

**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.  
Doctorado en Ciencias Aplicadas**

Doctoranda  
***Lic. Noelia Malena Schröder***

## **Odonatos bioindicadores de calidad ambiental. Diversidad específica y genética**

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de  
“Doctor en Ciencias Aplicadas”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director  
***Dr. Pablo Pessacq***  
Co-Director  
***Dr. Pedro Darío Zapata***

**Posadas, Misiones 2020**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones  
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y  
Naturales



# **ODONATOS BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL. DIVERSIDAD ESPECÍFICA Y GENÉTICA**

**Por Lic. Noelia Malena SCHRÖDER**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales  
de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS**

Posadas, República Argentina

2020

**Director:**

Dr. Pablo PESSACQ

**Co-director:**

Dr. Pedro D. ZAPATA

**TRIBUNAL EXAMINADOR** (resolución consejo directivo N° 375-20)

Dra. Juana PESO                      Universidad Nacional de Misiones

Dr. Javier MUZÓN                      Universidad Nacional de Avellaneda

Dr. Federico LOZANO                      Universidad Nacional de Avellaneda

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA** (resolución consejo directivo N°247-21)

Posadas, 8 de abril de 2021

# **ODONATOS BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL. DIVERSIDAD ESPECÍFICA Y GENÉTICA**

**Noelia Malena SCHRÖDER**

## **Lugar de desarrollo del trabajo de tesis**

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Molecular - Instituto de Biotecnología Misiones.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Entomológicas.

## **COMISIÓN DE SUPERVISIÓN** (resolución consejo directivo N° 022-17)

Dra. Victoria GARCIA      Universidad Nacional de Misiones

Dr. Diego BALDO            Universidad Nacional de Misiones

Dr. Javier MUZÓN            Universidad Nacional de Avellaneda

## **CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS**

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria  
(CONEAU) N° 344/11.



## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Dr. Pablo Pessacq y Dr. Pedro Zapata, por su colaboración y predisposición en todo momento.

A Camila Rippel por acercarme al mundo de los odonatos.

A Horacio Walantus por la gestión y colaboración en el trabajo a campo.

A Silvana Sawostjanik por su asistencia técnica en el trabajo molecular.

A mis compañeros de muestreos, Camila, Silvia, Álvaro, Nicolás, Marcelo, Mahia y Cintia.

A la comisión de seguimiento por sus valiosos consejos en el desarrollo de la tesis.

A los investigadores que colaboraron desinteresadamente en la identificación de especies, Dr. J. Muzón, Dr. F. Lozano, Lic. A. del Palacio, Dr. R. Garrison.

A mi esposo, familiares y amigos por acompañarme en este tiempo.

## Índice de contenidos

Listado de abreviaturas.....	8
Capítulo 1: Introducción.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	13
Hipótesis .....	13
Capítulo 2: Marco teórico.....	14
Capítulo 3: Materiales y Métodos.....	26
Diversidad específica y su relación con el ambiente.....	26
Área de estudio.....	26
Índice de ribera.....	29
Variables ambientales .....	30
Relevamiento de especies.....	30
Análisis de datos .....	31
Diversidad genética .....	32
Evaluación de microsatélites .....	32
Citocromo c oxidasa I (COI) .....	32
Capítulo 4: Resultados.....	34
Diversidad específica y su relación con el ambiente.....	34
Transferencia de microsatélites: .....	40
<i>Barcode</i> :.....	41
Capítulo 5: Discusión .....	44

Odonatos y estado de conservación.....	44
Transferencia de microsatélites .....	46
Base de datos de códigos de barra.....	47
Ventajas y desventajas del uso de Odonata como bioindicadores.....	48
Novedades taxonómicas y nuevos registros.....	50
Descripción de la larva de último estadio de <i>Peristicta aeneoviridis</i> .....	50
Nuevos registros.....	55
Capítulo 6: Conclusiones .....	56
Recomendaciones para trabajos futuros.....	57
Producción científica.....	58
Publicaciones en revistas científicas .....	58
Presentaciones a Congresos científicos.....	58
1. Tabla de análisis de ribera .....	59
2. Lista de especies coleccionadas .....	62
3. Lista de especies en muestreos preliminares: Área de recursos ambientales Zaimán.....	64
4. Cronograma de colecta y tamaño de muestra.....	66
Referencias Bibliográficas .....	68

## Listado de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
Ac. aep.	<i>Acanthagrion aepiolum</i>
Ac. cuy.	<i>Acanthagrion cuyabae</i>
Ac. flor.	<i>Acanthagrion floridense</i>
Ac. gracile	<i>Acanthagrion gracile</i>
Ac. hildeg.	<i>Acanthagrion hildegarda</i>
Ac. lancea	<i>Acanthagrion lancea</i>
Ar. albi.	<i>Argia albistigma</i>
Ar. croc.	<i>Argia croceipennis</i>
Ar. mollis	<i>Argia mollis</i>
Ar. reclusa	<i>Argia reclusa</i>
Ar. serva	<i>Argia serva</i>
Brech. sp1	<i>Brechmorhoga sp1</i>
Brech. sp2	<i>Brechmorhoga sp2</i>
Castor. jan.	<i>Castoraeschna januarina</i>
Cy.w.	<i>Cyanogomphus waltheri</i>
Dasyth. sp1	<i>Dasythemis sp1</i>
Diast. obs.	<i>Diastatops obscura</i>
Ela.1	<i>Elasmothermis sp1</i>
Eryth. atro.	<i>Erythrodiplax atroterminata</i>
Eryth. chteno.	<i>Erythrodiplax sp 2</i>
Eryth. fusca	<i>Erythrodiplax fusca</i>
Eryth. media	<i>Erythrodiplax media</i>
Eryth. melano.	<i>Erythrodiplax melanorubra</i>
Eryth. sp1	<i>Erythrodiplax sp1</i>
He. rosea	<i>Hetaerina rosea</i>
He. sp1	<i>Hetaerina sp1</i>
Hel. amazona	<i>Heliocharis amazona</i>
Het. auran.	<i>Heteragrion aurantiacum</i>
Hom. chelif.	<i>Homeoura chelifera</i>
Isch. capr.	<i>Ischnura capreolus</i>
Isch. fluv.	<i>Ischnura fluviatilis</i>
Miath. marc.	<i>Miathyria marcella</i>
Mnes. pruinosa	<i>Mnesarete pruinosa</i>

Mnes. pudica	<i>Mnesarete pudica</i>
Mycr. pseud.	<i>Micrathyria pseudeximia</i>
Mycr. sp1	<i>Micrathyria sp1</i>
Neo. sylv.	<i>Neoneura sylvatica</i>
Oxy term.	<i>Oxyagrion terminale</i>
Oxy. basale	<i>Oxyagrion basale</i>
Peri. aen.	<i>Peristicta aeneoviridis</i>
Perit. icterop.	<i>Perithemis icteroptera</i>
Perit. mooma	<i>Perithemis mooma</i>
Phyllo. sp1	<i>Phyllocycla sp1</i>
Progh. sp1	<i>Proghomphus sp1</i>
Tele. willinki	<i>Telebasis willinki</i>
Tigr. aurant.	<i>Tigriagrion aurantinigrum</i>

## Resumen

El creciente consumo de recursos naturales debido al crecimiento poblacional y la expansión de la actividad agrícola tiene un gran impacto en los ecosistemas acuáticos. El objetivo de este trabajo fue verificar si posibles cambios en la integridad del hábitat y de las variables fisicoquímicas, debido a diferentes usos de suelo, están relacionados con el ensamblaje de odonatos. Por otro lado, se buscó ampliar la base de datos de códigos de barra genéticos para especies presentes en la región Neotropical, lo que permitirá reforzar la identificación taxonómica específica contribuyendo a un primer paso en el camino de la taxonomía “integrativa” en la región. En primer lugar, se determinó el nivel de conservación de la zona riparia y los parámetros fisicoquímicos del agua en arroyos con diferente grado de impacto antropogénico, y se evaluó la riqueza y variación de la composición de especies, buscando potenciales indicadores de la calidad de hábitat. El índice de ribera permitió diferenciar tres estados de conservación, observándose una clara variación en la composición de la comunidad de odonatos presente. Ocho especies mostraron potencial para actuar como bioindicadores de calidad de agua, y pueden servir como herramientas para futuras estrategias de manejo y conservación de arroyos. Se evaluó, además, la transferencia de microsatélites en una especie ubicua en nuestra área de estudio, a fin de evaluar la relación del ambiente con la diversidad genética de la especie. Sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables. Finalmente hemos obtenido las secuencias del gen COI para diferentes especies presentes en la región, con una divergencia interespecífica entre 0,73 a 18,18%, apoyando la sensibilidad del método *barcode* para discriminar especies de odonatos neotropicales.

**Palabras clave:** Uso de suelo, Conservación, Especie indicadora, *Barcode*, Microsatélites.

## **Abstract**

The increasing consumption of natural resources due to population growth, and the expansion of agricultural activity have a major impact on freshwater ecosystems. The aim of this study was to verify if possible changes in habitat integrity and physical-chemical variables due to different land uses are related to Odonata assemblages. On the other hand, we attempted to expand the database of genetic barcodes for species present in the Neotropical region that will complement the taxonomic identification at species level and represents a first step on the path to an "integrative" taxonomy in the region. First, we evaluate the conservation status of the riparian zone and the physicochemical parameters of the water in streams with different degrees of anthropogenic impact, and assessed richness and variation in species composition, testing for potential indicators of habitat quality. The riparian index allowed the differentiation of three states and it was possible to discriminate the variation in the composition of communities present. Eight species showed potential as indicators of habitat quality that can serve as biomonitors in future strategies of management and conservation of streams. In addition, we evaluated the cross-species amplification of microsatellites in a ubiquitous species of our study area, in order to assess the relation of the environment with the genetic diversity of the species. However, no favorable results were obtained. Finally, we have obtained the sequences of the COI gene for different species present in the region, with an interspecific divergence between 0.73 to 18.18%, supporting the sensitivity of the barcode method to discriminate species of neotropical odonates.

**Key words:** Land use, Conservation, Indicator species, Barcode, Microsatellites.

## Capítulo 1: Introducción

El creciente consumo de recursos naturales debido a las actividades antropogénicas tiene un gran impacto en los ecosistemas acuáticos alrededor del mundo. La necesidad de contar con herramientas que faciliten la toma de decisiones en programas de monitoreo y conservación de arroyos y sus áreas riparias, impulsa a buscar una metodología simple y de bajo costo para la evaluación ambiental. En este sentido los bioindicadores resultan de gran utilidad. Las características que hacen a los Odonatos buenos indicadores están bien documentadas, aunque no existe mucha información con respecto al efecto de los diferentes usos de suelo en estas comunidades.

En este estudio evaluaremos, en un gradiente de diferentes usos de suelo, posibles cambios en la integridad del hábitat y las variables fisicoquímicas del agua, y su relación con la diversidad específica y genética de odonatos. Para ello, dividimos el trabajo en dos partes. En primer lugar, analizaremos la comunidad de odonatos en relación con los niveles de degradación de los ambientes loticos debido a las actividades humanas y evaluaremos la correlación de especies con las variables ambientales medidas. También esperamos encontrar especies indicadoras de calidad de hábitat, que puedan servir en futuras estrategias de manejo y conservación de arroyos en el sur de la provincia afectados por los rápidos cambios producidos debido a la intensificación del uso de suelo.

Cuando las poblaciones son expuestas a un estrés, en las etapas iniciales suele existir una drástica reducción del tamaño poblacional. Este proceso puede llevar a la pérdida de variabilidad genética debido a la deriva génica. Los impactos que afectan las condiciones del ambiente pueden además incrementar la selección y así reducir también la variabilidad genética. En este sentido, evaluaremos en segundo lugar, la transferencia de un panel de microsátélites en poblaciones de *Hetaerina rosea* residentes en los diferentes ambientes para caracterizar la diversidad genética presente. Además, analizaremos secuencias de citocromo oxidasa I para incorporar a la base de datos de *barcode* de especies presentes en la región Neotropical. Así, en este trabajo presentamos nueva información de campo que contribuye al conocimiento de la competencia de los Odonatos como bioindicadores de calidad de ambiente, además de datos moleculares que permitirán a futuro realizar una identificación taxonómica más integrativa en la región.

### Objetivo general

Analizar la relación existente entre la diversidad de odonatos con los cambios en la integridad del hábitat y las variables fisicoquímicas del agua, en ambientes loticos naturales y antropizados de la provincia de Misiones.

### **Objetivos específicos**

- Analizar la comunidad de odonatos en relación con los niveles de degradación de los ambientes loticos debido a las actividades humanas.
- Evaluar la correlación de especies con las variables ambientales medidas.
- Encontrar especies indicadoras de calidad de hábitat, que puedan servir en futuras estrategias de manejo y conservación de arroyos en el sur de la provincia de Misiones.
- Evaluar la capacidad de transferencia de microsatélites desarrollados en *Hetaerina americana*, para caracterizar la diversidad específica de las poblaciones de *H. rosea*.
- Incorporar secuencias a la base de datos de *barcode* para la identificación de especies de odonatos de la zona.

### **Hipótesis**

Las especies de Odonatos responderán de manera diferencial a los cambios producidos debido a la intensificación del uso de suelo y desarrollo urbano, lo que permitirá detectar especies indicadoras de calidad de hábitat.

## Capítulo 2: Marco teórico

### Usos de suelo y su efecto en la biodiversidad

La conservación de la biodiversidad es esencial para el funcionamiento de los ecosistemas y a la vez, fundamental para la sociedad humana, ya que proporciona servicios ambientales esenciales que en general se clasifican en cuatro grupos: de provisión (alimentos, agua limpia, materiales, etc.), de soporte (ciclado de nutrientes, producción de oxígeno, secuestro de carbono, formación de suelos, etc.), de regulación (del clima, control de inundaciones, control de enfermedades, etc.), y culturales (valores estéticos, espirituales, educacionales, de recreación, etc.) [1,2]. Sin embargo, la conservación de la diversidad es uno de los grandes desafíos de la humanidad, principalmente debido a las dificultades de compatibilizar el uso racional de los recursos naturales y el desarrollo productivo [1]. La pérdida de biodiversidad involucra procesos a diversas escalas, incluyendo factores locales, regionales y hasta globales. Las principales causas se relacionan con la conversión y pérdida de hábitats, fragmentación del paisaje, sobreexplotación de recursos naturales, cambio climático, introducción de especies invasoras y contaminación [2]. Por lo que las estrategias de conservación deben apuntar a evitar o minimizar estas presiones. Sin embargo, es poco frecuente la incorporación de este conocimiento (con respecto a los efectos de estas presiones en la biodiversidad) en la toma de decisiones, por parte de quienes gestionan los recursos.

Las diferentes prácticas de los usos de suelo han afectado la integridad y calidad de los recursos hídricos en todo el mundo [3,4] y son la principal amenaza a la integridad ecológica de los sistemas acuáticos [1]. El creciente consumo de recursos naturales, más evidente en las últimas décadas, es responsable, entre muchas otras consecuencias, de la fragmentación y pérdida de hábitat, y tienen un gran impacto en los ecosistemas de agua dulce mediante la modificación de los cursos, alteración del régimen hidrológico, pérdida de calidad de agua y disminución de la biodiversidad [5–8]. Los insectos que habitan estos ambientes no están ajenos a las presiones y se ven afectados no solo por los procesos de modificación propio del sistema acuático, sino que también reciben la influencia del paisaje circundante [9].

Según el informe de suelos del ministerio del agro y la producción de la provincia de Misiones [10], el 96% del territorio provincial corresponde a áreas rurales, de los cuales el 31,10% corresponde a superficie de producción agropecuaria y forestal. A pesar de las recomendaciones e incluso leyes que exigen su conservación, las diferentes prácticas agropecuarias suelen extenderse hasta los propios márgenes de los cursos de agua, ya sea tanto para un mayor aprovechamiento de la superficie de plantación, como en las prácticas ganaderas, donde los arroyos suelen ser usados como bebedero por parte del ganado. En cuanto a la actividad forestal, actualmente existe en la provincia una superficie de más de

200.000 ha de dichos cultivos, con el predominio de las especies *Pinus elliottii* Engelm., *P. taeda* L., *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, y otras de menor importancia (informe de suelos 2018 del ministerio del agro y la producción [10]). Si bien no se puede generalizar el efecto de las plantaciones de *Pinus* en el ambiente, ya que depende de la combinación de diferentes factores (como la región, cultivo previo, manejo actual de la plantación, etc.), un fenómeno general en estas áreas es la disminución del pH del suelo [11,12].

A diferencia de la actividad forestal, el incremento en el uso de pesticidas y fertilizante en la agricultura hace que cada día lleguen mayores concentraciones de químicos hasta las aguas superficiales. En este sentido, los nutrientes también juegan un rol importante en la dinámica de los ríos y juntamente con el aumento de la entrada de luz debido a la eliminación de la vegetación ribereña, producen la eutrofización que deriva en crecimiento excesivo de las algas dando lugar a una disminución del oxígeno disuelto [13,14]. En el contexto de este trabajo, la vegetación ribereña corresponde a aquella que se encuentra en la zona riparia, definida esta última como la interfase entre el paisaje (*landscape*) y el arroyo [15], es decir en sus márgenes. En adelante, riparia, ribereña y marginal se expresan como sinónimos.

Frecuentemente, los ríos y arroyos son usados para eliminar todo tipo de desechos (domésticos, industriales, aguas residuales, etc.), provocando así su contaminación, alterando los parámetros físico-químicos y las comunidades biológicas que los habitan, e impidiendo su plena utilización. En el ambiente urbano, además, los márgenes de los arroyos suelen ser ocupados por la población para la construcción de viviendas, causando la modificación del paisaje que genera el ensanchamiento y desviación del cauce, lagunas artificiales o incluso la interrupción del canal [16]. Según el censo 2010, la población total de la provincia es de 1.101.683 habitantes, el 73,8% de los cuales habita en la zona urbana. Es la provincia que registra, además, el mayor crecimiento intercensal [17]. Este incremento poblacional requiere una mayor inversión en políticas sanitarias. Los efluentes urbanos constituyen un grave problema en la provincia, ya que la gran mayoría de las urbanizaciones no cuentan con un sistema de cloacas eficiente, lo que lleva una vez más a la contaminación del recurso hídrico tanto a nivel de arroyos y ríos como así también de las napas subterráneas. La gran cantidad de materia orgánica que reciben los arroyos a través de la descarga de efluentes domésticos, genera un aumento de la densidad bacteriana, que a su vez aumenta la demanda bioquímica de oxígeno, disminuyendo su concentración [18] y provocando que muchos organismos con alta exigencia de oxígeno se vean perjudicados [1].

La pérdida de vegetación ribereña es un resultado común de las actividades humanas, entre las que más contribuyen a esta pérdida se encuentran la agricultura y ganadería, el crecimiento urbano y el desarrollo industrial, actividades que crecen con poco o nulo control, a pesar de que es bien conocido que la zona riparia es una forma efectiva de proteger el sistema fluvial y la fauna que alberga [16,19]. Un margen conservado reduce la erosión,

disminuye la entrada de sedimentos y otros contaminantes a los cursos de agua, y contribuye al mantenimiento de las comunidades autóctonas actuando como corredores de vida silvestre [20–22]. Además, la remoción de la vegetación riparia tiene un efecto negativo en el ingreso de materia orgánica que constituye la fuente primaria de energía en la cadena alimentaria de los ríos [23,24], con mayor relevancia en arroyos de bajo orden (en cuanto al número de arroyos tributarios) donde el metabolismo heterotrófico es dominante [25]. Todas estas modificaciones llevan, en la mayoría de los casos, a una homogenización del ambiente y en consecuencia a una disminución de la diversidad, ya que se pierden ciertos tipos de sustratos, alimentos y sitios de oviposición que permiten mantener una fauna diversa [1,26–28].

### **Indicadores de monitoreo y calidad ambiental**

El crecimiento continuo de la actividad agrícola, el aumento de la población alrededor del mundo y la importancia y escasez del recurso hídrico hace que cada tema relacionado a la conservación de los ecosistemas acuáticos sea una prioridad para la investigación. En general, para evaluar la calidad del recurso hídrico se utilizan índices de calidad de agua que son un conjunto de parámetros fisicoquímicos (y en algunos casos microbiológicos) que se computan en un solo valor, para determinar nivel de riesgo general del recurso hídrico para el uso según el cual se lo evalúa [29–31]. La estructura de cálculo de la mayoría de los índices se basa en la normalización de los parámetros que los conforman y su posterior ponderación en función de su importancia relativa en la calidad del agua [31–33]. Los parámetros mayormente empleados en los índices son el oxígeno disuelto, el pH, la DBO, los nitratos, los coliformes fecales, la temperatura, la turbidez y los sólidos disueltos totales [31,33–35].

Los indicadores basados en parámetros fisicoquímicos son ampliamente usados en monitoreo ambiental debido a la rapidez en el análisis, a la facilidad en los procesos de muestreo y en su interpretación. Sin embargo, estos valores representan solamente una simplificación del estado del agua, ya que su énfasis está puesto en la salud humana. Los métodos químicos y bacteriológicos tienen ciertas limitaciones con respecto al alto costo de los análisis y la sensibilidad para evaluar la situación general del sistema, además de limitarse al momento y lugar en que se tomó la muestra. Además, el incremento constante de contaminantes que llegan a los ambientes lóticos dificultan cada vez más la evaluación de calidad de agua [36–38]. De hecho, existe una preocupación creciente por el hecho de que las interacciones entre factores de estrés estén afectando negativamente la diversidad [39], ya que se ha demostrado que el efecto de algunos contaminantes puede ser magnificado en presencia de otros estresores, como por ejemplo el riesgo de predación [40,41] o altas temperaturas [42]. Esto podría explicar por qué el contaminante, a pesar de estar presente en niveles dentro de los parámetros considerados seguros, aún causan considerables pérdidas en la diversidad acuática [43,44]. En este sentido, los indicadores biológicos surgen como una forma de

complementar los indicadores fisicoquímicos y ayudar a resolver sus limitaciones. Adicionalmente, proveen herramientas que permiten entender cómo el ambiente y los factores de estrés actúan en la dinámica de las especies [45,46]. Los bioindicadores, tienen la ventaja de ser más integrativos, reflejando la acumulación de los efectos del impacto sobre el ecosistema en tiempo y espacio [1]. Además, pueden advertirnos del efecto de estresores ambientales que son difíciles de evaluar por otros métodos como la fragmentación del hábitat, la presencia de especies invasoras, la sobreexplotación de los recursos o el impacto del turismo sobre el ambiente [36]. Como desventaja se puede mencionar la limitación geográfica en la aplicación de estos indicadores, ya que, por razones biogeográficas y ecológicas, el elenco de especies no será el mismo en todas las regiones [36].

Los invertebrados acuáticos han sido utilizados para evaluar la condición ecológica de ríos en Europa desde inicios del siglo XX [47]. A lo largo de los años han surgido numerosas propuestas metodológicas, y algunas han sido adoptadas por las agencias gubernamentales de diferentes países para los controles rutinarios de calidad de agua [48,49]. Entre las metodologías más usadas se puede nombrar las basadas en índices de riqueza específica, métricas basadas en la tolerancia, índices bióticos según la respuesta diferencial de los organismos a las alteraciones del medio, entre otros (revisado en Prat et al., 2009 [50]).

La mayoría se han desarrollado para usarlos en un área geográfica concreta y, posteriormente, se han adaptado a otras zonas adecuando las listas de taxones y los valores de sensibilidad. Este tipo de análisis está siendo implementado con varios organismos en diferentes partes del mundo (revisado en Gonzales-Zuarth et al., 2014 [36]). Sin embargo, los estudios son aun escasos teniendo en cuenta la diversa hidrografía existente y la falta de protección de los sistemas acuáticos [51]. Así, la investigación en el uso de indicadores abióticos sumado a los estudios que evalúan los efectos adversos de las actividades humanas en estos ecosistemas, es una forma efectiva de proceder en la investigación, manejo y conservación de ambientes lóticos y sus áreas adyacentes [1,52,53].

### **Los odonatos y su ambiente**

Los odonatos son valiosas herramientas para el monitoreo de programas de restauración, han probado ser útiles indicadores de calidad ambiental (e.g. [54–59]), y son usados en abundantes estudios ecológicos (e.g. [60–63]). Aunque no hay mucha información sobre el efecto del uso de suelo en las comunidades de estos insectos, su valor en estos estudios es ampliamente reconocido y se fundamenta en las siguientes características: 1. Buen nivel de conocimiento taxonómico; 2. Alta visibilidad de los adultos debido a su tamaño, coloración y comportamiento; 3. Identificación a nivel específico practicable en el campo con binoculares con un entrenamiento taxonómico sencillo; 4. Fidelidad ambiental; 5. Gran sensibilidad a cambios ambientales estructurales (*i.e.*, vegetación invasora, modificación de vegetación

riberaña, cambios de sustrato y/o corriente) y físico-químicos (*i.e.*, contaminación, temperatura) [64].

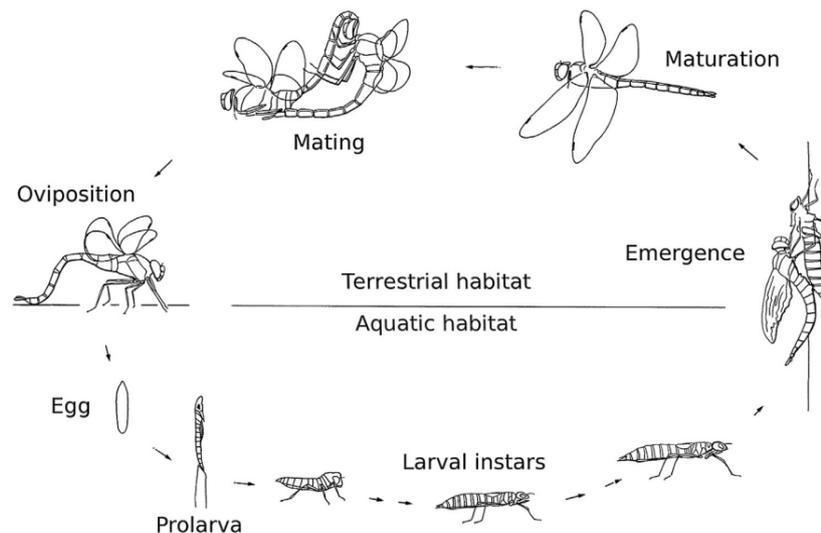
### **El orden Odonata**

Comprenden insectos cosmopolitas, que pueden ser encontrados en la mayoría de los ambientes acuáticos [65]. Hasta el momento se han identificado aproximadamente 6000 especies [66]. La región Neotropical, que comprende aproximadamente la región ubicada entre México y Argentina, presenta la mayor riqueza de especies de odonatos del mundo. Se han descrito 1768 especies, y muchas aún están siendo descritas, aunque se desconoce el 60% de los estadios inmaduros de las mismas [65]. En Argentina, la lista más reciente indica la presencia de 282 especies, de las cuales 195 pueden ser encontradas en la Provincia de Misiones, incluyendo tres especies endémicas [67].

El orden Odonata está representado por dos subórdenes en la región Neotropical, Zygoptera y Anisoptera [65,68]. Los representantes de Zygoptera poseen alas posteriores sin lóbulo anal desarrollado, por lo que son similares a las alas anteriores, y su capacidad de vuelo es más limitada [69]. En general, presenta especies pequeñas, principalmente clasificadas como “*thermal conformers*” [70,71]. Anisoptera en cambio, está representada por ejemplares que son más robustos, con alas anteriores y posteriores diferentes debido a que las posteriores son más anchas en la base por presentar el lóbulo anal desarrollado. Tienen gran capacidad de vuelo, pudiendo alcanzar altas velocidades y recorrer largas distancias [65]. Generalmente son especies medianas o grandes, clasificadas como heliotérmicas, aunque las excepciones son comunes y algunas son “*thermal conformers*” o especies endotérmicas [70,72]. Estos dos subórdenes son generalmente tratados separadamente en estudios ecológicos, ya que sus diferentes requerimientos ecofisiológicos pueden determinar la distribución de las especies [73]. Se ha registrado, por ejemplo, un reemplazo de especies pequeñas por otras más grandes (zigópteros reemplazados por anisópteros) cuando la vegetación ribereña de los arroyos se ve alterada o degradada [74]. Sin embargo, el límite entre los dos subórdenes, con respecto a estas características, no siempre es claro para todas las especies y la proporción Zygoptera/Anisoptera puede ser insuficiente para detectar diferencias [75]. En este sentido, las familias *Coenagrionidae* y *Libellulidae* presentan el mayor número de especies entre los zigópteros y anisópteros respectivamente [65,68]. Ambas incluyen en mayor número, especies con distribución amplia, con una mayor capacidad migratoria que dominan espacios abiertos y sin sombra [65,68,69,76], por lo que recientemente se ha propuesto que la proporción de estas familias en sus respectivos subórdenes podría ser un indicador objetivo más preciso para determinar el estado del ambiente que se desea evaluar [75].

### **Ciclo de vida**

Presentan un ciclo de vida hemimetábolo que incluye estado de huevo, larva y adulto. Los dos primeros se desarrollan en el agua, mientras que los adultos son voladores, lo que los hace adecuados para reflejar medidas de la calidad del hábitat tanto en el ambiente acuático como en el terrestre (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida de Odonata (extraído de Suhling et al., 2015 [68])

### El estado de larva

Las larvas de Odonatos presentan una gran variedad morfológica, pudiendo colonizar diferentes substratos dentro de los ambientes loticos y lenticos [77]. Son predadores eficientes ya que cuentan con un labio prensil altamente modificado, que se proyecta hacia adelante para capturar a la presa. Se alimentan de insectos acuáticos, pequeños peces, renacuajos, crustáceos y otros invertebrados en general, lo que los hace importantes en la estructuración de las redes alimentarias de los ecosistemas acuáticos donde habitan ([70]. La duración del estado larval, de acuerdo a la especie y la temperatura, varía entre algunas semanas y varios años y pueden presentar entre ocho y 17 estadios [70]. En las especies que se han especializado a cuerpos de agua temporarios, las larvas pueden desarrollarse en promedio de uno a cuatro meses, mientras que en las demás es muy común la presencia de ciclos univoltinos (una generación al año) [68]. Sin embargo, en las regiones tropicales, algunos Coenagrionidae y Libellulidae presentan un desarrollo continuo, pudiendo alcanzar hasta cuatro generaciones en un año (Corbet, 1999).

### Ambiente, parámetros físico-químicos y distribución de las larvas

Las principales sustancias que contaminan el agua son los productos de erosión, efluentes industriales, escorrentía agrícola (incluyendo pesticidas), y aguas residuales urbanas. El efecto de estas sustancias depende de la concentración y tiempo de exposición, pero también

del efecto de otros factores, como la temperatura, oxígeno disuelto, pH y sales disueltas, por lo que es esencial evaluar los efectos de los contaminantes a campo [70].

El pH del agua se correlaciona ampliamente con la distribución de ciertas taxa de odonatos, pero raramente es el determinante de esta distribución. Varias especies se encuentran en un amplio rango de pH. Este parámetro, además, está correlacionado con la salinidad y la conductividad, con la acumulación y descomposición de materia orgánica y la presencia o ausencia de peces, por lo que la distribución de invertebrados puede no estar determinada por el pH en sí sino por uno o varios de los factores físicos y bióticos que este refleja [70].

El movimiento del agua juega un papel importante en la distribución de ciertas especies, probablemente debido a que mantienen altas concentraciones de oxígeno disuelto que afecta el comportamiento, metabolismo y supervivencia de la larva de odonato. Si bien las larvas tienen mecanismos para tolerar bajos niveles de oxígeno, el efecto puede ser de manera indirecta mediante la disminución de organismos de los que se alimentan [70].

Por otro lado, Las larvas de odonatos pueden ser seriamente afectadas por la modificación física de su hábitat y por contaminantes, principalmente pesticidas. Entre los insecticidas comúnmente usados, los organoclorados y organofosforados tienen efecto más severo. Como predadores y presas, contribuyen a la biomagnificación de la degradación de productos de ciertos contaminantes en ecosistemas acuáticos [70]. Concentraciones subletales de organoclorados pueden permanecer en los organismos mucho después de que hayan desaparecido en el ambiente, debido a la ingesta de animales que acumularon estas sustancias tanto por exposición directa como por haber consumido presas contaminadas.

### **El estado adulto**

Después del período de mudas, en el que la larva crece, ocurre la metamorfosis y el desarrollo del adulto. Para la emergencia, la larva se desplaza fuera del agua agarrándose de raíces, plantas acuáticas, ramas, etc., hasta que el adulto emerge del exoesqueleto larval. En este periodo la larva no se alimenta más y puede respirar el aire atmosférico [70]. Luego el adulto pasa por un período de maduración sexual que varía de pocos días a dos meses según la especie. En esta fase, los adultos concentran sus actividades en la alimentación. Son predadores voraces al igual que la larva, y excelentes voladores, pudiendo capturar a sus presas en pleno vuelo [65]. Los odonatos adultos son muchas veces coloridos y vistosos. Luego de la madurez sexual, en general, los machos presentan un comportamiento territorial, defendiendo las inmediaciones de criaderos apropiados para su especie. Las hembras frecuentemente se dispersan para alimentarse, volviendo al ambiente acuático solo para la cópula y oviposición. Además de estas diferencias comportamentales, la mayoría de las especies presentan dimorfismo sexual donde los machos son más coloridos que las hembras [65,70].

La cópula es algo característico y único del orden Odonata. A diferencia de otros insectos, el macho posee una genitalia accesoria compleja en la parte ventral del segundo y tercer segmento abdominal. Antes de la cópula, el macho transfiere el esperma de su genitalia verdadera, cuyo poro se localiza en el noveno segmento abdominal, hasta el órgano copulador accesorio, curvando el abdomen y conectando la abertura genital con la genitalia accesoria. En la cópula, que generalmente ocurre durante el vuelo, los dos sexos pasan un tiempo considerable en tándem, con el macho sujetando a la hembra por la parte posterior de la cabeza o protórax mediante los cercos, paraproctos o epiprocto, para evitar que se aparee con otros machos. En este momento la hembra curva el abdomen hacia la región anterior, permitiendo la conexión de su genitalia, ubicada en el octavo segmento, con la genitalia accesoria del macho formando un enlace característico (Figura 2) [70].



**Figura 2.** Apareamiento de dos zigópteros formando el particular enlace. Campo Ramón, Misiones, 2018.

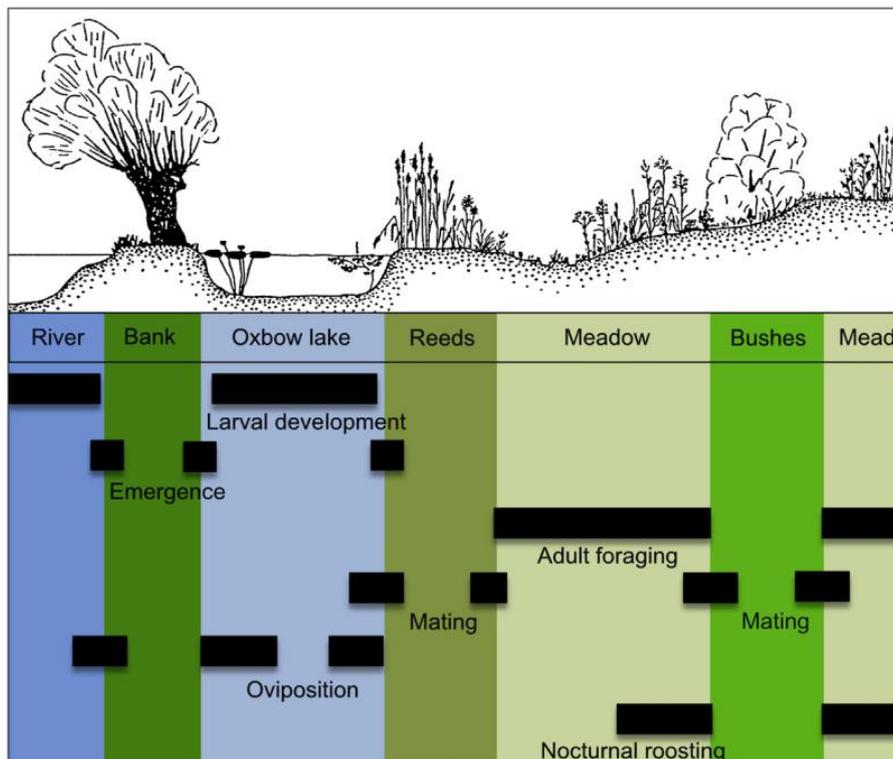
Existen tres tipos de oviposición que varían considerablemente dentro del grupo. En la mayoría de los casos la oviposición es endofítica, donde las hembras insertan los huevos en tejidos de plantas, troncos, hojas o raíces mediante un ovipositor ubicado en la región distal del abdomen (zigópteros en su mayoría). Otras especies (mayoría de los anisópteros), tienen oviposición exofítica, donde la hembra sumerge el extremo del abdomen en el agua y los huevos son liberados individualmente, o epifítica donde los huevos son adheridos al sustrato en masas gelatinosas [68,70].

El tiempo de eclosión depende de la temperatura del agua, pudiendo ocurrir, generalmente, entre cinco y treinta días. Del huevo emerge una pro-larva completamente envuelta por una fina membrana, la cual, minutos u horas después se rompe, dejando salir a la larva

propriadamente dicha [70]. Generalmente la primera muda ocurre directamente después o incluso durante este proceso, de manera que el segundo estadio larval sería el visible. El primer estadio es funcional solo en algunas especies que ovipositan fuera del agua, de modo que la prolarva alcanza el agua caminando [68].

### El ambiente del adulto

El ensamblaje de los odonatos adultos usualmente es influenciado por la fisionomía y estratificación de la vegetación marginal y la presencia de plantas acuáticas [54,78], dado que esos son parámetros relacionados a la selección del hábitat y de los sitios de oviposición [70]. La vegetación marginal también regula las condiciones microclimáticas locales [26,79,80], al afectar la llegada de la luz solar, que es uno de los factores determinantes en el comportamiento de los odonatos, debido a sus estrategias de termorregulación [72,73]. La regulación de la temperatura involucra cambios en la producción de calor metabólico, intercambio calórico con el ambiente o ambos. Algunas especies que pasan la mayor parte del tiempo posados y hacen solamente vuelos cortos, controlan su temperatura corporal ajustando su postura con respecto al sol. Otros, que vuelan continuamente, pueden regular su temperatura mediante ajustes en la producción de calor metabólico. Otros mecanismos que han sido registrados involucran la selección de microhábitat, el ajuste de la actividad diaria y el movimiento reversible de pigmento subcuticular [39,68,70].



**Figura 3.** Estructuras del hábitat que utiliza el odonato durante los diferentes estadios de su ciclo de vida (extraída de Suhling et al., 2015) [68].

Como la larva es relativamente sedentaria y en general confinada a un cuerpo de agua, suele asociarse esta etapa al hábitat característico de la especie. Pero debe tenerse en cuenta que el huevo y el adulto tienen requisitos específicos también (Figura 3). Las dimensiones del nicho de la especie varían en gran medida con la capacidad de dispersión del adulto. La experiencia indicaría que las especies responden a características del hábitat de manera jerárquica, en una secuencia de pasos que van desde el biotopo o macrohábitat (e.g. bosque, pantanal), el hábitat de la larva (laguna, arroyo) y al sitio de ovoposición (micrófitas, árboles enraizados) [68,70]. La selección de las dos primeras características se produce principalmente mediante percepción visual. Para el sitio de oviposición pueden estar involucrados, además, la sensibilidad táctil y térmica y la forma del crecimiento y la distribución de las plantas en el agua [68]. Si bien los Odonatos están asociados a plantas en todos los estados de su ciclo, se cree que la estructura y apariencia de la comunidad de plantas, más que la especie, sirven como claves para el reconocimiento del hábitat [70].

### **Diversidad genética como indicador**

Si bien el número de estudios con respecto a estrategias para el monitoreo de la diversidad biológica en diferentes ambientes está creciendo en el último tiempo, la variación genética de las poblaciones es menos conocida, desaprovechando los beneficios que otorgan los marcadores moleculares [81]. El monitoreo genético de las especies provee importante información con respecto al estado presente de las mismas [82]. Trabajos en insectos han permitido cuantificar el polimorfismo en un locus asociándolo a la demografía de la población y caracteres de historia de vida y fitness tanto en adultos como en larvas (revisado en Bybee et al., 2016 [39]). En otros organismos se ha demostrado una relación negativa entre la intensidad del uso de la tierra en las proximidades de las charcas y la diversidad genética de las poblaciones [83]. El mismo resultado se observa frente a la exposición a sustancias tóxicas, que redujeron la variabilidad genética de la población [84]. También se han utilizado odonatos como sistemas de modelo para estudios donde caracteres del paisaje como áreas urbanas [85] y el desarrollo de la agricultura [86] pueden limitar o afectar las vías de dispersión reduciendo además la diversidad de poblaciones aisladas. Recientemente se evaluó además, la diversidad genética como consecuencia de la expansión geográfica de las especies [87]. La diversidad genética intraespecífica es una medida esencial de la biodiversidad [88] y es un indicador del potencial de una población para adaptarse a futuros factores de estrés [89,90]. Según como afecten en los procesos microevolutivos, las actividades humanas pueden disminuir, aumentar o mantener la diversidad genética en el tiempo [91]. La fragmentación o destrucción del hábitat natural debido a la creciente actividad antrópica, provoca una disminución en la abundancia y un mayor aislamiento de las poblaciones. El aumento de la deriva genética, la endogamia y la reducción del flujo de genes que ocurre en estos casos,

pueden reducir sustancialmente la diversidad genética [92], aumentando el grado de homocigosis, la expresión de alelos recesivos deletéreos [93], y afectando a largo plazo, el potencial de la especie para adaptarse a las cambiantes condiciones ambientales [94].

El monitoreo genético de las poblaciones frecuentemente se basa en cambios de abundancia inferidos a través de cambios en la diversidad genética (heterocigocidad esperada, diversidad alélica, diversidad nucleotídica, etc.). Para caracterizar dicha variabilidad existen diferentes herramientas moleculares. Entre ellas, los microsatélites han mostrados ser muy útiles en varias especies, incluso dentro del orden Odonata [95,96]. Debido a la alta variabilidad y rápida evolución de estos elementos genéticos, son adecuados para estudiar la diferenciación entre poblaciones relacionadas como así también cambios recientes y rápidos en la variabilidad genética dentro de ellas. Otra ventaja de los microsatélites es la posibilidad de abarcar múltiples loci, aumentando así las chances de detectar variabilidad. Esto podría ser particularmente importante para monitorear ambientes donde las muestras son limitadas. Un inconveniente potencial de los microsatélites es que normalmente tienen que ser aislados de *novo* en la especie deseada, proceso que puede resultar laborioso y llevar cierto tiempo. Sin embargo, es común que utilizando cebadores desarrollados para especies emparentadas se logre una transferencia exitosa [97,98]. En la última década se han desarrollado paneles de microsatélites en varias especies de odonatos, sobre todo en aquellas que se ven expuestas a un peligro de extinción latente, como instrumento para desarrollar medias de conservación efectivas [96,97,99]. Sin embargo, la gran mayoría de estas especies no presentan su distribución en la provincia de Misiones, por lo que resulta necesario comprobar la efectividad de amplificación cruzada de estos marcadores moleculares.

*Hetaerina* Hagen in Selys, 1853 es un género de Odonata de la región Neotropical con alrededor de 40 especies descritas (Garrison, 1990). Estos zigópteros, se caracterizan por un comportamiento marcadamente territorial por parte del macho y la presencia de una mancha roja en la base del ala. Este carácter es importante en la competencia por el apareamiento: machos con manchas más grandes son más exitosos en la defensa del territorio donde las hembras se acercan para la cópula y presentan además una mayor respuesta inmunológica (Contreras-Garduño et al., 2007; Contreras-Garduño et al., 2006; Serrano-Meneses et al., 2018). *Hetaerina* es abundante en los ecosistemas loticos, y sus larvas son consideradas predadores importantes de varios grupos animales [104].

Numerosos estudios sobre ecología y comportamiento se han llevado a cabo en *Hetaerina americana* Fabricius, 1798, una especie cuya distribución se restringe al norte del continente americano (Garrison, 1990). Esta especie además ha sido foco de estudios a nivel genético [105] para los que se ha desarrollado un panel de microsatélites que ha mostrado ser potencialmente útil en la caracterización de otras especies del género [106]. En Argentina es posible encontrar cinco especies de *Hetaerina*: *H. longipes* Hagen in Selys, 1853, *H. mendezi*

Jurzitza, 1982, *H. proxima* Selys, 1853, *H. sanguinea* Selys, 1853 y *H. rosea* Selys, 1853 [67]. Esta última tiene una gran distribución, desde Brasil hasta el centro de Argentina, incluyendo la provincia de Misiones [67,100]. Habita ambientes lóticos, frecuentemente con abundante vegetación riparia [107], aunque también se las ha capturado en ríos degradados [108]. Son odonatos conspicuos, abundantes y relativamente fáciles de capturar, por lo que representan una opción viable para la evaluación genética poblacional.

### **Código de barras de ADN (*barcode*) para la identificación específica**

Además de presentar la mayor riqueza de odonatos, la fauna de la región Neotropical es la menos conocida en comparación a otras regiones [76], debido tanto a la gran diversidad presente como a las limitaciones relacionadas a la identificación de especies, ya que las claves taxonómicas disponibles para esta región son limitadas. Una forma de superar esta dificultad se encuentra en la utilización de herramientas moleculares como el código de barras (*barcode*) de ADN, una técnica de identificación rápida y precisa de especies a través de una región estandarizada de ADN. Desde la sugerencia como posible marcador para *barcode* de ADN [109] en [110], el fragmento de la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa mitocondrial (COI) se ha utilizado exitosamente en la identificación de una gran variedad de grupos animales [111]. El principal criterio para determinar un marcador de *barcode* corresponde a una mayor divergencia interespecífica y una menor variabilidad intraespecífica, para lograr una asignación precisa de la secuencia a un grupo taxonómico dado. El gen de la proteína de la mitocondria presenta algunas características que favorecen su uso como marcador: un alto número de copias por célula que facilita la amplificación por PCR, su carácter haploide, la ausencia de intrones, rara ocurrencia de indeles y baja tasa de recombinación [110] son algunas de ellas.

La base de datos de COI para odonatos presenta información de diferentes regiones como Europa y África. Evaluaciones previas de la capacidad del *barcode* para identificar especies de odonatos sugiere una precisión de alrededor del 95% [110]. El Barcoding parece ser una herramienta efectiva para asistir en estudios de diversidad de odonatos, pero la correcta identificación depende en gran medida de la existencia de una base de datos robusta sobre la cual comparar. Recientemente se comenzó a desarrollar una librería de referencia para la región Neotropical con un grupo de odonatos presentes en la región del Cerrado y Selva atlántica brasilera [112], donde fue posible identificar el 94% de especies, con una variación interespecífica de al menos 15%. Sin embargo, la escasez de datos moleculares de odonatos en esta región dificulta la utilización de este tipo de herramientas para la identificación. Así, sumar datos moleculares de las especies de nuestra región permitirá ampliar esta librería, lo que brindará una herramienta importante para una mejor interpretación de la diversidad presente en este grupo taxonómico.

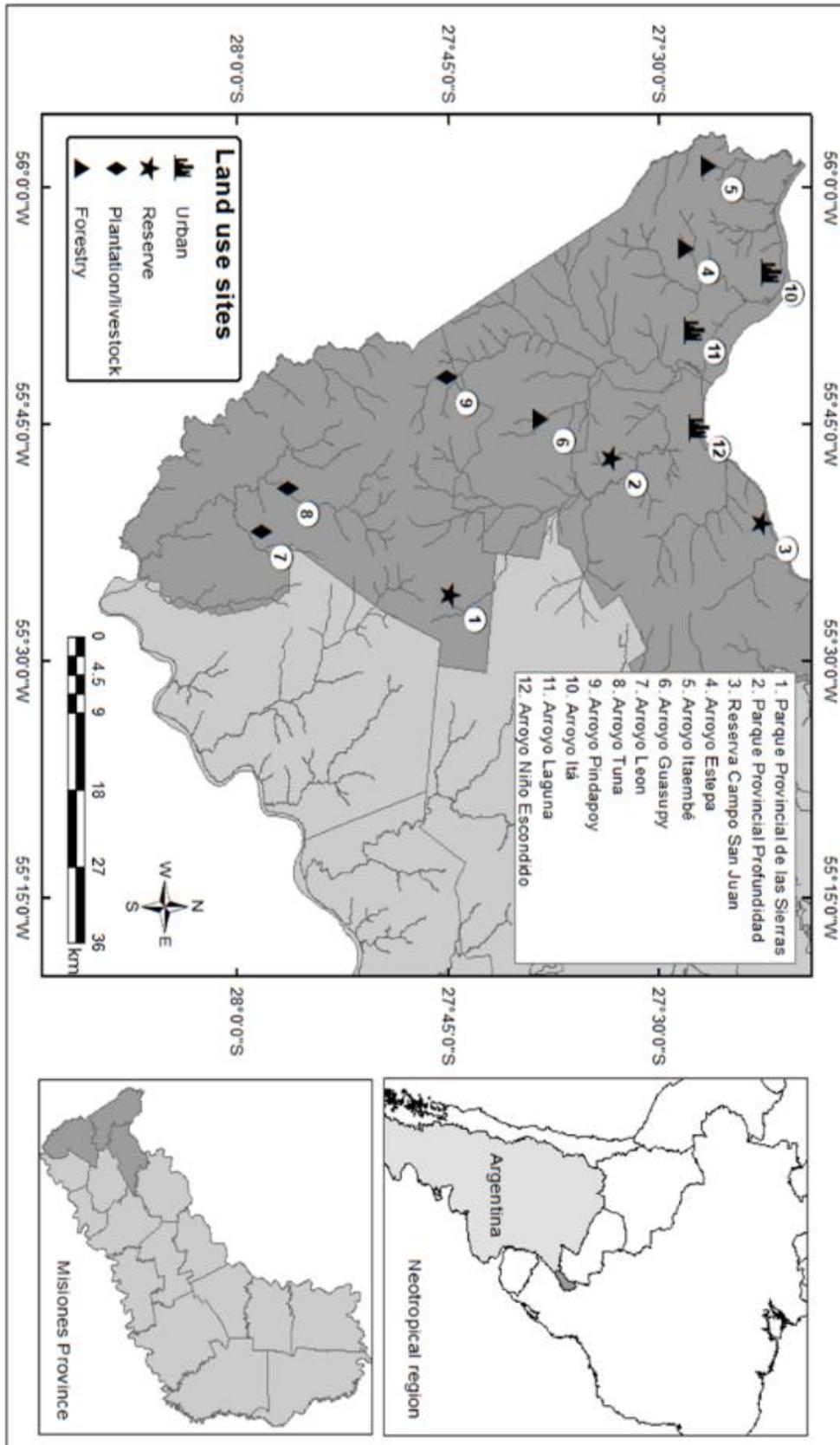
## Capítulo 3: Materiales y Métodos

### Diversidad específica y su relación con el ambiente

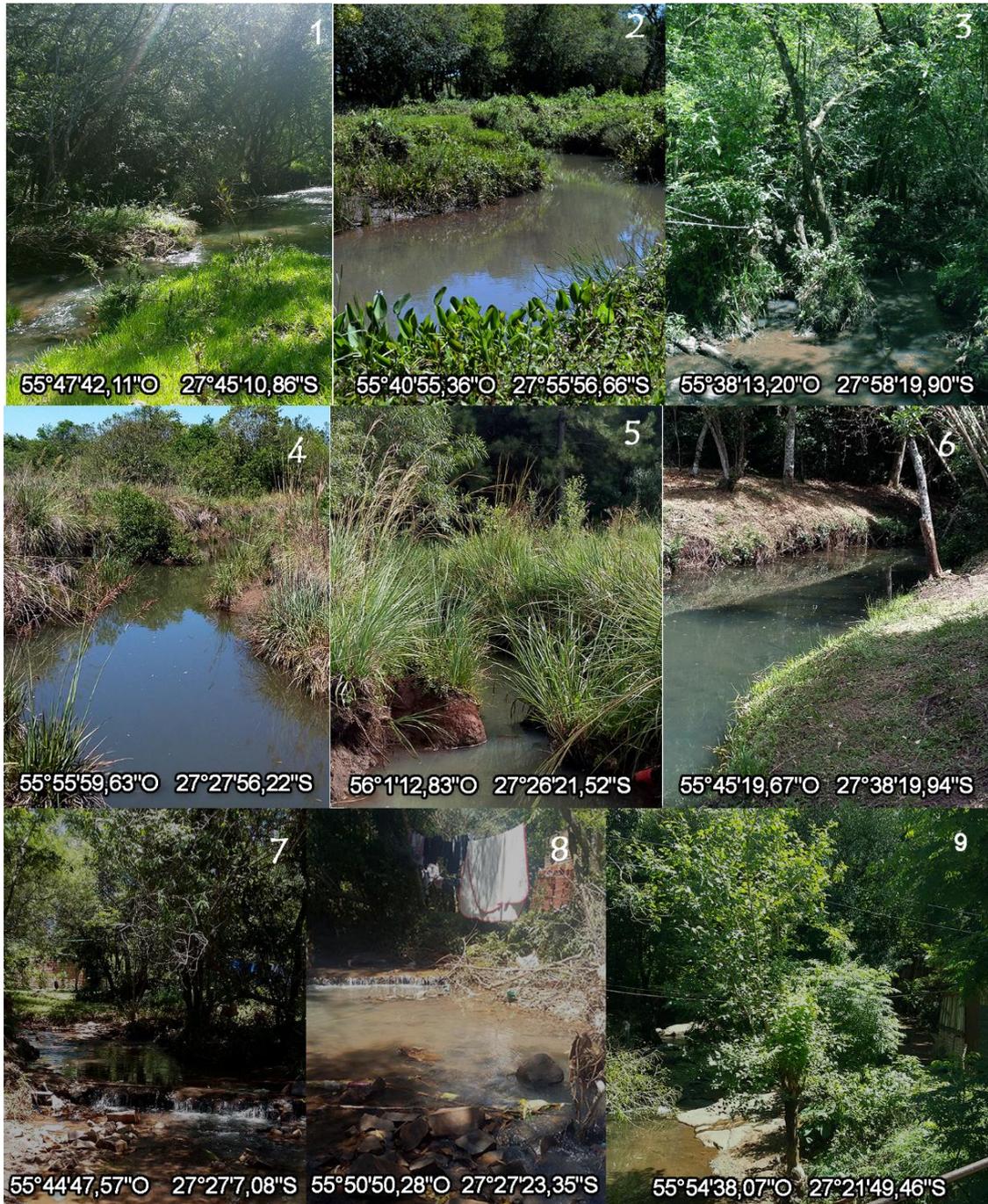
**Área de estudio:** para la realización del presente estudio, fue seleccionada la región sur de la provincia de Misiones donde está representada la ecorregión de campos y malezales. La misma comprende una zona de transición ecológica entre las ecorregiones limitantes: Selva Paranaense al noreste, Esteros del Iberá y Espinal al sudoeste [113]. Esta ecorregión, coincidente con el distrito del mismo nombre e incluido dentro de la provincia Paranaense del dominio Amazónico [114], posee la influencia de las ecorregiones que la rodean, lo que favorece la presencia de una rica fauna, incluyendo varias especies amenazadas en el país, como el ciervo de las pampas (IUCN 2015). El paisaje nativo está representado por pastizales con parches aislados de bosque autóctono. Acompañando los cursos fluviales también aparecen densos bosques en galerías. El clima es subtropical húmedo, con lluvias uniformes a lo largo del año, entre 1500-1700 mm anuales [113,114] y la literatura de esta región refleja una gran diversidad florística, debido a su particular condición de humedad y temperatura [114]. A pesar de esto, la ecorregión de Campos y Malezales es la región menos protegida del país en cuanto a proporción de reservas naturales [115] y al mismo tiempo, una de las más amenazadas por su área reducida, creciente forestación con especies exóticas (principalmente *Pinus sp.*) y agricultura. Si bien en Misiones más de una tercera parte de la territorialidad provincial está destinada a conservación (informe de suelos 2018 del ministerio del agro y la producción), la gran mayoría de las áreas protegidas buscan preservar la biodiversidad de la selva paranaense.

En este trabajo, se seleccionaron tres usos de suelo típicos de la región para evaluar sus efectos en la comunidad de Odonata y su hábitat: 1- área urbana, 2- agricultura-ganadería, 3- forestal, y 4- reservas naturales como sitios prístinos testigos. La ubicación de los mismos se observa en la Figura 4.

Para cada uso de suelo, se seleccionaron tres arroyos (de hasta 3m de ancho) donde la actividad antrópica seleccionada se ha desarrollado por al menos los últimos siete años, considerando además que no hubiera interferencia con las otras actividades y que el acceso al mismo fuera factible (Figura 5).



**Figura 4.** Área de estudio y sitios de muestreo evaluados en el sur de Misiones, 2016-2018.

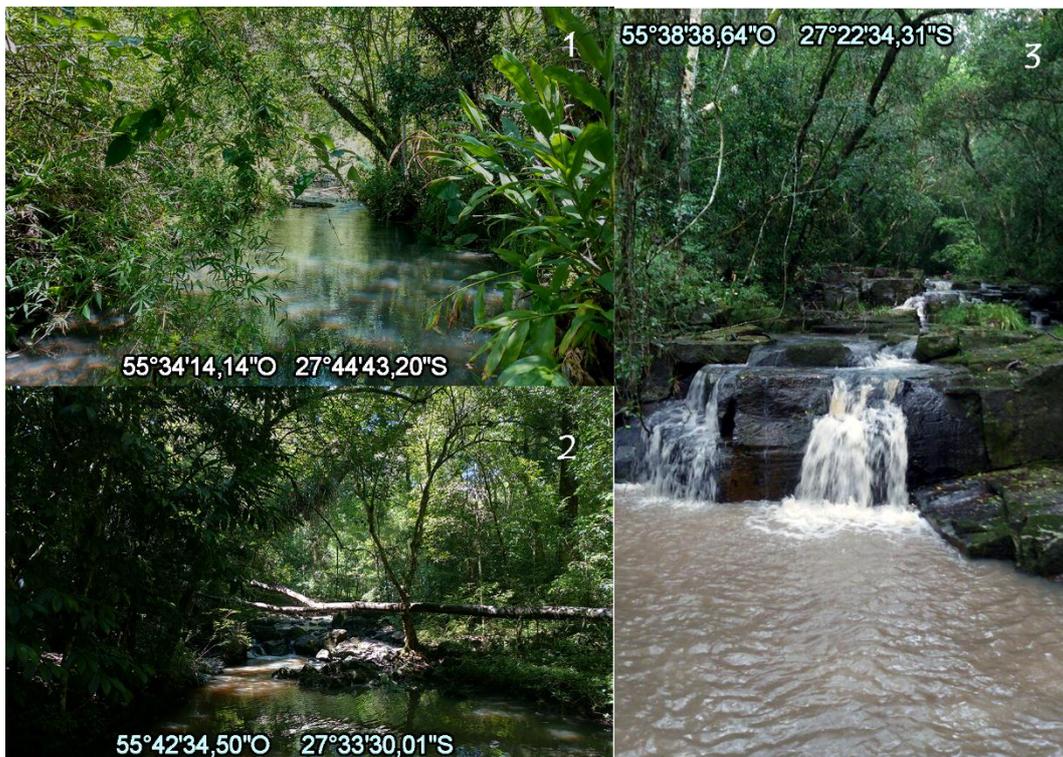


**Figura 5.** Arroyos seleccionados según el uso de suelo. Agricultura: 1-Pindapoy, 2-Tuna, 3-León. Forestación: 4-Estepa, 5-ltaembe, 6-Guasupy. Ambiente urbano: 7-Niño escondido, 8-Laguna, 9-Itá.

En cuanto a las reservas, se seleccionaron 3 grandes áreas que protegen la flora y fauna característica de la ecorregión de campos y malezales (Figura 6):

- Parque Provincial de las Sierras: con un área de 1088 hectáreas, fue creado en 1996 para la conservación de dos ecorregiones presentes en el área: al norte la región de Selva Paranaense, y al sur podemos encontrar una porción de Campos y Malezales.

- Parque Provincial Profundidad: con un área de 19 hectáreas de campos y bosques, protegida desde 1991.
- Reserva Privada Campo San Juan: aunque más reciente, es la reserva de mayor extensión en la ecorregión. Comprende 5000 hectáreas destinadas, desde 2009, a la conservación de una zona representativa de la ecorregión de Campos y Malezales [116]. Si bien se ubica en el límite de la ecorregión de Selva Paranaense, y podría ser considerada como ecotono entre las dos ecorregiones, la reserva presenta en parte de su extensión, flora y fauna típica de Campos y Malezales [116], como sucede con el Parque Provincial de las Sierras.



**Figura 6.** Arroyos seleccionados en reservas de la ecorregión de Campos y Malezales del sur de Misiones. 1) Crovetto. 2) Profundidad. 3) Campo San Juan.

**Índice de ribera:** la integridad del arroyo se ha medido en base al índice de integridad del hábitat (HII) [117] que se basa en 12 características estructurales del ambiente en la zona riparia. Cada variable estructural está compuesta por ítems que evalúan (i) el uso de suelo en el área externa al bosque ripario, (ii) el ancho de la vegetación ribereña y (iii) grado de preservación de la misma, (iv) la condición del bosque ripario dentro de los 10 m, (v) mecanismos de retención, (vi) sedimentos, (vii) estructura del margen, (viii) forma del cauce, (ix) fondo del arroyo (x) áreas de rápidos, piletas y meandros, (xi) vegetación acuática y (xii) detritos (Apéndice 1).

Para realizar la evaluación de ribera se ha seleccionado una transecta de 100 m sobre el margen del arroyo, estimando el estado de cada característica a lo largo de la misma. Para calcular el índice, las diferentes variables fueron ponderadas de acuerdo a la escala usada en cada caso. El índice final corresponde al promedio de estos valores, varía de 0 a 1 y es proporcional a la integridad del hábitat.

**Variables ambientales:** los parámetros ambientales también fueron evaluados debido a que pueden ser alterados por diferentes prácticas asociadas a los usos de suelo [16], pudiendo afectar el desarrollo larvario de los odonatos [70]. Las variables que se midieron son: nitratos, ortofosfato disuelto, DQO, sólidos disueltos totales, turbiedad, coliformes totales, temperatura aire, temperatura agua, conductividad, oxígeno y pH. Todos los parámetros ambientales fueron normalizados, para permitir su comparación. A fin de reducir variables y facilitar el análisis, se evaluó la correlación entre las mismas eliminando aquellas con un coeficiente de Pearson mayor a 0,8. Luego se seleccionaron las variables que mejor explicaban las diferencias de los diferentes sitios, conservando 5 variables en total (Tabla 1). La temperatura del agua fue determinada con un termómetro digital (WT-1), la conductividad se registró mediante un potenciómetro portable (JENCO 6350) y el oxígeno disuelto con un oxímetro portátil (HANNA HI 9146). Una muestra de agua fue tomada en dos ocasiones (al inicio de cada temporada de muestreo) en cada sitio para determinar turbidez y concentración de nitratos. Estos análisis fueron realizados por el programa de Efluentes Industriales y Urbanos (FCEQyN-UNaM, Misiones, Argentina).

**Relevamiento de especies:** La colección de odonatos machos adultos se llevó a cabo durante los meses de noviembre y febrero entre 2016 y 2018, de 10 a 15 hs, que corresponde al período de mayor actividad de los odonatos [70]. En este período, cada sitio fue visitado cuatro veces (ver detalle en apéndice 4). Los datos obtenidos en cada visita fueron combinados para capturar la mayor diversidad posible de cada sitio. Las hembras adultas no fueron consideradas debido a la dificultad en su identificación específica debido a la escasez de descripciones y claves adecuadas y que, a diferencia de los machos, no suelen estar tan presentes en territorio ribereño. A fin de determinar la abundancia y riqueza de especies, los odonatos fueron capturados a lo largo de 10 transectas (10m x 1m) paralelas al cauce del arroyo, siguiendo la metodología de Smith *et al.* (2007) [118]. Se utilizaron redes aéreas y los insectos coleccionados que no pudieron ser identificados a campo fueron muertos y fijados con alcohol 70%. Una vez en el laboratorio, fueron examinados mediante un microscopio estereoscópico Leica MZ6 y un microscopio Leica DM500. Para su identificación se utilizaron las claves taxonómicas pertinentes [119–123], colecciones de referencia y asistencia de especialistas argentinos (Dres. F. Lozano, J. Muzón, P. Pessacq) y extranjeros (Dr. R.W.

Garrison). Finalmente, aquellos especímenes que no pudieron ser identificados a nivel de especie, fueron tratados como morfotipos. Con excepción de unos pocos ejemplares (mencionados más abajo) todos los ejemplares coleccionados y fijados se encuentran depositados en el Centro de Investigaciones Entomológicas de Posadas. Para la identificación a campo, fueron realizados muestreos previos como entrenamiento en identificación. Luego de los primeros muestreos en el 2016, fue posible la identificación a campo de gran parte de las especies mediante captura y liberación, evitando la muerte innecesaria de ejemplares. En los muestreos se detectaron además especies cuyos estadios inmaduros no habían sido descritos aún, por lo que se procedió a la captura y cría de larvas en laboratorio para su posterior descripción. Las larvas de *Peristicta aeneoviridis* Calvert, 1909 fueron capturadas en el Parque Provincial Profundidad. Los especímenes fueron preservados en alcohol 70%, o bien fueron transportados vivos para su cría en frascos plásticos y mantenidos en criaderos individuales en el laboratorio, imitando las condiciones de su ambiente natural y controlando la oxigenación del agua, alimentación y emergencia.

Descripciones taxonómicas: las fotografías y micrografías fueron tomadas con la ayuda de una cámara digital Leica EC3 acoplada al material óptico mencionado más arriba. Las ilustraciones se realizaron con Adobe Illustrator CC®. Las medidas fueron tomadas mediante un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4. La fórmula mandibular corresponde a Watson (1956). Abreviaciones: S1–10: segmentos abdominales 1 a 10. Todos los especímenes utilizados en las descripciones morfológicas están depositados en la colección de “CIEMEP”, Esquel, Argentina.

**Análisis de datos:** para el ordenamiento y exploración de los factores que estructuran cada tipo de ambiente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), incluyendo los parámetros ambientales seleccionados y el índice Hll. El número de ejes conservados para el análisis se determinó mediante el modelo *broken-stick*. Las diferencias en las variables entre los estados de conservación fueron evaluadas usando los valores del eje y el test de *Kruskal-Wallis*. De esta manera, los arroyos clasificados como conservados en este estudio tienen un Hll superior a 0,8, los sitios intermedios están entre 0,5 y 0,8 y los degradados tienen un índice inferior a 0,5.

La representatividad de la riqueza de especies observada se evaluó mediante una curva de rarefacción y se estimó la diversidad alfa y beta para el área de estudio. La correlación de las variables ambientales con las especies de odonatos presentes fue evaluada mediante un análisis de correspondencia canónica (CCA) utilizando la matriz de la abundancia de especies log-transformada. Las diferencias en la proporción de Coenagrionidae/Zygoptera y Libellulidae/Anisoptera se evaluaron mediante un test de *Kruskal-Wallis*. Todos estos análisis fueron realizados con software Past3 [124].

Para evaluar potenciales especies indicadoras de las tres categorías de integridad de hábitat, se utilizó el método del valor indicador (IndVal) [125]. Este índice se calcula estimando la especificidad y fidelidad de cada especie a una condición dada. La significancia se obtuvo con un test de Monte Carlo, usando 10000 réplicas. Todos estos análisis fueron realizados en la plataforma R [126] usando los paquetes Species, Vegan e Indicspecies [127–129].

## Diversidad genética

**Evaluación de microsatélites:** Se extrajo el ADN de individuos de *Hetaerina rosea* que fueron encontrados en todos los sitios evaluados, a partir de una sola pata del adulto siguiendo el protocolo de [130], ya que es un método no invasivo que permitió conservar los ejemplares en la colección de Odonatos del Centro de Investigaciones Entomológicas. Debido a que los cebadores de microsatélites fueron desarrollados para una especie emparentada, se amplificaron las regiones de dos organismos al azar y los fragmentos fueron secuenciados a fin de confirmar que los mismos contienen regiones repetitivas. Los microsatélites seleccionados fueron amplificados en siete individuos por población. Partiendo del protocolo de Anderson y Grether (2013) [106] usando los cebadores híbridos-M13, se realizaron varios ensayos buscando optimizar las condiciones de PCR. Los parámetros de ciclado fueron los siguientes: 7min 94°C; 25 ciclos: 30s 94°C, 40s 55°C, 50s 72°C; 20 ciclos: 30s 94°C, 40s 51°C, 50s 72°C; 5min a 72°C. Los fragmentos obtenidos fueron evaluados mediante secuenciador capilar ABI 3037 (Macrogen, Inc) y el tamaño de los alelos fue valorado manualmente usando Peak Scanner v1.0 (PE Applied Biosystems).

**Citocromo c oxidasa I (COI):** se seleccionaron 189 individuos según la disponibilidad de ejemplares colectados en cada sitio de estudio para secuenciar la región del gen COI. Un fragmento de aproximadamente 650bp del extremo 5' de la subunidad I de citocromo oxidasa mitocondrial fue amplificado y secuenciado mediante el proyecto *International Barcode of Life* (iBoL), utilizando los siguientes primers desarrollados para odonatos:

HCO2198_t1 (Folmer tailed) F:	5'CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA3'
LCO1490_t1 (Folmer tailed) R:	5'TGTAAAACGACGGCCAGTGGTCAACAAATCATAAA GATATTGG3'

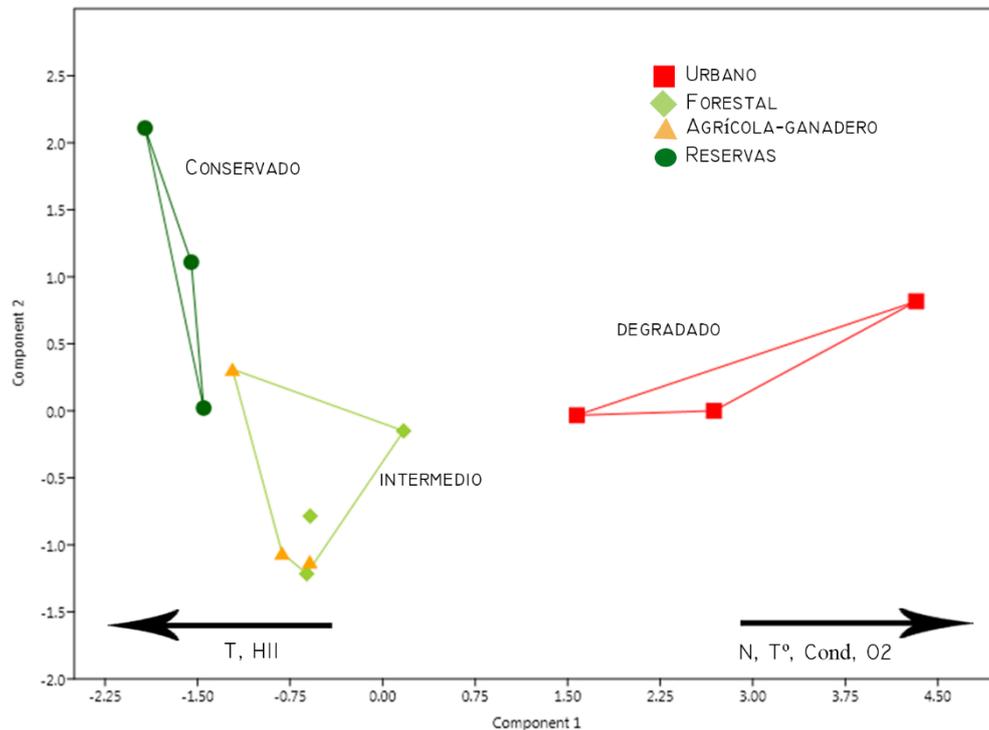
Las secuencias exitosas fueron almacenadas en Barcoding of Life Datasystem (BOLD: <http://www.boldsystems.org>) y los ejemplares depositados en el Museo Argentino de Ciencias

Naturales Bernardino Rivadavia. La diversidad intra e interespecífica fue estimada mediante la herramienta “*Barcode Gap Analysis*” que provee BOLD, utilizando Kimura-2-Parameter (K2P). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante MUSCLE [131] con la configuración por defecto. Se construyó además un árbol usando el método neighbor-joining para visualizar estas distancias.

## Capítulo 4: Resultados

### Diversidad específica y su relación con el ambiente

El análisis PCA de los parámetros abióticos permite diferenciar 3 grupos de sitios (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis de componentes principales del índice HII y las variables ambientales consideradas en el estudio de los arroyos de Misiones, representando los sitios en diferentes usos de suelo.

Según el modelo de broken stick, solo la primera componente resulta significativa, explicando el 60,36% de la variación de los parámetros abióticos. La misma está negativamente relacionada con el índice HII y la turbidez, en oposición a la concentración de nitratos, oxígeno disuelto y temperatura del agua, que muestran una correlación positiva (Tabla 1).

Se encontraron diferencias significativas ( $H=9,34$ ,  $p 0,01$ ) entre las categorías de hábitat (conservado, intermedio y degradado) y entre cada par de categorías ( $p 0,05$ ). Los sitios intermedios corresponden a áreas rurales destinadas a la agricultura, ganadería o a la industria forestal. Estos sitios presentan límites difusos en la zona riparia, con tránsito moderado en la ribera del arroyo y con vegetación dominada por pastos, arbustos y árboles aislados. La vegetación acuática, escasa, está representada por *Pontederia cordata* L., *Eryngium paniculatum* Cav. y *Scirpus* sp., entre otras.

**Tabla 1.** HII y variables ambientales usadas para la determinación del hábitat

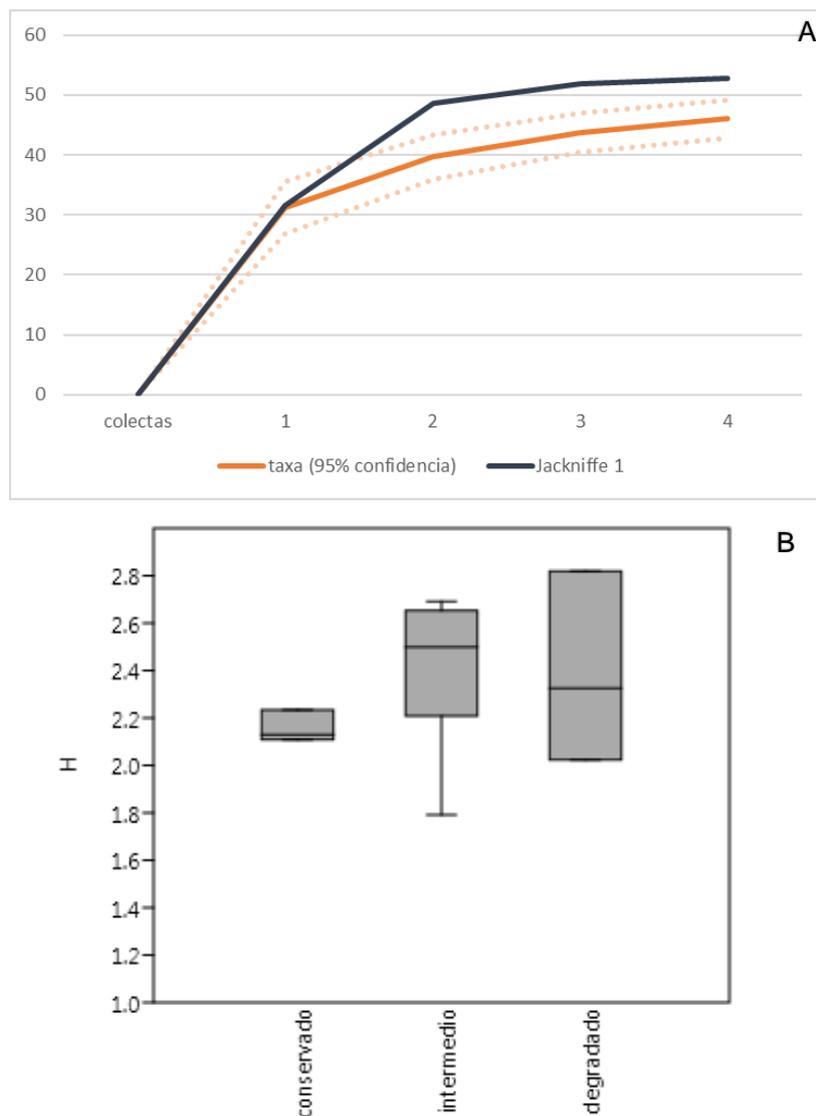
<b>variables</b>	<b>PC 1</b>	<b>PC 2</b>
N-nitratos (mgN/L)	<b>0,45498</b>	0,38337
turbiedad (NTU)	<b>-0,34625</b>	0,69845
temperatura agua (°C)	<b>0,48143</b>	0,14491
conductividad (uS/cm-*25°C)	<b>0,36814</b>	0,2844
oxígeno (ppm)	<b>0,36276</b>	0,23171
HII	<b>-0,41739</b>	0,45785
Eigenvalue	3,62	0,99
% varianza	60,36	16,8

El estado conservado corresponde a sitios ubicados dentro de reservas naturales, con actividad humana restringida, poca o nula erosión del canal y una ribera nativa con 3 estratos vegetales que proveen abundante sombra al arroyo, lo que se puede relacionar a una temperatura más baja del agua (Tabla 2). El estado degradado corresponde a áreas urbanas con alta actividad humana, márgenes deteriorados y ampliación del canal debido a la erosión. La vegetación ripiara está casi ausente, con pastos (donde predomina *Paspalum sp.*) y algunos árboles o arbustos, resultando en una mayor exposición a la luz solar. Estos sitios también tienen una alta concentración de nitratos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Índice de integridad de hábitat (HII) y parámetros ambientales medidos en cada sitio.

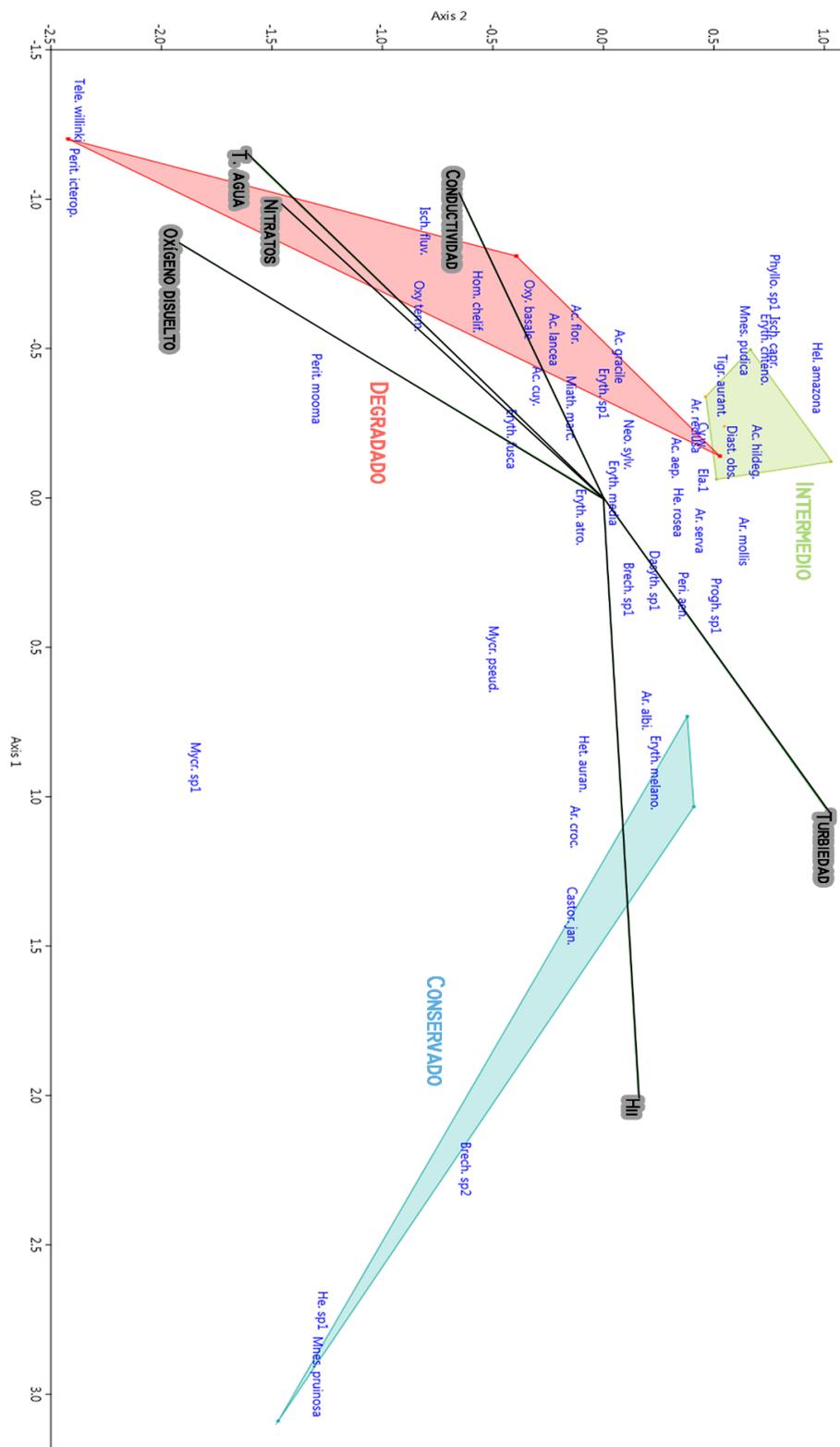
		<b>N-</b>					
<b>estado de conservación</b>	<b>uso de suelo</b>	<b>nitratos (mgN/L)</b>	<b>turbiedad (NTU)</b>	<b>temperatura agua (°C)</b>	<b>conductividad (uS/cm-*25°C)</b>	<b>oxígeno (ppm)</b>	<b>HII</b>
conservado	reserva	0,71	14,00	22,83	45,19	11,03	0,98
		0,84	29,00	23,55	73,46	10,84	0,92
		1,39	39,00	22,20	100,15	9,78	0,98
intermedio	forestal	0,62	9,90	22,08	39,50	12,57	0,51
		0,93	11,00	23,00	34,94	12,10	0,62
		0,72	13,00	23,08	254,58	9,14	0,58
	agrícola-ganadero	0,54	10,00	23,28	49,18	10,09	0,56
		0,51	12,00	23,45	32,74	8,52	0,57
degradado	urbano	0,87	25,00	22,18	75,14	10,81	0,68
		3,60	3,10	29,58	187,68	37,48	0,37
		2,25	7,70	29,85	250,30	10,30	0,34
		2,80	14,00	24,93	170,33	9,73	0,28

Treinta y seis especies y diez morfotipos de odonatos fueron coleccionadas durante el muestreo (Apéndice 2). Veintiséis especies corresponden a Zygoptera (903 individuos) y veinte a Anisoptera (234 individuos). Si bien las curvas no llegaron a una asíntota (Figura 8.a), la estimación del índice *Jackknife* de primer orden indica un número de 52 especies, por lo que 87% de la comunidad habría sido muestreada. Se observó una diversidad alfa promedio ligeramente mayor en los sitios intermedios (Figura 8.b), aunque con una gran varianza entre sitios. El índice de diversidad beta de *Whittaker* resultó un valor de 1,732. Durante los muestreos de entrenamiento, se han detectado dos especies aún no citadas para la provincia o el país: *Tholymis citrina* (Hagen, 1867) y *Minagrion waltheri* (Selys, 1876). Sumado a otras especies cuya distribución en la provincia han sido detectadas recientemente [67] (ver sección Nuevos registros).



**Figura 8.** Curva de rarefacción (a) de especies en los 4 muestreos realizados en el sur de Misiones, 2016-2018. Índice de diversidad Shannon-Wiener (b) en cada estado de conservación.

El CCA realizado mostró que la comunidad de odonatos responde a los parámetros abióticos considerados (Figura 9). Los dos ejes explican un 64% de la variancia y los parámetros significativos son el Hlll y en segundo lugar la concentración de nitratos en el agua (Tabla 3).

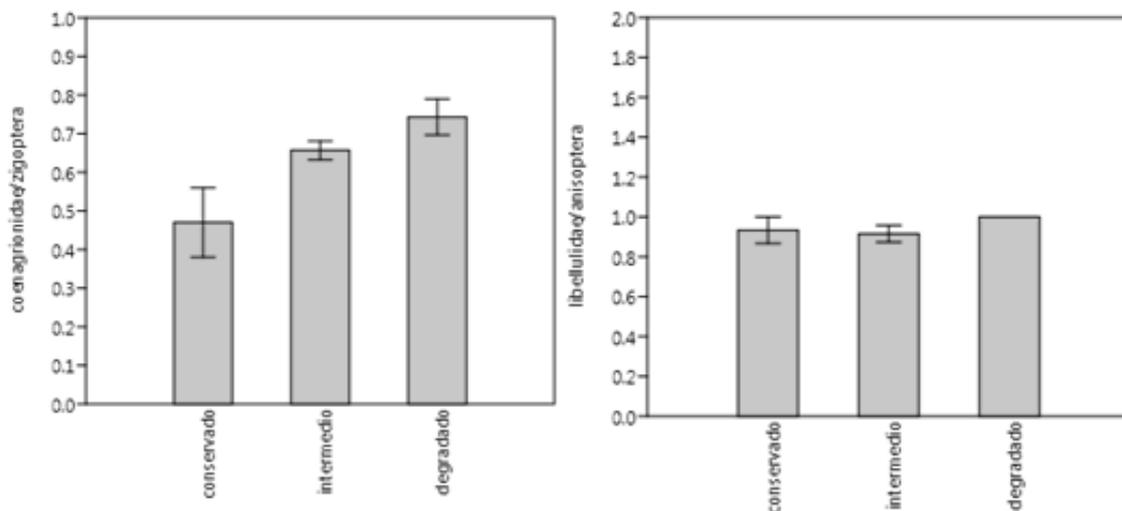


**Figura 9.** Análisis de correspondencia canónica realizado entre las especies de odonatos coleccionados y los parámetros ambientales seleccionados en los sitios. Ver especies en lista de abreviaturas.

**Tabla 3.** Importancia de las variables ambientales en la distribución de las especies de odonatos en los sitios evaluados. (\*representa un valor de  $p < 0,1$  y \*\*  $p < 0,05$ ).

<b>Variables abióticas</b>	<b>Eje 1</b>	<b>Eje 2</b>
Nitratos *	-0,396	-0,586
Turbiedad	0,423	0,410
T. agua	-0,460	-0,644
Conductividad	-0,410	-0,263
Oxígeno disuelto	-0,342	-0,770
HII**	0,804	0,064

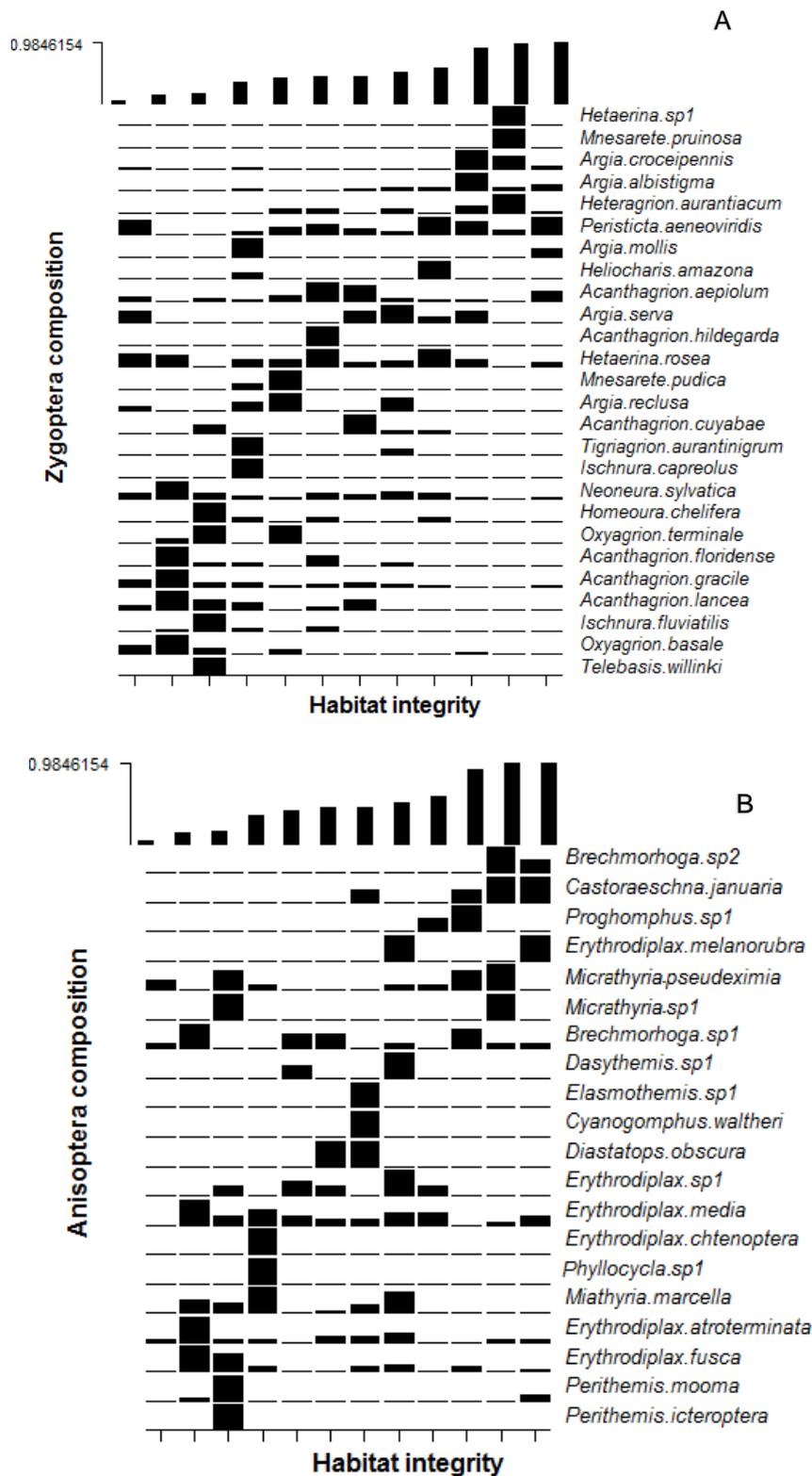
El cociente Libelulidae/Anisoptera no mostró una relación con respecto al gradiente de conservación del hábitat, lo que sería esperable según los resultados de Dolny & Šigutová (2019) [75], como es mencionado en la introducción. Sin embargo, la proporción de Coenagrionidae/Zygoptera incrementó significativamente ( $H=5,4$   $p < 0,05$ ;  $H=3,85$   $p < 0,05$ ) con la degradación del ambiente (Figura 10). La diferencia en la proporción no resultó significativa solamente entre ambientes intermedios y degradados ( $H2,4$   $p=0,11$ ).



**Figura 10.** Proporción de Coenagrionidae/Zygoptera y de Libelulidae/Anisoptera en un gradiente de estados de conservación.

En cuanto a la comunidad de odonatos, las especies de Zygoptera más ampliamente distribuidas fueron *Hetaerina rosea*, coleccionada en todos los sitios y *Peristicta aeneovidridis*, encontrada en once de los doce sitios evaluados, en todos los estados de conservación, mientras que las especies de Anisoptera más distribuidas fueron *Erythrodiplax atroterminata* Ris, 1911 y *E. media* Borrer, 1942, recolectados en nueve y diez sitios, respectivamente y en todos los estados de conservación. Por otro lado, *Telebasis willinki*, Fraser 1948 y *Perithemis icteropectera* Selys in Sagra, 1857 fueron encontrados exclusivamente en el ambiente

degradado. *Hetaerina sp1* y *Brechmorhoga sp2*, fueron exclusivas de ambientes conservados (Figure 11).



**Figura 11.** Abundancia relativa de especies de Zygoptera (A) y Anisoptera (B) según la integridad del hábitat en arroyos evaluados en Misiones.

Ocho especies de odonatos fueron clasificados como potenciales indicadores de integridad de hábitat para los ambientes conservados y degradados. Sin embargo, no se detectaron especies indicadoras de ambientes intermedios (Tabla 4).

**Tabla 4.** Valor indicador (IndVal) para las especies de odonatos coleccionados en arroyos de Misiones.

<b>Especies</b>	<b>Estado de integridad</b>	<b>indval</b>	<b>pvalor</b>
<i>Argia croceipennis</i>	conservado	0,953	0,007
<i>Castoraeschna januarua</i>		0,909	0,022
<i>Argia albistigma</i>		0,829	0,008
<i>Heteragrion aurantiacum</i>		0,814	0,024
<i>Oxyagrion basale</i>	degradado	0,897	0,008
<i>Acanthagrion lancea</i>		0,777	0,024
<i>Acanthagrion gracile</i>		0,741	0,001
<i>Neoneura sylvatica</i>		0,622	0,006

### **Diversidad genética**

Se logró la extracción de ADN de calidad a partir del tejido muscular obtenido de una sola pata de ejemplares adultos.

#### **Transferencia de microsatélites:**

Se amplificaron 5 loci en *Hetaerina rosea*, a partir de los 11 pares de cebadores desarrollados para *Hetaerina americana* (Tabla 5). A partir de la secuenciación de estos amplicones se determinó que un locus (H15) se corresponde con el microsatélite desarrollado para *H. americana*, el locus H4 no presenta secuencias repetitivas y los tres (H8, H10 y H11) restantes si bien presentan secuencias en tándem, no se corresponden con los motivos publicados por Anderson y Grether (2013) [106] para la especie mencionada. Al evaluar la variabilidad de estos últimos en las poblaciones seleccionadas, se observó que H10 es monomórfico, al igual que en *Hetaerina americana*. En cuanto a los tres loci con motivos repetitivos, la amplificación resultó dificultosa, dando falsos negativos en reiteradas ocasiones. Debido a estas dificultades, no fue posible lograr la transferencia de estos marcadores desde otra especie a las de interés en este trabajo y, por ende, para evaluar la variabilidad y estructura genética de las poblaciones de *H. rosea* mediante microsatélites es necesario avanzar en su obtención por otras metodologías como por ejemplo NGS.

**Tabla 5.** Amplificación cruzada de microsatélites en *Hetaerina rosea*.

Locus	Motivo	Motivo	Tamaño	Variabilidad
	H. americana	H. rosea	(bp) H. rosea	
H1	TTA	-	-	-
H3	GGAG	-	-	-
H4	AATG	no tiene	100	-
H7	GGGA	-	-	-
H8	GGGA	GAG	220-523	si
H10	ATCT	CCCTTT	200	no
H11	TCCC	CCCA	168-627	si
H15	GGAT	GGAT	276-300	si
H17	GCAT	-	-	-
H18	GAAT	-	-	-
H22	CAT	-	-	-

**Barcode:**

En cuanto a la secuenciación de COI, de los 189 ejemplares seleccionados, se logró una amplificación correcta en 92 y una secuenciación de calidad solamente en 51 individuos.

No se observó relación entre el éxito de la amplificación y/o secuenciación y la especie, ni con la población a la que correspondía la muestra. El único caso distintivo se observa en la población del arroyo Pindapoy (sitio 9), donde no fue posible obtener secuencias de calidad. Esto implica que, para algunas especies, las secuencias de COI fueron generadas a partir de un solo individuo, como es el caso de *Castoraeschna januaria* (Hagen, 1867), *Oxyagrion terminale* Selys, 1876, *Tigriagrion aurantinigrum* Calvert, 1909, *Erythrodiplax fusca* (Rambur, 1842), *Miathyria marcella* (Selys in Sagra, 1857) y *Perithemis icteroptera* (Selys in Sagra, 1857). Las secuencias obtenidas a partir de morfotipos no se han incluido en el análisis de *barcode*, pero se observan en el árbol de la figura 14.

**Tabla 6.** Distancia K2P de COI entre las especies estudiadas.

Familia	Especie	N	Media	Max	EC	DEC
Aeshnidae	<i>Castoraeschna januaria</i>	1	N/A	0	<i>P. aeneoviridis</i>	16,46
Coenagrionidae	<i>Homeoura chelifera</i>	2	0	0	<i>P. aeneoviridis</i>	16,25
	<i>Ischnura fluviatilis</i>	3	0,31	0,46	<i>O. terminale</i>	15,55
	<i>Neoneura sylvatica</i>	8	0,2	0,56	<i>T. aurantinigrum</i>	18,66
	<i>Oxyagrion basale</i>	8	0,99	1,94	<i>O. terminale</i>	3,84
	<i>Oxyagrion terminale</i>	1	N/A	0	<i>O. basale</i>	3,84
	<i>Peristicta aeneoviridis</i>	6	5,36	9,91	<i>M. marcella</i>	14,42
	<i>Tigriagrion aurantinigrum</i>	1	N/A	0	<i>O. basale</i>	16,28
Heteragrionidae	<i>Heteragrion aurantiacum</i>	2	0,15	0,15	<i>O. basale</i>	18,18
Libellulidae	<i>Erythrodiplax atroterminata</i>	5	1,72	2,6	<i>E. fusca</i>	0,73
	<i>Erythrodiplax fusca</i>	1	N/A	0	<i>E. atroterminata</i>	0,73
	<i>Miathyria marcella</i>	1	N/A	0	<i>P. aeneoviridis</i>	14,42
	<i>Perithemis icteroptera</i>	1	N/A	0	<i>M. marcella</i>	15,52

N: número de secuencias; Media (%): valor promedio de distancia genética intraespecífica; Max (%): distancia genética intraespecífica máxima; EC: especie relacionada más cercana según árbol NJ. DEC: menor distancia genética a la especie más cercana.

La divergencia genética intraespecífica varió entre 0 y 9,91% y la divergencia interespecífica para el conjunto de datos varió de 0,73 a 18,18% (Tabla 6). *Erythrodiplax atroterminata* presentó una divergencia intraespecífica superior al 2% y la distancia con la especie más cercana, *Erythrodiplax fusca*, menor a la divergencia máxima intraespecífica. *Peristicta aeneoviridis* por otro lado, presenta una divergencia intraespecífica máxima significativamente superior a las demás especies.

La mayoría de las especies determinadas morfológicamente formaron también grupos separados en el árbol (Figura 14), apoyando las determinaciones. El género *Peristicta* presenta dos clusters concordantes con la divergencia intraespecífica alta. El género *Erythrodiplax* Brauer, 1868 sin embargo, forma varios grupos que no se corresponden con los morfotipos planteados.



## Capítulo 5: Discusión

### Odonatos y estado de conservación

De acuerdo al índice HII y los parámetros ambientales, se discriminaron tres estados de conservación consistentes con el grado de alteración antropogénica existente. Las principales diferencias entre estos estados fueron dadas por el HII, lo que implica que el uso del suelo en zonas aledañas al cauce del arroyo tiene una gran influencia en la conservación de la zona riparia y esta tiene, además, un impacto en las variables fisicoquímicas del agua. Esto puede afectar el ensamble de odonatos debido a que las especies responden diferencialmente a la fisionomía y estratificación vertical de la vegetación marginal, tanto debido a sus requerimientos en la ovoposición, como así también a la variación que se produce en las condiciones microclimáticas del hábitat [26,70,80]. En el ambiente conservado analizado en este trabajo, la abundante vegetación ribereña es una característica destacable. Debido a ella, los arroyos presentan gran cantidad de detritos, que consisten en hojas y ramas que caen sobre el cauce, lo que podría explicar los valores elevados de turbidez de estos sitios [132]. En los hábitats degradados, en cambio, no hay bosque ribereño, sino pastos variados, arbustos y escasos árboles pioneros. El principal parámetro que los caracteriza es la alta concentración de nitratos debido a las descargas urbanas, y la temperatura del agua más elevada, que resulta de una mayor incidencia solar. Estos valores se corresponden con estudios realizados previamente en la zona [34] donde se detectaron valores elevados de nitratos y conductividad en arroyos cercanos a las urbanizaciones. En cuanto a los ambientes rurales, hay una mayor variación de los parámetros entre sitios debido a que la intensidad de actividad agrícola difiere entre sitios. Se observa cierto grado de cobertura ribereña, diferente intensidad de pastoreo, el acceso al arroyo es variable, etc., pero todos tienen características intermedias a las descritas anteriormente.

Contrario a lo que se esperaba, la proporción Libelulidae/Anisoptera no difirió entre las categorías de hábitat. Si bien este análisis ha resultado positivo anteriormente [75], el estudio se basó en la recopilación de una gran cantidad de trabajos de regiones de selva tropical. En cambio, el área evaluada en este trabajo está ubicada en la región de Campos y Malezales, donde el bosque en galería de la ribera del arroyo se continua con pastizales, típicamente habitados por Anisoptera. Así, a pesar de la variación en las condiciones ambientales, la composición similar de especies de Anisoptera en ambientes conservados y degradados podría responder a esta heterogeneidad ambiental y a la capacidad de dispersión que tienen estos individuos, cuya presencia en el bosque en galería sería solo transitoria (también llamadas especies turistas), como se registra en otros estudios [133]. A pesar de ello, el cociente Coenagrionidae/Zygoptera aumentó paralelamente a la perturbación del ambiente.

Si bien los zigópteros son conocidos por ser más sensibles a los requerimientos del microhábitat [26,73,134], a las características estructurales del arroyo [135,136] y a la presencia de plantas para ovoposición endofítica [72,137], la familia Coenagrionidae presenta una gran cantidad de especies con características generalistas que explicarían el aumento de la proporción de especies de Coenagrionidae en relación al total de zigópteros, a medida que las condiciones del hábitat presentan mayor alteración [75,76]. Esta variable podría ser usada como un indicador con ciertas restricciones, como evaluación rápida de degradación ambiental entre sitios similares, o para un programa de monitoreo a largo plazo de un sitio particular [75], ya que el resultado puede depender de la región o ambiente estudiado.

Si bien el uso de grupos taxonómicos superiores (por ejemplo, suborden o familia) como indicadores presenta una mayor simplicidad en cuanto a la identificación, no resulta tan preciso como el uso de especies indicadoras. De hecho, las recientes modificaciones en la filogenia de odonatos han incorporado nuevos géneros y especies a la familia Coenagrionidae [66], por lo que este sistema no resultaría tan efectivo como fue planteado. Además, la posibilidad de identificación confiable a nivel de especie en la mayoría de los odonatos representa una ventaja que debería ser aprovechada en los indicadores de ambiente, ya que los requerimientos ecológicos se describen a nivel de especie (teoría del nicho ecológico) [138].

La diversidad alfa no mostró relación directa con el grado de conservación del ambiente. Si bien el índice de Shannon toma en cuenta el número de especies (riqueza) y su abundancia (equidad), no considera la valencia ecológica de las especies. Así, las diferencias entre estados de conservación fueron evidentes en término de composición de la comunidad. El análisis de correspondencia canónica permitió observar una influencia del ambiente en la distribución de las especies. Entre las variables analizadas, solo el Hll y la concentración de nitratos influyeron significativamente en la composición y abundancia de odonatos. Así, *Argia croceipennis* Selys, 1865, *A. albistigma* Hagen in Selys, 1865, *Castoraeshna januaría* Hagen, 1867 y *Heteragrion aurantiacum* Selys, 1862 resultaron indicadores de áreas conservadas. Estas especies comparten características del hábitat como rocas y vegetación sumergida entre las cuales la larva vive; ribera boscosa con rocas y troncos donde el adulto se posa y vegetación acuática donde la hembra oviposita [120]. Por otro lado, hay especies de Zygoptera que no requieren la protección de los bosques en galería, como es el caso de *Acanthagrion lancea* Selys, 1876, *A. gracile* Rambur, 1842, *Oxyagrion basale* Selys, 1876 y *Neoneura sylvatica* Hagen in Selys, 1886. En nuestro estudio, estas especies tuvieron una gran fidelidad y especificidad a los ambientes degradados. Se ha señalado anteriormente que algunas especies de estos géneros se establecen en arroyos de poca corriente [139], vegetación marginal compuesta por pastos y plantas flotantes donde el adulto se posa y masas de algas o ramas muertas donde la hembra oviposita [120,140,141]. Estas

características son comunes en ambientes degradados [142] y, por lo tanto, estas especies tienen mayor capacidad de aprovechar los cambios provocados por el proceso de urbanización y ocupar así estos sitios. Esto ha sido propuesto en un estudio de impactos urbanos donde las especies del género *Erythrodiplax* (Anisoptera), típica de sistemas lénticos, aparecen como bioindicadores de hábitat perturbados [135].

En términos de ambiente intermedio, no hay indicadores específicos, sino una mezcla de especies presentes en las comunidades de los dos extremos (degradado y conservado), y especies que tienen cierta tolerancia a alteraciones antropogénicas o un nicho más amplio, como *Hetaerina rosea*, *Erythrodiplax fusca*, etc. [52,140]. A pesar de que hemos encontrado especies exclusivas de ambientes intermedios (ver Figura 11), se encuentran en bajo número y solamente en algunos sitios, por lo que no califican como especies indicadoras.

Nuestros datos muestran coincidencias con otros trabajos llevados a cabo en la región subtropical y algunas discrepancias que podemos resaltar. Por ejemplo, en coincidencia con este trabajo, se ha determinado que *Acanthagrion Selys, 1876* y *Oxyagrion Selys, 1865* son buenos indicadores de áreas impactadas y arroyos sin sombra respectivamente [52,140]. *Argia reclusa Selys, 1865* también ha sido asociada a ambientes impactados [140], y en nuestro estudio han sido hallados solamente en ambientes degradados. *Erythrodiplax fusca* resultó ser indicador de ambientes degradados repetidamente [52,135,136,140], pero en nuestro caso, esta especie presenta una amplia distribución, incluyendo ambientes conservados. *Heteragrion Selys, 1862* ya fue detectado como indicador de hábitat conservado [135,136] al igual que en este trabajo y también se detectó una especie de *Argia Rambur, 1842* como indicador de ambientes conservados [135]. Finalmente, *Argia mollis Hagen in Selys, 1865* fue encontrada en nuestros ambientes conservados al igual que en un estudio previo [52], pero además fue hallada en ambientes intermedios.

### **Transferencia de microsatélites**

La modificación del ambiente debido a las actividades humanas puede ser un gran impulsor del patrón genético de una especie [143], ya que los diferentes usos de suelo generan muchas veces la fragmentación y degradación del hábitat, alterando patrones genéticos de deriva y flujo génico entre poblaciones [144]. Resulta esencial entonces, poder inferir la conectividad funcional de las poblaciones [145] y, finalmente, predecir el efecto de la modificación del paisaje en el flujo de genes, para poder continuar el desarrollo antrópico a través de manejos que minimizan el impacto sobre las especies [146]. Muchos odonatos que habitan ambientes loticos están altamente restringidos a su hábitat y muestran un menor potencial de dispersión que otras especies adaptadas a hábitats menos estables [147,148]. Por ende, evaluar la diversidad genética de las poblaciones permitiría plantear mejores estrategias de monitoreo para la conservación de la especie, por lo que resulta valioso contar con herramientas

moleculares que puedan ser aplicadas a las especies que habitan una región determinada. Los microsatélites representan una herramienta adecuada para medir la variación en diversidad asociada al impacto ambiental, debido a su carácter neutral y a una mayor sensibilidad a la dinámica temporal en procesos ecológicos [149]. Sin embargo, presentan el inconveniente de que los costos y tiempo de desarrollo específico son altos. Si bien en muchos casos la amplificación cruzada ha dado buenos resultados [98], no hemos logrado transferir el panel de microsatélites desarrollado para *Hetaerina americana* a *H. rosea*, en base a los ejemplares presentes en nuestra región de estudio. Los inconvenientes fueron varios: en primer lugar, la mayoría de los loci (4 de 11) no amplificaron en *H. rosea*, a diferencia de otras especies del género con distribución simpátrica [106]. Por otro lado, no todas las regiones amplificadas presentaban secuencia repetitiva, de hecho, solamente una corresponde a la secuencia repetitiva reportada para *H. americana*. Finalmente, la baja reproducibilidad de las amplificaciones podría estar asociada a un apareamiento débil o poco específico de los cebadores en la región blanco, ya que no han sido desarrollados específicamente para la especie y los sitios de unión pueden ser variables. Debido al bajo número de loci y al hecho de que la amplificación cruzada no resulta confiable, desarrollar un panel de microsatélites específicos para *H. rosea* sería útil para lograr evaluar la diversidad en esta especie y detectar posibles indicadores de impacto antrópico en esta región. Esta especie parece adecuada para este tipo de estudios por su amplia distribución, ubicuidad, y relativamente fácil identificación. En cuanto a la metodología, resulta interesante utilizar la tecnología NGS, ya que presenta un camino prometedor para el desarrollo de microsatélites, principalmente en organismos no-modelo, donde el conocimiento del genoma es limitado o nulo [150,151]. Esta herramienta permite el desarrollo de un gran número de marcadores de manera rápida, fácil y con mejor costo-beneficio, comparado con los métodos tradicionales, ya que no requieren la construcción de bibliotecas genómicas [151]. Además, presentan una mayor resolución de los estudios poblacionales debido a que facilitan la obtención no solo del tamaño sino también de la secuencia del loci en estudio, permitiendo detectar polimorfismos de secuencia y deleciones/inserciones en las regiones flanqueantes, además de los polimorfismos de longitud tradicionales [152,153]. Estas características han permitido observar con mayor claridad, patrones de estructura genética en algunas poblaciones [154].

### **Base de datos de códigos de barra**

Basados en nuestros resultados, y sin considerar los casos con identificación específica dudosa, el análisis de las secuencias de código de barras mostró una diferencia interespecífica entre 3,84 y 18,66%, a pesar del reducido número de individuos. Así, nuestros datos apoyan la capacidad de identificación de especies a partir de este análisis molecular en especies de la región Neotropical, reconocido tan solo en un único trabajo previo [112]. En

cuanto a la superposición en el rango de variación que se observa en el género *Erythrodiplax*, es probable que se deba a una identificación errónea a nivel específico, lo cual no es raro en el género, ya que el mismo presenta una gran riqueza de especies con caracteres morfológicos que muchas veces varían intraespecíficamente [155]. Sería importante reevaluar estos ejemplares para obtener resultados más precisos.

Por otro lado, la identificación de *Peristicta aeneoviridis* fue corroborada y sus diferencias morfológicas con otras especies del género en la región son claras, por lo que confiamos que todos los ejemplares corresponden morfológicamente a la misma especie. Resulta interesante destacar que la mayor divergencia observada ocurre entre individuos colectados en sitios al este y al oeste de la provincia, por lo que podríamos suponer cierto aislamiento geográfico y posible divergencia entre las poblaciones. De todas maneras, el número de secuencias es muy bajo para sacar conclusiones al respecto, por lo que esta elevada divergencia intraespecífica debería ser evaluada en mayor profundidad.

### **Ventajas y desventajas del uso de Odonata como bioindicadores**

Existen claras ventajas para el uso de Odonata como bioindicadores, como por ejemplo la simplicidad para evaluar uno o varios sitios rápidamente. A diferencia de los análisis de agua, la evaluación de odonatos es económica y no requiere tratamiento especial o cuidado al transportar las muestras al laboratorio, y, de hecho, con un poco de entrenamiento, gran parte de la identificación puede ser realizada a campo. Esta también es una de las ventajas de usar adultos como indicadores, ya que la captura de larvas es usualmente más laboriosa y la identificación es dificultosa, y aunque en la actualidad existen claves genéricas para la región Neotropical (e.g. [65,156]), solo alrededor del 75% de los géneros y un porcentaje mucho menor de especies han sido descritas, sumado a que la identificación de estadios tempranos es casi imposible [69]. Además, ya se ha comprobado en otros estudios que la correspondencia entre larvas y adultos presentes en un sitio es significativa [133,157]. En este sentido, la cría de larvas muestreadas en los sitios de estudio ha permitido aportar al conocimiento e identificación de especies de odonatos en estadios inmaduros, como se evidencia en la sección de novedades taxonómicas. Conocer la especie en todos los estadios de su ciclo de vida es importante para el estudio de la diversidad y la comprensión de todos sus requerimientos ecológicos, y permite además el estudio de ambientes acuáticos sin la dificultad que implica la necesidad de esperar que el organismo complete su ciclo para identificarlo.

El análisis de la comunidad Odonata adulta combinada con el análisis de ribera es una herramienta efectiva y de bajo costo para determinar la calidad de hábitat. Tanto las especies indicadoras como la proporción Coenagrionidae/Zygoptera (esta última con más restricciones), podrían ser utilizadas como herramientas en la gestión y conservación de

ambientes loticos. Sin embargo, es necesario notar que no todos los parámetros usados como indicador fueron útiles en esta área. Esto sugiere que se necesitan estudios previos en cada región para entender el grado de discriminación que la comunidad de odonatos puede alcanzar.

Somos conscientes de que el número de especímenes y sitios es todavía bajo para hacer un análisis completo de la estructura de la comunidad en diferentes usos de suelo y calidad de hábitat, pero estos datos, los primeros para la provincia, son el punto de partida necesario para una comprensión del uso de odonatos como bioindicadores en esta ecorregión. Nuestros datos refuerzan el concepto de que la alteración humana modifica la vegetación riparia y lleva a la pérdida de calidad ambiental, que se refleja en cambios en la comunidad de odonatos. También contribuye al conocimiento de la diversidad de odonatos en la ecorregión de campos y malezales. Además, las coincidencias con trabajos realizados en otras regiones permiten destacar el carácter indicador de ciertos grupos (especies o géneros), por lo que sería interesante analizar la posibilidad de utilizar odonatos como bioindicadores en escalas superiores a la ecorregión.

La restauración y protección de estos ecosistemas es una prioridad debido a la expansión de las actividades económicas en una región de limitada extensión. En el caso de hábitats acuáticos, la degradación puede ser reducida mediante el mantenimiento de la vegetación ribereña y el planeamiento urbano para evitar urbanización irregular, y así prevenir extinciones locales de las especies de odonatos y de la fauna autóctona en general.

## **Novedades taxonómicas y nuevos registros**

### **Descripción de la larva de último estadio de *Peristicta aeneoviridis***

El género *Peristicta* Hagen in Selys, 1860 se distribuye en el noreste de la Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay [158–160]. Actualmente se compone de ocho especies (*P. aeneoviridis* Calvert, 1909; *P. forceps* Hagen in Selys, 1860; *P. gauchae* Santos, 1968; *P. guarellae* Anjos-Santos & Pessacq, 2013; *P. lizeria* Navás, 1920; *P. jalmosi* Pessacq & Costa, 2007; *P. janiceae* Pessacq & Costa, 2007; and *P. muzoni* Pessacq & Costa, 2007), y es muy probable que existan aun especies por ser descriptas (Prof. A.B.M. Machado, pers. comm.). Hasta el momento, solo la larva de *P. forceps* [159] y *P. guarellae* (Santos 1971, descripta como *P. aeneoviridis*, ver Anjos-Santos & Pessacq 2013[158]) se conocen. El género ha sido incluido en la clave de Coenagrionidae de Lozano et al. (2018) [161] y puede ser fácilmente identificado por la presencia de lamela caudal ovoide con nodo poco definido, un par de setas en el prementón y 4-5 setas en el palpo. El patrón de coloración de las patas, abdomen y lamela caudal, formas y setas de la lamela caudal, setas de las patas, como así también el tamaño relativo de los ganchos de la lacinia, son caracteres diagnósticos potenciales para la separación de larvas de las distintas especies; estos caracteres se resumen en la Tabla 7 para las tres larvas conocidas.

*Peristicta aeneoviridis* y *P. forceps* son simpátricas, las dos se conocen en Argentina, Brasil y Uruguay, *P. aeneoviridis* es también conocida en Paraguay [159]. Ambas especies son frecuentes en pequeños arroyos de las cuencas del Paraná y Uruguay en Argentina, pero hasta el momento, no se ha encontrado las dos especies en el mismo sitio. Actualmente, *P. guarellae* solo se conoce en la localidad tipo (sur de Brasil, estado de Paraná), y probablemente comparta parte de su distribución en Brasil con las otras dos especies conocidas; su presencia en Argentina es poco probable.

A partir de la evaluación de dos exuvias (1 ♂, 1 ♀ ambas emergidas en laboratorio) y sus correspondientes adultos se ha podido determinar que la larva de *P. aeneoviridis*, corresponde a un pequeño coenagrionido, con un par de setas en el prementon, laminilla caudal ovoide con nodo poco definido y marcas claras marginales, fémur con una banda oscura apical, una basal y dos mediales.

**Tabla 7.** Caracteres larvales en especies de *Peristicta*.

	<i>P. aeneoviridis</i>	<i>P. forceps</i>	<i>P. guarellae</i>
<b>Setas en el prementón</b>	4	4-5	5
<b>Proporciones de los ganchos de la lacinia ventral</b>	1:0,3:0,2	1:0,5:0,3	?
<b>Bandas oscuras del fémur medial</b>	2	1	aparentemente 2
<b>Setas del fémur</b>	ovoides	ovoides y espiniformes	?
<b>Bandas abdominales claras</b>	2, laterales	2, laterales	2 laterales, 1 medio-dorsal
<b>Setas abdominales en el margen posterior del segmento</b>	s7-10, algunas en s6	s6-10	?
<b>Ápice de la laminillas caudales</b>	redondeadas	rectas, cóncavas	redondeadas
<b>Marcas claras de la laminillas caudales</b>	presentes	presentes	ausentes

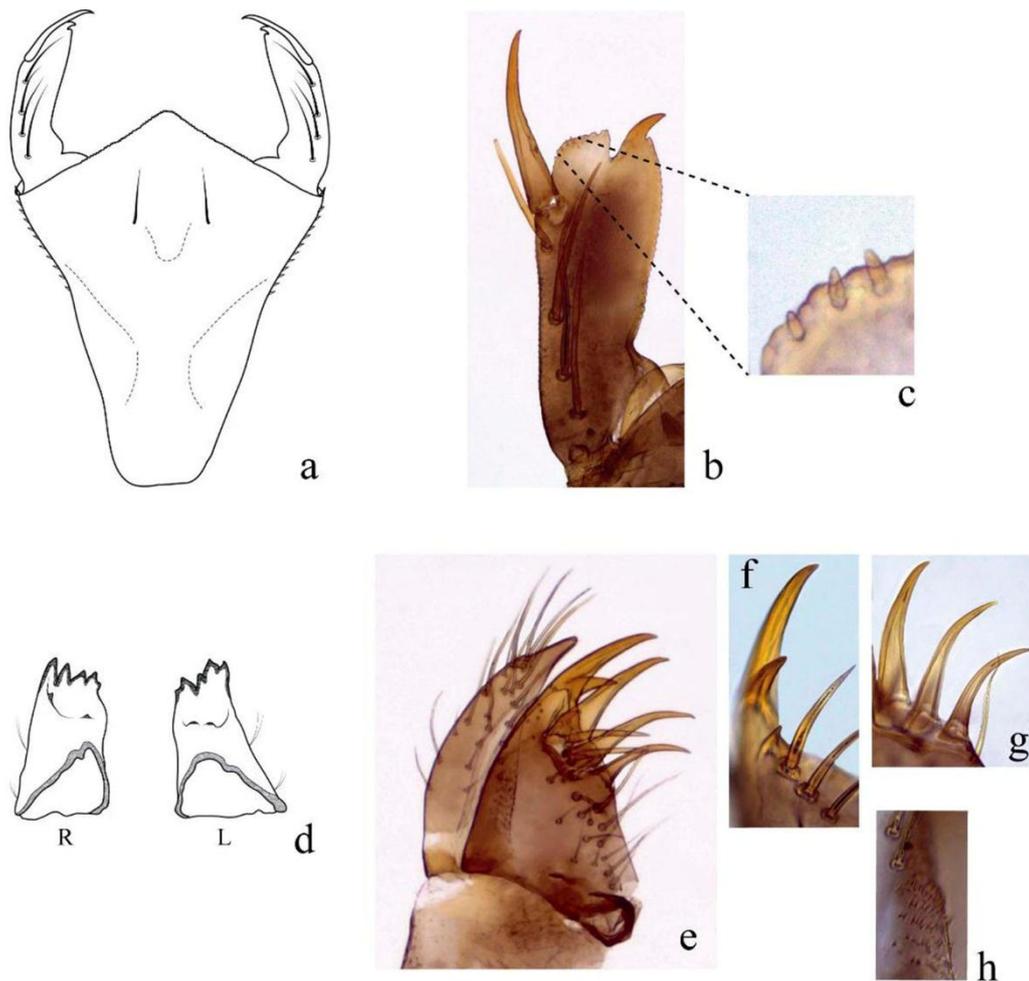
La descripción del último estadio larvario se detalla a continuación:

-Cabeza: alrededor de 1,6 veces tan ancha como larga, margen posterior ligeramente cóncavo, lóbulos cefálicos con varias setas ovoides cortas y algunas setas finas semejantes a pelos, antena con seis antenómeros, 1<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> con el tercio basal marrón oscuro y los dos tercios apicales marrón, 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> antenómero marrón claro con la mitad distal amarillo pálido, 6<sup>to</sup> antenómero amarillo pálido, largo proporcional de los antenómeros: 0,9:0,8:1:1:0,9:0,6. Articulación premental alcanza la primera coxa; prementum (Figura 12a) corto y amplio, alrededor de 1,2 veces tan largo como ancho, margen anterior triangular y crenulado, con una seta premental a cada lado de la línea media; márgenes laterales con una fila de 9-11 setas cortas espiniformes en el tercio distal. Palpo (Figura 12 b, c) con margen externo crenulado, con cuatro setas largas; margen distal con el diente curvado típico y externamente a él, dos o tres dientes muy pequeños y tres setas espiniformes cortas y robustas (Figura 12c); margen

interno crenulado; diente móvil delgado y agudo, cerca de un tercio del largo del margen externo. Mandíbulas como en Figura 12d. Formula mandibular L 1+2345 0 ab; R 1 -2345 y a. Maxila (Figura 12 e): lacinia (Figura 12 e–g) con seis dientes: tres dorsales (Figura 12 f) ligeramente curvados hacia adentro, similares en forma y tamaño, y tres dientes ventrales (Fig. 12g) con diferente forma y tamaño: uno apical, similar a dos dorsales, los restantes más pequeños, proporciones como sigue: 1:0,3:0,2. Basal al diente dorsal hay una fila de setas largas y plumosas: dos gruesas y las demás finas; basal al diente ventral hay una fila de tres setas similares a pelos largos, gruesos y varias setas cortas, finas y plumosas. Galea (figura 12 e) algo curvada hacia adentro, ápice robusto, redondeado, con setas largas y plumosas en la superficie externa, base (figura 12h) con varias setas espiniformes cortas.

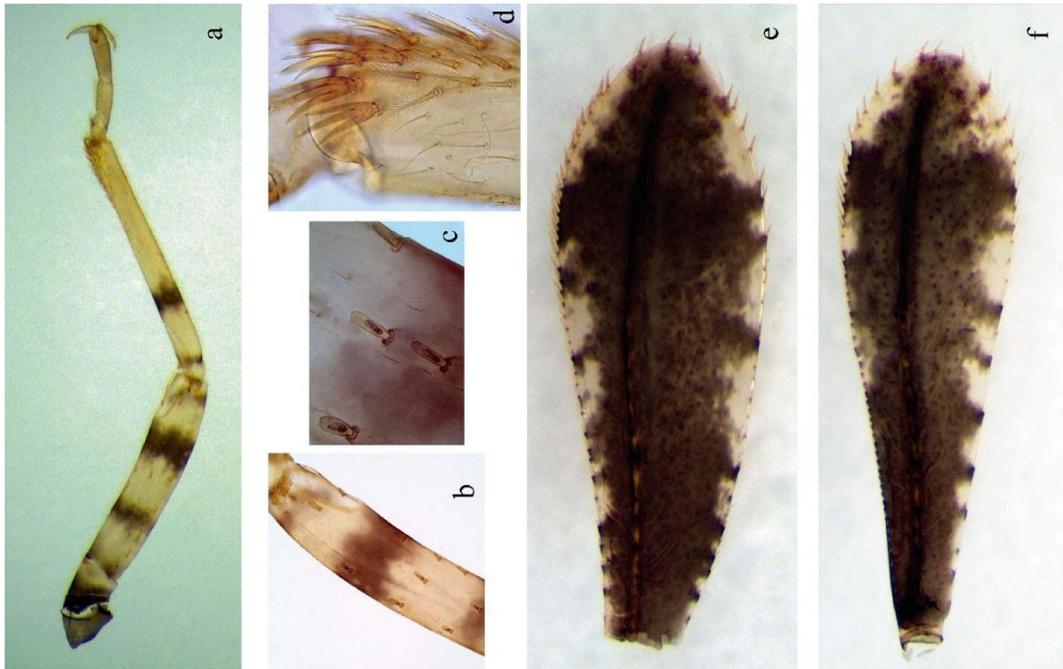
-Tórax: pronotum y sintorax marrón oscuro, con dos bandas dorsales claras. Las pterotecas son prácticamente paralelas, alcanzando el segmento 5. Patas (figuras 13 a-d) esbeltas, cubiertas por pequeñas setas semejantes a pelos, marrón claro; coxa marrón; base del trocánter marrón oscura; fémures con una banda apical, una banda basal y dos bandas mediales oscuras (figura 13a), la distal más ancha; fémures protorácicos con una fila de setas ovoides en el margen flexor y extensor, la superficie restante con algunas setas ovoides (figura 13b, c); margen flexor de los fémures meso y metatorácicos con una fila de setas ovoides dispersas, menos desarrolladas en margen extensor. Tibia (figura 13a) con una banda oscura en el tercio apical, más pronunciada en la pata protorácica, superficie extensora con setas largas, finas, similares a pelos, tercio apical flexor (figura 13d) con abundantes setas plumosas tridentadas. Margen extensor de los tarsos con setas largas, finas, como pelos, margen flexor con dos filas ventrales de setas plumosas, uñas tarsales simples e iguales.

-Abdomen: cilíndrico, marrón oscuro, con dos bandas longitudinales dorsales a ambos lados de la línea media; segmento 1-4 con setas finas en la superficie dorsal; segmento 6-10 con una fila distal de espinas, espaciadas en el segmento 6. Los cercos en macho y hembra están dañados y no pueden ser descriptos. Gonapófisis masculina puntiaguda y divergente, con finas setas, superando el margen anterior del segmento 10. Gonapófisis femenina alcanza el segmento 10, valvas externas puntiagudas, valvas internas redondeadas. Laminillas caudales (Figura 13e, f) marrón, con marcas claras en los márgenes, ovoide, ápice redondeado, nodo poco definido, tercio distal del margen con varias setas largas semejantes a pelos, superficie cubierta de setas muy finas, laminilla lateral (Figura 13f) más de tres veces tan larga como la sección más ancha, margen dorsal con 20-23 setas espiniformes, más densas y largas hacia el ápice, margen ventral con 53-55 setas espiniformes, más largas hacia el ápice, carina lateral con una fila de 29-31 setas espiniformes, región basal con cuatro setas cortas, gruesas, espiniformes.



**Figura 12.** Último estadio larval de *Peristicta aenoviridis*: a) prementum, vista dorsal; b) palpo labial izquierdo, vista dorsal; c) detalle del margen externo del palpo labial; d) mandíbulas, vista interna: derecha (R) e izquierda (L); e) maxila izquierda, vista ventral; f) dientes dorsales de la lacinia izquierda; g) dientes ventrales de la lacinia izquierda; h) detalle de la base de galea.

Laminilla media (Figura 13e) tres veces tan larga como su sección más ancha, con cuatro setas ovoides en la región basal, margen dorsal con 40 setas espiniformes, más densas y largas hacia el ápice, margen ventral con 27-29 setas espiniformes, más largas hacia el ápice, carina lateral con 23-26 setas espiniformes.



**Figura 13.** Ultimo estadio larval de *Peristicta aenoviridis*: a) pata protorácica derecha, vista ventral; b) detalle de fémur protorácico, vista ventral; c) setas en fémur protorácico, vista ventral; d) protibia, vista ventral; e) laminilla caudal media, vista lateral-izquierda; f) laminilla caudal lateral, vista lateral-izquierda.

-Medidas (en mm): macho (n=1): ancho máximo de la cabeza 2.5, largo máximo de la cabeza 1.4, largo máximo del prementon 1.3, ancho máximo del prementon 1, largo del fémur I 2, fémur II 2.5, fémur III 3.2, largo tibia I 0.9, tibia II 1.3, tibia III 2, largo externo de las pterotecas 2.6, largo interno de las pterotecas 2.5, cercos 0.2, laminilla caudal lateral 2.3, laminilla caudal central 2.4. Hembra (n=1): ancho máximo de la cabeza 2.6, largo máximo de la cabeza 1.6, largo máximo del prementon 1.2, ancho máximo del prementon 1, largo del fémur I 1.3, fémur II 1.6, fémur III 2.3, largo tibia I 1.1, tibia II 1.2, tibia III 1.5, largo externo de las pterotecas 2.6, largo interno de las pterotecas 2.5, cercos 0.1, laminilla caudal lateral 2.2, laminilla caudal central 2.2.

*Peristicta aeneoviridis* se distingue de *P. forceps* (las características de esta última en paréntesis) por presentar dos bandas mediales oscuras en el fémur (una), ápice de la lamela caudal redondeada (recto a profundamente cóncavo), solo setas ovoides en el fémur (ovoides y espiniformes), tamaño relativamente pequeño de los dientes ventrales de la lacinia (más grandes) y un anillo apical disperso de setas espiniformes en el segmento 6 (más denso). Basado en la descripción de Santos (1971) [162], *Peristicta guarellae* se puede distinguir de las otras dos larvas mediante la falta de marcas claras marginales en la laminilla caudal y una banda clara longitudinal en la región medial del abdomen (oscura en las demás especies).

## Nuevos registros

A pesar de la reducida dimensión del área de estudio, hemos detectado dos especies que no habían sido registradas en la región. Una de ellas, *Minagrion waltheri* ha sido coleccionada por primera vez en la Argentina. El registro más cercano de esta especie corresponde al Bioma Pampa, en Rio Grande del sur, un estado brasilero adyacente a nuestro sitio de estudio [163]. *Tholymis citrina*, por otro lado, se ha encontrado en las provincias de Santa Fe, Jujuy, Tucumán y Salta [164], por lo que hemos extendido su área de distribución hacia el noreste de la Argentina.

Dos especies que fueron recientemente detectadas en la zona [67] también han sido muestreadas: *Telagrion longum* (Selys, 1876) y *Micrathyria pseudeximia* (Westfall, 1992). En los muestreos preliminares se han detectado dos especies, *Nephepeltia berlai* (Santos, 1950) y *Argentagrion ambiguum* (Ris, 1904), que aunque no están presentes en la lista de especies para la provincia [164], ya han sido citadas en Misiones [165,166] y se han incorporado en la lista más reciente de Odonatos del país [67]. La detección de estas especies resalta el pobre conocimiento del área, y el ejemplo de las libélulas podría extenderse muy probablemente a otros órdenes de insectos, mostrando la necesidad de profundizar los estudios en esta área para comprender y registrar su diversidad y dimensionar la importancia de proteger la ecorregión.

## Capítulo 6: Conclusiones

- Las diferentes prácticas asociadas al uso de suelo típico de la región afectan en diferente grado los parámetros fisicoquímicos y ambientales y esto a su vez influye en el ensamblaje de Odonatos. El Hll y la concentración de nitratos en el agua son los parámetros con impacto significativo en las poblaciones.
- La proporción Coenagrionidae/Zygoptera podría ser indicativo del estado de conservación del ambiente con ciertas restricciones: como un parámetro de evaluación rápida, o para estudiar un sitio en particular en el tiempo. Sin embargo, no presenta la precisión que permite el uso de especies indicadoras.
- *Argia croceipennis*, *Castoraeschna januaría*, *Argia albistigma*, *Heteragrion aurantiacum*, *Oxyagrion basale*, *Acanthagrion lancea*, *Acanthagrion gracile* y *Neoneura sylvatica* son especies indicadoras del estado de conservación del ambiente asociado al uso de suelo en la región. Representan un posible método de bajo costo para facilitar decisiones de conservación en programas de monitoreo y restauración.
- Se incorporaron secuencias a la base de datos de *barcode* para la identificación de las siguientes especies de odonatos de la zona: *Homeoura chelifera*, *Ischnura fluviatilis*, *Neoneura sylvatica*, *Oxyagrion basale*, *Peristicta aeneoviridis*, *Heteragrion aurantiacum*. Sin embargo, es necesario establecer una rigurosa identificación morfológica en especies dificultosas (e.g. género *Erythrodiplax*) para poder contar con una base de datos de referencia confiable, ya que en estos casos la identificación específica mediante secuencias no fue posible.
- La transferencia de marcadores moleculares microsátélites de *Hetaerina rosea*, cuya distribución no abarca la zona de estudio, no fue posible. Sería de utilidad desarrollar marcadores para especies de la zona a fin de poder evaluar el estado de las poblaciones.

Algunas especies de Odonatos respondieron de manera diferencial a los cambios producidos en el ambiente debido a la intensificación del uso de suelo y desarrollo urbano. Esto permitió detectar especies indicadoras de ambientes conservados y degradados, por lo que se acepta la hipótesis planteada.

## **Recomendaciones para trabajos futuros**

-Aumentar número de sitios para obtener mayor significancia en los efectos del ambiente sobre las especies y la posible detección de indicadores de ambientes intermedios. Es probable además que un mayor número de colectas permita detectar más especies en la zona.

-Incorporar NGS para evaluar la diversidad de las poblaciones ya que permite el desarrollo de un gran número de marcadores de manera rápida y con mejor costo-beneficio, comparado con los métodos tradicionales, debido a que no requieren la construcción de bibliotecas genómicas, lo que resulta conveniente en organismos donde el conocimiento del genoma es limitado o nulo.

-Identificar morfológicamente las especies que no pudieron ser identificadas y aumentar el número especies secuenciadas y de secuencias por especie a fin de poder establecer un código de barras confiable para la correcta identificación molecular.

## Producción científica

### Publicaciones en revistas científicas

- Schröder N.M., Rippel C.G., Walantus L.H., Zapata P.D., Pessacq P. (2020). Odonata assemblages as indicators of stream condition – A test from northern Argentina. *Northwestern Journal of Zoology*, 16 (2): 117-124.
- Schröder, N.M., Anjos-Santos, D., Rippel, C.G., & Pessacq, P. (2020). Description of the last instar larva of *Peristicta aeneoviridis* Calvert, 1909 (Odonata: Coenagrionidae). *Zootaxa*, 4728(4), zootaxa.4728.4.4.
- Rippel, C.G., Neiss, U.G., Del Palacio, A., Schröder, N.M., Fleck, G., Hamada, N., Martí, D.A., & Schweigmann, N.J. (2020). Description of the last-instar larva of *Zenithoptera lanei* Santos, 1941 (Odonata: Libellulidae). *Zootaxa*, 4732(3), zootaxa.4732.3.11.
- Schröder, N.M., Rippel, C.G., & Pessacq, P. (2021). Odonata (Insecta) checklist in reserves in Campos y Malezales ecoregion in Misiones, with new distributional records. *RSEA*. 80(1): 70-73.

### Presentaciones a Congresos científicos

- Schröder, Noelia M., Rippel, Camila G., Walantus, L. Horacio, Zapata, Pedro D., Pessacq, Pablo. “Evaluación preliminar de la comunidad de odonatos en relación al estado conservación ribereña en arroyos del sur de Misiones”. Congreso Brasileiro de Zoología. 26 de febrero al 2 de marzo de 2018. Foz do Iguazu, Paraná, Brasil.
- Rippel, Camila G., Schröder, Noelia M., Walantus Leonardo H. “Evaluación de la capacidad predatoria de los subórdenes Anisoptera y Zygoptera (orden: Odonata) sobre *Culex quinquefasciatus*”. X Jornadas Regionales Sobre Mosquitos. Septiembre 2016. Mar del Plata, Argentina.
- Schröder, Noelia M., Rippel, Camila G., Walantus, L. Horacio. “Advances In The Analysis Of Stomach Contents Of Dragonflies, Intended To Determine The Species Consumed”. International Congress of Odonatology. 15 al 20 de noviembre de 2015. Ciudad de la Plata, Buenos Aires, Argentina.

### Proyecto de investigación dentro del cual se desarrolló la tesis

Esta tesis no está comprendida dentro de un proyecto científico-tecnológico financiado.

## Apéndices

### 1. Tabla de análisis de ribera

#### **F1 Uso de lotes adyacentes a la zona riparia**

- 6 Bosque primario que se continúa con área de campos conservada.
- 5 Bosque secundario.
- 4 Ganadería/pasturas
- 3 Agricultura conservacionista. Cobertura permanente
- 2 Cultivos de ciclo corto. Suelo expuesto
- 1 Área urbana

#### **F2 Ancho del bosque ripario**

- 6 Bosque que se continúa con área de campos conservados
- 5 Entre 30 y 100m
- 4 Entre 5 y 30m
- 3 Entre 1 y 5m
- 2 Bosque ausente, pero con algunos arbustos y árboles pioneros
- 1 Bosque y arbustos ausentes

#### **F3 Continuidad del bosque ripario**

- 5 Intacto, sin espacios en la vegetación
- 4 Espacios a intervalos de >50m
- 3 Espacios frecuentes con barrancos y espacios a cada 50m
- 2 Muchos espacios y barrancos en toda su longitud
- 1 Sin bosque ripario

#### **F4 Vegetación de la zona riparia dentro de los 10m desde el canal**

- 6 Más del 90% de la vegetación es nativa o arboles no-pioneros
- 5 Especies pioneras con árboles maduros
- 4 Hábitat en regeneración con predominancia de especies pioneras, bosque secundario y denso sotobosque
- 3 Pastos con arbustos y árboles pioneros
- 2 Pastos y algunos arbustos
- 1 Sin vegetación/construcción

### **F5 Mecanismos de retención**

- 5 Canal de rocas y / o troncos antiguos puestos firmemente en su lugar
- 4 Rocas y / o troncos actuales, pero rellenas con sedimentos
- 3 Dispositivos de retención suelto, que se mueve con inundaciones
- 2 Canales de limo arenoso suelto, pocas obstrucciones del canal
- 1 Retención por alguno de los siguientes: plástico, metal, vidrio, caucho, materiales de construcción.

### **F6 Sedimentos**

- 4 Poco o sin ensanchamiento del canal por acumulación de sedimentos
- 3 Algunos bancos de grava de piedras gruesas y poco limo
- 2 Sedimentos de rocas, arena y limo común
- 1 Flujo del canal modificado por sedimentos

### **F7 Estructura de los márgenes**

- 5 Márgenes discretos
- 4 Márgenes estables, con la roca / suelo sujetarse firmemente por las hierbas, arbustos o raíces de los árboles
- 3 Márgenes firmes, pero flojamente sujetos por hierbas y arbustos
- 2 Márgenes de tierra suelta sujeta por una capa dispersa de hierba y arbustos
- 1 Márgenes inestables, fácilmente perturbados, con tierra o arena suelta

### **F8 Forma del cauce**

- 4 El canal del río no ha estado modificado
- 3 Modificaciones de las terrazas adyacentes al lecho del río con reducción del canal
- 2 Signos de alteración y estructuras rígidas intermitentes que modifican el canal del río
- 1 Río canalizado en la totalidad del tramo, cauce poco profundo

### **F9 Fondo del arroyo**

- 5 Piedra de varios tamaños unidos
- 4 Piedra que se mueven fácilmente, con poco limo
- 3 Fondo de limo, grava y arena, estable en algunos lugares
- 2 Fondo uniforme de arena y limo flojamente unidos
- 1 Fondo pedregoso ausente

### **F10 Rápidos, estanques y meandros**

- 4 Visibles, a intervalos de 5-9 veces el ancho del arroyo.

3 irregularmente espaciados

2 largos estanques separados de cortos rápidos, sin meandros

1 ausentes o flujo corregido

### **F11 Vegetación acuática**

5 Cuando está presente, se compone de musgo y parches de algas

4 Las algas dominan en lagunas, plantas vasculares a lo largo del borde

3 Capas de algas presentes, algunas plantas vasculares, algunos musgos

2 Capas de algas cubren parte inferior, plantas vasculares dominan el canal

1 Vegetación acuática ausente

### **F12 Detritos**

5 Principalmente consiste en hojas y madera, sin sedimentos

4 Principalmente consiste en hojas y madera, con sedimento

3 Pocas hojas y madera, restos orgánicos finos, sin sedimentos

2 No hay hojas o escombros leñosos, materia orgánica gruesa/fina, con sedimentos

1 Sedimentos anaeróbicos finos, no hay suciedad más gruesa

## 2. Lista de especies coleccionadas

Especies	Usos de suelo
<b>Anisoptera</b>	
<b>Aeshnidae</b>	
<i>Castoraeschna januaria</i> Hagen, 1867	1,2
<b>Gomphidae</b>	
<i>Cyanogomphus waltheri</i> Selys, 1873	3
<i>Progomphus</i> sp1.	1,3
<i>Phyllocycla</i> sp1	3
<b>Libellulidae</b>	
<i>Brechmorhoga</i> sp1	1-4
<i>Brechmorhoga</i> sp2	1
<i>Dasythemis</i> sp1	2,3
<i>Diastatops obscura</i> Fabricius, 1775	2,3
<i>Elasmothermis</i> sp1	3
<i>Erythrodiplax atroterminata</i> Ris, 1911	1-4
<i>Erythrodiplax fusca</i> Rambur, 1842	1,2
<i>Erythrodiplax media</i> Borrer, 1942	1-4
<i>Erythrodiplax melanorubra</i> Borrer, 1942	1,2
<i>Erythrodiplax</i> sp1	2-3
<i>Erythrodiplax</i> sp2	2
<i>Miathyria marcella</i> Selys in Sagra, 1857	2-4
<i>Micrathyria pseudeximia</i> Westfall, 1992	1-4
<i>Micrathyria</i> sp1	1,4
<i>Perithemis mooma</i> Kirby, 1889	1,4
<i>Perithemis icteroptera</i> Selys in Sagra 1857	1
<b>Zygoptera</b>	
<b>Calopterygidae</b>	
<i>Hetaerina rosea</i> Selys, 1853	1-4
<i>Hetaerina</i> sp1	1
<i>Mnesarete pruinosa</i> Hagen in Selys, 1853	1
<i>Mnesarete pudica pudica</i> Hagen in Selys, 1853	2,3
<b>Coenagrionidae</b>	
<i>Acanthagrion aepolum</i> Tennessen, 2004	2-4
<i>Acanthagrion cuyabae</i> Calvert, 1909	1-4

<i>Acanthagrion gracile</i> Rambur, 1842	2-4
<i>Acanthagrion lancea</i> Selys 1876	2-4
<i>Acanthagrion floridense</i> Fraser, 1946	3
<i>Acanthagrion hildegarda</i> Gloger 1967	3
<i>Argia albistigma</i> Hagen in Selys, 1865	1-4
<i>Argia croceipennis</i> Selys, 1865	1,2,4
<i>Argia mollis</i> Hagen in Selys, 1865	1,2
<i>Argia reclusa</i> Selys, 1865	2-4
<i>Argia serva</i> Hagen in Selys, 1865	1-4
<i>Homeoura chelifera</i> Selys, 1876	2-4
<i>Ischnura fluviatilis</i> Selys, 1876	3-4
<i>Ischnura capreolus</i> Hagen, 1861	2
<i>Oxyagrion basale</i> Selys, 1876	2
<i>Oxyagrion terminale</i> Selys, 1876	3,4
<i>Tigriagrion aurantinigrum</i> Calvert, 1909	2
<i>Telebasis willinki</i> Fraser, 1948	4
<i>Neoneura sylvatica</i> Hagen in Selys, 1886	1-4
<i>Peristicta aeneoviridis</i> Calvert, 1909 (+)	1-4

---

**Heteragrionidae**

<i>Heteragrion aurantiacum</i> Selys, 1862	1-3
--	-----

---

**Dicteriadidae**

<i>Heliocharis amazona</i> Selys, 1853	3
--	---

---

1) Reservas, 2) Forestal, 3) Agrícola-ganadero, 4) Urbano. (+) Larva descripta.

### 3. Lista de especies en muestreos preliminares: Área de recursos ambientales

#### Zaimán

---

#### Anisoptera

---

#### Aeshnidae

---

*Limnetron antarcticum* Förster, 1907

---

#### Libellulidae

---

*Dasythemis venosa* Burmeister, 1839

*Diastatops* sp1

*Erythemis* sp1

*Erythrodiplax atroterminata* Ris, 1911

*Erythrodiplax basalis* Kirby, 1897

*Erythrodiplax fusca* Rambur, 1842

*Erythrodiplax latimaculata* Ris, 1911

*Erythrodiplax media* Borror, 1942

*Erythrodiplax nigricans* Rambur, 1842

*Erythrodiplax ochracea* Burmeister, 1839

*Erythrodiplax paraguayensis* Förster, 1905

*Erythrodiplax umbrata* Linnaeus, 1758

*Macrothemis* sp1

*Miathyria marcella* Selys in Sagra, 1857

*Micrathyria pseudeximia* Westfall, 1992

*Nephepeltia berlai* Santos, 1950

*Perithemis mooma* Kirby, 1889

*Tholymis citrina* Hagen, 1867 (\*)

*Zenithoptera lanei* Santos, 1941

---

#### Zygoptera

---

## **Calopterygidae**

---

*Hetaerina rosea* Selys, 1853

---

## **Coenagrionidae**

---

*Acanthagrion aepiolum* Tennessen, 2004

*Acanthagrion cuyabae* Calvert, 1909

*Acanthagrion gracile* Rambur, 1842

*Acanthagrion lancea* Selys 1876

*Argentagrion ambiguum* Ris, 1904

*Argia serva* Hagen in Selys, 1865

*Minagrion waltheri* Selys, 1876 (\*)

---

(\*) Nuevo registro.

#### 4. Cronograma de colecta y tamaño de muestra

<b>Cronograma de colecta</b>	<b>Número de individuos</b>	<b>Riqueza de especies</b>
<b>Parque Provincial de las Sierra</b>		
05/11/16	28	9
27/02/17	9	3
29/11/17	28	8
07/02/18	13	6
<b>Parque Provincial Cañadón de Profundidad</b>		
06/11/16	42	9
25/02/17	12	6
22/11/17	31	7
07/02/18	22	8
<b>Reserva privada Campo San Juan</b>		
23/11/16	24	6
03/03/17	12	6
27/11/17	29	9
26/02/18	13	8
<b>A. Estepa</b>		
07/11/16	23	10
14/02/17	15	10
23/11/17	23	10
13/02/18	19	5
<b>A. Itaembé</b>		
07/11/16	23	9
14/02/17	10	9
23/11/17	38	12
13/02/18	18	7
<b>A. Guasupy</b>		
24/11/16	23	5
25/02/17	18	11
22/11/17	20	10
14/02/18	19	8
<b>A. León</b>		
12/11/16	22	5
18/02/17	13	8
12/11/17	28	10
24/02/18	9	5
<b>A. Tuna</b>		
12/11/16	33	8
18/02/17	22	10
12/11/16	30	8
24/02/18	18	8
<b>A. Pindapoy</b>		
24/11/16	23	5
21/02/17	21	7
20/11/17	30	7
14/02/18	18	7
<b>A. Itá</b>		

10/11/16	27	10
13/02/17	18	6
13/11/17	18	8
05/02/18	35	11

---

**A. Laguna**

---

16/11/16	25	7
16/02/17	32	10
14/11/17	41	9
05/02/18	52	10

---

**A. Niño escondido**

---

23/11/16	19	8
16/02/17	23	8
15/11/17	25	5
05/02/18	30	8

## Referencias Bibliográficas

- [1] F. De Olivera Roque, D.F. Buss, S. da Silva Abes, M. Stefanos, L. Juen, T. Siqueira, Insetos auaticos no ambito de instrumentos de gestao ambiental: caminhos ainda pouco explorados. in: N. Hamada, J. L. Nessimian R. B. Querino, Insetos aquaticos na Amazonia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia, Editora do INPA, Manaus, Brasil, 2014.
- [2] Millennium Ecosystem Assessment, Ecosystems and human well-being: synthesis. Disponible en <http://www.millenniumassessment.org/documents/document.356.aspx.pdf>, (2005).
- [3] J.A. Floey, R.S. Defries, G.P. Asner, C.C. Barford, Global Consequences of Land Use, *Science*. (2005) 309:570–4. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1111772>.
- [4] J.H. Goldstein, G. Caldarone, T.K. Duarte, D. Ennaanay, N. Hannahs, G. Mendoza, S. Polasky, S. Wolny, G.C. Daily, Integrating ecosystem-service tradeoffs into land-use decisions, *PNAS*. 109 (2012) 7565–7570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201040109>.
- [5] P.B. Bedient, H.S. Rifai, C.J. Newell, Ground water contamination: transport and remediation., Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs, USA, 1994. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19951903374> (accessed December 3, 2018).
- [6] P.S. Hooda, A.C. Edwards, H.A. Anderson, A. Miller, A review of water quality concerns in livestock farming areas, *Science of The Total Environment*. 250 (2000) 143–167. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00373-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00373-9).
- [7] J.H. Janse, J.J. Kuiper, M.J. Weijters, E.P. Westerbeek, M.H.J.L. Jeuken, M. Bakkenes, R. Alkemade, W.M. Mooij, J.T.A. Verhoeven, GLOBIO-Aquatic, a global model of human impact on the biodiversity of inland aquatic ecosystems, *Environmental Science & Policy*. 48 (2015) 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2014.12.007>.
- [8] J.P.H.B. Ometo, L.A. Martinelli, M.V. Ballester, A. Gessner, A.V. Krusche, R.L. Victoria, M. Williams, Effects of land use on water chemistry and macroinvertebrates in two streams of the Piracicaba river basin, south-east Brazil, *Freshwater Biology*. 44 (2000) 327–337. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00557.x>.
- [9] J.A. Wiens, Riverine landscapes: taking landscape ecology into the water, *Freshwater Biology*. 47 (2002) 501–515. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00887.x>.
- [10] Ministerio del Agro y la Producción – Misiones, (n.d.). <https://agro.misiones.gob.ar/> (accessed July 4, 2020).
- [11] S.T. Berthrong, E.G. Jobbágy, R.B. Jackson, A global meta-analysis of soil exchangeable cations, pH, carbon, and nitrogen with afforestation, *Ecological Applications*. 19 (2009) 2228–2241. <https://doi.org/10.1890/08-1730.1>.

- [12] A. Rigueiro-Rodríguez, M.R. Mosquera-Losada, E. Fernández-Núñez, Afforestation of agricultural land with *Pinus radiata* D. don and *Betula alba* L. in NW Spain: Effects on soil PH, understory production and floristic diversity eleven years after establishment, *Land Degradation & Development*. 23 (2012) 227–241. <https://doi.org/10.1002/ldr.1072>.
- [13] H.P. Jarvie, P.J.A. Withers, R. Hodgkinson, A. Bates, M. Neal, H.D. Wickham, S.A. Harman, L. Armstrong, Influence of rural land use on streamwater nutrients and the ir ecological significance, *Journal of Hydrology*. 350 (2008) 166–186. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.10.042>.
- [14] P.J.A. Withers, H.P. Jarvie, C. Stoate, Quantifying the impact of septic tank systems on eutrophication risk in rural headwaters, *Environment International*. 37 (2011) 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.01.002>.
- [15] R.C. Petersen, The RCE: a Riparian, Channel, and Environmental Inventory for small streams in the agricultural landscape, *Freshwater Biology*. 27 (1992) 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1992.tb00541.x>.
- [16] E. Troitiño, M.C. Costa, L. Ferrari, A. Giorgi, La conservación de las zonas ribereñas de arroyos pampeanos., *Actas Del Congreso de Hidrología de Llanuras*. (2010) 1256–1263.
- [17] IPEC, Censo 2010, IPEC Misiones. (2010). <https://ipecmisiones.org/censo-2010-datos-estadisticos-de-la-poblacion-de-misiones/> (accessed July 14, 2020).
- [18] S.B. Jonnalagadda, G. Mhere, Water quality of the odzi river in the eastern highlands of zimbabwe, *Water Research*. 35 (2001) 2371–2376. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00533-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00533-9).
- [19] M. Yoshimura, Effects of forest disturbances on aquatic insect assemblages, *Entomological Science*. 15 (2012) 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00511.x>.
- [20] J.B. Kauffman, W.C. Krueger, Livestock impacts on riparian ecosystems and streamside management implications...a review., *Rangeland Ecology & Management / Journal of Range Management Archives*. 37 (1984) 430–438.
- [21] G. Sparovek, S. Beatriz Lima Ranieri, A. Gassner, I. Clerice De Maria, E. Schnug, R. Ferreira dos Santos, A. Joubert, A conceptual framework for the definition of the optimal width of riparian forests, *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 90 (2002) 169–175. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00195-5).
- [22] L.D. Zweig, C.F. Rabenni, Biomonitoring for deposited sediment using benthic invertebrates: A test on 4 Missouri streams, *Journal of the North American Benthological Society*. 20 (2001) 643–657.

- [23] M.D. DeLong, M.A. Brusven, Allochthonous input of organic matter from different riparian habitats of an agriculturally impacted stream, *Environmental Management*. 18 (1994) 59–71. <https://doi.org/10.1007/BF02393750>.
- [24] J. Pozo, E. González, J.R. Diez, J. Molinero Ortiz, A. Elozegi, Inputs of Particulate Organic Matter to Streams with Different Riparian Vegetation, *Journal of the North American Benthological Society*. 16 (1997) 602–611. <https://doi.org/10.2307/1468147>.
- [25] J.F. Gonçalves-Júnior, R. Tavares Martins, B.M. de Paiva Ottoni, S.R. Marques Crouceiro, Uma visão sobre a decomposição foliar em sistemas aquáticos brasileiros. in: Hamada, N., Nessimian, J. L. y Querino, R. B. *Insetos aquáticos na Amazonia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia.*, Editora do INPA, Manaus – AM, Brasil, 2014.
- [26] F.G. Carvalho, N.S. Pinto, J.M.B. de Oliveira Júnior, L. Juen, Effects of marginal vegetation removal on Odonata communities, *Acta Limnologica Brasiliensia*. 25 (2013) 10–18. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2013005000013>.
- [27] C.J. da Silva Monteiro, S.R.M. Couceiro, N. Hamada, L. Juen, Effect of vegetation removal for road building on richness and composition of Odonata communities in Amazonia, Brazil, *International Journal of Odonatology*. 16 (2013) 135–144.
- [28] L. Juen, J.M.B. de Oliveira-Junior, Y. Shimano, T.P. Mendes, H.S.R. Cabette, Composição e riqueza de Odonata (Insecta) em riachos com diferentes níveis de conservação em um ecótono Cerrado-Floresta Amazônica, *Acta Amazonica*. 44 (2014) 223–233. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672014000200008>.
- [29] T. Abbasi, S.A. Abbasi, *Water Quality Indices*, Elsevier, 2012.
- [30] M. Gitau, J. Chen, Z. Ma, Water Quality Indices as Tools for Decision Making and Management, *Water Resources Management*. 30 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11269-016-1311-0>.
- [31] K.I. Soumaila, Albachir Seydou Niandou, Mustapha Naimi, Chikhaoui Mohamed, Keith Schimmel, Stephanie Luster-Teasley, Naeem Nizar Sheick, A Systematic Review and Meta-Analysis of Water Quality Indices, *JAST-B*. 9 (2019). <https://doi.org/10.17265/2161-6264/2019.01.001>.
- [32] N.E. Samboni Ruiz, Y. Carvajal Escobar, J.C. Escobar, A review of physical-chemical parameters as water quality and contamination indicators, *Revista Ingenieria e Investigacion*. 27 (2007) 172–181.
- [33] P. Torres, C.H. Cruz, P.J. Patiño, Índices de calidad de agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano. Una revisión crítica, *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*. 8 (2009) 16.
- [34] E. Avigliano, N. Schenone, Water quality in Atlantic rainforest mountain rivers (South America): quality indices assessment, nutrients distribution, and consumption effect,

- Environ Sci Pollut Res Int. 23 (2016) 15063–15075. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6646-9>.
- [35] S.F. Pesce, D.A. Wunderlin, Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba City (Argentina) on Suquia River, *Water Research*. 34 (2000) 2915–2926. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00036-1).
- [36] C.A. Gonzales-Zuarth, A. Vallarino, J.C. Perez-Gimenez, A.M. Low-Pfeng, *Bioindicadores: Guardianes de nuestro futuro ambiental*, Instituto Nacional de Ecología Climático (INECC). (2014). <https://agua.org.mx/biblioteca/bioindicadores-guardianes-nuestro-ambiental/> (accessed June 26, 2020).
- [37] L. Li, B. Zheng, L. Liu, Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: Definitions, Approaches and Trends, *Procedia Environmental Sciences*. 2 (2010) 1510–1524. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>.
- [38] M. Springer, Biomonitorio acuático, *Revista de Biología Tropical*. 58 (2010) 53–59. <https://doi.org/10.15517/rbt.v58i4.20082>.
- [39] S. Bybee, A. Córdoba-Aguilar, M.C. Duryea, R. Futahashi, B. Hansson, M.O. Lorenzo-Carballa, R. Schilder, R. Stoks, A. Suvorov, E.I. Svensson, J. Swaegers, Y. Takahashi, P.C. Watts, M. Wellenreuther, Odonata (dragonflies and damselflies) as a bridge between ecology and evolutionary genomics, *Frontiers in Zoology*. 13 (2016) 46. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0176-7>.
- [40] M. Campero, S. Slos, F. Ollevier, R. Stoks, Sublethal pesticide concentrations and predation jointly shape life history: behavioral and physiological mechanisms, *Ecol Appl*. 17 (2007) 2111–2122. <https://doi.org/10.1890/07-0442.1>.
- [41] R. Relyea, N. Mills, Predator-Induced Stress Makes the Pesticide Carbaryl More Deadly to Gray Treefrog Tadpoles (*Hyla versicolor*), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (2001) 2491–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.031076198>.
- [42] P.D. Noyes, M.K. McElwee, H.D. Miller, B.W. Clark, L.A. Van Tiem, K.C. Walcott, K.N. Erwin, E.D. Levin, The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world, *Environment International*. 35 (2009) 971–986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>.
- [43] M. Beketov, B. Kefford, R.B. Schäfer, M. Liess, Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(27): 11039-43, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>.
- [44] E. Malaj, P.C. von der Ohe, M. Grote, R. Kühne, C. Mondy, P. Usseglio-Polatera, W. Brack, R.B. Schäfer, Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems

- on the continental scale, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (2014) 9549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321082111>.
- [45] J. Heino, J. Soininen, J. Alahuhta, J. Lappalainen, R. Virtanen, A comparative analysis of metacommunity types in the freshwater realm, *Ecology and Evolution*. 5 (2015) 1525–1537. <https://doi.org/10.1002/ece3.1460>.
- [46] J.R. Karr, Assessment of Biotic Integrity Using Fish Communities, *Fisheries*. 6 (1981) 21–27. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1981\)006<0021:AObIUF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1981)006<0021:AObIUF>2.0.CO;2).
- [47] V.H. Resh, J.D. Unzicker, Water Quality Monitoring and Aquatic Organisms: The Importance of Species Identification, *Journal (Water Pollution Control Federation)*. 47 (1975) 9–19.
- [48] J.L. Metcalfe, Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: History and present status in Europe, *Environmental Pollution*. 60 (1989) 101–139. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90223-6).
- [49] D.M. Rosenberg, V.H. Resh, eds., *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*, Springer US, 1993. <https://www.springer.com/gp/book/9780412022517> (accessed June 26, 2020).
- [50] N. Prat, B. Rios-Touma, R. Acosta, M. Rieradevall, Los macroinvertebrados como indicadores de calidad de las aguas, in: 2009: pp. 631–654.
- [51] C.J. Vörösmarty, P.B. McIntyre, M.O. Gessner, D. Dudgeon, A. Prusevich, P. Green, S. Glidden, S.E. Bunn, C.A. Sullivan, C.R. Liermann, P.M. Davies, Global threats to human water security and river biodiversity, *Nature*. 467 (2010) 555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>.
- [52] L.B. Calvão, L. Juen, J.M.B. de Oliveira Junior, J.D. Batista, P. De Marco Júnior, Land use modifies Odonata diversity in streams of the Brazilian Cerrado, *J Insect Conserv*. 22 (2018) 675–685. <https://doi.org/10.1007/s10841-018-0093-5>.
- [53] L. Juen, E. Cunha, F. Carvalho, M. Ferreira, T. Begot, A. Andrade, Y. Shimano, H. Sousa, P. Pompeu, L. Montag, Effects of Oil Palm Plantations on the Habitat Structure and Biota of Streams in Eastern Amazon: Effect of Oil Palm on the Structure of Stream, *River Research and Applications*. 32 (2016) 2081–2094. <https://doi.org/10.1002/rra.3050>.
- [54] T.E. Clark, M.J. Samways, Dragonflies (Odonata) as Indicators of Biotope Quality in the Kruger National Park, South Africa, *Journal of Applied Ecology*. 33 (1996) 1001–1012. <https://doi.org/10.2307/2404681>.
- [55] T.B. Miguel, L.B. Calvão, M.V.C. Vital, L. Juen, A scientometric study of the order Odonata with special attention to Brazil, *International Journal of Odonatology*. 20 (2017) 27–42. <https://doi.org/10.1080/13887890.2017.1286267>.

- [56] C.S. Monteiro-Júnior, L. Juen, N. Hamada, Effects of urbanization on stream habitats and associated adult dragonfly and damselfly communities in central Brazilian Amazonia, *Landscape and Urban Planning*. 127 (2014) 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2014.03.006>.
- [57] M. Rocha, P. Rodríguez, A. Córdoba-Aguilar, Spatial and temporal effects of land use change as potential drivers of odonate community composition but not species richness, *Biodiversity and Conservation*. 28 (2019) 451–466. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1671-2>.
- [58] J.P. Simaika, M.J. Samways, Reserve selection using Red Listed taxa in three global biodiversity hotspots: Dragonflies in South Africa, *Biological Conservation*. 142 (2009) 638–651. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.11.012>.
- [59] C.M. Suárez-Tovar, M. Rocha-Ortega, A. González-Voyer, D. González-Tokman, A. Córdoba-Aguilar, The larger the damselfly, the more likely to be threatened: a sexual selection approach, *J Insect Conserv*. 23 (2019) 535–545. <https://doi.org/10.1007/s10841-019-00142-0>.
- [60] K. Koch, C. Wagner, G. Sahlén, Farmland versus forest: comparing changes in Odonata species composition in western and eastern Sweden, *Insect Conservation and Diversity*. 7 (2014) 22–31. <https://doi.org/10.1111/icad.12034>.
- [61] M.L. May, Odonata: Who They Are and What They Have Done for Us Lately: Classification and Ecosystem Services of Dragonflies, *Insects*. 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/insects10030062>.
- [62] S. Renner, G. Sahlén, E. Périco, Testing Dragonflies as Species Richness Indicators in a Fragmented Subtropical Atlantic Forest Environment, *Neotrop Entomol*. 45 (2016) 231–239. <https://doi.org/10.1007/s13744-015-0355-9>.
- [63] G. Sahlén, K. Ekestubbe, Identification of dragonflies (Odonata) as indicators of general species richness in boreal forest lakes, *Biodiversity and Conservation*. 10 (2001) 673–690. <https://doi.org/10.1023/A:1016681524097>.
- [64] B. Oertli, The use of dragonflies in the assessment and monitoring of aquatic habitats, in: *Dragonflies Damselflies Model Org Ecol. Evol. Res*, 2008: pp. 79–96. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199230693.003.0007>.
- [65] U.G. Neiss, N. Hamada, *Ordem Odonata*. in: N. Hamada, J. L. Nessimian R. B. Querino, *Insetos aquáticos na Amazonia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia.*, Editora do INPA, Manaus, Brasil, 2014.
- [66] K.-D.B. Dijkstra, V.J. Kalkman, R.A. Dow, F.R. Stokvis, J.V. Tol, Redefining the damselfly families: a comprehensive molecular phylogeny of Zygoptera (Odonata), *Systematic Entomology*. 39 (2013) 68–96. <https://doi.org/10.1111/syen.12035>.

- [67] F. Lozano, A. del Palacio, L. Ramos, J. Muzon, The Odonata of Argentina: state of knowledge and updated checklist., *International Journal of Odonatology*. 23 (2020) 113–153.
- [68] F. Suhling, G. Sahlén, S. Gorb, V. Kalkman, K. Dijkstra, J. Tol, Order Odonata, in: Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates: Ecology and General Biology: Fourth Edition*, 2015: pp. 893–932. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00035-8>.
- [69] P. Pessacq, J. Muzon, U.G. Neiss, Order Odonata. in: N. Hamada, J.H. Thorp, C. Rogers, Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates: Volume 3: Keys to Neotropical Hexapoda*, Academic Press, 2018.
- [70] P.S. Corbet, *Dragonflies: Behavior and Ecology of Odonata*, Comstock Pub Assoc, Ithaca, New York, 1999.
- [71] T. McKay, T. Herman, Thermoregulatory constraints on behavior: patterns in a neotropical dragonfly assemblage, *Odonatologica*. 27 (2008) 29–39.
- [72] P.Jr. De Marco, D.C. Resende, Activity patterns and thermoregulation in a tropical dragonfly assemblage, *Odonatologica*. 2 (2002) 129–138.
- [73] P.Jr. De Marco, J.D. Batista, H.S.R. Cabette, Community Assembly of Adult Odonates in Tropical Streams: An Ecophysiological Hypothesis, *PLOS ONE*. 10 (2015) e0123023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123023>.
- [74] D.F.G. Pereira, J.M.B. de Oliveira Junior, L. Juen, Environmental changes promote larger species of Odonata (Insecta) in Amazonian streams, *Ecological Indicators*. 98 (2019) 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.09.020>.
- [75] A. Dolný, H. Šigutová, A novel approach involving the use of Odonata as indicators of tropical forest degradation: When family matters, *Ecological Indicators*. 104 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.05.001>.
- [76] V. Kalkman, V. Clausnitzer, K. Dijkstra, A. Orr, D. Paulson, J. Tol, Global diversity of dragonflies (Odonata) in freshwater, in: *Hydrobiologia*, 2008: pp. 351–363. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7\\_38](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_38).
- [77] A.L. Carvalho, J.L. Nessimian, Odonata do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: hábitos e hábitos das larvas, *Oecologia Brasiliensis*. 5 (1995) 1981–9366. <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.1998.0501.01>.
- [78] T.A. Hofmann, C.F. Mason, Habitat characteristics and the distribution of Odonata in a lowland river catchment in eastern England, *Hydrobiologia*. 539 (2005) 137–147. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-3916-1>.
- [79] R.D. Moore, D.L. Spittlehouse, A. Story, Riparian Microclimate and Stream Temperature Response to Forest Harvesting: A Review, *Journal of the American Water Resources Association*. 41 (2005) 813–834. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2005.tb03772.x>.

- [80] M.E. Rodrigues, F. de Oliveira Roque, J.M.O. Quintero, J.C. de Castro Pena, D.C. de Sousa, P. De Marco Junior, Nonlinear responses in damselfly community along a gradient of habitat loss in a savanna landscape, *Biological Conservation*. 194 (2016) 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.001>.
- [81] M.K. Schwartz, G. Luikart, R.S. Waples, Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management, *Trends in Ecology & Evolution*. 22 (2007) 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>.
- [82] R. Herzog, H. Hadrys, Long-term genetic monitoring of a riverine dragonfly, *Orthetrum coerulescens* (Odonata: Libellulidae): Direct anthropogenic impact versus climate change effects, *PLOS ONE*. 12 (2017) e0178014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178014>.
- [83] A. Coors, J. Vanoverbeke, T. De Bie, L. De Meester, Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*, *Aquat. Toxicol.* 95 (2009) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.08.004>.
- [84] C. Nowak, C. Vogt, M. Pfenninger, K. Schwenk, J. Oehlmann, B. Streit, M. Oetken, Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 881–886. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.005>.
- [85] P. Watts, F. Rousset, I. Saccheri, R. Leblois, S. Kemp, D. Thompson, Compatible genetic and ecological estimates of dispersal rates in insect (*Coenagrion mercuriale*: Odonata: Zygoptera) populations: Analysis of “neighbourhood size” using a more precise estimator, *Molecular Ecology*. 16 (2007) 737–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03184.x>.
- [86] P.C. Watts, I.J. Saccheri, S.J. Kemp, D.J. Thompson, Population structure and the impact of regional and local habitat isolation upon levels of genetic diversity of the endangered damselfly *Coenagrion mercuriale* (Odonata: Zygoptera), *Freshwater Biology*. 51 (2006) 193–205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01478.x>.
- [87] J. Swaegers, J. Mergeay, L. Therry, M.H.D. Larmuseau, D. Bonte, R. Stoks, Rapid range expansion increases genetic differentiation while causing limited reduction in genetic diversity in a damselfly, *Heredity*. 111 (2013) 422–429. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.64>.
- [88] A.R. Hughes, B.D. Inouye, M.T.J. Johnson, N. Underwood, M. Vellend, Ecological consequences of genetic diversity, *Ecology Letters*. 11 (2008) 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>.
- [89] R.R. Bijlsma, V. Loeschcke, Bijlsma R, Loeschcke V.. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol* 18: 744-749, *Journal of Evolutionary Biology*. 18 (2005) 744–9. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00962.x>.

- [90] R. Frankham, Stress and adaptation in conservation genetics, *Journal of Evolutionary Biology*. 18 (2005) 750–755. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00885.x>.
- [91] J. Dibattista, Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations, *Conservation Genetics*. 9 (2007) 141–156. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9317-z>.
- [92] D. Charlesworth, J.H. Willis, The genetics of inbreeding depression, *Nature Reviews Genetics*. 10 (2009) 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>.
- [93] D.H. Reed, R. Frankham, Correlation between Fitness and Genetic Diversity, *Conservation Biology*. 17 (2003) 230–237. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236.x>.
- [94] Y. Willi, J. Van Buskirk, A.A. Hoffmann, Limits to the Adaptive Potential of Small Populations, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 37 (2006) 433–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110145>.
- [95] J.A. Aranguren Mendez, R. Roman, W. Isea, Y. Villasmil, J. Jordana, Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión, *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13 (2005).
- [96] A. Lin, S. Wei, L. Cao, X. Liu, First development and characterization of 27 novel microsatellite markers in the dobsonfly *Neoneuromus ignobilis* (Megaloptera: Corydalidae) at genome-scale level, *Appl Entomol Zool.* 55 (2020) 149–158. <https://doi.org/10.1007/s13355-019-00664-8>.
- [97] K.K. Abbott, J.C. Abbott, J.D. Lozier, R.R. Beasley, S.L. Lance, Development of polymorphic microsatellite markers for a rare dragonfly, *Cordulegaster sarracenia* (Odonata: Cordulegastridae), with notes on population structure and genetic diversity, *International Journal of Odonatology*. 21 (2018) 165–171. <https://doi.org/10.1080/13887890.2018.1498398>.
- [98] P. Watts, D. Thompson, S. Kemp, Cross-species amplification of microsatellite loci in some European zygopteran species (Odonata: Coenagrionidae), *International Journal of Odonatology*. 7 (2012) 87–96. <https://doi.org/10.1080/13887890.2004.9748198>.
- [99] M.J. Kim, J.S. Kim, S.-S. Kim, I. Kim, Development and validation of microsatellite markers for an endangered dragonfly, *Libellula angelina* (Odonata: Libellulidae), with notes on population structures and genetic diversity, *International Journal of Odonatology*. 23 (2020) 93–102. <https://doi.org/10.1080/13887890.2019.1701573>.
- [100] R.W. Garrison, A Synopsis of the Genus *Hetaerina* with Descriptions of Four New Species (Odonata: Calopterygidae), *Transactions of the American Entomological Society*. 116 (1990) 175–259.
- [101] J. Contreras-Garduño, H. Lanz-Mendoza, A. Córdoba-Aguilar, The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and

- survival in males of the American rubyspot, *J. Insect Physiol.* 53 (2007) 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.03.003>.
- [102] J. Contreras-Garduño, J. Canales-Lazcano, A. Córdoba-Aguilar, Wing pigmentation, immune ability, fat reserves and territorial status in males of the rubyspot damselfly, *Hetaerina americana*, *J Ethol.* 24 (2006) 165–173. <https://doi.org/10.1007/s10164-005-0177-z>.
- [103] M.A. Serrano-Meneses, K. López-García, A.I. Carrillo-Muñoz, Assortative Mating by Size in the American Rubyspot Damselfly (*Hetaerina americana*), *J Insect Behav.* 31 (2018) 585–598. <https://doi.org/10.1007/s10905-018-9701-1>.
- [104] O.M. Fincke, S.P. Yanoviak, R.D. Hanschu, Predation by odonates depresses mosquito abundance in water-filled tree holes in Panama, *Oecologia.* 112 (1997) 244–253. <https://doi.org/10.1007/s004420050307>.
- [105] Y.M. Vega-Sánchez, L.F. Mendoza-Cuenca, A. González-Rodríguez, Complex evolutionary history of the American Rubyspot damselfly, *Hetaerina americana* (Odonata): Evidence of cryptic speciation, *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 139 (2019) 106536. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106536>.
- [106] C.N. Anderson, G.F. Grether, Characterization of novel microsatellite loci for *Hetaerina americana* damselflies, and cross-amplification in other species, *Conservation Genet Resour.* 5 (2013) 149–151. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9755-x>.
- [107] P. Pessacq, J. Muzón, Description of the Final Stadium Larva of *Hetaerina rosea* Selys (Zygoptera: Calopterygidae), *Studies on Neotropical Fauna and Environment.* 39 (2004) 239–242. <https://doi.org/10.1080/01650520400007363>.
- [108] P.S. Ferreira-Peruquetti, P.D. De Marco Jr., Efeito da alteração ambiental sobre comunidades de Odonata em riachos de Mata Atlântica de Minas Gerais, Brasil, *Revista Brasileira de Zoologia.* 19 (2002) 317–327. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752002000200002>.
- [109] P.D.N. Hebert, A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. deWaard, Biological identifications through DNA barcodes., *Proc Biol Sci.* 270 (2003) 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- [110] T. Bergmann, J. Rach, S. Damm, R. DeSalle, B. Schierwater, H. Hadrys, The potential of distance-based thresholds and character-based DNA barcoding for defining problematic taxonomic entities by CO1 and ND1, *Molecular Ecology Resources.* 13 (2013) 1069–1081. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12125>.
- [111] R. DeSalle, P. Goldstein, Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding, *Front. Ecol. Evol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>.
- [112] R. Koroiva, M. Pepinelli, M.E. Rodrigues, F. de O. Roque, A.P. Lorenz-Lemke, S. Kvist, DNA barcoding of odonates from the Upper Plata basin: Database creation and genetic

- diversity estimation, PLOS ONE. 12 (2017) e0182283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182283>.
- [113] S.D. Matteucci, Ecorregión Campos y Malezales. In: J. Morello, S.D. Matteucci, A. Rodriguez, M. Silva (Eds.) Ecorregiones y Complejos Ecosistémicos Argentinos, Orientación Gráfica Editora S.R.L., 2012.
- [114] A.L. Cabrera, Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería., ACME S.A.C.I., Buenos Aires, Argentina, 1994.
- [115] J.C. Chebez, Guía de reservas naturales de la Argentina, 1 edición, Latin grafica SRL, camora, Buenos Aires, 2006.
- [116] V. Bauni, M. Homberg, Reserva natural Campo San Juan, Misiones, Argentina, Primera edición, Fundación de Historia Natural Félix de Azara, Buenos Aires, 2015.
- [117] J.L. Nessimian, E.M. Venticinque, J. Zuanon, P.Jr. De Marco, M. Gordo, L. Fidelis, Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams, *Hydrobiologia*. (2008) 614–117.
- [118] J. Smith, M.J. Samways, S. Taylor, Assessing Riparian Quality Using Two Complementary Sets of Bioindicators, *Biodivers Conserv*. 16 (2007) 2695–2713. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9081-2>.
- [119] J.M. Costa, A.N. Lourenço, L.P. Vieira, *Micrathyria pseudhypodidyma* sp. n. (Odonata: Libellulidae), com Chave das Espécies do Gênero que Ocorrem no Estado do Rio de Janeiro, *Neotrop Entomol*. 31 (2002) 377–389. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000300006>.
- [120] R.W. Garrison, N. von Ellenrieder, J.A. Louton, *Dragonfly Genera of the New World: an illustrated and annotated key to the Anisoptera*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA., 2010.
- [121] R.W. Garrison, A synopsis of the genera *Mnesarete* Cowley, *Bryoplathanon* Gen. Nov., and *Ormenoplebia* Gen. Nov. (Odonata: Calopterygidae), *Contributions in Science*. 506 (2006) 1–84.
- [122] N. von Elenrieder, R.W. Garrison, Dragonflies and Damselflies (Insecta: Odonata) of the Argentine Yungas: Species composition and identification., *Scientific Reports*, Società Zoologica 'La Torbiera', Italy. 7 (2007) 1–13.
- [123] N. von Elenrieder, J. Muzon, The Argentinean species of the genus *Perithemis* Hagen (Anisoptera : Libellulidae), *Odonatologica*. 28 (1999) 385–398.
- [124] Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan, PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, *Palaeontologia Electronica*. 4 (2001) 1–9.
- [125] M. Dufrene, P. Legendre, Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach, *Ecological Monographs*. 67 (1997) 345–366. <https://doi.org/10.2307/2963459>.

- [126] R Development Core Team, R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical Computing, Vienna, (2011).
- [127] M. De Caceres, P. Legendre, Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference., *Ecology*. 90 (2009) 3566–3574.
- [128] W. Ji-Ping, SPECIES: An R Package for Species Richness Estimation., *Journal of Statistical Software*. 40 (2011) 1–15.
- [129] J. Oksanen, F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. Minchin, R. O’Hara, G. Simpson, P. Solymos, M. Stevenes, H. Wagner, *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-2, (2012).
- [130] H. Hadrys, W. Schroth, B. Schierwater, B. Streit, O.M. Fincke, Tree hole odonates as environmental monitors: Non-invasive isolation of polymorphic microsatellites from the neotropical damselfly *Megaloprepus caerulatus*, *Conserv Genet*. 6 (2005) 481–483. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-4971-5>.
- [131] R.C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res*. 32 (2004) 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- [132] D. Li, S. Liu, *Water Quality Monitoring and Management: Basis, Technology and Case Studies*, Academic Press, 2018.
- [133] F. Valente Neto, F. De Olvera Roque, M.E. Rodrigues, L. Juen, Toward a practical use of Neotropical odonates as bioindicators: Testing congruence across taxonomic resolution and life stages, *Ecological Indicators*. 62 (2015) 952–959.
- [134] J.M.B. de Oliveira-Junior, P. De Marco, K. Dias-Silva, R.P. Leitão, C.G. Leal, P.S. Pompeu, T.A. Gardner, R.M. Hughes, L. Juen, Effects of human disturbance and riparian conditions on Odonata (Insecta) assemblages in eastern Amazon basin streams, *Limnologica*. 66 (2017) 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.04.007>.
- [135] C. da S. Monteiro Júnior, L. Juen, N. Hamada, Analysis of urban impacts on aquatic habitats in the central Amazon basin: Adult odonates as bioindicators of environmental quality, *Ecological Indicators*. 48 (2015) 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.08.021>.
- [136] J.M.B. de Oliveira-Junior, Y. Shimano, T.A. Gardner, R.M. Hughes, P. de M. Júnior, L. Juen, Neotropical dragonflies (Insecta: Odonata) as indicators of ecological condition of small streams in the eastern Amazon, *Austral Ecology*. 40 (2015) 733–744. <https://doi.org/10.1111/aec.12242>.
- [137] D.C. Resende, P. De Marco Jr., First description of reproductive behavior of the Amazonian damselfly *Chalcopteryx rutilans* (Rambur) (Odonata, Polythoridae), *Revista Brasileira de Entomologia*. 54 (2010) 436–440. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262010000300013>.

- [138] J.M. Chase, Ecological niche theory. In Scheiner S.M. & Willig M.R. The theory of ecology., The University of Chicago Press, Chicago, 2011.
- [139] J.C.F. de Assis, A.L. Carvalho, J.L. Nessimian, Composição e preferência por microhabitat de imaturos de Odonata (Insecta) em um trecho de baixada do Rio Ubatiba, Maricá-RJ, Brasil, Rev Bras Entomol. 48 (2004) 273–282. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262004000200017>.
- [140] S. Dutra, P. De Marco, Bionomic differences in odonates and their influence on the efficiency of indicator species of environmental quality, Ecological Indicators. 49 (2015) 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.016>.
- [141] J.Â. Fulan, R. Henry, Distribuição temporal de imaturos de Odonata (Insecta) associados a Eichhornia azurea (Kunth) na Lagoa do Camargo, Rio Paranapanema, São Paulo, Revista Brasileira de Entomologia. 51 (2007) 224–227. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262007000200013>.
- [142] M.E. Bleich, M.T.F. Piedade, A.F. Mortati, T. André, Autochthonous primary production in southern Amazon headwater streams: Novel indicators of altered environmental integrity, Ecological Indicators. 53 (2015) 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.040>.
- [143] S.R. Palumbi, Humans as the World's Greatest Evolutionary Force, Science. 293 (2001) 1786–1790. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>.
- [144] C. Schmidt, M. Domaratzki, R.P. Kinnunen, J. Bowman, C.J. Garroway, Continent-wide effects of urbanization on bird and mammal genetic diversity, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 287 (2020) 20192497. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2497>.
- [145] G. Segelbacher, S.A. Cushman, B.K. Epperson, M.-J. Fortin, O. Francois, O.J. Hardy, R. Holderegger, P. Taberlet, L.P. Waits, S. Manel, Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges, Conserv Genet. 11 (2010) 375–385. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0044-5>.
- [146] M.J. van Strien, D. Keller, R. Holderegger, J. Ghazoul, F. Kienast, J. Bolliger, Landscape genetics as a tool for conservation planning: predicting the effects of landscape change on gene flow, Ecological Applications. 24 (2014) 327–339. <https://doi.org/10.1890/13-0442.1>.
- [147] C. Hof, M. Brändle, R. Brandl, Lentic odonates have larger and more northern ranges than lotic species, Journal of Biogeography. 33 (2006) 63–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01358.x>.
- [148] C. Hof, M. Brändle, D.M. Dehling, M. Munguía, R. Brandl, M.B. Araújo, C. Rahbek, Habitat stability affects dispersal and the ability to track climate change, Biology Letters. 8 (2012) 639–643. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0023>.

- [149] J. Xue, X. Yu, H. Zhang, X. Chen, W. Bu, Population genetics and ecological niche modeling shed light on conservation of the island endemic damselfly *Pseudolestes mirabilis* (Odonata, Pseudolestidae), *Hydrobiologia*. 790 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10750-016-3038-6>.
- [150] Y. Kamimura, J. Abe, R.L. Ferreira, K. Yoshizawa, Microsatellite markers developed using a next-generation sequencing technique for *Neotrogla* spp. (Psocodea: Prionoglarididae), cave dwelling insects with sex-reversed genitalia, *Entomological Science*. 22 (2019) 48–55. <https://doi.org/10.1111/ens.12339>.
- [151] S. Taheri, T. Lee Abdullah, M.R. Yusop, M.M. Hanafi, M. Sahebi, P. Azizi, R.R. Shamshiri, Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants, *Molecules*. 23 (2018) 399. <https://doi.org/10.3390/molecules23020399>.
- [152] P. Šarhanová, S. Pfanzelt, R. Brandt, A. Himmelbach, F.R. Blattner, SSR-seq: Genotyping of microsatellites using next-generation sequencing reveals higher level of polymorphism as compared to traditional fragment size scoring, *Ecology and Evolution*. 8 (2018) 10817–10833. <https://doi.org/10.1002/ece3.4533>.
- [153] J. Viruel, A. Haguénauer, M. Juin, F. Mirleau, D. Bouteiller, M. Boudagher-Kharrat, L. Ouahmane, S.L. Malfa, F. Médail, H. Sanguin, G.N. Feliner, A. Baumel, Advances in genotyping microsatellite markers through sequencing and consequences of scoring methods for *Ceratonia siliqua* (Leguminosae), *Applications in Plant Sciences*. 6 (2018) e01201. <https://doi.org/10.1002/aps3.1201>.
- [154] M. Curto, S. Winter, A. Seiter, L. Schmid, K. Scheicher, L.M.F. Barthel, J. Plass, H. Meimberg, Application of a SSR-GBS marker system on investigation of European Hedgehog species and their hybrid zone dynamics, *Ecology and Evolution*. 9 (2019) 2814–2832. <https://doi.org/10.1002/ece3.4960>.
- [155] A. del Palacio, J. Muzón, Redescription of *Erythrodiplax pallida* (Needham, 1904) (Odonata: Libellulidae), *International Journal of Odonatology*. 19 (2016) 23–30. <https://doi.org/10.1080/13887890.2016.1143408>.
- [156] U. Neiss, G. Fleck, P. Pessacq, K. Tennessen, Odonata, in: 2018: pp. 399–447. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804223-6.00017-2>.
- [157] T.P. Mendes, J.M.B. Oliveira-Junior, H.S.R. Cabette, J.D. Batista, L. Juen, Congruence and the Biomonitoring of Aquatic Ecosystems: Are Odonate Larvae or Adults the Most Effective for the Evaluation of Impacts., *Neotropical Entomology*. 46 (2017) 631–641.
- [158] D. Anjos-Santos, P. Pessacq, *Peristicta guarellae* sp. nov. from Brazil (Odonata: Protoneuridae), *International Journal of Odonatology*. 16 (2013) 293–299. <https://doi.org/10.1080/13887890.2013.845066>.

- [159] P. Pessacq, *Peristicta aeneoviridis* Calvert, 1909 and *P. forceps* Hagen in Selys, 1860: Redescriptions and a new synonymy (Zygoptera: Protoneuridae), *Odonatologica*. 36 (2007) 207–218.
- [160] P. Pessacq, J.M. Costa, Three new species of *Peristicta* Hagen in Selys (Odonata: Zygoptera: Protoneuridae) from Brazil, *Neotropical Entomology*. 36 (2007) 46–52. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000100006>.
- [161] F. Lozano, J. Muzon, D. Anjos-Santos, P. Pessacq, Superfamily Coenagrionoidea. In: Hamada, N., Thorp, J. & Rogers, D.C. (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, volume 3. Keys to Neotropical Hexapoda.*, Elsevier Science & Technology, Kansas, 2018.
- [162] N.D. Santos, Descrição da ninfa de *Peristicta aeneoviridis* Calvert, 1909 (Odonata: Protoneuridae)., *Atas Da Sociedade de Biologia Do Rio de Janeiro*. 15 (1971) 144–145.
- [163] M.S. Dalzochio, S. Renner, C. Sganzerla, G. Prass, G.J. Ely, L.C. Salvi, N. Dametto, E. Périco, M.S. Dalzochio, S. Renner, C. Sganzerla, G. Prass, G.J. Ely, L.C. Salvi, N. Dametto, E. Périco, Checklist of Odonata (Insecta) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil with seven new records, *Biota Neotropica*. 18 (2018). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2018-0551>.
- [164] N. von Ellenrieder, J. Muzón, An Updated checklist of the Odonata from Argentina., *Odonatologica*. 37 (2008) 55–68.
- [165] N. von Ellenrieder, A synopsis of the Neotropical genus *Nephepeltia* (Odonata: Libellulidae), including description of a new species, synonymies, and a key to males, *Zootaxa*. 3796 (2014) 121–146. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3796.1.6>.
- [166] N. von Ellenrieder, Revalidation of *Argentagrion* and redefinition of *Homeoura*, with the description of *H. obrieni* n. sp. (Odonata: Coenagrionidae), *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*. 67 (2017).