctricas (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). Esta interrupción de la conectividad en ríos provoca impactos en diferentes niveles de la diversidad biológica (genéticos, especies, comunidades y ecosistemas) (AGOSTINHO et al., 2016; RAMOS et al., 2012; SALCEDO et al., 2018), debido a que modifican los paisajes y afectan la conectividad entre las poblaciones. En este sentido, las barreras no solo fragmentan la continuidad de los ríos, si no también provocan la pérdida de hábitat. A pesar de esto, varias barreras están siendo implantadas o están en construcción en Sudamérica (ZARFL et al., 2014).

Para las especies potamódromas, las represas representan un agravante a su estilo de vida, ya que impiden su traslado aguas arriba o aguas abajo (LIERMANN et al., 2012). Las barreras físicas, generalmente registran grandes impactos, principalmente, en aquellas utilizadas para generar energía eléctrica (BECKER; ABERNETHY; DAUBLE, 2003; PORCHER; TRAVADE, 2002). En la actualidad, Brasil cuenta con aproximadamente 4.360 represas en general (SILVEIRA; CRUZ, 2005). Por otro lado, la generación de energía eléctrica se da en un 90% mediante la utilización de turbinas hidroeléctricas (PETRERE-JÚNIOR et al., 2002). Las barreras construidas con fin de generar energía eléctrica, afectan la migración de los peces, acarreando perjuicios en el ciclo de vida de algunas especies, principalmente, en la reproducción y alimentación (MAKRAKIS et al., 2011). Para los peces ascendentes, las represas pueden generar una barrera imposible de pasar, y para las especies que se trasladan aguas abajo, el camino puede ser peligroso, ya que existe la posibilidad de caer en las turbinas de las represas hidroeléctricas y fallecer (BECKER; ABERNETHY; DAUBLE, 2003). No obstante, se han creado diferentes mecanismos para facilitar el paso de las especies migratorias (AGOSTINHO et al., 2003), sin embargo, aún existe dudas de la eficiencia de estas estructuras (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015).

Asociado a las represas hidroeléctricas, producto de la captación de agua, se crean los reservorios o embalses. En América del Sur existe un gran número de embalses, los cuales presentan diferentes longitudes, alcanzando hasta 190 km, siendo el caso de Porto Primavera. Los embalses crean un gradiente hidrológico y limnológico en transición, que va de ambientes lóticos a semilóticos y lenticos (OKADA; AGOSTINHO; GOMES, 2005). Además, los reservorios presentan un flujo de agua muy bajo, con mayor profundidad y alta transparencia, en comparación con los ríos adyacentes (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). Estas condiciones desfavorecen el desarrollo de huevos y larvas, ya que los exponen a una mayor tasa de depredación, y evita el traslado de forma pasiva mediada por las corrientes de aguas (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). Cabe destacar que los peces potamódromos neotropicales evolucionaron dentro un contexto fluvial de aguas corrientosas, por lo que, su traslado aguas abajo era mediado por estas condiciones, en este sentido, probablemente las aguas estancadas, desfavorezcan la orientación e impida la migración aguas abajo (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). De esta manera, las represas generalmente evitan los movimientos río arriba, mientras que los reservorios impiden los movimientos río abajo tanto de adultos como de larvas y huevos (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015).

1.4 Formas de minimizar los impactos por las barreras.

Como mecanismos que amenizan los impactos generados por la fragmentación de hábitats causados por las represas, se han creado estructuras que facilitan la migración de los peces, denominados de sistemas de transferencia de peces (STP) (CLAY, 1995). En Sudamérica, los STP que conectan los ríos fragmentados son: canales, escaleras y elevadores (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). Sin embargo, de modo general, pocas represas presentan este tipo de estrategias y en el caso de Brasil, apenas nueve hidroeléctricas han construido algún tipo de STP (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015).

Para evaluar la eficiencia de estas estructuras en la migración de las especies, los estudios se han centrado en describir el flujo de los peces, ya sea utilizando radio-telemetría, marcación y recaptura, modelamientos o muestreando las especies que se encuentran en los pases (BRITTO; CARVALHO, 2013b; CELESTINO et al., 2019; LIRA et al., 2017; MAKRAKIS et al., 2011). No obstante, los peces reaccionan de forma diferente a los obstáculos, algunos se arriesgan a subir las barreras por medio de los diferentes mecanismos (escaleras, canales o elevadores), y otros establecen poblaciones separadas mediados por la barrera (HARVEY; CAROLSFESD, 2003, p. 10). En este contexto, aún quedan dudas con respecto a la eficiencia de las estructuras que facilitan la migración en los peces, ya que son estrategias que aún se encuentran a medio camino, debido a que su eficiencia y consecuencias no han sido muy claras (BROWN et al., 2013; PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015).

1.5 Cuenca del Paraná

La cuenca del Paraná se encuentra inserida dentro de la gran cuenca hídrica de la Plata, en la cual ocupa 48,7% de la superficie (BREA; ZUCOL, 2011) (Fig. 2, 3 y 4). Esta cuenca, históricamente se encontró dividida entre Alto y Bajo Paraná, dividido a la presencia de las cascadas de Sete Quedas, cuya formación data aproximadamente durante el pleistoceno (BUCKUP, 2011; MAAK, 1968). Esta cuenca congrega dos provincias ictio-faunísticas, evidenciadas por alto grado de endemismo del Alto Paraná, producto del aislamiento natural, provocado por las cascadas (BUCKUP, 2011). De la misma manera, las cascadas por mucho tiempo aislaron las poblaciones de especies presentes en ambas eco-regiones, impidiendo el flujo genético y provocando procesos de evolución independiente (MACHADO et al., 2016;

MONDIN et al., 2018; PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009b). Por ejemplo, en el caso de la especie *S. brasiliensis*, la divergencia alopátrica en las poblaciones se dio hace aproximadamente 0,89 Ma (MACHADO; GALETTI; CARNAVAL, 2018).

Posterior a la construcción de la represa hidroeléctrica de Itaipú, todo el conjunto de cascadas de Sete Quedas, quedó sumergido en el reservorio (BUCKUP, 2011). El embalse de Itaipú fue creado en 1983 y posee cerca de 160 kilómetros de extensión (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). En este sentido, la barrera que separaba el Alto y Bajo Paraná fue dislocado cerca de 160 km aguas abajo (Fig. 2). Por consecuencia del desaparecimiento de la barrera natural, se registraron incidencias de especies pertenecientes al Bajo Paraná en ríos del Alto Paraná, producto de la migración de especies que se encontraron en el área del embalse (geográficamente perteneciente al Bajo Paraná) durante la inundación (JÚLIO JÚNIOR et al., 2009; LANGEANI et al., 2007; VITULE; SKÓRA; ABILHOA, 2011) (Fig.2).

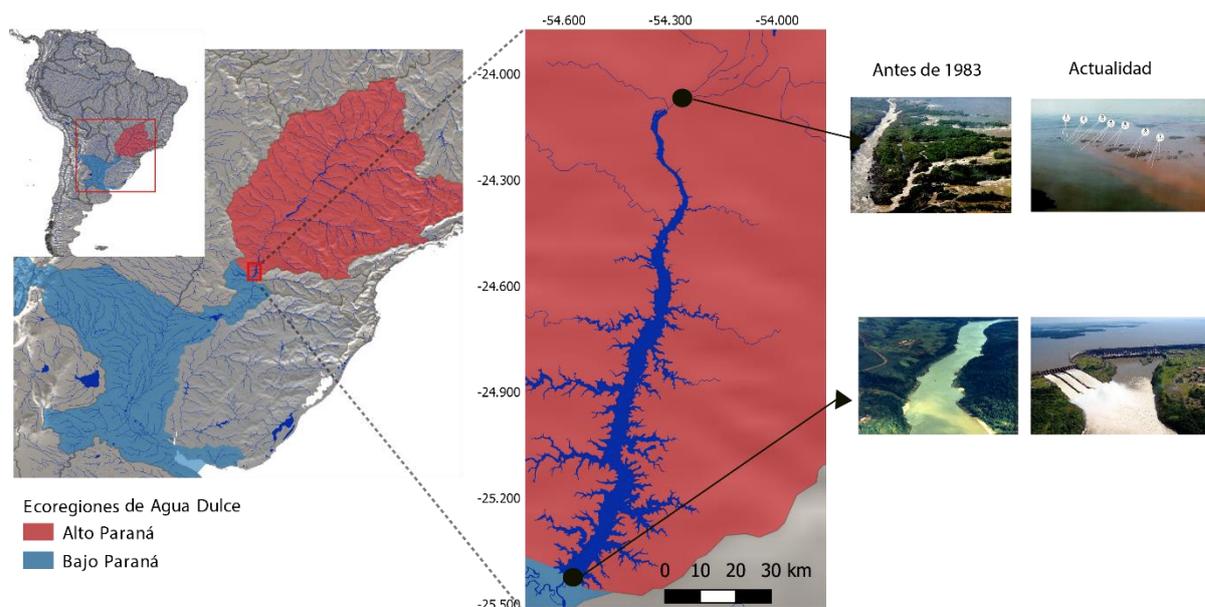


Figura 2. Modificación de la barrera entre el Alto y Bajo Paraná. El mapa fue elaborado en el *software QGIS* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008) y división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008).

En el año 2002 fue construido el Canal de Piracema, con el fin de ayudar a la migración de los organismos acuáticos y conectar las poblaciones aguas arriba y abajo de la represa (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2004). Este canal tiene una extensión de 10 km y sube 120m hasta llegar al reservorio de Itaipú (MAKRAKIS et al., 2011). Levantamientos ictiológicos realizados en el canal, han demostrado la utilización del mismo por parte de 17 especies de peces migratorios, de los cuales puede destacarse la presencia de *Salminus*

brasiliensis, en tres de los cinco puntos de muestreo (MAKRAKIS et al., 2011). En este segundo plano de la historia, esta estructura está favoreciendo la migración de los peces, no obstante, considerando que las eco-regiones de agua dulce poseen riquezas diferentes, los conectores estarían homogenizando las ensamblas (VITULE; SKÓRA; ABILHOA, 2011).

Además, una de las características actuales de la cuenca del Paraná, producto de la acción antrópica, es la presencia de diferentes represas a lo largo de su extensión, las cuales fueron construidas a partir de la década de 1960 (AGOSTINHO et al., 2003). En la actualidad, existen más de 130 represas con altura mayor a 10 m (Agostinho *et al.*, 2003) (Fig. 3). De las represas de la región, se destacan Yacyretá, Itaipú y Porto Primavera por poseer los reservorios con mayor extensión, presencia de STP y mayor número de estudios acerca de sus efectos en la diversidad biológica (LIRA et al., 2017; PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015)

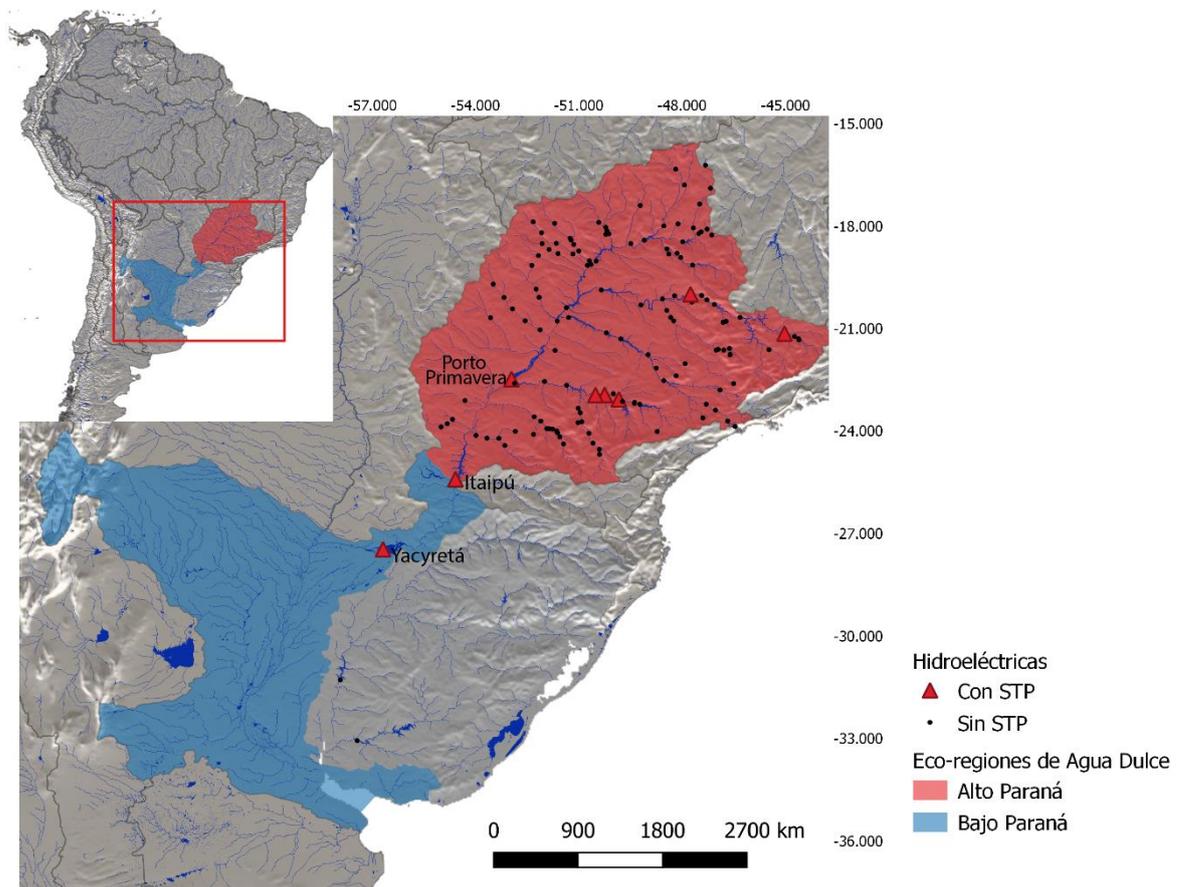


Figura 3. Mapa de la cuenca del Paraná con las principales represas hidroeléctricas. Los triángulos rojos muestran las hidroeléctricas con sistemas de transferencia de peces (STP) y los círculos negros las hidroeléctricas sin STP. El mapa fue elaborado en el *software* QGIS (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008), división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008), ubicación de usinas Hidroeléctricas de (SIGEL/ANEEL, 2019) e información de los STP de (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015).

1.6 *Salminus brasiliensis*

En la cuenca del río Paraná se destaca la presencia de la especie *Salminus brasiliensis*, una especie de gran tamaño, con una longitud máxima de 780 mm, perteneciente a la orden de los Characiformes (GRAÇA; PAVANELLI, 2007). Vernáculamente es llamado de dorado, dorada o pirayú (LIMA, 2006). Esta especie vive en canales y ríos, donde se alimenta de otros peces (HAHN; FUGI; ADRIAN, 2004). La distribución de esta especie se ha registrado en los ríos de la Cuenca de la Plata, Mamoré y drenaje de la Laguna de los Patos (GRAÇA; PAVANELLI, 2007) (Fig. 4).

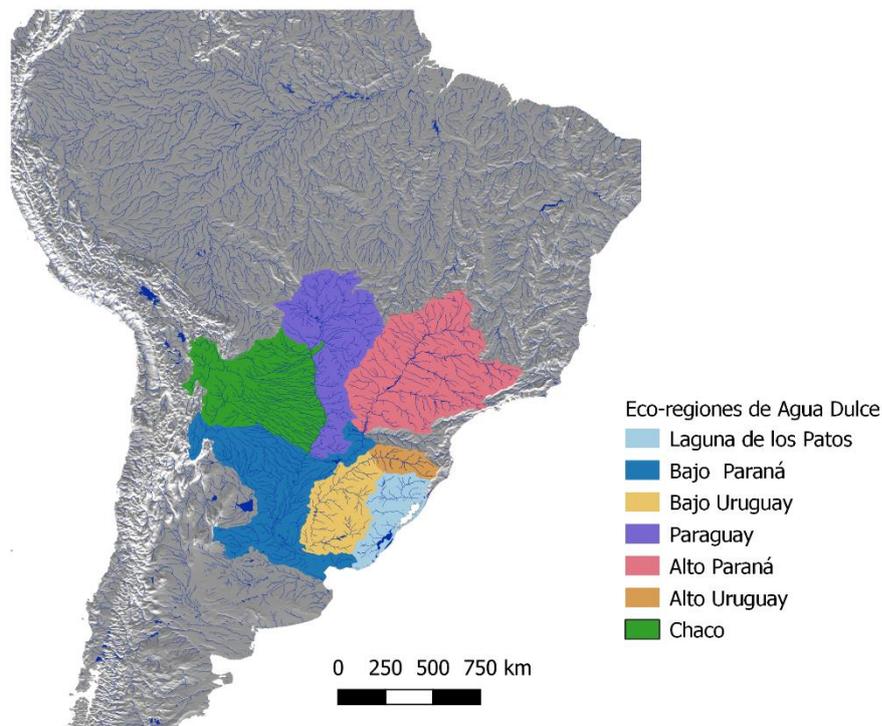


Figura 4. Mapa de la distribución de la especie *S. brasiliensis*. El mapa fue elaborado en el *software QGIS* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008) y división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008).

S. brasiliensis presenta diferentes tipos de migración, dependiendo de la fase etaria, en el cual ocupa diferentes ambientes (AGOSTINHO et al., 1997). Las larvas y huevos son mantenidas en áreas inundadas y lagos marginales y en la fase juvenil la especie explora ambientes lenticos o semilenticos (GOMES, 2016). Esta especie presenta desova anual en primavera y en verano de octubre a enero, donde la fecundación se da de forma externa (SUZUKI et al., 2004). Los factores externos como la temperatura y duración del día estimulan los procesos reproductivos, influenciando el desarrollo gonadal (BARBIERI; FERNANDO

ANDRÉ SALLES; TEIXEIRA-FILHO, 2004; VAZZOLER et al., 1997). Las hembras maduran gonadalmente con 378 mm y los machos con 324 mm (SUZUKI et al., 2004). Esta especie es considerada en alto riesgo de extinción (GRAÇA; PAVANELLI, 2007), debido al declino de sus poblaciones causado por el desmonte de la vegetación marginal, pesca excesiva, captura de juveniles, drenaje de lagos marginales, regulación del régimen hidrológico de los ríos, construcción de barreras, contaminación de los cuerpos de agua y la introducción de especies exóticas (GOMES, 2010). Por estos motivos, investigaciones que faciliten información que pueda ser utilizada en planes de repoblamiento son de vital importancia para mantener dicha especie.

1.7 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones consigue responder preguntas acerca de la biología y patrón de migración de las especies. Esta área de estudio consigue elucidar interrogantes a los cuales métodos tradicionales no lo harían como, por ejemplo, en el caso de los peces migratorios, conseguir asignar la posible población de origen a los individuos en tránsito, además de determinar la estructura poblacional ya sea espacial y temporal. Conocer la estructuración genética y diversidad genética de las poblaciones es de vital importancia a la hora de conservar las especies, ya que esta información puede ser utilizada en estrategias de repoblación (GOMES, 2010). De esta manera, solo mediante la delimitación de las poblaciones como unidades naturales, se puede realizar planes de manejo de forma adecuada, garantizando la integridad genética y el potencial evolutivo (FAULKS et al., 2017), sin generar homogenización genética en las poblaciones (PETSCH, 2016).

Por otro lado, en la mayoría de investigaciones acerca de las especies migratorias en los sistemas de transferencia de peces, se asume la eficiencia en base a un enfoque de poblaciones netamente ecológico, basados en el muestreo, telemetría y marcación/recaptura (CELESTINO et al., 2019; LIRA et al., 2017; MAKRAKIS et al., 2011). De esta manera, se desconsidera la estructuración evolutiva de las especies, desestimando la población real o el origen de los individuos, más allá del hecho de que muchas especies migratorias se encuentran estructuradas espacial y temporalmente (MONDIN et al., 2018; PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009b; RIBOLLI et al., 2016). Para este tipo de interrogantes, la genética de poblaciones consigue revelar información que los otros métodos tradicionales no lo harían, como ya reportado en varios trabajos utilizando especies de la cuenca del Paraná (ASHIKAGA et al., 2015;

BIGNOTTO et al., 2009; FERREIRA et al., 2015, 2017; GALINDO et al., 2019; GÓMEZ; PEREIRA, 2018; MARTINS et al., 2003; PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009a; PRADO et al., 2018; SILVA et al., 2015; SOUZA-SHIBATTA et al., 2018; VAINI et al., 2016). En el caso de la especie *S. brasiliensis*, en trabajos realizados en la cuenca del Paraná, ya se han reportado diferentes niveles de diversidad genética y estructuración genética tanto espacial como temporal, producto de la fragmentación de hábitats (ALVES, 2018; GOMES, 2010; MONDIN et al., 2018; RIBOLLI et al., 2016; RIBOLLI; ZANIBONI-FILHO; GALETTI, 2018; ROSSO et al., 2017; RUEDA et al., 2011).

1.8 Estructuración genética en poblaciones

A pesar de su importancia en la ciencia, el termino población presenta diferentes connotaciones dependiendo del área de estudio. En la ecología, se lo reconoce como un grupo de individuos de la misma especie que interactúan en un determinado espacio y tiempo, por otro lado, en las ciencias evolutivas se enfatiza más la cohesión reproductiva, siendo de esta manera, grupos de individuos de la misma especie que presentan las mismas posibilidades de aparearse (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006). Independiente de la definición optada, todas presentan una implicación cohesiva, que une individuos de la misma especie (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006).

Los métodos evolutivos que determinan poblaciones, utilizan la información genética obtenida a partir de genes estructurales, regiones reguladoras de genes y regiones de ADN no codificantes. Las diferencias genéticas dentro de las poblaciones son inducidas por procesos evolutivos, como selección natural, flujo genético, deriva genética, mutación y también por el tiempo en el cual ocurrieron estos eventos (HILSDORF; HALLERMAN, 2017a). En este sentido, las poblaciones son estructuradas como producto de eventos del pasado. En ambientes naturales las poblaciones no son homogéneas, sino más bien, están estructuradas en mayor o menor grado (HILSDORF; HALLERMAN, 2017a; WAPLES; GAGGIOTTI, 2006). En el caso de no existir algún tipo de estructuración genética, el fenómeno es conocido como panmixia. En las poblaciones panmícticas existe un alto grado de conectividad entre grupos de individuos reproductores (Fig. 5).

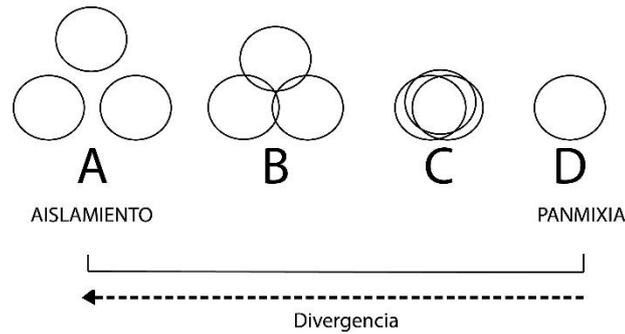


Figura 5. Estructuración poblacional. A - Grupos no conectados, B - baja conectividad, C - conectividad significativa y D - panmixia. (Traducido de (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006))

Para determinar la estructuración genética, históricamente han sido muy utilizados modelos derivados de la estadística F de Wright (WRIGHT, 1950, 1965). No obstante, en los últimos años, han sido cada vez más utilizados modelos basados en estadística bayesiana (CORANDER; WALDMANN; SILLANPÄÄ, 2003). De modo general, el objetivo de los algoritmos utilizados en genética de poblaciones es identificar agrupaciones panmícticas dentro de los grupos de muestreo (BENTLEY et al., 2018).

En la ciencia evolutiva se han dedicado a desarrollar aplicaciones empíricas y metodologías para estimar el grado de diferenciación de las poblaciones utilizando datos de marcadores moleculares (CORANDER; WALDMANN; SILLANPÄÄ, 2003). En los últimos años se han desarrollado varios modelos espaciales que determinan la estructura genética de las poblaciones, las cuales presentan la peculiaridad de insertar en un espacio explícito a los organismos, para posteriormente, determinar la estructura con otros grupos (CHENG et al., 2013). En este sentido, cada subpoblación presenta un conjunto de alelos propios que se diferenciara del resto dependiendo de las frecuencias alélicas. Estos enfoques, a pesar de que se pretenden unir dos paradigmas antiguos en la determinación de poblaciones (ecológico y evolutivo), pierden información acerca de la evolución y estructura anidada de las poblaciones, ya que el objetivo es identificar agrupaciones panmícticas dentro de una población más amplia y heterogénea (BENTLEY et al., 2018; WAPLES; GAGGIOTTI, 2006), quedando dudas en la identificación de los migrantes dentro de cada grupo de muestreo. Sin embargo, existen análisis que consiguen resolver estos problemas, desconsiderando *a priori* el origen de las muestras, como por ejemplo STRUCTURE, SAPCLUST y BAPS (Análisis de Estructuración Poblacional Bayesiano), los cuales utilizan información únicamente de marcadores de microsatélites. En este sentido, determinar la estructura poblacional desconsiderando la información geográfica e identificando los migrantes dentro de cada sitio de muestreo, ha sido

restringido por mucho tiempo a la utilización de marcadores de microsatélite. En este sentido, la utilización de otros marcadores tales como secuencias de ADN, no han conseguido ajustarse a la solución de estos dilemas (BENTLEY et al., 2018). No obstante, en 2013 fue creada una versión del análisis de estructuración poblacional bayesiano (BAPS) utilizando secuencias de ADN, basado en la agrupación jerárquica, por cual fue denominado de hierBAPS (CHENG et al., 2013). El análisis de hierBAPS puede acomodar grandes alineamientos de múltiples secuencias y proporcionar resultados mediante una estructura jerárquica (CHENG et al., 2013). El enfoque jerárquico para agrupar secuencias permite detectar linajes separados residentes dentro de las subpoblaciones y proporciona también, una manera útil de aumentar el poder estadístico en los diferentes niveles. Además, los resultados son comparables con los linajes formados mediante análisis de filogenias (CHENG et al., 2013; WILLEMS et al., 2012). Hasta hace poco, el análisis de hierBAPS estaba disponible únicamente como un código binario en MATLAB, el cual era difícil de instalar y usar, por la falta de manuales. No obstante, este análisis fue implantado en el lenguaje de programación de R en 2018, con el fin de facilitar su uso y aumentar la replicabilidad (BENTLEY et al., 2018).

Por lo general, los análisis de estructuración genética se realizan utilizando marcadores de origen uniparental, como las secuencias D-Loop y marcadores biparentales como microsatélites. En algunos trabajos, ambos marcadores muestran historias parecidas (FERREIRA et al., 2015; GALINDO et al., 2019; SOUZA-SHIBATTA et al., 2018), ratificando de esta manera la estructuración o no estructuración de las poblaciones. No obstante resultados contrarios también han sido registrados (FERREIRA et al., 2015; GALINDO et al., 2019; SOUZA-SHIBATTA et al., 2018). Como expuesto anteriormente, históricamente era difícil comparar los resultados obtenidos en ambos marcadores moleculares utilizando análisis de agrupamiento basados en estadística bayesiana, ya que no existía un análisis análogo para los datos de secuencias de ADN, siendo solo posible comparar la estructuración genética considerando la población de origen como dato *a priori* con los índices de F_{ST} y Φ_{ST} . En la actualidad pocos trabajos han utilizado los análisis bayesianos en ambos marcadores, no obstante las escasas investigaciones han mostrado la eficiencia de utilizar este enfoque (HINDLEY et al., 2018; RUBIO-CASTRO; QUIÑONEZ-VELÁZQUEZ; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2019).

1.9 Tasas de migración en ambientes fragmentados

Actualmente, la fragmentación es un problema grave en la manutención de las poblaciones naturales. Como mostrado anteriormente, los ambientes de agua dulce se encuentran fuertemente fragmentados y la tendencia es que dicha fragmentación aumente. En este sentido, utilizando datos moleculares surgen metodologías que intentan comprobar las tasas de migración históricas y recientes en las poblaciones con el objetivo de identificar los cambios y prever sus efectos (SAMARASIN; SHUTER; RODD, 2016; WILSON; RANNALA, 2003). En la genética de la conservación varios estudios utilizan los resultados del *software* MIGRATE-n como migración histórica y los resultados del *software* BAYESASS, como migración reciente (SAMARASIN; SHUTER; RODD, 2016). Enfocados al efecto de las centrales hidroeléctricas, en un contexto de fragmentación del hábitat, se han utilizado estos análisis en peces mostrando una disminución de la migración reciente en comparación con la migración histórica (SAMARASIN et al., 2017; VERA-ESCALONA et al., 2018). Pero, en el caso de Itaipú, el contexto es diferente, como ya relatado anteriormente, la presencia de la represa hidroeléctrica y del canal de Piracema, posiblemente estén conectando poblaciones que históricamente estuvieron aisladas. En estudio de Gomez y Pereira (2018), con el pez migrador *Pseudoplatystoma corruscans*, aguas abajo y aguas arriba de la represa de Itaipú, se observó que la migración reciente es cinco veces más alta que la migración histórica, posiblemente debido a la conexión reciente por la presencia de Itaipú. En este sentido, los análisis de migración son muy importantes, porque pueden revelar tanto la pérdida de conexión en poblaciones históricamente conectadas, como también el surgimiento de conexión en poblaciones históricamente separadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Mediante lo expuesto el objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad y estructuración genéticas y las tasas de migración de la especie *S. brasiliensis*, aguas arriba y aguas debajo de la barrera de Itaipú Binacional, para testar la hipótesis de que pertenecen a poblaciones genéticamente diferentes.

2.2 Objetivos específicos

- Analizar los índices de diversidad y estructuración genéticas y las tasas de migración histórica y reciente de las poblaciones de *S. brasiliensis*, aguas arriba y aguas abajo del reservorio de Itaipú;
- Identificar los individuos en tránsito (migrantes) durante la época de migración y correlacionarlos hacia las probables poblaciones de origen para evaluar la migración de *S. brasiliensis* entre las eco regiones del Bajo y Alto Paraná;
- Analizar el papel del canal de Piracema, como corredor biológico conectando las poblaciones de aguas arriba y aguas abajo.

3 METODOLOGÍA

3.1 Obtención de muestras.

Las muestras de *S. brasiliensis* fueron obtenidas en colaboración con la empresa Itaipú Binacional y con busca activa junto a pescadores. Los organismos fueron capturados durante la época de migración, conocida como *piracema*, la cual va desde octubre a enero. Los individuos fueron capturados durante las migraciones de 2015 a 2018.

Los organismos fueron capturados en ocho localidades diferentes, siendo estas: Ayolas (A), elevador de la hidroeléctrica de Yacretá (Y), río Paraná en Ciudad del Este (CE), Canal de Piracema (CP), Reservorio del lago de Itaipú (R), río Paraná en Guaíra (G), río Paraná en la región de Ilha Grande (IG) y en la usina hidroeléctrica de Porto Primavera (PP) (Fig .6). Las muestras de Ayolas y Ciudad del Este fueron donadas por pescadores de la región, mientras tanto, el resto de muestras fueron obtenidas por Itaipú mediante la captura y posterior soltura de los especímenes. Las muestras de tejido fueron obtenidas de un fragmento de la aleta adiposa o de individuos en estado larval (IG) y posteriormente fijadas y guardadas en alcohol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Veinte e seis muestras adicionales de especímenes encontrados aguas arriba y aguas abajo de la represa de Itaipú fueron obtenidas como secuencias de ADN depositados en el banco de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Fig. 6) (Anexo 1).

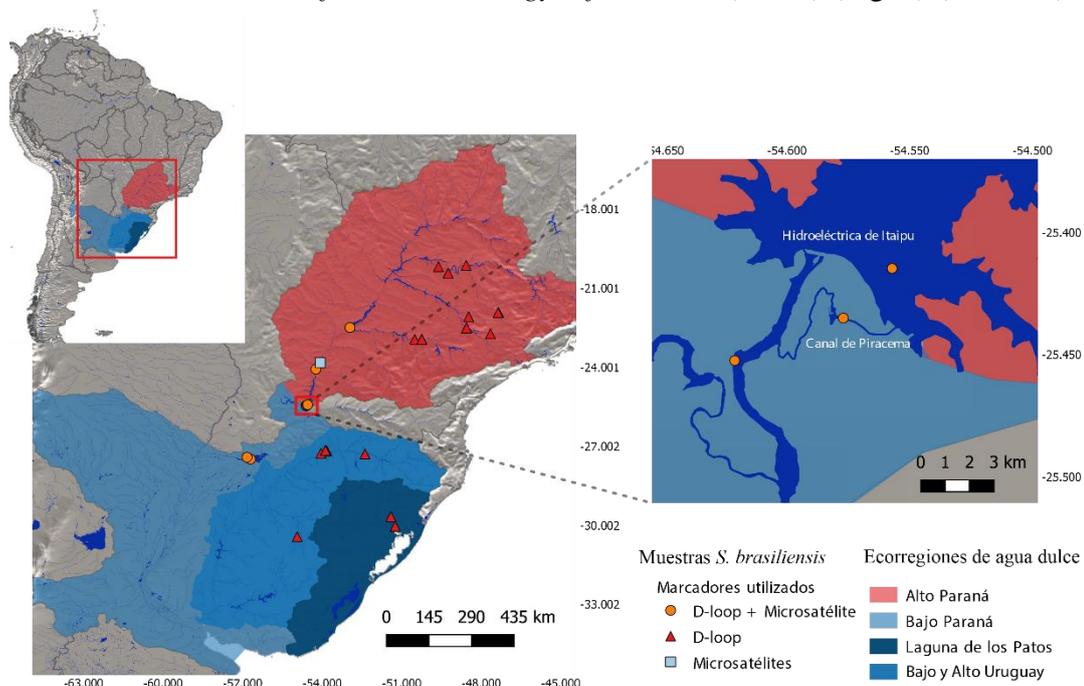


Figura 6. Ubicación de las muestras de individuos de *S. brasiliensis* y el tipo de marcador molecular obtenido. El mapa fue elaborado en el *software QGIS* (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de ríos y lagos obtenidos en HydroSheds (LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008), y la división de eco-regiones de agua dulce de Abell y colaboradores (2008).

3.2 Obtención de datos moleculares.

3.2.1 Extracción de ADN

El ADN fue obtenido haciendo uso de kits comerciales de extracción (*Promega y Sigma*). Posteriormente, el producto de la extracción fue verificado en un gel de agarosa al 0,8% y almacenado a 4°C.

3.2.2 Marcador de ADNmt (D-Loop)

Para acceder a los índices de diversidad y estructuración poblacional, fue utilizado un fragmento de la región mitocondrial D-Loop. Para amplificar esta región, fueron utilizados los *primers* 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' (CRONIN, et al, 1993), 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (MEYERE et al, 2001). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 12,5 µL, conteniendo 8,15 µL de agua, 1,25 µL de *buffer* 10X, 0,5 µL de cada *primer*, 0,5 µL de dNTP, 0,5 µL de MgCl₂, 0,1 µL de *Taq Platinum* y 1,0 µL del ADN molde. La amplificación del fragmento de ADN se realizó con la desnaturalización inicial de 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 1,15 minutos, y al final, una etapa de extensión de 72°C por 10 minutos. El producto de cada PCR fue verificado en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, las muestras amplificadas por PCR fueron sometidas a la reacción de secuenciamiento de forma independiente para cada filamento (F y R), utilizando el kit “*Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems). Consecutivamente el producto de la reacción de secuenciamiento fue purificado por precipitación en EDTA/Acetato de sodio/Etanol y analizado en un secuenciador de ADN automático, modelo ABI 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Geneious® 7.1.3 para la obtención de las secuencias consenso. Para verificar la existencia de contaminantes (ADN exógeno), las secuencias fueron sometidas al programa BLAST, disponible en el sitio web NCBI <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) disponible online <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>>.

3.2.3 Marcadores de microsatélites

Se utilizaron 11 marcadores de microsatélites descritos para la especie *S. brasiliensis*, Sbra04, Sbra05, Sbra07, Sbra09, Sbra20, Sbra36, Sbra38 (CAO et al., 2016), Sfra4 (ROSSINI et al., 2010), Sm16, Sm17 y Sm41 (RUEDA et al., 2011).

Las reacciones de PCR, fueron realizadas mediante la reacción de multiplex PCR, las cuales fueron montadas haciendo uso del software *Multiplex Manager V1.2* (HOLLELEY; GREERTS, 2009). En este sentido, se montó tres reacciones de multiplex con los *primers* que presentaban compatibilidad, siendo estos Mix1 (Sbra20 y Sbra05), Mix2 (Sbra38 y Sbra09) y Mix3 (Sbra36 y Sbra7). Los otros *primers* fueron amplificados solos.

Para conducir el proceso de obtención de genotipos en los pasos posteriores, fue utilizada la técnica de análisis de fragmentos marcados con fluorescencia. Para eso, el *primer Forward* de cada marcador fue preparado de acuerdo a la metodología planteada por Schuelke (2000), mediante la cual se adiciona una cauda M13. Fueron obtenidos *primers* M13 marcados con las fluorescencias FAM, HEX y CY3 para posterior marcación de los productos de la PCR de cada *primer*. Previamente a la realización de las reacciones de PCR, las fluorescencias para cada marcador fueron seleccionadas, de modo que posibiliten la mezcla de los productos de diferentes marcadores para la etapa de análisis de fragmentos en el secuenciador, los cuales formaran tres grupos (Tab. 1)

Tabla 1. Resumen metodológico en la obtención de datos de microsatélites.

Grupos de Secuenciamento	Fluorescencia	Mix	Primer	Temperatura (°C)	Tamaño (pb)
GrupoA	CY3	Mix1	Sabra20	51	156-181
	CY3	Mix1	Sabra5	51	216-287
	FAM	MIX2	Sabra38	50	72-112
	FAM	MIX2	Sabra9	50	137-170
	HEX		Sm41	50	168-172
GrupoB	CY3	Mix5	Sabra36	51	79-113
	CY3	Mix5	Sabra7	51	160-227
	HEX		Safra4	53	200-250
GrupoC	FAM		Sabra4	50	215-276
	CY3		Sm17	50	196-234
	HEX		Sm16	50	135-148

Las reacciones de la PCR fueron conducidas en un volumen final de 12,0 μ L, en la cual, variaron las concentraciones de *primers* y agua, dependiendo de cada reacción, manteniendo

1,25 μL de *buffer* 10X, 0,5 μL de dNTP, 0,5 μL de MgCl_2 , 0,1 μL de *Taq Platinum* y 1,0 μL del ADN molde. Para las PCR con un solo marcador de microsatélite (Sm41, Safra4, Sabra4, Sm17, y Sm16), se completó la reacción con 0,5 μL de *primer R*, 0,125 μL de *primer F*, 0,5 μL de *primer* con fluorescencia (FAM, HEX o CY3) y 8,02 μL de agua. Para el Mix 1 se completó con 0,5 μL de *primer R* Sabra5, 0,125 μL de *primer F* Sabra5, 0,4 μL de *primer R* Sabra20, 0,1 μL del *primer F* Sabra20, 0,9 μL de *primer* con fluorescencia (CY3) y 7,125 μL de agua. Para el Mix2 se completó con 0,5 μL de *primer R* Sabra9, 0,125 μL de *primer F* Sabra9, 0,1 μL de *primer R* Sabra38, 0,05 μL del *primer F* Sabra38, 0,6 μL de *primer* con fluorescencia (FAM) y 7,125 μL de agua. Para el Mix3 se completó con 0,5 μL de *primer R* Sabra36, 0,125 μL de *primer F* Sabra36, 0,4 μL de *primer R* Sabra7, 0,1 μL del *primer F* Sabra7, 0,9 μL de *primer* con fluorescencia (CY3) y 7,125 μL de agua.

Las reacciones de PCR, se realizaron en dos pasos, en el primero se amplificó el fragmento de interés, y en el segundo se realizó la marcación con el *primer* marcado con fluorescencia. En el primer paso, el proceso inicia con la desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, posteriormente un ciclo de unión de *primer* (la temperatura varía dependiendo de cada *primer* según lo mostrado en la tabla 1) por 30 segundos y consecuentemente a 72°C por 30 segundos. Después de los 30 ciclos iniciales, la PCR era pausada para colocar los el *primers* marcado con fluorescencia (Tab. 1), para posteriormente continuar la reacción por más 12 ciclos, con 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos y finalmente con un ciclo de extensión a 72°C por 20 minutos. Posteriormente, las reacciones de PCR fueron verificadas en un gel de Agarosa al 3%.

Posterior a las reacciones de PCR, las muestras fueron agrupadas dependiendo del tamaño y fluorescencia (Tab. 1), en un volumen final de 10 μL , conteniendo 0,5 μL de cada muestra de PCR, 0,5 μL de marcador de peso molecular GeneScan 350 ROX y el volumen faltante de Formamida Hi-Di. Consecutivamente las muestras fueron analizadas en un secuenciador automático ABI PRISM 3500-XL (Applied Biosystems). Los alelos de los diferentes loci y el montaje de los genotipos fueron obtenidos en el programa *Geneious*® 7.1.3, haciendo uso del complemento para microsatélite.

3.3 Análisis genéticos intra-poblaciones

3.3.1 Variación genética en las secuencias D-Loop

Para los análisis de diversidad genética con las secuencias D-Loop, fueron considerados 18 locales de muestreo, siendo que algunas localidades fueron juntadas, en base dos criterios, proximidad geográfica y compartimiento de haplotipos, esto con el fin de aumentar el número de muestras dentro de los grupos (Tab. 2). Con la información genética del ADNmt fue mensurado el número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) usando el programa DnaSP v5.10 (Rozas e Rozas, 1995). Los índices de diversidad fueron obtenidos para todas las muestras, y para cada localidad.

3.3.2 Variación genética en microsatélites

El número de alelos, número de alelos efectivos, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, índice de fijación y equilibrio de Hardy-Weinberg fueron obtenidos con el *software* GenAlEx 6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Las frecuencias de alelos nulos se calculó de acuerdo a Dempster et al, (1977), haciendo uso del *software* FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2006).

3.4 Análisis genéticos inter-poblacionales

3.4.1 Análisis de agrupamientos naturales

Para identificar los agrupamientos naturales en las muestras se realizó un Análisis Discriminantes de Componentes Principales (DAPC), tanto para las secuencias D-Loop, como para los microsatélites. El análisis de DAPC, es un método multivariado diseñado para identificar y describir grupos de individuos relacionados genéticamente, permitiendo extraer información genética, asignando individuos a grupos, dando una visualización de la diferenciación entre poblaciones y la contribución de los alelos individuales a la estructuración poblacional en dos dimensiones (MUNIZ et al., 2019). El análisis de DAPC fue realizado en el *software* R, haciendo uso del complemento *adegenet v2.1.1* (JOMBART, 2008; JOMBART; AHMED, 2011). No obstante, con el fin de comparar los resultados y determinar de mejor manera los grupos naturales que serán utilizados en los análisis posteriores, se realizó también un análisis de hierBAPS (BENTLEY et al., 2018; CHENG et al., 2013) en el *software* R, con el complemento *rhierbaps v. 1.1* (BENTLEY et al., 2018), para las secuencias D-Loop, y un análisis de agrupamientos bayesianos en el *software* STRUCTURE v. 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) para los datos de microsatélites. El análisis de agrupamientos

bayesianos del STRUCTURE, se realizó explorando varios valores de K (1 hasta 5), mediante diez ejecuciones independientes, con cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) de 3×10^5 y *burn in* de 10^6 . El valor de K para el análisis de hierBAPS fue obtenido por el análisis con un enfoque jerárquico, por otro lado, el valor de K en el structure es detectado por el por el análisis del software STRUCTURE HARVESTER, disponible online <<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>> (EARL; VONHOLDT, 2012).

El gráfico de los resultados del hierBAPS, se realizó en el software R, en base a la frecuencia de los *clusters* para cada muestra, y para los resultados del STRUCTURE se utilizó el *POPHELPER Structure Web App v1.0.10* disponible online <<http://www.pophelper.com/>>.

3.4.2 Estructura genética entre el Alto y Bajo Paraná

Una vez determinado los agrupamientos naturales y descartando los grupos conflictivos (ver en los resultados), se realizaron análisis de estructuración genética para las muestras del Alto y Bajo Paraná con un enfoque clásico, basado en los valores de F_{ST} , para microsatélites y Φ_{ST} para las secuencias D-Loop, y otro enfoque basado en estadística bayesiana con los análisis de hierBAPS y agrupamientos bayesianos en el STRUCTURE (para las secuencias D-Loop y microsatélites respectivamente).

Los análisis basados en estadística bayesiana se realizaron con los mismos parámetros ya descritos. No obstante, para identificar gráficamente los *clusters*, se realizó una red de haplotipos en el programa PopART (LEIGH; BRYANT, 2015), utilizando la metodología de *Median-Joining Networks*, en el cual se incluye nodos para representar secuencias inferidas, y de esta manera, acortar la longitud de la red (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999). Además, se realizó un dendrograma en el software MEGA (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2016), mediante la metodología de *neighbor-joining*, utilizando como modelo de sustitución Jukes-Cantor (Seleccionado en el ModelTest con el criterio corregido de Akaike). La información del BAPS, fue acoplado al árbol en el *software R* con el paquete *phytools* y *ggtree* (REVELL, 2012; YU et al., 2017).

Los valores de Φ_{ST} par a par fueron obtenidos en el programa *Arlequin v.3.5.2.2* (EXCOFFIER; LISCHER, 2015). Los valores de F_{ST} , se realizaron con el método ENA, que corrige la presencia de alelos nulos como una medida en la estructuración genética, el cual es implementado en el *software* FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2006). Se realizó también el

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), para las secuencias D-Loop y microsatélites, para obtener los valores de significancia estadística y las proporciones de variación dentro y entre los grupos del Alto y Bajo Paraná, en el programa *Arlequin v.3.5.2.2* (EXCOFFIER; LISCHER, 2015).

3.4.3 Migración histórica y reciente entre el Alto y Bajo Paraná

Para evaluar la migración histórica se utilizó el software MIGRATE-n, v.3.6.11 (BEERLI, 2016), que evalúa la migración de $\sim 4N_e$ generaciones pasadas. El resultado del MIGRATE-n es la tasa de migración escalonada por mutación $M=(m/\mu)$ basándose en un enfoque de máxima verosimilitud y MCMC (SAMARASIN; SHUTER; RODD, 2016). Siguiendo las recomendaciones planteadas por el autor, el análisis se realiza dos veces. En el primero se obtiene los valores de M y θ utilizando los valores de F_{ST} como parámetro inicial del cálculo. En el segundo análisis los valores obtenidos de M y θ del primer análisis son insertados como parámetros iniciales. Ambos análisis fueron conducidos con 10 *short chains* con 5×10^3 muestras y *burn-in* de 10^3 seguidas de tres *long chains* con 5×10^5 muestras y *burn-in* 10^3 en dos replicas independientes. Debido al alto requerimiento computacional, los análisis se realizaron en la página web CIPRES < <https://www.phylo.org/portal2/login!input.action> >.

Para obtener la tasa de migración reciente (3-5 generaciones), se utilizó el *software* BAYESASS v.3.0.4 (WILSON; RANNALA, 2003). Este análisis utiliza un enfoque bayesiano con MCMC, para estimar la tasa de migración contemporánea en migrantes por generación. Inicialmente se realizó corridas exploratorias para ajustar los valores de *delta* (a = frecuencia alélica; f = coeficiente de apareamiento; y m = tasa de migración) para garantizar que los valores de aceptación para que cada estimador quede entre 20-60% como recomiendan los autores. Posteriormente, la ejecución del software se realizó con 10^7 interacciones y *burn in* de 10^6 . Para comparar las tasas de migración reciente e histórica, se siguió el protocolo planteado por Gibbs y Chiuichi (2010), que utiliza los valores de m , del BAYESASS, y estima los valores de m para el MIGRATE-n a partir de los valores de $M(m/\mu)$, considerando la tasa de mutación para microsatélites de $\mu=5 \times 10^{-4}$.

3.4.4 Identificación de migrantes

Debido al ruido que presentaron las muestras de CE, CP y R en los primeros análisis, muy probablemente por la gran cantidad de migrantes, las muestras fueron separadas de los análisis anteriores y analizadas en este tópico.

Llevando en consideración el papel del Canal de Piracema como corredor biológico que conecta las poblaciones del Alto y Bajo Paraná, se evaluó el número de migrantes pertenecientes en las localidades de CE, CP y R, utilizando las secuencias D-Loop y microsatélites, mediante los análisis de hierBAPS y agrupamientos bayesianos en el STRUCTURE, respectivamente. Los análisis se realizaron utilizando los parámetros ya expuestos. Para determinar los migrantes en los resultados del STRUCTURE, se atribuyó la pertenecía a cada *cluster* cuando este sobrepaso el 50% de semejanza.

4 RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de tejido y ADN de 162 individuos de la especie *S. brasiliensis*, de ocho localidades en el entorno de la represa del Itaipú Binacional (Tab. 2 y Anexo 1). Fue posible amplificar, por PCR, el fragmento de la secuencia D-Loop de 120 individuos, los cuales resultaron en 99 secuencias de buena calidad, pertenecientes a siete localidades distintas (A, Y, CE, CP, R, G, PP) (Anexo 1). Las secuencias obtenidas se sumaron otras 26 secuencias D-Loop, descargadas del NCBI, pertenecientes a individuos de la especie *S. brasiliensis* capturados en diferentes localidades aguas arriba y aguas abajo de la represa de Itaipú (Anexo 1). Al final se obtuvo 125 secuencias D-Loop con el tamaño final del fragmento utilizado de 435 pares de bases. Para el marcador de tipo microsatélites, fueron genotipados 162 individuos para 11 marcadores (Anexo 1) pertenecientes a ocho localidades (A, Y, CE, CP, R, G, IG y PP).

4.1 Análisis genéticos intra-poblaciones

4.1.1 Variación genética en las secuencias D-Loop

Las secuencias obtenidas resultaron en 59 haplotipos, producto de la presencia de 75 sitios polimórficos. La diversidad nucleotídica (π) global fue de 0,35 y la diversidad haplotípica (H_d) de 0,96. Los valores de diversidad nucleotídica (π) en las muestras, variaron de 0,00 a

0,36, y la diversidad haplotípica (Hd) varió de 0,00 a 1. El grupo de Ayolas y Yacyretá presentaron mayor número de haplotipos (28) y la muestra formada por Porto Primavera y Paranapanema presentaron mayor diversidad nucleotídica (0,36). La muestra formada por la cuenca del río Uruguay (U), río Ibicuí da Amada (I) y Jacuí (J) presentaron mayor diversidad haplotípica (1,00) (Tab. 2).

Tabla 2. Diversidad genética de *Salminus brasiliensis* obtenidas a partir de ADNmt. NSb – número de individuos de *S. brasiliensis*, H – número de haplotipos, π – Diversidad nucleotídica, Hd – diversidad haplotípica.

Numero	Localidades	NSb	H	π	Hd
1	Uruguay (U), Ibicuí da Amada (I), Jacuí (J)	8	8	0,21	1
2	Ayolas (A), Yacyretá (Y)	36	28	0,22	0,98
3	Ciudad del Este (CE)	13	12	0,15	0,98
4	Canal de Piracema (CP)	25	19	0,3	0,97
5	Reservorio (R)	10	8	0,25	0,95
6	Guairá (G) Paraná (P)	14	7	0,23	0,84
7	Porto Primavera (PP), Paranapanema (PNM)	8	6	0,36	0,92
8	Turvo (Tu), Grande (Gr), Mogi-Guaçu (MG)	7	5	0,05	0,9
9	Jacaré-Pepira (JP), Tietê (T), Piracicaba (Pi)	4	1	0	0
TOTAL		125	59	0,35	0,96

4.1.2 Variación genética en microsatélites

Los 11 marcadores microsatélites utilizados presentaron un total de 97 alelos, variando de 2 a 13 alelos por locus, con un promedio de 8,8 alelos (Tab. 3). El número de alelos efectivos vario de 1,32 a 8,19 (Tab. 3). La heterocigosidad observada vario de 0,154 a 0,900 y la heterocigosidad esperada de 0,204 a 0,840 (Tab. 3). El índice de fijación (F) vario de -0,915 a 1 (Tab. 3). En las muestras se detectaron desviaciones significativas al HWE ($P < 0,05$) para 35 locus en siete localidades (Tab. 3). Las frecuencias de alelos nulos, por el software FreeNA, oscilaron entre 0,0 a 0,35 (Tab. 3).

Tabla 3. Resumen de datos de microsatélite para las muestras de *S. brasiliensis*. Las siglas corresponden a cada población siendo estas A- Ayolas, Y - Yacyretá, CE - Ciudad del Este, CP - Canal de Piracema, R - Reservorio, G - Guaira, IG - Ilha Grande y PP - Porto Primavera.

		Sb9	Sb5	Sb20	Sb38	Sm41	Safra4	Sb36	Sb7	Sbra4	sm16	Sm17
A	N	19	19	20	17	20	20	20	20	20	19	20
	Na	10	8	6	9	3	5	7	7	6	2	2
	Ne	5,309	5,597	3,791	6,283	1,421	3,791	3,125	3,687	2,797	1,566	1,882
	Ho	0,632	0,737	0,250	0,529	0,350	0,750	0,400	0,250	0,650	0,263	0,650
	He	0,812	0,821	0,736	0,841	0,296	0,736	0,680	0,729	0,643	0,361	0,469
	F	0,222	0,103	0,660	0,370	-0,181	-0,019	0,412	0,657	-0,012	0,272	-0,387
	HWE	0,00*	0,008*	0,002*	0,039*	0,825	0,966	0,002*	0,000*	0,626	0,236	0,084
	R	0,104	0,053	0,276	0,167	0,000	0,000	0,185	0,276	0,000	0,085	0,000
Y	N	30	31	31	29	31	31	28	30	30	31	30
	Na	10	12	7	9	4	5	7	9	7	2	3
	Ne	6,122	6,141	3,859	5,443	2,546	3,247	5,010	3,579	3,965	1,579	2,247
	Ho	0,667	0,516	0,258	0,793	0,419	0,613	0,393	0,333	0,600	0,419	0,567
	He	0,837	0,837	0,741	0,816	0,607	0,692	0,800	0,721	0,748	0,367	0,555
	F	0,203	0,383	0,652	0,028	0,309	0,114	0,509	0,537	0,198	-0,143	-0,021
	HWE	0,001*	0,000*	0,000*	0,376	0,001*	0,637	0,000*	0,000*	0,028*	0,425	0,976
	R	0,111	0,168	0,273	0,017	0,103	0,030	0,231	0,218	0,085	0,000	0,000
CE	N	17	17	18	18	18	18	18	17	18	18	18
	Na	8	12	6	8	2	5	8	8	5	2	2
	Ne	4,158	7,707	2,365	4,469	1,528	3,240	4,101	3,440	3,057	1,857	1,906
	Ho	0,647	0,882	0,278	0,667	0,444	0,722	0,444	0,412	0,500	0,389	0,556
	He	0,760	0,870	0,577	0,776	0,346	0,691	0,756	0,709	0,673	0,461	0,475
	F	0,148	-0,014	0,519	0,141	-0,286	-0,045	0,412	0,420	0,257	0,157	-0,169
	HWE	0,771	0,712	0,001*	0,008*	0,225	0,493	0,003*	0,000*	0,008*	0,505	0,474
	R	0,047	0,000	0,199	0,057	0,000	0,000	0,182	0,169	0,127	0,052	0,000
CP	N	24	26	26	25	26	26	26	26	25	25	25
	Na	9	13	4	9	4	5	8	10	6	2	3
	Ne	4,861	8,194	2,327	7,102	1,688	3,512	5,180	6,318	2,841	1,771	2,080
	Ho	0,792	0,769	0,154	0,840	0,385	0,615	0,500	0,500	0,560	0,480	0,400
	He	0,794	0,878	0,570	0,859	0,408	0,715	0,807	0,842	0,648	0,435	0,519
	F	0,003	0,124	0,730	0,022	0,056	0,140	0,380	0,406	0,136	-0,103	0,230
	HWE	0,677	0,523	0,000*	0,539	0,043*	0,064	0,000*	0,000*	0,657	0,607	0,461
	R	0,000	0,043	0,272	0,014	0,005	0,078	0,176	0,193	0,021	0,000	0,073
R	N	10	11	11	11	11	11	11	9	10	11	10
	Na	8	6	6	9	2	4	7	9	5	2	3
	Ne	5,556	2,847	3,723	6,914	1,424	2,305	4,654	7,714	3,571	1,984	1,942
	Ho	0,900	0,636	0,545	0,909	0,364	0,545	0,364	0,778	0,700	0,545	0,400
	He	0,820	0,649	0,731	0,855	0,298	0,566	0,785	0,870	0,720	0,496	0,485
	F	-0,098	0,019	0,254	-0,063	-0,222	0,036	0,537	0,106	0,028	-0,100	0,175
	HWE	0,925	0,042*	0,239	0,163	0,461	0,680	0,001*	0,278	0,918	0,740	0,445
	R	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000	0,000	0,233	0,074	0,003	0,000	0,034
G	N	9	9	9	8	9	9	9	9	9	9	9
	Na	8	7	6	8	3	5	7	6	6	2	3
	Ne	6,231	4,909	3,767	7,111	2,051	3,000	3,857	3,522	3,767	1,528	2,219
	Ho	0,778	0,444	0,556	0,750	0,333	0,778	0,556	0,333	1,000	0,222	0,667
	He	0,840	0,796	0,735	0,859	0,512	0,667	0,741	0,716	0,735	0,346	0,549
	F	0,074	0,442	0,244	0,127	0,349	-0,167	0,250	0,534	-0,361	0,357	-0,213
	HWE	0,320	0,333	0,022*	0,194	0,478	0,860	0,272	0,011*	0,646	0,284	0,606

	R	0,009	0,198	0,096	0,066	0,117	0,000	0,073	0,207	0,000	0,108	0,000
IG	N	43	44	34	41	43	23	38	39	30	44	43
	Na	9	4	7	9	3	4	11	10	6	3	3
	Ne	4,970	2,093	1,990	4,435	1,655	3,276	3,642	6,311	2,699	1,324	2,263
	Ho	0,488	1,000	0,206	0,512	0,395	0,391	0,553	0,462	0,533	0,273	0,860
	He	0,799	0,522	0,497	0,775	0,396	0,695	0,725	0,842	0,629	0,245	0,558
	F	0,389	-0,915	0,586	0,339	0,001	0,437	0,238	0,452	0,153	-0,115	-0,542
	HWE	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,445	0,043*	0,000*	0,000*	0,000*	0,778	0,000*
	R	0,178	0,000	0,212	0,153	0,006	0,174	0,099	0,208	0,079	0,000	0,000
PP	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Na	3	5	2	4	2	3	2	5	3	2	2
	Ne	2,571	4,500	1,800	3,600	1,800	2,571	2,000	4,500	2,000	1,800	1,385
	Ho	0,667	1,000	0,000	1,000	0,000	0,667	0,333	1,000	0,333	0,667	0,333
	He	0,611	0,778	0,444	0,722	0,444	0,611	0,500	0,778	0,500	0,444	0,278
	F	-0,091	-0,286	1,000	-0,385	1,000	-0,091	0,333	-0,286	0,333	-0,500	-0,200
	HWE	0,506	0,532	0,083	0,609	0,083	0,506	0,564	0,532	0,112	0,386	0,729
	R	0,000	0,000	0,315	0,000	0,315	0,000	0,111	0,000	0,001	0,000	0,000

N, número de individuos; Na, número de alelos; Ne, número de alelos efectivos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; F, índice de fijación; HWE, probabilidad de equilibrio de Hardy Weinberg; R, frecuencia de alelos nulos por locus. Los números con * presentan un valor de $p < 0,05$.

4.2 Análisis genéticos inter-poblacionales

4.2.1 Análisis de agrupamientos naturales

En un primer momento, se utilizó el análisis de DAPC para los marcadores moleculares utilizados (D-Loop y microsatélites), lo cual muestra gráficamente las relaciones genéticas entre los individuos de las diferentes muestras, para intentar observar agrupamientos naturales. Los gráficos mostraron la existencia de dos agrupamientos principales, uno con predominio de las muestras del Alto Paraná y otro con predominio de las muestras del Bajo Paraná (Fig. 7). Por otro lado, los gráficos evidencian que las muestras pertenecientes al Canal de Piracema y Reservorio presentan individuos que comparten semejanzas genéticas entre los diferentes grupos (Alto y Bajo Paraná) (Fig. 7). Posteriormente, los análisis de estructuración poblacional por el análisis de hierBAPS, para las secuencias D-Loop, y por el análisis STRUCTURE, para los datos de microsatélites, ratificaron los datos observados en el análisis de DAPC, mostrando la existencia de dos poblaciones ($K = 2$), siendo que las muestras CP y R (Canal de Piracema y Reservorio, respectivamente) son compuestas por una mezcla de individuos pertenecientes a los dos grupos identificados (Fig. 7). Las muestras obtenidas en el Canal de Piracema y Reservorio fueron colectadas durante la época de migración, por lo que, muy probablemente, representan individuos transitorios. Por lo tanto, serán consideradas, en este trabajo, como poblaciones en tránsito.

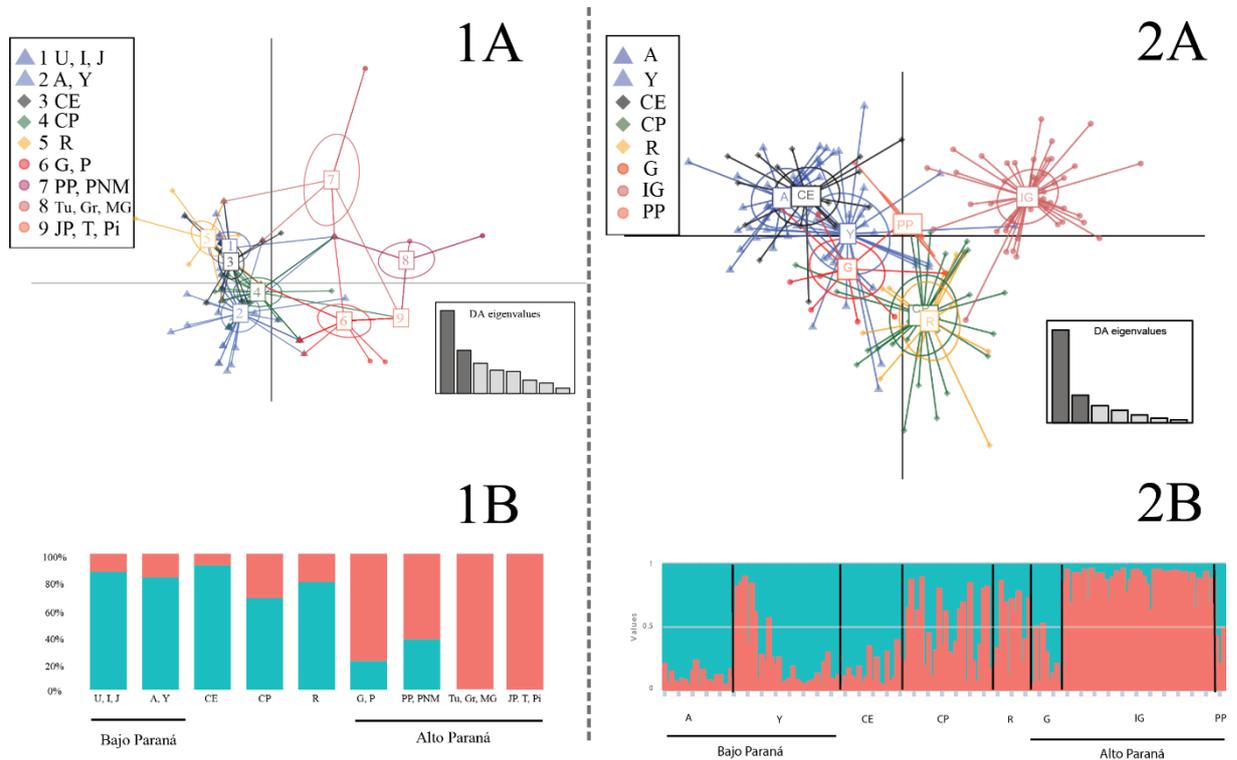


Figura 7. Análisis de estructuración genética para los marcadores D-Loop y microsatélites. 1A - DAPC para las secuencias D-Loop (la numeración corresponde a las muestras presentadas en la Tabla 2). 2A - DAPC para los datos de microsatélites. 1B - Análisis de hierBAPS para las secuencias D-Loop, mostrando la frecuencia de individuos de cada muestra en cada cluster. 2B - Análisis de agrupaciones Bayesianas del STRUCTURE, mostrando la probabilidad de pertinencia de los individuos de cada muestra a cada cluster ($K = 2$, determinado por el STRUCTURE HARVESTER); cluster azul = Bajo Paraná y cluster rojo = Alto Paraná.

En base a los resultados presentados hasta el momento, se evidencia la presencia de dos agrupamientos, atribuidas a las diferentes eco-regiones de agua dulce (Alto y Bajo Paraná), lo cual queda más evidente en una segunda DAPC, excluyendo CE, CP, y R (Fig. 8). En este sentido, de aquí en adelante serán consideradas las localidades que se encuentran aguas abajo de la represa de Itaipú como Bajo Paraná (Ayolas y Yacyretá con los microsatélites) (Uruguay, Ibicuí da Amada, Jacuú, Ayolas y Yacyretá para el D-Loop) y las localidades que se encuentran aguas arriba de la represa como Alto Paraná (Guaira, Ilha Grande y Porto Primavera para microsatélites) (Guaira, Porto Primavera, Paranapanema, Turvo, Grande, Mogi-Guaçu, Jacaré-Pepira, Tietê y Piracicaba para el D-Loop). De la misma forma, las muestras del Canal de Piracema, Reservorio y Ciudad del Este, debido a la presencia de “migrantes”, serán consideradas muestras en tránsito y no entrarán en los análisis de estructuración poblacional. La muestra de Ciudad del Este fue incluida en este último grupo, a pesar de agrupar con las

muestras del bajo Paraná, debido a la proximidad geográfica con la Barrera de Itaipú, por lo que, probablemente, podría estar formado por individuos en tránsito.

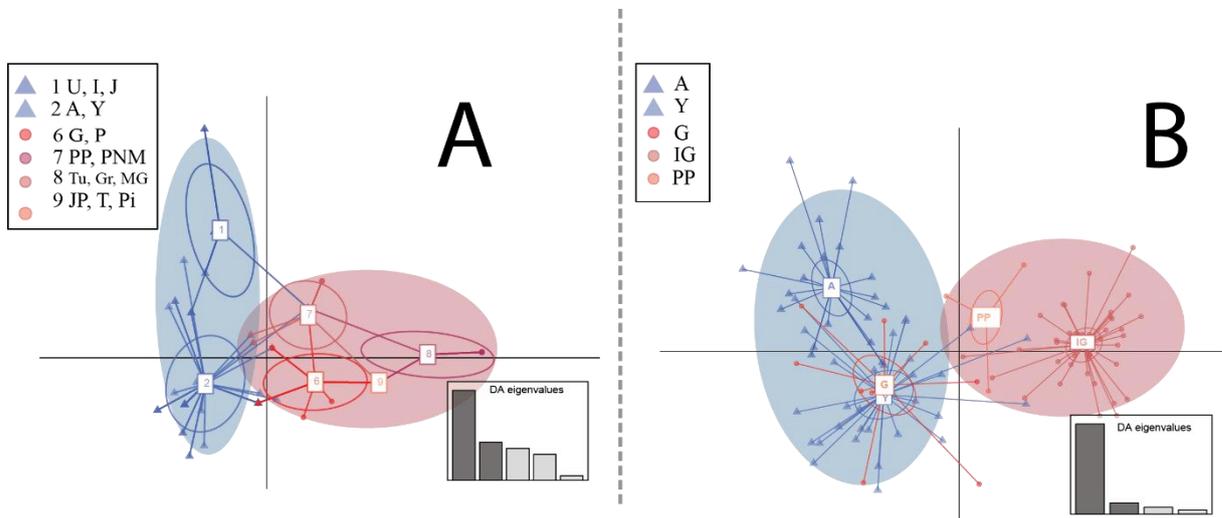


Figura 8. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) para los marcadores D-Loop y microsatélites. A - DAPC para las secuencias D-Loop sin CE, CP y R. La numeración de la figura 1A corresponde a las muestras presentadas en la Tabla 2. B - DAPC para los datos de microsatélites excluyendo CE, CP, y R. En las figuras, el círculo azul representa las muestras del Bajo Paraná y el círculo rojo a las muestras del Alto Paraná.

4.2.2 Estructura genética entre el Alto y Bajo Paraná

Utilizando los agrupamientos de muestras indicados en el tópico anterior, los análisis de hierBAPS (D-Loop) y agrupamientos Bayesianos realizado por el *STRUCTURE* (microsatélites), muestran la presencia de dos *clusters*, siendo el *cluster 1* atribuido al Bajo Paraná y el *cluster 2* al Alto Paraná (Fig. 9).

Para las secuencias D-Loop, los dos *clusters* están separados por 38 pasos mutacionales, representado en la red de haplotipos (Fig. 9 – 2A), lo cual se relaciona, con la gran distancia genética mostrada en el dendrograma que se obtiene en el resultado del análisis de hierBAPS (Fig. 9 - 1A). Atribuyendo a cada muestra su ubicación en las diferentes eco-regiones de agua dulce donde fueron capturados, se puede identificar la predominancia de organismos capturados en el Bajo Paraná (80%) en el *cluster 1* y en el Alto Paraná (79%) en el *cluster 2* (Fig. 9-2A). En este sentido, asumo que, el *cluster 1* corresponde a un linaje genético perteneciente al Bajo Paraná, y el *cluster 2* a otro linaje genético perteneciente al Alto Paraná. Sin embargo, a pesar de existir estos grupos bien marcados, existen algunos individuos dentro de cada población que se atribuyen al linaje de la otra población, los cuales asumo como “migrantes” (Fig. 9-2A).

Para los datos de microsatélites también fueron recuperados los mismos dos clústeres ($K = 2$), siendo que el *cluster 1* es representado por 88,24% de organismos pertenecientes a las muestras colectadas en el Bajo Paraná y el *cluster 2* es representado por el 88,24% de organismos pertenecientes a las muestras colectadas en el Alto Paraná (Fig. 9-B). En este sentido, asumo también, que los datos de microsatélites están determinados la estructuración genética de cada eco-región en base a cada *cluster* atribuido. No obstante, en cada localidad se encuentran individuos atribuidos a lo otro clúster, los cuales asumo como “migrantes” (Fig. 9).

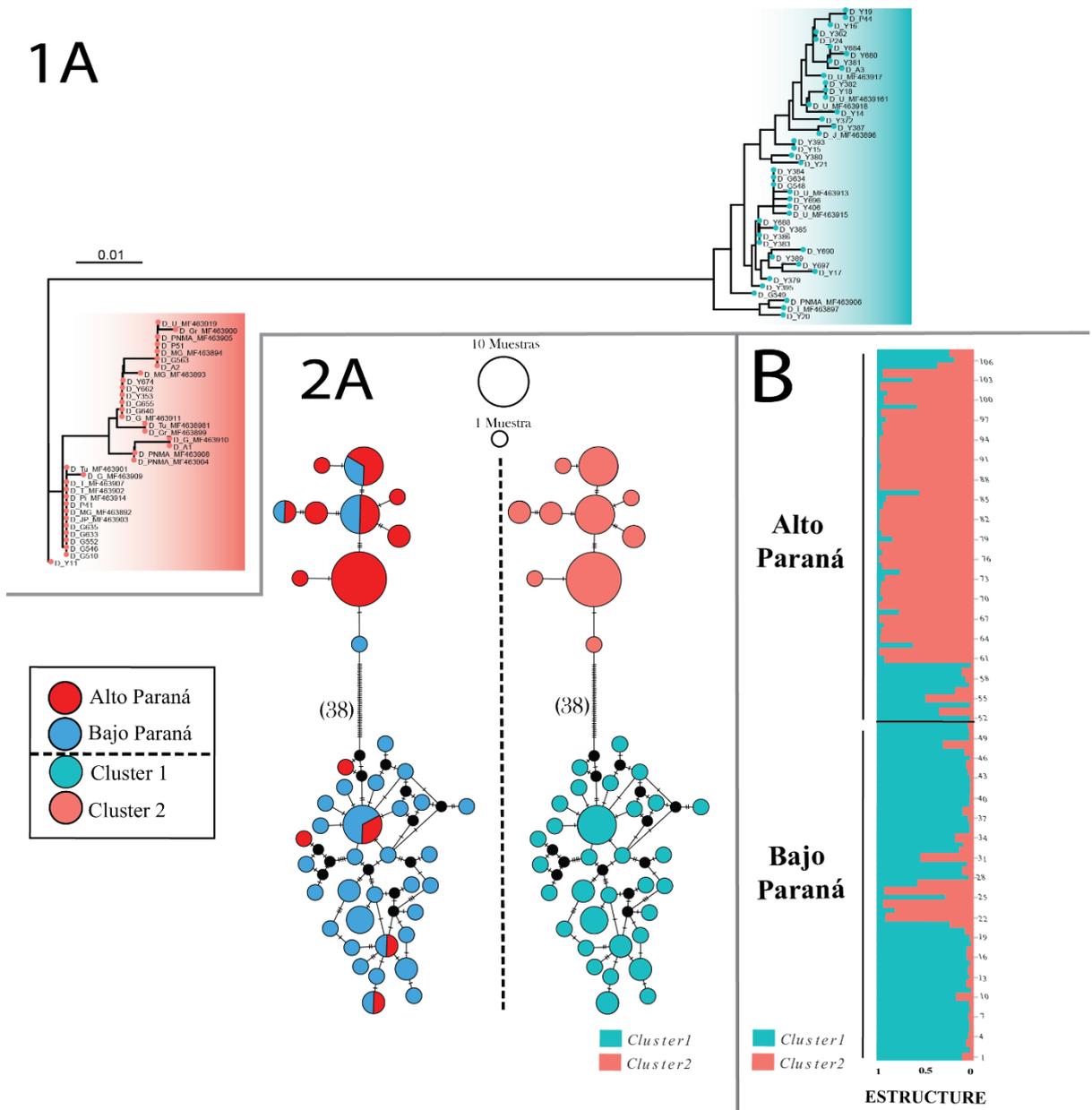


Figura 9. Resultados de la estructuración genética para las muestras del Alto y Bajo Paraná. En la figura 1A se muestra el resultado del análisis de hierBAPS en un dendrograma. La figura 2A muestra los resultados del hierBAPS en una red de haplotipos (derecha) y de la ubicación de captura de cada individuo en las diferentes eco-regiones de agua dulce (izquierda). En la figura B se presenta el resultado del análisis de agrupación Bayesiana del STRUCTURE ($K = 2$ determinado por el STRUCTURE HARVESTER).

Los índices de estructuración poblacional F_{ST} (con corrección de ENA, para microsatélites) y Φ_{ST} (para las secuencias D-Loop) entre los agrupamientos de Alto y Bajo Paraná, presentaran valores de 0,067 y 0,063, respectivamente, con $p < 0,05$ (Tab. 4).

Tabla 4. Matriz de distancias genética en pares, F_{ST} con corrección ENA para microsatélites y Φ_{ST} para D-Loop

Φ_{ST} F_{ST}	Bajo Paraná	Alto Paraná
Bajo Paraná	0	0,063*
Alto Paraná	0,067*	0

Los números con * presentan un valor de $p < 0,05$

El AMOVA entre las dos poblaciones para los datos de microsatélites muestra que la mayor variación se encuentra dentro de las muestras (90,19%) y la menor variación entre los grupos (4,32%). No obstante, para los datos de mtADN, la mayor variación se encuentra entre los grupos (50,87%) y la menor variación entre las muestras dentro de los grupos (1,04%) (Tab. 5).

Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las muestras de *S. brasiliensis*, entre grupos (Alto y Bajo Paraná), entre muestras dentro de los grupos y dentro de las muestras. Φ_{CT} – Diferencia genética entre grupos, Φ_{SC} - diferencia genética entre muestras dentro de los grupos, Φ_{ST} - dentro de las muestras.

Fuente de Variación	Porcentaje de variación	
	Microsatélites	D-Loop
Entre grupos	4,32	50,87
Entre poblaciones dentro de los grupos	5,48	1,04
Dentro de las muestras	90,19	48,09
	$\Phi_{CT} = 0,043$	$\Phi_{CT} = 0,500$
	$\Phi_{SC} = 0,057^*$	$\Phi_{SC} = 0,021$
	$\Phi_{ST} = 0,098^*$	$\Phi_{ST} = 0,520^*$

Los números con * presentan un valor de $p < 0,05$

4.2.3 Migración histórica y reciente entre el Alto y Bajo Paraná

Con los datos de microsatélites fueron estimados los valores de flujo génico (migración) históricos ($\sim 4N_e$ generaciones) y recientes (2-5 generaciones) entre las poblaciones del Alto y Bajo Paraná, con los *softwares* MIGRATE-n v.3.7.2 y BAYESASS v.3, respectivamente. Las tasas históricas de migración M (m/μ) calculadas por el MIGRATE-n, fueron de 11,09 (10,24-

11,99 – IC 95%) del Bajo al Alto Paraná y de 5,55 (5,10-6,05 – IC 95%) del Alto para el Bajo Paraná (Fig. 10). En base a estos resultados se puede observar que la migración es asimétrica, ya que no existe superposición en los intervalos de confianza (Fig. 10), siendo cerca de dos veces mayor en el sentido del Bajo al Alto Paraná en comparación al otro sentido (Fig. 10). Con el fin de comparar las tasas de migración histórica y reciente obtenida en el MIGRATE-n y BAYESASS, se transformó los valores de migración escalonada por mutación ($M = m/\mu$) a la tasa de migración por generación (m), utilizando la tasa media de mutación para los marcadores de microsatélites de $\mu=5 \times 10^{-4}$, siguiendo el protocolo de Chiuuchi (2010). En este sentido las tasas de migración históricas (m) fueron de 0,55% y 0,27% entre el Bajo - Alto Paraná y Alto – Bajo Paraná, respectivamente (Fig. 10).

La tasa de migración reciente (m), obtenida en el BAYESASS, fue de 5,74% (DP=0,02) en el sentido del Bajo al Alto Paraná y 3,17% (DP = 0,01) en el sentido del Alto al Bajo Paraná (Fig. 10). De la misma forma, se convirtieron las tasas de migración reciente, m , obtenida por el software BAYESASS, para la tasa M (m/μ), resultando en los valores de M de 114,8 y 63,4 del Bajo al Alto Paraná y del Alto al Bajo Paraná, respectivamente (Fig. 10).

De esta manera, se evidencia un aumento de, aproximadamente, 10 veces en las tasas de migración reciente en relación a las tasas de migración históricas en los dos sentidos (Fig. 10).

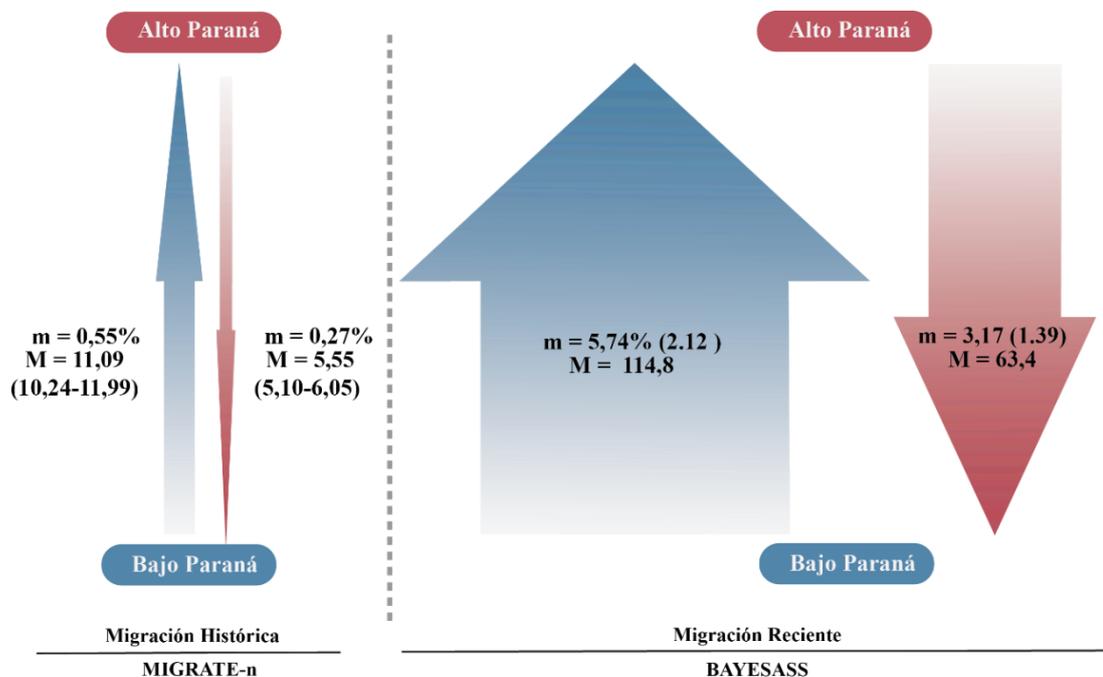


Figura 10. Tasas de migración histórica y reciente de *S. brasiliensis* entre el Alto y Bajo Paraná. M corresponde a la tasa migración escalonada por mutación (m/μ), y m a la tasa de migración. El ancho de las flechas es proporcional a las tasas de migración.

4.2.4 Evaluación del Canal de Piracema como corredor biológico.

Atribuyendo el *clúster 1* al Bajo Paraná y el *cluster 2* al Alto Paraná dados por los análisis de hierBAPS y agrupamientos Bayesianos realizado en el *STRUCTURE*, las muestras obtenidas en el Canal de Piracema y Reservorio mostraron una mezcla de migrantes de ambas poblaciones (Fig. 7). No obstante, Ciudad del Este presento un migrante con las secuencias D-Loop y ninguno con los datos de microsatélites (Fig. 11). En las muestras del Canal de Piracema se presentó una predominancia de individuos de origen genético del Bajo Paraná, tanto para las secuencias D-Loop (68%), como para los datos de microsatélites (58%). Para la muestra del Reservorio, el marcador de mtADN presento mayor número de migrantes del Bajo Paraná (80%) y para los datos de microsatélites, con las mismas muestras, existió una mayor predominancia de individuos con características genéticas del Alto Paraná (54,5%). De modo general, los datos muestran que el Canal de Piracema está siendo utilizado por la especie como corredor migratorio, conectando las dos poblaciones, mediante una migración más acentuada en el sentido del Bajo al Alto Paraná (Fig. 11), lo cual se relaciona con las tasas de migración obtenidas anteriormente.

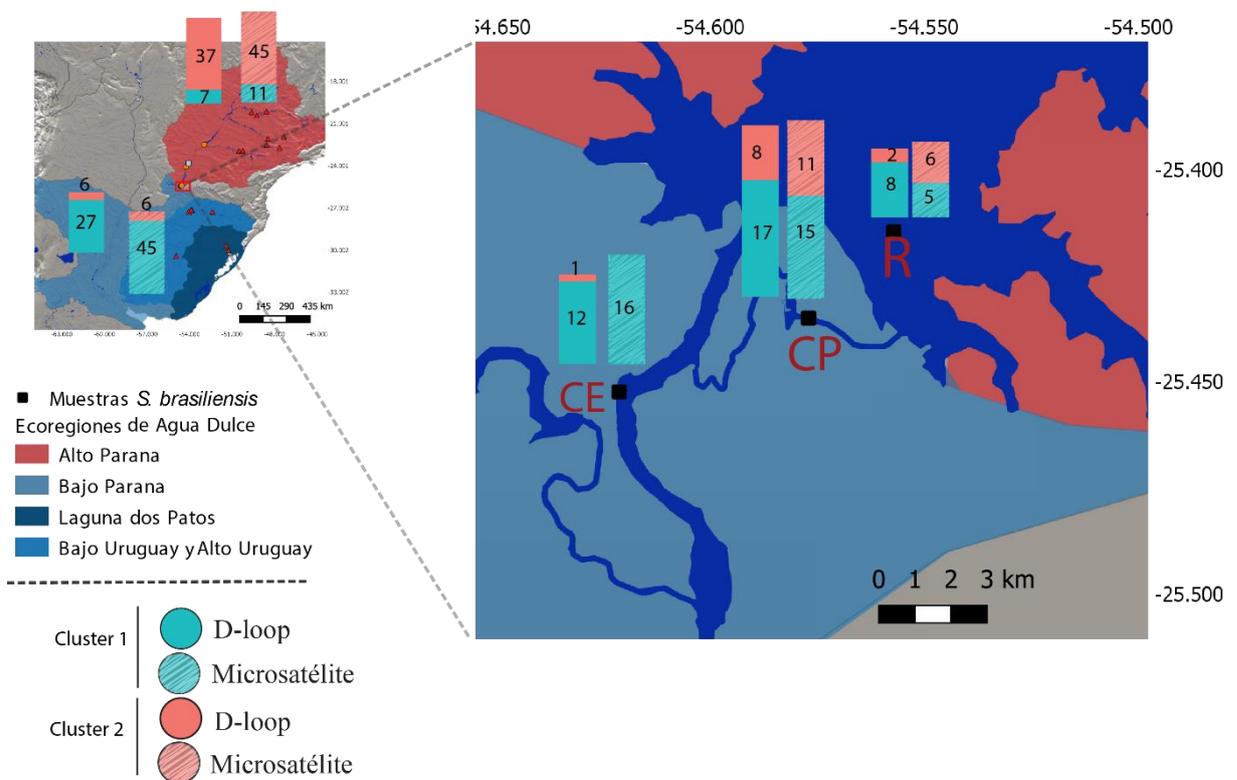


Figura 11. Asignación de población de origen a las muestras encontradas en Ciudad del Este (CE), canal de piracema (CP) y reservorio de Itaipú (R), utilizando las secuencias D-Loop y datos de microsatélites. El mapa fue elaborado en el software *QGis* (QGis DEVELOPMENT TEAM, 2018), haciendo uso de los *shapefiles* de (ABELL et al., 2008; LEHNER; VERDIN; JARVIS, 2008).

5 DISCUSIÓN

5.1 Análisis genéticos intra-poblacionales

5.1.1 Variación genética en las secuencias D-Loop y de los microsatélites

Los marcadores moleculares de origen uniparental y biparental (D-Loop y microsatélites) son muy utilizados para generar información acerca de la variación genética de las especies de interés económico y ecológico en la región Neotropical (ASHIKAGA et al., 2015; FERREIRA et al., 2015, 2017; GALINDO et al., 2019; GÓMEZ; PEREIRA, 2018; PRADO et al., 2018; SILVA et al., 2015; SOUZA-SHIBATTA et al., 2018; VAINI et al., 2016). El conocimiento de la diversidad genética es de vital importancia para la manutención de las especies en peligro de extinción, ya que dicha información direcciona de mejor manera las acciones de gestión de conservación (HILSDORF; HALLERMAN, 2017b). Además, la persistencia a largo plazo de las especies dependen de que la diversidad genética sea la suficiente para adaptarse y sobrevivir a los ambientes cambiantes (HUGHES et al., 2008).

Los resultados con las secuencias D-Loop muestran una alta diversidad genética en las muestras analizadas (Tab. 2) comparado con otros trabajos utilizando la misma especie en la cuenca del Paraná (MONDIN et al., 2018; ROSSO et al., 2017) y otras especies migratorias de la región (BIGNOTTO et al., 2009; GARCEZ; CALCAGNOTTO; DE ALMEIDA-TOLEDO, 2011; MARTINS et al., 2003). La diversidad genética vario entre cada muestra, no obstante, se evidenció un mayor número de haplotipos y diversidad haplotípica en las muestras pertenecientes al Bajo Paraná, esto probablemente debido a la baja fragmentación en la eco-región (Fig. 3). En contra partida, en el Alto Paraná, los valores de diversidad genética fueron inferiores, muy probablemente debido a la gran fragmentación provocada por la presencia de inúmeras centrales hidroeléctricas (Fig. 3). Este patrón no fue observado en el trabajo de Rosso (2017), donde la diversidad haplotípica y el número de haplotipos fue mayor en el Alto Paraná. No obstante, la diferencia en nuestros resultados, pudo deberse al alto número de muestras y la gran amplitud geográfica de muestreo, que abarco más localidades pertenecientes a diferentes eco-regiones de agua dulce comparadas al trabajo de Rosso (2017).

Para los datos de microsatélites, también se evidencia altos niveles de diversidad genética. El promedio de alelos por locus de 8,8, fue un poco inferior a los encontrados por Ribolli y colaboradores (2016) (de 12,9) y Alves (2018) (de 11,7), los cuales, analizaron la

misma especie. Este número medio de alelos por locus también fue inferior a trabajos realizados en la región con otras especies migratorias (ASHIKAGA et al., 2015; FERREIRA et al., 2015, 2017; GÓMEZ; PEREIRA, 2018; PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009a; PRADO et al., 2018; SILVA et al., 2015; VAINI et al., 2016). Estas diferencias pueden ser resultado de los diferentes números de muestras y locus microsatélites utilizados en cada trabajo.

En los datos de microsatélites, la diversidad genética es vista en términos de Heterocigosidad esperada, debido a que esta información se encuentra ligada a procesos de adaptación, donde los valores disminuyen con el aumento de endogamia (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Los valores de Heterocigosidad esperada observados dentro del presente estudio, variaron de 0,204 a 0,84, mostrando así una gran variación entre los locus y las muestras, asemejándose a los resultados encontrados por de Ribolli y colaboradores (2016), donde los valores variaron entre 0,193 y 0,955. No obstante, en los resultados de Alves (2018), se encontró una menor variación, presentando valores entre 0,760 y 0,846. La variación en los valores dentro de la muestra utilizada, puede deberse a la amplitud temporal de algunas muestras, como también al polimorfismo de los loci utilizados.

Por otro lado, el 68% de las muestras presentaron valores positivos para F_{IS} (He - Ho), lo que demuestra una deficiencia de heterocigotos en las muestras. No obstante, este tipo de resultados es común en peces, además, ya ha sido relatado en otros trabajos con *S. brasiliensis* por Rossini (2010) con un 80% y Alves (2018), con 77,7%. Estos valores, por lo general, son asociados a eventos de subdivisión poblacional y endogamia (ALLENDORF, 2017). Según Alves (2018), esta falta de heterocigotos en las poblaciones de *S. brasiliensis*, puede deberse a la pesca excesiva de jóvenes, como también por el aumento de acciones antrópicas causadas por el crecimiento urbano.

Cerca de 40%, de los 88 testes para el equilibrio de Hardy-Weinberg (cada locus para cada muestra) (Tab. 3), muestran desvíos, con valores significativos menores a $p < 0,05$. No obstante, los desvíos al HWE, son comunes en los marcadores de microsatélites (ALVES, 2018). Estos desvíos pueden estar relacionados con el alto número de alelos por locus, ocurrencia de alelos nulos, efectos *stuttering* o *drop-out*, efecto Wahlund, selección de alelos específicos y endocruzamiento (PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009). No obstante, ninguno de los locus presentó desvío de HWE para todas las muestras, así como ninguna muestra presentó desvío para todos los loci (Tab. 3), de forma que todos pudieron ser utilizados en los análisis.

5.2 Análisis genéticos inter-poblacionales

5.2.1 Análisis de agrupamientos y estructuración genética

El análisis de DAPC con todas las muestras, presentó gráficamente la complicada estructura genética entre los grupos muestreados de *S. brasiliensis* en el área de extensión de Itaipú. No obstante, este análisis, que extrae la información genética y permite desentrañar la estructura de poblaciones complejas de forma rápida (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010), permitió identificar las muestras sobrepuestas (CP y R), las cuales, muy probablemente, se debieron al alto número de migrantes. En la actualidad, este enfoque de análisis multivariado se ha mostrado eficiente para representar gráficamente, en dos dimensiones, la estructura y relación genética entre poblaciones de peces de agua dulce, obteniendo resultados coherentes a los generados por los análisis de enfoque Bayesiano (BASIITA; ZENGER; JERRY, 2017; MUNIZ et al., 2019; PRADO et al., 2018; RIBOLLI; ZANIBONI-FILHO; GALETTI, 2018). En este sentido, al realizar el segundo análisis DAPC, excluyendo las muestras de CE, CP y R (Fig. 8), se pudo elucidar, de mejor manera, la estructura y diferenciación entre los grupos pertenecientes a las eco-regiones de agua dulce del Alto y Bajo Paraná.

El análisis de hierBAPS, con las secuencias D-Loop, mostró la presencia de dos linajes atribuidos al Alto y Bajo Paraná, con un alto grado de diferenciación (38 pasos de mutación entre ellos (Fig. 9)). Estudios de filo-geografía utilizando secuencias de otros marcadores moleculares del ADNmt (COI y CytB) y del ADN nuclear (RAG2 y S7) en la misma especie, han llegado a los mismos resultados, demostrando la presencia de dos linajes evolutivos diferentes, pertenecientes también al Alto y Bajo Paraná (MACHADO; GALETTI; CARNAVAL, 2018; MACHADO et al., 2016; ROSSO et al., 2017). Según Machado y colaboradores (2018), la divergencia genética de las poblaciones de *S. brasiliensis* ocurrió hace aproximadamente 0,89 millones de años, como consecuencia del apareamiento de la cascada de Sete Quedas. A pesar del desconocimiento concreto del origen de la cascada de Sete Quedas, según Bartorelli (2004), este pudo haber ocurrido durante el pleistoceno medio hace aproximadamente 1,5 millones de años.

Los análisis en el STRUCTURE, con los datos de microsatélites, mostraron, de igual manera, la presencia de dos *clusters* atribuidos a cada eco-región de agua dulce. Este resultado se repite también en otras especies, como *Pseudoplatystoma corruscans* (GÓMEZ; PEREIRA, 2018; PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009b; PRADO et al., 2018; VAINI et al., 2016), y

P. reticulatum (PRADO et al., 2018; VAINI et al., 2016), donde las poblaciones se encuentran estructuradas, descartando así, la hipótesis de panmixia en el río Paraná.

La utilización de marcadores uniparentales y biparentales pueden dar resultados semejantes (FERREIRA et al., 2015; GALINDO et al., 2019; SOUZA-SHIBATTA et al., 2018), como también mostrar-se discordancias (DIBATTISTA et al., 2012; YANG et al., 2016). No obstante, los marcadores moleculares utilizados (D-Loop y microsatélites) en nuestro trabajo recuperaron el mismo patrón, contando historias evolutivas similares (Fig.9 y 11), dando un mayor sustento a nuestra hipótesis de dos poblaciones.

Por lo general, las secuencias de ADN son analizadas en base a modelos derivados de la estadística F de Wright (WRIGHT, 1950, 1965). En la actualidad se han creado modelos basados en estadística bayesiana para determinar la estructuración genética, como el hierBAPS, que desconsidera el origen de las muestras, consiguiendo elucidar la estructura interna de los grupos y los posibles migrantes dentro de ellos, siendo este resultado comparable con aquellos ofrecidos por el STRUCTURE con datos de microsatélite, el cual es basado en análisis bayesianos (BENTLEY et al., 2018; CHENG et al., 2013). De modo general, el análisis de hierBAPS se mostró eficiente con nuestros datos, aportando resultados semejantes al análisis Bayesiano ejecutado en el STRUCTURE. De esta manera, los resultados se tornaron comparables, mostrando historias parecidas en ambos marcadores. A pesar de que no existen muchos trabajos utilizando el análisis de hierBAPS, los existentes demuestran la eficiencia para determinar la estructura poblacional utilizando secuencias de ADN (HINDLEY et al., 2018; RUBIO-CASTRO; QUIÑONEZ-VELÁZQUEZ; GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2019).

De la misma manera que los análisis de enfoque bayesiano, los índices clásicos de F_{ST} , y Φ_{ST} (Tab. 3), mostraron una estructuración genética entre el Alto y Bajo Paraná. Los valores para ambos índices ($F_{ST}=0,06$ y $\Phi_{ST}=0,06$) muestran una estructuración moderada. Según Wright (1978), valores entre 0 a 0,05 muestran una baja diferenciación genética, de 0,05 a 0,15 una diferenciación genética moderada y de 0,15 a 0,25 una diferenciación genética alta. Otros trabajos utilizando la misma especie, en el pantanal (FREITAS, 2010), río Mogi Guaçu (ALVES, 2018) y río Uruguay (RIBOLLI, 2014) mostraron una baja diferenciación genética ($<0,05$), muy probablemente, por comparar muestras de localidades próximas. No obstante, en muestras del Alto y Bajo Paraná, con la especie *Pseudoplatystoma corruscans*, mostraron valores de F_{ST} de 0,08, demostrando de igual manera, una diferenciación genética moderada entre poblaciones de especies que ocurren en las dos eco-regiones de agua dulce (GÓMEZ; PEREIRA, 2018).

Por otro lado, los análisis de AMOVA no mostró significancia para diferenciar el Alto y Bajo Paraná en ambos marcadores (Tab. 4). En el caso de microsatélites, esto se debe probablemente, al hecho de que las muestras de Guaira y Porto Primavera poseían pocos individuos (Anexo 1), de los cuales, muchos fueron identificados como migrantes (Fig. 7 y 9), y de esta manera, esto pudo acarrear ruido en el análisis. De la misma forma, para las secuencias D-Loop, la estructuración no fue significativa, probablemente, por la presencia de una subestructuración poblacional dentro del grupo del Alto Paraná (datos no mostrados) (Fig. 8).

5.2.2 Migración histórica y reciente entre el alto y bajo Paraná

Para comprender los resultados atribuidos a la migración histórica del MIGRATE-n (~4Ne generaciones) y la migración reciente del BAYESASS (2–5 generaciones pasadas), hay que llevar en consideración dos aspectos importantes en la historia de conexión de las eco-regiones del Alto y Bajo Paraná. Por un lado, históricamente el Alto y Bajo Paraná permanecieron aislados por una barrera natural (la cascada de Siete Quedas) que surgió hace aproximadamente 1,5 millones de años (BARTORELLI, 2004), la cual fue posteriormente substituida por una barrera artificial, en el año de 1983, debido a la construcción de Itaipú. La construcción de la Hidroeléctrica sumergió la barrera natural de Siete Quedas, desplazando la barrera cerca de 160 km aguas abajo (Fig. 2). En este acontecimiento, algunos individuos que pertenecían al Bajo Paraná, que se encontraron en el área de transferencia de la barrera (futuro reservorio), por lo que pudieron colonizar el Alto Paraná en el momento que se represo el agua y desapareció la cascada de Sete Quedas. Como consecuencia de la inundación del reservorio del Itaipú, se han registrado la colonización del Alto Paraná por 36 especies del Bajo Paraná (JÚLIO JÚNIOR et al., 2009; LANGEANI et al., 2007; OTA et al., 2018). De la misma forma, muy probablemente, pudo haber favorecido, también, la colonización de linajes pertenecientes del Bajo al Alto Paraná, aumentando de esta manera el número de migrantes.

Además, en el año 2002, Itaipú creó el Canal de Piracema, con lo propósito de conectar las regiones aguas abajo y aguas arriba de la barrera. De la misma forma, ya se ha registro de, por lo menos, 13 especies de peces del Bajo Paraná que colonizaran el Alto Paraná por el Canal de Piracema (OTA et al., 2018). Levantamientos ictiológicos realizados en el canal, han demostrado la utilización del mismo por 17 especies de peces migratorios, de los cuales puede destacarse la presencia de *Salminus brasiliensis*, en tres de los cinco puntos de muestreo (MAKRAKIS et al., 2011), lo cual demuestra la utilización del sistema de transferencia de

peces (MAKRAKIS et al., 2011). En este contexto, los resultados apoyan la hipótesis de que la migración histórica entre las poblaciones del Paraná, era bajo o inexistente ($m = 0,55$ y $0,27\%$), debido principalmente al aislamiento provocado por la cascada de Sete Quedas. No obstante, la migración reciente muestra un aumento de cerca 10 veces, siendo este, mayor en el sentido del Bajo al Alto Paraná (Fig. 10). El substancial aumento en las tasas de migración reciente, pueden deberse, en un inicio a los migrantes que se encontraron en el área de distribución del reservorio, y más reciente, también de aquellos que utilizan el Canal de Piracema.

Pelicice y colaboradores (2015), en un estudio de revisión bibliográfica percibieron que los sistemas de transferencia de peces como canales, favorecen la migración unidireccional, siendo este mayor en sentido aguas arriba que aguas abajo (AGOSTINHO et al., 2011; BRITTO; CARVALHO, 2013a; PELICICE; AGOSTINHO, 2012), lo cual se asemeja a los resultados obtenidos. No obstante, estos resultados dependen mucho de cada especie, ya que también se ha registrado la eficiencia de los sistemas de transferencia de peces de forma bidireccional en la cuenca del Paraná (CELESTINO et al., 2019).

Tanto las tasas de migración histórica y reciente, muestran un flujo mayor en el sentido Bajo-Alto Paraná. No obstante, nuestra hipótesis inicial era que la tasa de migración histórica entre el Bajo y Alto Paraná sería inexistente o menor que el sentido contrario, debido a la imposibilidad de transportarse aguas arriba por la presencia de la cascada. De la misma forma, en el caso de la migración del Alto al Bajo Paraná, la migración podría existir, mismo que en niveles bajos debido a la migración pasiva a favor de la corriente de agua, principalmente de huevos y larvas. No obstante, según Samarasin y colaboradores (2016), los análisis de migración reciente e histórico, pueden tener ciertos desajustes a la realidad, si la migración reciente ha cambiado sustancialmente (para el MIGRATE-n) o si el análisis se realiza con un tamaño efectivo poblacional alto ($N_e \geq 1000$) (para el BAYESASS). En estos casos, el MIGRATE-n puede subestimar la migración histórica cuando hay una reciente caída de la tasa de migración (SAMARASIN; SHUTER; RODD, 2016). Los datos obtenidos, muestran que existe una mudanza reciente en la tasa de migración, pero en el sentido de que hay un aumento. Tal hecho, puede haber provocado ruido en los resultados del MIGRATE-n, de modo que no pudiera recuperar la dirección real de la migración histórica entre Alto y Bajo Paraná, ya que se basa en datos actuales. De cualquier manera, los resultados muestran que existe un aumento substancial en las tasas de migración en ambas direcciones, lo que coincide con la conexión reciente de las dos eco-regiones de agua dulce. Nuestros resultados fueron semejantes a los encontrados en la especie *Pseudoplatystoma corruscans*, en el cual, la migración reciente

aumento cerca de cinco veces en relación a la migración histórica, además, de que esta migración es más intensa en sentido aguas arriba (GÓMEZ; PEREIRA, 2018).

Los análisis de migración histórica y reciente son muy utilizados en estudios de especies migratorias, principalmente con el fin de conocer los efectos en ambientes fragmentados provocados por la construcción de hidroeléctricas, en los cuales, las poblaciones que históricamente estaban conectadas, dejaron de estarlo (CHIUCCHI; GIBBS, 2010; FERREIRA et al., 2017; GÓMEZ; PEREIRA, 2018; SAMARASIN et al., 2017; VERA-ESCALONA et al., 2018; WHITE; KOHLI; CONVERSE, 2018). No obstante, nuestro trabajo se destaca por evaluar uno escenario opuesto, ya que evalúa el efecto de la conexión reciente de poblaciones que históricamente han permanecido separadas, siendo así uno de los primeros en responder este tipo de pregunta.

5.3 Evaluación del Canal de Piracema como corredor biológico.

Los resultados obtenidos demostraron la eficiencia del Canal de Piracema como corredor biológico, a través de la presencia de migrantes de linajes pertenecientes tanto del Alto y Bajo Paraná (Fig. 11). No obstante, existe una mayor representatividad de individuos pertenecientes al linaje del Bajo Paraná en el canal y en las muestras cercanas (Ciudad del Este y Reservorio) (Fig. 11). Estos resultados corroboran la hipótesis de que los canales favorecen en mayor grado la traslocación aguas arriba y en menor grado aguas abajo, como fue mostrado en los trabajos de marcación y recaptura de Britto y Carvalho (2013), estudiando los STP, localizados en las represas de Canoas I y II, donde la migración ascendente de las especies fue mantenida, no obstante la migración pasiva de las larvas no fue encontrada. De la misma forma, en trabajos realizados en las represas del río Tocantins, la migración aguas arriba fue más intensa, que la migración aguas abajo (AGOSTINHO et al., 2011; PELICICE; AGOSTINHO, 2012). Además, la baja representación de individuos pertenecientes al Alto Paraná en las poblaciones transitorias, apoya también, la hipótesis de que los reservorios pueden servir como barreras para el movimiento migratorio aguas abajo (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). En esta hipótesis, los reservorios impiden la migración pasiva (a favor de la corriente), una vez que transforman un ambiente lótico en léntico, el cual aumenta dependiendo del tamaño del embalse, y en el caso de las larvas, la transparencia del agua, aumenta la tasa de predación, logrando así un impedimento del flujo migratorio de adultos y larvas aguas abajo (PELICICE; POMPEU; AGOSTINHO, 2015). No obstante, tanto aguas arriba como aguas abajo de la

represa y reservorio de Itaipú, se registra la presencia de migrantes de cada eco-región, lo que demuestra la conectividad entre las poblaciones, demostrando así, la efectividad del canal de Piracema (Fig. 11).

Por otro lado, una vez caracterizada la existencia de dos poblaciones características de cada eco-región (Alto e Bajo Paraná), se evidencian como posibles consecuencias de la reciente conexión, el inicio de una posible homogenización genética en las poblaciones. Como demostrado en términos de homogenización biótica en las asambleas de peces, en las cuales se han reportado la presencia de especies del Bajo Paraná (48 especies), como exóticas en el Alto Paraná, debido a la formación del reservorio de Itaipú, así como también a la construcción del Canal de Piracema (MAKRAKIS et al., 2007; VITULE; SKÓRA; ABILHOA, 2011). Esta homogenización biótica puede traer como consecuencia la pérdida de diferencias biológicas, ya sean funcionales, taxonómicas o genéticas (OLDEN et al., 2004; PETSCH, 2016). A pesar de las graves implicaciones de la homogenización biótica, hasta la actualidad las consecuencias en ambientes de agua dulce son poco exploradas (PETSCH, 2016), y más aún en el caso de homogenización genética, ya que la mayoría de trabajos se centran en la falta de conexión de ambientes fragmentados, y no de la homogenización genética de ambientes históricamente aislados.

A nivel poblacional, la estructura genética refleja la historia evolutiva de sus integrantes relacionado a la adaptación local (BERNATCHEZ, 2016; CARRERAS et al., 2017). En este sentido, la homogenización genética puede provocar la pérdida de adaptación local, principalmente en pequeñas poblaciones, dando lugar a cambios evolutivos en las especies (OLDEN et al., 2004; PETSCH, 2016). Al igual que nuestros resultados, diferentes marcadores moleculares (COI, CytB y D-loop) han demostrado la gran diferencia genética en la especie *S. brasiliensis*, mostrando dos linajes diferentes atribuidos a cada eco-región (MACHADO et al., 2016). Estas diferencias genéticas, pueden representar adaptación local, debido a las diferencias ambientales y biológicas en la composición de las comunidades acuáticas entre ambas eco-regiones (QUIRÓS; BECHARA; RESENDE, 2007), lo cual sugiere, una historia evolutiva independiente en los linajes de cada eco-región. De la misma forma, la homogenización genética, dependiendo de la deriva, puede traer como consecuencia la pérdida de diversidad genética (LACY, ROBERT, 1987), la cual puede llevar a la disminución de las aptitudes de la especie, y acarrear graves consecuencias en el potencial adaptativo y evolutivo (BUTT et al., 2016; HILSDORF; HALLERMAN, 2017c; NAVASCUÉS; STOECKEL; MARIETTE, 2010). De esta manera, las estrategias de conservación de la especie *S. brasiliensis* deben llevar en

consideración la estructuración histórica de la población, para de esta manera mantener la integridad evolutiva de la especie.

Nuestros resultados traen una perspectiva nueva a ser considerada al momento de realizar estrategias de manejo de las especies que utilizan el Canal de Piracema. De esta manera, como ya discutido anteriormente, no solo se debe llevar en consideración las posibles consecuencias de la homogenización de las asambleas de peces (MAKRAKIS et al., 2011), sino también la homogenización de las poblaciones, que históricamente se han mantenido estructuradas. Por lo que las estrategias de conservación deben mantener la integridad de las provincias ictiofaunísticas, como también la historia evolutiva de las especies de amplia distribución en la cuenca.

6 CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron una alta diversidad genética en las muestras utilizadas y demostró la existencia de dos poblaciones bien estructuradas en el Alto y Bajo Paraná, que históricamente fueron aisladas por la Cascada de Sete Quedas.

Los análisis de migración mostraron que la migración histórica entre Alto y Bajo Paraná era baja o inexistente y que la migración reciente aumento cerca de 10 veces, siendo más intensa en el sentido del Bajo al Alto Paraná, producto de la conexión reciente causada por la construcción del barraje de Itaipú y del canal de Piracema.

La identificación de migrantes mostró la eficiencia del canal de Piracema como corredor biológico conectando las dos eco regiones de agua dulce. No obstante, la atribución de población de origen a los migrantes, demuestra la predominancia de organismos pertenecientes al linaje del Bajo Paraná en las proximidades de la represa de Itaipú, lo que corrobora la hipótesis de que los canales son más eficientes en la migración aguas arriba.

Por otro lado, este intercambio de individuos de linajes diferentes a futuro puede traer como consecuencia la homogenización genética de las poblaciones de *S. brasiliensis*, principalmente en las áreas adyacente a la represa de Itaipú, lo que puede traer como consecuencias la pérdida de diversidad genética y adaptación local.

Así, las estrategias de conservación deben llevar en consideración la historia evolutiva de la especie y de las poblaciones para garantizar la integridad genética y o potencial evolutivo de la especie y sus poblaciones.

7 BIBLIOGRAFÍA

ABELL, R. et al. Freshwater Ecoregions of the World : A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. **BioScience**, v. 58, n. 5, p. 403, 2008.

AGOSTINHO, A. A. et al. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds.). . **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. p. 229–248.

AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory Fishes of the Upper Paraná River Basin. In: CAROLSFELD, J. et al. (Eds.). . **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Ottawa: The International Bank for Reconstruction and Development, The World Bank, 2003. p. 19–98.

AGOSTINHO, A. A. et al. Fish assemblages in Neotropical reservoirs: Colonization patterns, impacts and management. **Fisheries Research**, v. 173, p. 26–36, 2016.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 4, n. 3, p. 255–256, 2004.

AGOSTINHO, C. S. et al. All that goes up must come down ? Absence of downstream passage through a fish ladder in a large Amazonian river. **Hydrobiologia**, v. 675, n. 1, p. 1–12, 2011.

ALBERT, J. S.; BART, H. L. J.; REIS, R. E. B. Species Richness and Cladal Diversity. In: JAMES S. ALBERT; REIS, R. E. (Eds.). . **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. 1. ed. [s.l.] University of California Press, 2011. p. 89–104.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Introduction to Neotropical Freshwaters. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. (Eds.). . **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. 1. ed. [s.l.] University of California Press, 2011. p. 3–20.

ALLENDORF, F. W. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 2, p. 420–430, 2017.

ALVES, R. R. **Padrões de migração de *Salminus brasiliensis* (Characiformes, Characidae, Salmininae) no rio Mogi Guaçu utilizando marcadores genéticos moleculares**. [s.l.] Universidad Estadual Paulista, 2018.

- ASHIKAGA, F. Y. et al. The endangered species *Brycon orbignyianus* : genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 7, p. 1845–1855, 2015.
- BALIAN, E. V. et al. An introduction to the Freshwater Animal Diversity Assessment (FADA) project. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 3–8, 2008.
- BANDEL, H.-J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.
- BARBIERI, G.; FERNANDO ANDRÉ SALLES, M. A. C.; TEIXEIRA-FILHO, A. R. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 169–174, 2004.
- BARTORELLI, A. Origem da Grandes Cachoeiras do Planalto Basáltico da Bacia do Paraná: Evolução Quaternária e Geomorfologia. In: MANTESSO-NETO, V. et al. (Eds.). **Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flávio Marques de Almeida**. São Paulo: Editora Beca Produções Culturais, 2004. p. 95–111.
- BASIITA, R. K.; ZENGER, K. R.; JERRY, D. R. Populations genetically drifting within a complex geological system: The case of strong structure and low genetic diversity in the migratory freshwater catfish, *Bagrus docmak*, in East Africa. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 16, p. 6172–6187, 2017.
- BECKER, J. M.; ABERNETHY, C. S.; DAUBLE, D. D. Identifying the effects on fish of changes in water pressure during turbine passage. **Hydro Review**, n. September, p. 1–5, 2003.
- BEERLI, P. **MIGRATE**. Disponível em: <<https://peterbeerli.com/migrate-html5/download.html>>. Acesso em: 18 jul. 2019.
- BENTLEY, S. D. et al. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. **Wellcome Open Research**, v. 3, n. 0, p. 93, 2018.
- BERNATCHEZ, L. On the maintenance of genetic variation and adaptation to environmental change: considerations from population genomics in fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 6, p. 2519–2556, 2016.
- BIGNOTTO, T. S. et al. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes : Pimelodidae) in the Paraná River Basin.

Brazilian Journal of Biology, v. 69, n. 2, p. 681–689, 2009.

BINDER, T. R.; COOKE, S. J.; HINCH, S. G. The Biology of Fish Migration. In: FARRELL, A. P. (Ed.). . **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. San Diego: Elsevier Inc., 2011. v. 3p. 1921–1927.

BREA, M.; ZUCOL, A. F. The Paraná-Paraguay Basin: Geology and Paleoenvironments. In: **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. 1. ed. [s.l.] University of California Press, 2011. p. 69–88.

BRITTO, S. G. C.; CARVALHO, E. D. Reproductive migration of fish and movement in a series of reservoirs in the Upper Parana River basin . **Fisheries Management and Ecology Fisheries**, v. 20, n. 5, p. 426–433, 2013a.

BRITTO, S. G.; CARVALHO, E. D. Reproductive migration of fish and movement in a series of reservoirs in the Upper Parana River basin, Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 20, n. 5, p. 426–433, 2013b.

BROWN, J. J. et al. Fish and hydropower on the U.S. Atlantic coast: failed fisheries policies from half-way technologies. **Conservation Letters**, v. 6, n. 4, p. 280–286, 2013.

BUCKUP, P. A. The Eastern Brazilian Shield. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. (Eds.). . **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. 1. ed. [s.l.] University of California Press, 2011. p. 203–210.

BUTT, N. et al. Challenges in assessing the vulnerability of species to climate change to inform conservation actions. **Biological Conservation**, v. 199, p. 10–15, 2016.

CAO, Y.-L. et al. Microsatellite records for volume 8, issue 3. **Conservation Genetics Resourt**, v. 8, n. 3, p. 359–370, 2016.

CARRERAS, C. et al. Population genomics of an endemic Mediterranean fish: Differentiation by fine scale dispersal and adaptation. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–12, 2017.

CELESTINO, L. F. et al. Bidirectional connectivity via fish ladders in a large Neotropical river. **River Research and Applications**, v. 35, n. 3, p. 236–246, 2019.

CHAPUIS, M.-P.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621–631, 2006.

CHENG, L. et al. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS

software. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 5, p. 1224–1228, 2013.

CHIUCCHI, J. E.; GIBBS, H. L. Similarity of contemporary and historical gene flow among highly fragmented populations of an endangered rattlesnake. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 24, p. 5345–5358, 2010.

CLAY, C. H. **Design of fishways and other fish facilities**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

CORANDER, J.; WALDMANN, P.; SILLANPÄÄ, M. J. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 367–374, 2003.

DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 39, n. 1, p. 1–38, 1977.

DIBATTISTA, J. D. et al. Phylogeography of Two Closely Related Indo-Pacific Butterflyfishes Reveals Divergent Evolutionary Histories and Discordant Results from mtDNA and Microsatellites. **Journal of Heredity**, v. 103, n. 5, p. 617–629, 2012.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, jun. 2012.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. **ARLEQUIN Ver 3.5. An integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis** Switzerland Swiss Institute of Bioinformatics, , 2015.

FAULKS, L. K. et al. Going, going, gone? Loss of genetic diversity in two critically endangered Australian freshwater fishes, *Scaturiginichthys vermeilipinnis* and *Chlamydogobius squamigenus*, from Great Artesian Basin springs at Edgbaston, Queensland, Australia. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 27, n. 1, p. 39–50, 2017.

FERREIRA, D. G. et al. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers : a case study. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 1, p. 151–166, 2015.

FERREIRA, D. G. et al. Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 1, p. 209–231, 2017.

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

FREITAS, L. A. DE C. M. **Diversidade genética em Dourado (*Salminus brasiliensis*, Curvier, 1816), uma espécie de grande interesse comercial no Pantanal Mato-grossense**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2010.

GALINDO, B. A. 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, p. 1–10, 2019.

GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Population structure of the migratory fish Prochilodus lineatus (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 21, n. 3, p. 268–275, 2011.

GOMES, F. D. **Tributários na manutenção da diversidade genética de peixes migradores da Bacia do Alto Rio Paraná, Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2016.

GOMES, P. C. **Diversidade genética de *Salminus brasiliensis* utilizando em programas de reprovamento**. [s.l.] Universidade Estadual DE Maringá, 2010.

GÓMEZ, J. A.; PEREIRA, L. H. GENETIC STRUCTURE OF PINTADO (PSEUDOPLATYSTOMA CORRUSCANS) IN THE INFLUENCE AREA OF ITAIPU BINATIONAL DAM ESTRUTURA. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 5, n. 2, p. 88–109, 2018.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. 1ª Edição ed. Maringá: EDUEM, 2007.

HAHN, N. S.; FUGI, R.; ADRIAN, I. F. Trophic ecology of the fish assemblages. In: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds.). **The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 247–269.

HARVEY, B.; CAROLSFESD, J. Introduction: Fishes of the Floods. In: CAROLSFELD, J. et al. (Eds.). **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Ottawa: The International Bank for Reconstruction and Development, The World Bank, 2003. p. 1–18.

- HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. **Genetic Resources of Neotropical Fishes**. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2017a.
- HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. Characterization of Genetic Resources. In: HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. (Eds.). . **Genetic Resources of Neotropical Fishes**. 1. ed. [s.l.] Springer, 2017b. p. 55–117.
- HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. Prospective Views and Recommendations. In: HILSDORF, A. W. S.; HALLERMAN, E. M. (Eds.). . **Genetic Resources of Neotropical Fishes**. 1. ed. [s.l.] Springer, 2017c. p. 211–238.
- HINDLEY, J. A. et al. The influence of latitude, geographic distance, and habitat discontinuities on genetic variation in a high latitude montane species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- HOLLELEY, C. E.; GREERTS, P. G. Multiplex Manager 1.0: a crossplatform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. **BioTechniques**, v. 46, n. 7, p. 511–517, 2009.
- HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414–1436, 2006.
- HUGHES, A. R. et al. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v. 11, n. 6, p. 609–623, 2008.
- JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, n. 11, p. 1403–1405, 2008.
- JOMBART, T.; AHMED, I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 3070–3071, 2011.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v. 11, n. 94, p. 2–15, 2010.
- JÚLIO JÚNIOR, H. F. et al. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 709–718, 2009.
- LACY, ROBERT, C. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. **Conservation Biology**, v. 1, n. 2, p. 143–158, 1987.

LANGGANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná : composição atual e perspectivas futuras Introdução O Alto Paraná é área complexa devido às atividades tectônicas. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 181–197, 2007.

LEHNER, B.; VERDIN, K.; JARVIS, A. New global hydrography derived from spaceborne elevation data. **Eos**, v. 89, n. 10, p. 93–94, 2008.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART : full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LÉVÊQUE, C. et al. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 545–567, 2008.

LIERMANN, C. R. et al. Implications of Dam Obstruction for Global Freshwater Fish Diversity. **BioScience**, v. 62, n. 6, p. 539–548, 2012.

LIMA, F. C. T. **Revisão taxonomica e relações filogeneticas do genero Salminus (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

LIRA, N. A. et al. Fish passages in South America: an overview of studied facilities and research effort. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 2, p. 1–14, 2017.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. Paleogene Radiations. In: **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. 1. ed. [s.l.] University of California Press, 2011. p. 105–118.

LUNDBERG, J. G. et al. The stage for neotropical fish diversification a history of tropical south american rivers. In: MALABARBA, L. et al. (Eds.). . **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. EDIPUCRS ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 13–48.

MACHADO, C. B.; GALETTI, P. M. J.; CARNAVAL, A. C. Bayesian analyses detect a history of both vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 45, p. 1313–1325, 2018.

MACHADO, C. D. B. et al. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). **Systematics and Biodiversity**, v. 15, n. 4, p. 372–382, 2016.

MAKRAKIS, M. C. et al. Migratory movements of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, in the highly impounded Paraná River. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, n. 6, p. 700–704, 2007.

MAKRAKIS, S. et al. Ascent of neotropical migratory fish in the Itaipu Reservoir fish pass.

River Research and Applications, v. 27, n. 4, p. 511–519, 2011.

MARTINS, C. et al. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 33–38, 2003.

MONDIN, L. A. DE C. et al. Genetic Pattern and Demographic History of *Salminus brasiliensis*: Population Expansion in the Pantanal Region during the Pleistocene. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. January, p. 1–8, 2018.

MORRONE, J. J. Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. **CI**, v. 30, p. 202–214, 2014.

MUNIZ, F. L. et al. Detecting population structure of *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae) through microsatellites markers developed by next generation sequencing. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 2473–2484, 2019.

MYERS, G. S. Usage of Anadromous, Catadromous and Allied Terms for Migratory Fishes. **Copeia**, v. 1949, n. 2, p. 89–97, 1949.

NAVASCUÉS, M.; STOECKEL, S.; MARIETTE, S. Genetic diversity and fitness in small populations of partially asexual, self-incompatible plants. **Heredity**, v. 104, n. 5, p. 482–492, 2010.

OKADA, E. K.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. Spatial and temporal gradients in artisanal fisheries of a large Neotropical reservoir, the Itaipu Reservoir, Brazil. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 62, n. 3, p. 714–724, 2005.

OLDEN, J. D. et al. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 1, p. 18–24, 2004.

OTA, R. R. et al. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, p. 1–111, 2018.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, C. S. Deficient downstream passage through fish ladders : the case of Peixe Angical Dam , Tocantins River , Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 4, p. 705–713, 2012.

PELICICE, F. M.; POMPEU, P. S.; AGOSTINHO, A. A. Large reservoirs as ecological barriers

to downstream movements of Neotropical migratory fish. **Fish and Fisheries**, v. 16, n. 4, p. 697–715, 2015.

PEREIRA, L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes : Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 2015–225, 2009a.

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215–225, 2009b.

PETREIRE-JÚNIOR, M. et al. Review of the Fisheries in the Brazilian Portion of the Paraná/Pantanal Basin. In: COWX, I. G. (Ed.). . **Management and Ecology of Lake and Reservoir Fisheries**. London: Wiley-Blackwell, 2002. p. 123–143.

PETSCH, D. K. Causes and consequences of biotic homogenization in freshwater ecosystems. **International Review of Hydrobiology**, v. 101, n. 3–4, p. 113–122, 2016.

PORCHER, J. P.; TRAVADE, F. Fishways: biological basis, limits and legal considerations. In: LARINIER, M.; TRAVADE, F.; PORCHER, J. P. (Eds.). . **Fishways: Biological Basis, Design Criteria and Monitoring, Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture**. Rome: FAO, 2002. p. 9–20.

PRADO, F. D. et al. Genetic structure and evidence of anthropogenic effects on wild populations of two Neotropical catfishes : baselines for conservation. **Journal of Fish Biology** (2018), v. 92, n. 1, p. 55–72, 2018.

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

QGIS DEVELOPMENT TEAM. **QGIS Geographic Information System.**, 2018.

QUIRÓS, R.; BECHARA, J. A.; RESENDE, E. K. Fish diversity and ecology, habitats and fisheries for the un-dammed riverine axis Paraguay-Parana- Rio de la Plata (Southern South America) R. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 10, n. 2, p. 187–200, 2007.

RAMOS, J. V. B. et al. Genetic diversity of the species *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes) in the canoas complex - Paranapanema river. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 4, p. 821–828, 2012.

REVELL, L. J. phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 217–223, 2012.

RIBOLLI, J. **Caracterização genética populacional do dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) na Bacia do alto e médio rio Uruguai**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2014.

RIBOLLI, J. et al. Isolation-by-time population structure in potamodromous Dourado *Salminus brasiliensis* in southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 1, p. 67–76, 2016.

RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, P. E.; GALETTI, P. M. J. Genetic evidences of non-reproductive shoaling in the freshwater fish *Salminus brasiliensis*. **Hydrobiologia**, v. 815, n. 1, p. 65–72, 2018.

ROSSINI, B. C. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus* Bruno. **Molecular Ecology Resources**, p. 1–7, 2010.

ROSSINI, B. C. “ **Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi- Guaçu** ”. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2010.

ROSSO, J. J. et al. Basin-scale distribution and haplotype partitioning in different genetic lineages of the Neotropical migratory fish *Salminus brasiliensis*. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 28, n. 2, p. 1–13, 2017.

RUBIO-CASTRO, G. G.; QUIÑONEZ-VELÁZQUEZ, C.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. J. Genetic homogeneity of the Pacific thread herring (*Opisthonema libertate*) (Günther , 1867) in the Eastern Pacific , inferred from mtDNA sequences. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 30, n. 3, p. 517–524, 2019.

RUEDA, E. C. et al. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for the migratory characiform fish, *Salminus brasiliensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 79, n. 5, p. 1370–1375, 2011.

SALCEDO, N. et al. Fragmentation of Andes-to-Amazon connectivity by hydropower dams. **Science Advances**, v. 4, n. 1, p. eaao1642, 2018.

SAMARASIN, P. et al. After 100 years : hydroelectric dam-induced life-history divergence and population genetic changes in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Conservation Genetics**, v. 18, n. 6, p. 1449–1462, 2017.

SAMARASIN, P.; SHUTER, B. J.; RODD, F. H. The problem of estimating recent genetic connectivity in a changing world Running. **Conservation Biology**, v. 31, n. 1, p. 126–135, 2016.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233–234, 2000.

SIGEL/ANEEL. **Sistema de Informações Geográficas do Setor Elétrico**. Disponível em: <<https://sigel.aneel.gov.br/portal/home/>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

SILVA, J. et al. Genetic structuring of *Salminus hilarii* Valenciennes , 1850 (Teleostei : Characiformes) in the rio Paraná basin as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 547–556, 2015.

SILVEIRA, G.; CRUZ, J. **Seleção ambiental de barragens: análise de favorabilidades ambientais em escala de bacia hidrográfica**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

SOUZA-SHIBATTA, L. et al. Genetic Diversity of the Endangered Neotropical Cichlid Fish (*Gymnogeophagus setequedas*) in Brazil. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. 13, p. 1–10, 2018.

SUZUKI, H. et al. Reproductive ecology of the fish assemblage. In: THOMAZ, S.; AGOSTINHO, A.; HAHN, N. (Eds.). . **The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backuys Publishers, 2004. p. 271–292.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. **MEGA7**, 2016.

THUROW, R. Life Histories of Potamodromous Fishes. In: MORAIS, P.; DAVERAT, F. (Eds.). . **An Introduction to Fish Migration**. 1. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2016. p. 29–54.

TOUSSAINT, A. et al. Global functional diversity of freshwater fish is concentrated in the Neotropics while functional vulnerability is widespread. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–9, 2016.

VAINI, J. O. et al. Genetic variability of pure *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* individuals in the Paraná and Paraguay River basins. **Fisheries Science**, v. 82, n. 4, p. 605–611, 2016.

VAZZOLER, A. E. . et al. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In:

VAZZOLER, A. E. A.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds.). . **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**. Maringá: EDUEM, 1997. p. 249–265.

VERA-ESCALONA, I. et al. Past , present , and future of a freshwater fish metapopulation in a threatened landscape. **Conservation Biology**, v. 32, n. 4, p. 849–859, 2018.

VITULE, J. R. S.; SKÓRA, F.; ABILHOA, V. Homogenization of freshwater fish faunas after the elimination of a natural barrier by a dam in Neotropics. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 2, p. 111–120, 2011.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 6, p. 1419–1439, 2006.

WELCOMME, R. L. **River fisheries**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1985.

WHITE, M. M.; KOHLI, B. A.; CONVERSE, P. E. Historical and Contemporary Gene Flow and the Genetic Structure of Muskellunge in the Ohio River Drainage. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 147, n. 6, p. 1067–1077, 2018.

WILLEMS, R. J. L. et al. Restricted Gene Flow among Hospital Subpopulations of *Enterococcus faecium*. **mBio**, v. 3, n. 4, p. 1–12, 2012.

WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian Inference of Recent Migration Rates Using Multilocus Genotypes. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 1177 LP – 1191, 1 mar. 2003.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323–354, 1950.

WRIGHT, S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395–420, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations**. IV ed. Chicago: Press, University of Chicago, 1978.

YANG, J. et al. The population history of *Garra orientalis* (Teleostei : Cyprinidae) using mitochondrial DNA and microsatellite data with approximate Bayesian computation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 73, p. 2–15, 2016.

YU, G. et al. Ggtree: an R Package for Visualization and Annotation of Phylogenetic Trees

With Their Covariates and Other Associated Data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 28–36, 2017.

ZARFL, C. et al. A global boom in hydropower dam construction. **Aquatic Sciences**, v. 77, n. 1, p. 161–170, 2014.

8 ANEXOS

Anexo 1. Muestras de *S. brasiliensis* utilizadas.

Numero de individuo	Numero de voucher	Numero de acceso GenBank	Ecorregión de agua dulce	Localidad	País	D-loop	Microsatélite	Latitud	Longitud
1	-	MF463892	Alto Paraná	Mogi-Guaçu	Brasil	x		-21,9237	-47,35237
2	-	MF463893	Alto Paraná	Mogi-Guaçu	Brasil	x		-21,9237	-47,35237
3	-	MF463894	Alto Paraná	Mogi-Guaçu	Brasil	x		-21,9263	-47,37149
4	-	MF463896	Laguna dos patos	Jacuí	Brasil	x		-30,0239	-51,25348
5	-	MF463897	Laguna dos patos	Ibicuí da Amada	Brasil	x		-30,4196	-54,95046
6	-	MF463898	Alto Paraná	Turvo	Brasil	x		-20,1779	-49,62139
7	-	MF463899	Alto Paraná	Grande	Brasil	x		-20,1274	-48,57503
8	-	MF463900	Alto Paraná	Grande	Brasil	x		-20,4245	-49,25973
9	-	MF463901	Alto Paraná	Turvo	Brasil	x		-20,4232	-49,25562
10	-	MF463902	Alto Paraná	Tietê	Brasil	x		-22,5138	-48,57503
11	-	MF463903	Alto Paraná	Jacaré-Pepira	Brasil	x		-22,07504	-48,48010
12	-	MF463904	Alto Paraná	Paranapanema	Brasil	x		-22,93330	-50,25000
13	-	MF463905	Alto Paraná	Paranapanema	Brasil	x		-22,93330	-50,25000
14	-	MF463906	Alto Paraná	Paranapanema	Brasil	x		-22,93330	-50,51667
15	-	MF463907	Alto Paraná	Tietê	Brasil	x		-22,49833	-48,56132
16	-	MF463908	Alto Paraná	Paranapanema	Brasil	x		-22,93330	-50,25000
17	-	MF463909	Alto Paraná	Paraná	Brasil	x		-23,36976	-53,76456
18	-	MF463910	Alto Paraná	Paraná	Brasil	x		-23,36976	-53,76456
19	-	MF463911	Alto Paraná	Paraná	Brasil	x		-23,36976	-53,76456
20	-	MF463913	Uruguay	Uruguai	Brasil	x		-27,28353	-52,39229
21	-	MF463914	Alto Paraná	Piracicaba	Brasil	x		-22,72722	-47,65760
22	-	MF463915	Uruguay	Uruguai	Brasil	x		-27,16773	-53,83528
23	-	MF463916	Uruguay	Uruguai	Brasil	x		-27,26393	-54,05471
24	-	MF463917	Uruguay	Uruguai	Brasil	x		-27,14252	-53,88427
25	-	MF463918	Uruguay	Uruguai	Brasil	x		-27,14252	-53,88427
26	-	MF463919	Uruguay	Uruguai	Brasil	x		-27,14252	-53,88427
27	D_A1	-	Bajo Paraná	Ayolas	Paraguay	x	x	-27,40584	-56,84423
28	D_A2	-	Bajo Paraná	Ayolas	Paraguay	x	x	-27,40584	-56,84423
29	D_A3	-	Bajo Paraná	Ayolas	Paraguay	x	x	-27,40584	-56,84423
30	D_CE10	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
31	D_CE11	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
32	D_CE12	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
33	D_CE13	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
34	D_CE14	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
35	D_CE15	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
36	D_CE18	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
37	D_CE2	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
38	D_CE3	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
39	D_CE5	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
40	D_CE6	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
41	D_CE7	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
42	D_CE8	-	Alto Paraná	Ciudad del Este	Paraguay	x	x	-25,45230	-54,62130
43	D_CP102	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
44	D_CP120	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
45	D_CP125	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
46	D_CP126	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711

47	D_CP129	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
48	D_CP130	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
49	D_CP131	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
50	D_CP132	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
51	D_CP133	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
52	D_CP134	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
53	D_CP145	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
54	D_CP160	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
55	D_CP162	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
56	D_CP16E	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
57	D_CP200	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
58	D_CP202	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
59	D_CP204	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
60	D_CP3	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
61	D_CP58	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
62	D_CP74	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
63	D_CP85	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
64	D_CP91	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
65	D_CP93	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
66	D_CP94	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
67	D_CP98	-	Alto Paraná	Canal de Piracema	Brasil	x	x	-25,43493	-54,57711
68	D_G510	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
69	D_G546	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
70	D_G548	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
71	D_G549	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
72	D_G552	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
73	D_G563	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
74	D_G633	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
75	D_G634	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
76	D_G635	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
77	D_G640	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
78	D_G655	-	Alto Paraná	Guaíra	Brasil	x	x	-24,06599	-54,24564
79	D_P24	-	Alto Paraná	Porto Primavera	Brasil	x	x	-22,48837	-52,95748
80	D_P41	-	Alto Paraná	Porto Primavera	Brasil	x	x	-22,48837	-52,95748
81	D_P44	-	Alto Paraná	Porto Primavera	Brasil	x	x	-22,48837	-52,95748
82	D_P51	-	Alto Paraná	Porto Primavera	Brasil	x	x	-22,48837	-52,95748
83	D_R100	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
84	D_R101	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
85	D_R107	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
86	D_R111	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
87	D_R121	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
88	D_R122	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
89	D_R128	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
90	D_R62	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
91	D_R63	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
92	D_R64	-	Alto Paraná	Reservatorio	Brasil	x	x	-25,41463	-54,55724
93	D_Y11	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
94	D_Y14	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
95	D_Y15	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
96	D_Y16	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
97	D_Y17	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
98	D_Y18	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231

99	D_Y19	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
100	D_Y20	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
101	D_Y21	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
102	D_Y353	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
103	D_Y362	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
104	D_Y372	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
105	D_Y379	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
106	D_Y380	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
107	D_Y381	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
108	D_Y382	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
109	D_Y383	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
110	D_Y384	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
111	D_Y385	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
112	D_Y386	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
113	D_Y387	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
114	D_Y389	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
115	D_Y393	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
116	D_Y395	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
117	D_Y406	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
118	D_Y662	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
119	D_Y674	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
120	D_Y680	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
121	D_Y684	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
122	D_Y688	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
123	D_Y690	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
124	D_Y696	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
125	D_Y697	-	Bajo Paraná	Yacyreta	Paraguay / Argentina	x	x	-27,47985	-56,71231
126	DL2	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,89611	-54,10972
127	DL3	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,81278	54,00500
128	DL4	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,92722	-54,02722
129	DL5	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,92722	-54,02722
130	DL6	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,92722	-54,02722
131	DL7	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,92722	-54,02722
132	DL8	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-23,92722	-54,02722
133	DL9	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
134	DL10	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
135	DL11	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
136	DL12	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
137	DL13	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
138	DL14	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
139	DL15	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,01361	-54,17500
140	DL33	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil		x	-24,04528	-54,23083

141	DL34	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
142	DL35	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
143	DL36	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
144	DL37	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
145	DL38	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
146	DL39	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
147	DL40	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
148	DL41	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
149	DL42	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
150	DL43	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
151	DL44	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
152	DL45	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
153	DL46	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
154	DL47	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
155	DL48	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
156	DL49	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
157	DL50	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
158	DL51	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
159	DL53	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
160	DL54	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
161	DL55	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,06444	-54,19556
162	DL56	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-24,04528	-54,23083
163	DL57	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,89611	-54,10972
164	DL58	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,48639	-53,99222
165	DL59	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,50333	-53,90056
166	DL60	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,50333	-53,90056
167	DL61	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,50333	-53,90056
168	DL62	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,89611	-54,10972
169	DL63	-	Alto Paraná	Ilha Grande	Brasil	x	-23,75972	-53,99250
