

Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
Programa de Pós-Graduação Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

Análises moleculares em *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae): limites taxonômicos e relações intragenéricas

SHIZUKA HASHIMOTO

Manaus – AM

Junho de 2015

SHIZUKA HASHIMOTO

Análises moleculares em *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae): limites taxonômicos e relações intragenéricas

ORIENTADORA: JACQUELINE DA SILVA BATISTA, Dra.

CO-ORIENTADORA: LÚCIA H. RAPP PY-DANIEL, Dra.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre

Fonte financiadora: FAPEAM/CNPq Sisbiota81762/2013-0

Br-BOL564953/2010-5

Manaus – AM

Junho de 2015

Shizuka Hashimoto

Análises moleculares em *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae): limites taxonômicos e relações intragenéricas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Igor Luis Kaefer

Universidade de Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Alessandro Gaspareto Bifi

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prof. Dr. Santiago Linório Ferreyra Ramos

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo - ESALQ/USP

FICHA CATALOGRÁFICA

H346 Hashimoto, Shizuka
Análises moleculares em *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae): limites taxonômicos e relações intragenéricas / Shizuka Hashimoto. --- Manaus: [s.n.], 2015.
x, 64 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.
Orientador : Jacqueline da Silva Batista.
Coorientador: Lúcia H. Rapp Py-Daniel.
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. *Ageneiosus*. 2. Bagre. I. Título.

CDD 597.52

SINOPSE

Dados moleculares são ferramentas muito utilizadas para trabalhos que incluem a taxonomia e filogenia para responder questões relacionadas à conservação, distribuição e história natural de grupos taxonômicos. Foram amostradas 18 espécies do gênero *Ageneiosus* e utilizado marcador molecular mitocondrial Citocromo Oxidase da subunidade I (COI) para discriminar as espécies de peixes através dos valores de variação genética intra e interespecífica. Foram geradas ainda hipóteses filogenéticas quanto a posição dentro do gênero *Ageneiosus* da Bacia Amazônica utilizando os genes mitocondriais COI e ATPase.

AVISO

Esta dissertação faz parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva e, para fins nomenclaturais não deve ser vista como publicação. Dessa forma, informações inéditas, bem como nomes atribuídos a possíveis novas espécies e hipóteses apresentados aqui ainda não estão disponíveis na literatura zoológica. Apesar de disponível publicamente, pessoas interessadas devem estar atentas e cientes a essa informação ao referenciar publicamente conteúdo deste estudo.

NOTICE

This dissertation is presented as partial fulfillment of the dissertation requirement for the Master degree in Genética, Conservação e Biologia Evolutiva and, as such, is not intended as a publication. Therefore, new data, new names and hypothesis expressed here in are not available in the zoological literature. Although available in public, readers are advised to this study should be attended and aware that information content to public reference.

Aos meus pais

“Os problemas nunca vão desaparecer, mesmo a mais bela existência.
Problemas existem para serem resolvidos, e não para perturbar-nos.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

À minha família Hashimoto, meus pais Shoji e Miyoko e aos meus irmãos Kyosuke e Naosuke.

Ao Sonny, meu companheiro por estar ao meu lado sempre.

Às minhas orientadoras, Prof^a. Dr^a. Jacqueline da Silva Batista e a Prof^a. Dr^a. Lúcia H. Rapp Py-Daniel, pelas sugestões, correções do plano e da dissertação, e que me acolhem cada uma em seus respectivos laboratórios, o Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) e a Coleção de Peixes do INPA.

Ao Christian Cramer, pelo contato com a Universidade de Rondônia (UNIR).

À Barbara Calegari (PUCRS), Carolina Doria (UNIR), Mark Sabaj (ANSP), Celeste Nakayama (INPA) e Jansen Zuanon (INPA) pelo empréstimo das amostras.

À Maria (UNIR) que gentilmente fotografou as espécies com os *vouchers* da Instituição.

À Marlene (INPA) que me auxiliou no banco de tecidos da Instituição.

Ao Efrem Ferreira (INPA) pela oportunidade de obter amostras do Rio Negro.

Aos Carlos Scheider, Cristina Bürhein, Gislene Gilse pelas contribuições na aula de qualificação.

Ao colaborador, Frank pela ajuda na identificação dos espécimes e questionamentos que me fez este trabalho.

Aos colegas da coleção de peixes Madoka, Rafa, Isabel, Ronna, Renildo e Andressa pela deposição das espécies, mesa redonda e pelos cafés da manhã, no almoço e no final da tarde.

Ao grupo Pirada e LTBM Giselle, Denise, Kyara, Kátia, Paula, Mateus, Romina, Crysa, Glauco, Érico e Erik pelo convívio no laboratório. As amigas de mestrado Camila, Érica, Jéssica e Nayara pelo apoio em discussões metodológicas, psicológico em todas as horas do dia. Aos amigos em geral, Breno, Mie Jaque pelo apoio moral.

Ao programa de Pós-Graduação de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEv) pela oportunidade do mestrado.

À FAPEAM e ao CNPq pelo financiamento dos projetos Sisbiota e BrBol.

À Capes pelo financiamento da bolsa de mestrado.

E agradeço a todos que não pude citar mas contribuíram diretamente e indiretamente, não tem o espaço suficiente para escrever aqui mas está na minha memória.

Muito obrigada!

RESUMO

A Bacia Amazônica se destaca por possuir uma das mais extensas, complexas e diversificadas redes fluviais do mundo. Esta vasta região inclui o rio Orinoco e as Guianas e se estende desde as nascentes dos Andes peruanos até sua foz no Oceano Atlântico. Dentro da ordem Siluriformes, a família Auchenipteridae possui uma distribuição nos rios da América do Sul e Panamá. Dentre os auchenipterídeos, *Ageneiosus* se destaca pela diversidade de espécies e ampla distribuição nesses rios. Esse estudo foi dividido em dois tópicos: a delimitação taxonômica das espécies de *Ageneiosus* e o posicionamento filogenético das espécies dentro do gênero. A metodologia do DNA *barcode* foi utilizada para determinar os grupos taxonômicos, a variação intra e interespecífica através do modelo de evolução molecular o Kimura-2-parâmetros (K2P) e a árvore de *Neighbour-Joining* com suporte de *bootstrap* de 10.000 réplicas. Foram examinados no total 18 espécies de *Ageneiosus*, utilizando como grupo externo as espécies *Auchenipterichthys punctatus* e *A. longimanus*. A análise molecular delimitou algumas das espécies e encontrou um grupo que formou um complexo de espécies. Sequências nucleotídicas de dois marcadores de DNA mitocondrial (COI e ATPase) foram utilizados para inferências das relações filogenéticas dentro do gênero. A relação filogenética foi investigada utilizando análises de verossimilhança e de inferência bayesiana que possibilitaram recuperar respostas evolutivas distintas. Essas 18 espécies formam um grupo monofilético dentro do gênero *Ageneiosus* e as espécies *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A.* sp. n. “projetada” e *A. vittatus* mostraram relações complexas. Há evidência da existência do “clado *Tympanopleura*” que representa o agrupamento das espécies proposta por Ribeiro (2011).

Palavras-chaves: DNA barcode, sistemática molecular, Bacia Amazônica, bagre, peixes neotropicais.

ABSTRACT

The Amazon Basin remains one of the most extensive, complex and diversified fluvial networks of the world. This vast region includes the Orinoco river and the Guyana watersheds, extending from headwaters of the Peruvian Andes to mouth of the Atlantic Ocean. Within Siluriformes, Auchenipteridae family is distributed in the rivers of South America and Panama. Among auchenipterids, *Ageneiosus* stands out for its diversity of species and wide distribution in these rivers. This study was divided into two topics: the taxonomic delimitation of the species of *Ageneiosus* and, the phylogenetic position of species within genus. The DNA *barcode* methodology was used to define groups within and between species through the molecular evolution model Kimura-2-parameter (K2P) and the construct *Neighbour-Joining* tree with 10.000 bootstrap. Eighteen species of *Ageneiosus* were examined in total with *Auchenipterichthys punctatus* and *A. longimanus* as outgroups. The molecular analysis delimited some of the species and pointed to one complex of species. The inference of phylogenetic relationship within the genus was used based on mitochondrial DNA sequences, COI and ATPase. Phylogenetic relationships were investigated using Maximum Likelihood and Bayesian Analysis that provided different evolutionary answers. Those species formed a monophyletic group within *Ageneiosus* genus and shows complex relationships between species *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”* and *A. vitattus*. There is evidence of the existence of a “clade *Tympanopleura*” which represents the group of species proposed by Ribeiro (2011).

Keywords: DNA barcode, phylogeny, Amazon Basin, catfish, Neotropical fishes.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Aspectos gerais.....	1
1.2. Histórico do gênero <i>Ageneiosus</i>	1
1.3. Biologia.....	3
1.4. Marcadores moleculares mitocondriais.....	3
2. OBJETIVO GERAL.....	6
2.1. Objetivos específicos.....	6
Capítulo 1: Delimitação molecular das espécies do gênero <i>Ageneiosus</i> (Siluriformes: Auchenipteridae) com o uso do DNA Barcoding.....	7
Capítulo 2: Relações filogenéticas dentro do gênero <i>Ageneiosus</i> com marcadores mitocondriais.....	29
3. CONCLUSÃO GERAL.....	51
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO 1.....	58
ANEXO 2.....	61

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Valores de variação a <i>posteriori</i> da distância genética intra e interespecífica das espécies de <i>Ageneiosus</i>	14
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Mapa das espécies 18 espécies examinadas: A – *A. atronasus*; B – *A. brevis*; C – *A. dentatus*; D – *A. inermis*; E – *A. militaris*; F – *A. piperatus*; G – *A. polystictus*; H – *A. rondoni*; I – *Ageneiosus* sp. J – *A. sp. n. “anal curta”* K – *A. aff. atronasus*; L – *A. aff. brevis*; M – *A. sp. n. “projetada”*; N – *A. sp. n. vittatus*; O – *A. sp. n. “Walsh”*; P – *A. ucayalensis*; Q – *A. uranophthalmus*; R – *A. vittatus*.....11

Figura 2 – Visão geral da árvore de agrupamento de vizinhos (NJ) construída com 210 exemplares distribuídos em 18 espécies de *Ageneiosus*.....16

Figura 3 –Lado esquerdo, árvore de agrupamento de vizinhos e lado direito destacando o grupo 1 *Ageneiosus inermis* e grupo 2 *Ageneiosus polystictus* com as respectivas localidades: T – rio Tapajós; W- rio Waini; AS- Alto Solimões; MS – Médio Solimões; P- rio Purus; M- rio Madeira; BS – Baixo Solimões; J – rio Juruá; Tr – rio Trombetas; A – rio Araguaia; X- rio Xingu; L – rio Litaine; N – rio Negro.....17

Figura 4 –Lado esquerdo, árvore de agrupamento de vizinhos e lado direito destacando o grupo 3 que representa seis espécies: *Ageneiosus sp. n. “anal curta”*, *A. dentatus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. vittatus* com as respectivas localidades: P – rio Purus; N – rio Negro MS – Médio Solimões; M – rio Madeira; U – rio Uruguai.....19

Figura 5 –Lado esquerdo, árvore de agrupamento de vizinhos e lado direito destacando o grupo 4 – *Ageneiosus atronasus*, grupo 5 – *A. aff. brevis*, grupo 6 – *A. piperatus*, grupo 7 – *A. rondoni* e grupo 8 – *A. sp. n. “Walsh”* com as respectivas localidades: R- rio Rupununi; P – rio Purus; M – rio Madeira; N – rio Negro; J – rio Juruá; T – rio Tapajós.....21

Figura 6 – Exemplar da UNIR (UFRO-I 016312), identificado como *Ageneiosus brevis*.....22

Figura 7 - Exemplar do INPA (INPA 41635), representando *Ageneiosus rondoni*.....22

Figura 8 – Exemplar da UNIR (UFRO-I 007660), identificado como *Ageneiosus sp. n. vittatus*.....23

Figura 9 –Exemplar do INPA (INPA 41761), representando, <i>Ageneiosus</i> sp. n. “Walsh”	23
---	----

Capítulo 2

Figura 1 – Filogenia de caracteres morfológicos proposta por Ribeiro (2011) para o gênero <i>Ageneiosus</i>	32
--	----

Figura 2 – Mapadas drenagens onde os exemplares distribuídos em 16 espécies de <i>Ageneiosus</i> foram amostradas: 1- Alto rio Amazonas; 2- rio Juruá; 3- rio Purus; 4- rio Negro; 5- Médio Amazonas (Manaus); 6- rio Madeira; 7- rio Trombetas; 8- rio Tapajós; 9- Baixo Amazonas (Santarém); 10- rio Xingu; 11- rio Araguaia; 12- rio Waini; 13- rio Rupununi; 14- rio Litani; 15- rio Uruguai.....	34
--	----

Figura 3 – Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (lado esquerdo) e de Inferência Bayesiana (lado direito) do gênero <i>Ageneiosus</i> geradas com as sequencias nucleotídicas de COI.....	37
--	----

Figura 4 – Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (lado esquerdo) e de Inferência Bayesiana (lado direito) do gênero <i>Ageneiosus</i> geradas com as sequencias nucleotídicas de ATPase.....	38
---	----

Figura 5 – Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (lado esquerdo) e de Inferência Bayesiana (lado direito) do gênero <i>Ageneiosus</i> gerada com os marcadores moleculares COI e ATPase concatenados.....	39
--	----

Figura 6 – Árvore de Inferência Bayesiana com marcador ATPase em detalhe do ramo contendo as espécies: <i>A. sp. n. “anal curta”</i> , <i>A. dentatus</i> , <i>A. ucayalensis</i> , <i>A. uranophthalmus</i> , <i>A. sp. n. “projetada”</i> e <i>A. vittatus</i>	42
---	----

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Aspectos gerais

Os Siluriformes, popularmente conhecido como bagres, compõem uma das mais diversas ordens dentre os Ostariophysi e estão amplamente distribuídos, ocorrendo nas águas marinhas e continentais. A ordem é composta por 36 famílias, 477 gêneros e 3.088 espécies distribuídas pelo mundo (Ferraris, 2007). Na região Neotropical, os Siluriformes estão representados por 15 famílias e 1.650 espécies válidas, e estima-se que existam mais de 600 espécies ainda não descritas (Reis *et al.*, 2003).

Dentro desta ordem, a família Auchenipteridae apresenta uma distribuição restrita aos rios da América do Sul e Panamá, possui 20 gêneros e 94 espécies válidas (Ferraris, 2007). Esta compreende espécies de peixes de pequeno a médio porte (Ferraris, 2003) e algumas espécies de grande porte que realizam migrações reprodutivas (Goulding, 1980) e tem importância comercial (Barthem e Goulding, 1997).

O gênero *Ageneiosus* ocorre por toda a região Neotropical. Entre as espécies, *Ageneiosus inermis* é a mais amplamente distribuída nos rios da América do Sul, e é a espécie que atinge maior tamanho entre os auchenipterídeos (cerca de 50 cm - Ribeiro, 2011). A maioria das espécies do gênero *Ageneiosus* se distribui na bacia do rio Amazonas, mas há espécies como *A. millitaris* e *A. ucayalensis* que ocorrem na bacia dos rios Paraná-Paraguai (Júnior *et al.*, 2009) e *A. pardalis*, é a única espécie trans-Andina do gênero.

1.2. Histórico do gênero *Ageneiosus*

La Cépède (1803) propôs o gênero *Ageneiosus*, Eigenmann e Eigenmann (1890), revisando os Nematognathi da América do Sul, reconheceram onze espécies válidas para *Ageneiosus* dentro da família Siluridae. O gênero foi considerado pertencente à família Doradidae no trabalho de Regan (1911) e, mais tarde, no trabalho de Jordan (1923), enquanto que Miranda-Ribeiro (1911) considerou *Ageneiosus* no nível de família, Ageneiosidae. Eigenmann em 1912, propôs o gênero *Tympanopleura* para alocar a espécie *T. piperatae* e outras duas espécies *T. alta* e *T. nigricollis* dentro de Siluridae.

Britski (1972), estudando Auchenipteridae e Ageneiosidae, propôs que Auchenipteridae fosse subdividida em 4 sub-famílias e que a família Ageneiosidae fosse retirada. As espécies de Ageneiosidae, então, foram transferidas para os gêneros *Ageneiosus* e

Tetranematicthys. O autor considerou também o gênero *Tympanopleura* como sinônimo de *Ageneiosus*, aumentando para mais de 33 as espécies reconhecidas para o gênero. Ferraris (1988) estudou as relações dos gêneros da família Auchenipteridae e lançou a hipótese de que os gêneros *Ageneiosus* e *Tetranematicthys* estariam dentro da família Auchenipteridae. No ano seguinte, Curran (1989) também estudou a família Auchenipteridae porém não incluiu em seus estudos os gêneros *Ageneiosus* e *Tetranematicthys*. Portanto, o estudo de Ferraris foi considerado o mais bem fundamentado.

Em 1990, Walsh em sua tese, realizou a segunda revisão de *Ageneiosus* e considerou os gêneros *Ageneiosus* e *Tetranematicthys* ainda como grupo válido dentro de Ageneiosidae, e Auchenipteridae como família distinta. Neste estudo, o autor reconheceu 10 espécies válidas (*A. brevis*, *A. piperatus*, *A. atronatus*, *A. pardalis*, *A. vittatus*, *A. valenciennesi*, *A. ucayalensis*, *A. polystictus*, *A. brevifilis* e *A. marmoratus*) e uma não descrita. Em 1993, de Pinna, estudando as famílias Doradidae e Auchenipteridae, considerou *Ageneiosus* e *Tetranematicthys* como parte da família Auchenipteridae corroborando a hipótese de Ferraris (1988). Os trabalhos filogenéticos subsequentes também demonstraram que *Ageneiosus* está dentro da família Auchenipteridae tanto em análises com caracteres morfológicos (Diogo 2003; Akama 2004; Birindelli, 2014) como com dados moleculares (Sullivan et al., 2006; Arce et al., 2013).

A terceira revisão do gênero, feita por Ribeiro (2011) com base em caracteres morfológicos, corroborou a monofilia do gênero *Ageneiosus*, considerando 19 espécies, das quais 13 espécies de *Ageneiosus* válidas (*A. atronatus*, *A. brevis*, *A. dentatus*, *A. inermis*, *A. magoi*, *A. militaris*, *A. pardalis*, *A. piperatus*, *A. polystictus*, *A. rondoni*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. vittatus*) e seis não descritas formalmente (*Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. aff. atronatus*, *A. aff. brevis*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. sp. n. “Teles Pires”* e *A. sp. n. “Walsh”*). Ainda dentro de *Ageneiosus*, o autor observou dois clados bem distintos e nomeou informalmente de “clado *Ageneiosus*” (*Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. inermis*, *A. magoi*, *A. militaris*, *A. pardalis*, *A. vittatus*, *A. polystictus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. sp. n. “Teles Pires”*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. sp. n. “Walsh”*) e “clado *Tympanopleura*” (*A. atronatus*, *A. aff. atronatus*, *A. brevis*, *A. aff. brevis*, *A. rondoni* e *A. piperatus*).

1.3. Biologia

Uma característica marcante na família é a presença de dimorfismo sexual em machos sexualmente maduros tais como: o barbilhão maxilar mais longo, desenvolvendo fileiras de espinhos, acúleo na nadadeira dorsal ossificado, e desenvolvimento de um órgão intromitente para inseminação interna (Ferraris, 1988; de Pinna 1993; Rapp Py-Daniel e Cox-Fernandes, 2005).

De acordo com Smith (1981) *Ageneiosus ucayalensis* realiza migrações reprodutivas na bacia Amazônica, entretanto, *A. inermis* não apresenta comportamento migrador comparado com outras espécies da sua família, mesmo tendo uma distribuição ampla (Rapp Py-Daniel, com. pess.). Estes peixes vivem no fundo dos rios e os juvenis nas calhas dos rios principais (Britski, 1972; Walsh 1990;), tem hábito noturno e alimentam-se de microcrustáceos e peixes (Fréry *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 2004; Sá-Oliveira, 2014). Algumas espécies de *Ageneiosus* são fonte de subsistência, apresentando potencial econômico e de fonte de proteínas para populações ribeirinhas (MPA/MMA, 2011; Batista *et al.*, 2012).

1.4. Marcadores moleculares mitocondriais

Embora estejam disponíveis muitos trabalhos de revisão taxonômica, no momento existe apenas dois trabalhos com o uso de dados moleculares em Doradoidea, mais especificamente membros da família Doradidae (Arceet *et al.*, 2013; Moyer *et al.*, 2004) e nenhum estudo específico para a família Auchenipteridae ou *Ageneiosus*.

Dados moleculares são ferramentas muito utilizadas para trabalhos que incluem a taxonomia, filogenia e filogeografia para responder questões relacionadas à conservação, distribuição e história natural de grupos taxonômicos. A molécula fundamental é o DNA (ácido desoxirribonucleico), conhecida como a molécula da hereditariedade em todos os organismos (Stryer, 1988) por ser o reservatório de informações genéticas, e ocupa uma posição central entre as macromoléculas biológicas (Lehninger *et al.*, 1995). O fragmento de DNA mais utilizado é o DNA mitocondrial (DNAmt) encontrado nas células somáticas do organismo, mais precisamente nas mitocôndrias, e é largamente utilizado (Avise, 1994).

(Função do genoma mitocondrial) Estudos realizados com o genoma mitocondrial de peixes têm mostrado que este é constituído por cerca de 17.000 pares de bases (pb), sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades

I, II e III do citocromo *c* oxidase, as subunidades 6 e 8 da ATP sintetase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH (Meyer, 1993; Garesse *et al.*, 1997; Miya *et al.*, 2003; Ballard e Withlock, 2004). Entre os Siluriformes, análises do DNA mitocondrial explicaram a monofilia de Doradidae e Astrodoradinae utilizando os genes 12s e 16s (Moyer *et al.*, 2004) e a relação filogenética da família Ictaluridae com o citocromo *b* (Hardman, 2005), bem como na resolução ou na identificação de grupos com conflitos taxonômicos (Martin e Bermingham, 2000).

O DNA mitocondrial é geneticamente mais eficiente do que o DNA nuclear (Attardi, 1985; Gray, 1989), pois esta organela possui um genoma próprio, composto por uma única molécula circular e com o tamanho variando entre 15 a 20 kilobases (KB), quando se considera que não contem seqüências duplicadas, não possui íntrons e os genes são geralmente separados por menos do que 10 pares de bases (Wolstenholme e Clary, 1985). O DNA mitocondrial é um eficiente marcador molecular para análises intra e inter-específicas, podendo ter aplicações em diversos tipos de estudos, tais como em biogeografia histórica (Eberhard e Bermingham, 2005), análises de zonas de hibridação, estimativas do grau de variabilidade genética (Ward e Holmes, 2007), caracterização de estrutura populacional, relações filogenéticas (Bromhaam *et al.*, 2002) e estudos de conservação genética (Bickford *et al.*, 2007; Ardura *et al.*, 2010).

O gene citocromo *c* oxidase subunidade I é o gene que ajuda a diferenciar as espécies e tem sido utilizado como DNA *barcode* (ou código de barras de DNA). Este gene foi escolhido pelo seu papel central no metabolismo e, portanto, sua presença em quase todos os eucariontes; por apresentar maior taxa evolutiva comparada aos genes codificados pelo núcleo; e, finalmente, por ser mais adequado para discriminar táxons estreitamente relacionados (Hebert *et al.* 2003). Desta forma, o DNA *barcode* é um gene que pode ser uma ferramenta padronizada e única para identificação de espécies, servindo tanto na identificação de espécies já descritas como também inferência descoberta de espécies novas.

O gene ATP sintetase (ATPase) de subunidades 6 e 8 é responsável pela codificação de uma enzima que hidroliza o ATP e funciona como um transportador de energia em todas as atividades básicas das células que requerem energia. Estes genes são conservados em relação a outros genes mitocondriais, por isso são ferramentas utilizadas para determinar relações filogenéticas, filogeografia (Habibet *al.*, 2012; Borba *et al.*, 2013) e também estimar divergências intra-específicas (Frederico *et al.*, 2012).

A possibilidade de obtenção de uma quantidade relativamente grande de dados em um tempo relativamente curto tem estimulado muitos pesquisadores a incluir em seus projetos de estudo análises de sequências de DNA. Assim, por exemplo, no conjunto de trabalhos publicados pode-se observar o amplo e versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos, variando de populações locais até grandes grupos taxonômicos.

2. OBJETIVO GERAL

Delimitar as espécies do gênero *Ageneiosus* e sua relação filogenética utilizando os marcadores mitocondriais do Citocromo Oxidase da subunidade I (COI) e ATP sintetase (ATPase).

2.1. Objetivos específicos

- Identificar as espécies de *Ageneiosus* amostradas com o uso do citocromo oxidase;
- Avaliar a existência de espécies crípticas e/ou polimórficas do gênero *Ageneiosus* e comparar com as informações disponíveis;
- Criar um banco de dados de *Ageneiosus* através das sequências do código de barras de DNA (COI) relacionadas aos *vouchers* depositados nas Coleções Ictiológicas do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e na Coleção Genética da UNIR (Fundação Universidade Federal de Rondônia);
- Estabelecer o posicionamento filogenético das espécies do gênero *Ageneiosus*;
- Avaliar possível existência dos clados *Ageneiosus* e *Tympanopleura* dentro do gênero;

Assim, esta dissertação foi dividida em dois capítulos visando melhor o entendimento dos objetivos propostos. O primeiro capítulo tem o propósito de delimitar e identificar as espécies do gênero *Ageneiosus* e no segundo capítulo de elucidar o posicionamento filogenético das espécies dentro do gênero.

Hashimoto, S., Rapp Py-Daniel, L.H.& Batista, J.S. Delimitação molecular das espécies do gênero *Ageneiosus* (Siluriformes: Auchenipteridae) com o uso do DNA *barcoding**

* Manuscrito em preparação para revista *Plos One*.

RESUMO

Introdução: DNA *barcode* é uma ferramenta muito utilizada em trabalhos de sistemática para determinar certos grupos taxonômicos, identificar espécies crípticas e avaliar a existência de espécies crípticas ou polimórficas.

Metodologia: Foram gerados no total 210 sequências das 18 espécies de *Ageneiosus*, ao longo da distribuição das espécies na América do Sul utilizando o modelo de evolução molecular Kimura-2-parâmetros (K2P), a árvore de *Neighbour-Joining* com suporte de *bootstrap* de 10.000 réplicas e foi utilizado como grupo externo as espécies *Auchenipterichthys punctatus* e *A. longimanus*.

Conclusão: A partir de identificações taxonômicas preliminares, a análise molecular possibilitou delimitar as espécies do gênero *Ageneiosus* com mais precisão: *Ageneiosus* sp. teve relação intraespecífica com *A. inermis*; *A. aff. atronatus* com *A. atronatus*; *A. brevis* com *A. rondoni* e *A. aff. vittatus* com *A. sp. n. "Walsh"*; e distinguir *A. polystictus* de *A. inermis*. As espécies *A. sp. n. "anal curta"*, *A. ucayalensis*, *A. dentatus*, *A. uranophthalmus*, *A. vittatus* e *A. sp. n. "projetada"* formaram um complexo de espécies.

INTRODUÇÃO

A ordem Siluriformes compreende uma grande diversidade de peixes sem escamas, conhecidos como bagres, e é amplamente distribuída ocupando desde águas marinhas a continentais. Dentro desta ordem, a família Auchenipteridae apresenta uma distribuição por toda a região Neotropical. Dentro dessa família, o gênero *Ageneiosus* se destaca por estar distribuído aos rios da América do Sul e Panamá e ocupar diferentes habitats (Nelson, 2006; Ferraris, 2007).

Uma característica marcante na família é a presença de dimorfismo sexual em machos sexualmente maduros na forma de modificações no barbilhão maxilar, espinho da nadadeira dorsal, e até desenvolvimento de um órgão intromitente para inseminação interna (Ferraris, 1988; de Pinna 1998; Rapp Py-Daniel e Cox, 2005; Ribeiro, 2011). A família também tem representantes de interesse comercial *ie. Ageneiosus inermis* conhecida popularmente como mandubé, a qual atinge o maior tamanho dentro do gênero e é fonte de subsistência e de proteínas para populações ribeirinhas (Ribeiro, 2011) e apresentando potencial econômico em desembarques pesqueiros (MPA/MMA, 2011).

Existiram três revisões taxonômicas para o gênero, a primeira foi realizada por Eigenmann e Eigenmann (1890), e incluiu na época onze espécies de *Ageneiosus* válidas (*A. armatus*, *A. atronatus*, *A. axillaris*, *A. caucanus*, *A. brevifilis*, *A. brevis*, *A. dawalla*, *A. dentatus*, *A. porphyreus*, *A. ucayalensis* e *A. valenciennesi*). Na segunda revisão, realizada por Walsh (1990), foram consideradas válidas 10 espécies (*A. brevis*, *A. piperatus*, *A. atronatus*, *A. pardalis*, *A. vittatus*, *A. valenciennesi*, *A. ucayalensis*, *A. polystictus*, *A. brevifilis* e *A. marmoratus*).

Na mais recente revisão de Ribeiro (2011), foram consideradas 19 espécies, das quais considera 10 espécies válidas de Ferraris (2007) (*Ageneiosus atronatus*, *A. brevis*, *A. inermis*, *A. magoi*, *A. militaris*, *A. pardalis*, *A. piperatus*, *A. polystictus*, *A. ucayalensis*, *A. vittatus*). O autor revalida *A. rondoni* de *A. brevis*, *A. dentatus* de *A. ucayalensis*, e sinonimiza *A. marmoratus* em *A. inermis*. Ainda reconhece seis espécies não descritas formalmente (*A. sp. n.* “gr. atronatus”, *A. sp. n.* “anal curta”, *A. sp. n.* “gr. brevis”, *A. sp. n.* “projetada”, *A. sp. n.* “Teles Pires” e *A. sp. n.* “Walsh”) e a descrição de *A. uranophthalmus* (Ribeiro e Rapp Py-Daniel, 2010). Assim, *Ageneiosus* é, até o momento, o gênero mais rico em espécies da família Auchenipteridae.

Diferentemente dos trabalhos de revisão taxonômica do gênero, trabalhos com uso de marcadores moleculares podem ser mais abrangentes, a nível de ordem (Sullivan *et al.*, 2006), superfamílias ou famílias específicas como Ariidae (Betancur e Armbruster, 2009), Pimelodoidea (Sullivan e John, 2013), Doradidae (Arce *et al.*, 2013) e Heteropneustidae (Ratmuangkhwang *et al.*, 2014). No entanto, não existe nenhum estudo com abordagem molecular a nível da família Auchenipteridae ou do gênero *Ageneiosus*.

Marcadores moleculares são ferramentas muito utilizadas para trabalhos de sistemática para determinar certos grupos taxonômicos, como citado acima. O DNA mitocondrial é um eficiente marcador molecular para análises intra e interespecíficas, pois apresenta maior taxa evolutiva comparada com outros genes nucleares e por ser mais adequado para discriminar táxons estreitamente relacionados. O gene citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) é o gene mitocondrial que ajuda a diferenciar as espécies, e tem sido utilizado como DNA *barcode* (ou código de barras de DNA) (Hebert *et al.* 2003a).

Estudos mostram que o DNA *barcode* pode detectar muitas espécies crípticas e apontar novas espécies (Hebert *et al.*, 2004; Jörger *et al.*, 2012) através de um banco de sequências

genéticas como o BOLD (*Barcode of Life Data System*) em larga escala facilitando o acesso à informação taxonômica (Hebert *et al.*, 2003b). Essa avaliação rápida da biodiversidade possibilita a criação de estratégias para a conservação de espécies (De Salle e Amato, 2004). Com o diagnóstico das 19 espécies previstas no gênero *Ageneiosus*, o DNA *barcode* pode ser útil para ajudar a diferenciar essas espécies, validar as espécies ainda não descritas e encontrar espécies crípticas e/ou polimórficas.

O objetivo deste trabalho foi delimitar as espécies do gênero *Ageneiosus* utilizando marcador molecular mitocondrial do Citocromo oxidase da subunidade I (COI), identificar as espécies de *Ageneiosus* amostradas e avaliar a existência de espécies crípticas e/ou polimórficas do gênero *Ageneiosus* para comparar as informações de identificação taxonômica existente.

MATERIAL E MÉTODOS

Material de estudo

Este trabalho contou com informações disponíveis em coleções ictiológicas e possibilitou a criação de um banco de dados de *Ageneiosus* através das sequências do código de barras de DNA (COI) relacionadas aos *vouchers* depositados nas Coleções Ictiológicas e de Recursos Genéticos do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e da UNIR (Fundação Universidade Federal de Rondônia). Também foram examinados exemplares provenientes do LTBM (Laboratório Temático de Biologia Molecular) do INPA, ANSP (Academy of Natural Sciences, Philadelphia) e ROM (Royal Ontario Museum) ao longo da distribuição do gênero comparando com a identificação do material da coleção do INPA (figura 1). *Auchenipterichthys punctatus* e *A. longimanus* foram utilizadas como grupo externo.

Foram obtidas 210 sequências nucleotídicas, identificadas como 18 espécies de *Ageneiosus*: *A. atronasus* (n= 10), *A. aff. atronasus* (n= 1), *A. sp. n. “anal curta”* (n= 1), *A. brevis* (n= 10), *A. aff. brevis* (n= 4), *A. dentatus* (n= 10), *A. inermis* (n=51), *A. militaris* (n= 1), *A. piperatus* (n= 6), *A. polystictus* (n= 7), *A. sp. n. “projetada”* (n= 9), *A. rondoni* (n= 2), *Ageneiosus sp.* (n= 32), *A. ucayalensis* (n=18), *A. uranophthalmus* (n= 11), *A. vittatus* (n= 4), *A. sp. n. vittatus* (n= 9) e *A. sp. n. “Walsh”* (n= 24). Foi incluída uma sequência de *A. inermis* do GenBank (FJ418755) (Ardura *et al.*, 2010) e para o grupo externo foram obtidas 4

sequências: *Auchenipterichthys punctatus*(n=2) e *A. longimanus* (n=2). Todos esses exemplares e local de coleta estão descritas na figura 1 e mais detalhadamente no anexo 1.



Figura 1 – Mapa das 18 espécies examinadas: A – *A. atronasus*; B – *A. brevis*; C – *A. dentatus*; D – *A. inermis*; E – *A. militaris*; F – *A. piperatus*; G – *A. polystictus*; H – *A. rondoni*; I – *Ageneiosus* sp. J – *A. sp. n. “anal curta”* K – *A. aff. atronasus*; L – *A. aff. brevis*; M – *A. sp. n. “projetada”*; N – *A. sp. n. vittatus*; O – *A. sp. n. “Walsh”*; P – *A. ucayalensis*; Q – *A. uranophthalmus*; R – *A. vittatus*

Extração, amplificação e sequenciamento do DNA Genômico

O material genético de cada indivíduo foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Sambrook e Russell, 2001). O fragmento de DNA foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase utilizando os mesmos *primers* de Ivanova *et al.*, 2007. O volume final da reação foi de 15 µL, utilizando 1 µL de 10 a 50 ng de DNA total; 1,5 µL de Tampão 10x; 1,2 µL de MgCl₂ a 25mM; 2,5 µL dNTP a 1mM; 0,3 µL de cada *primer* a 5uM; 0,2µL de *Taq* DNA Polimerase a 5U/µL; e água milli-Q para completar o volume da reação. Em seguida,

essa composição foi submetida a amplificação em um termociclador durante 35 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% e corado com GelRed (Biotium), visualizado e fotografado no fotodocumentador.

Após checagem da amplificação, o produto de PCR foi purificado pelo método tradicional de precipitação em etanol com Polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20% (Paithankar e Prasad, 1991) que tem como objetivo eliminar os reagentes não incorporados da amplificação.

A reação de sequenciamento de DNA foi utilizado BigDye™ v.3.1 para inserir fluorescência através do método de Platt *et al.* (2007). Posteriormente, a reação foi precipitada pelo método etanol/isopropanol para retirada de produto não incorporado e ressuspensão em formamida para então ser eletro-injetada no analisador de DNA ABI 3130 xL (*Applied Biosystems*) para obter as sequências de DNA.

Análises das sequências nucleotídicas

A edição, conferência, compilação e alinhamento múltiplo das sequências geradas no sequenciador foram realizadas com o auxílio do programa: Geneious V. R6 (Biomatters), disponível em <http://www.geneious.com/>. Os alinhamentos múltiplos das sequências foram feitos utilizando o ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) no próprio programa. As sequências geradas foram comparadas com as sequências depositadas no Genbank (*National Center for Biotechnology Information*) através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997), e depois de serem alinhadas, elas foram traduzidas em aminoácidos para verificar um possível códon de parada.

A composição nucleotídica e a média das distâncias intra e interespecíficas das espécies do gênero foram calculadas com auxílio do programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) usando o modelo de evolução molecular Kimura-2-parâmetros (K2P) com o qual também foi verificada a divergência genética entre as sequências de DNA. Foi também estimada uma árvore de *Neighbour-Joining* (Saitou e Nei, 1987) com suporte de *bootstrap* de 10.000 réplicas (Felsenstein, 1985). Para análises de relacionamento foi utilizado como grupo externo representantes do gênero *Auchenipterichthys* (*A. punctatus* e *A. longimanus*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências de DNA geradas continham 620 pares de bases, destas apresentam 286 sítios de mutações e 194 sítios polimórficos. Não apresentaram inserções e/ou deleções, foram traduzidas em aminoácidos e todas elas não apresentaram códon de parada. A composição média das bases nitrogenadas de adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) do gene foi de 26%, 27,5%, 27,7% e 18,9%, respectivamente.

Segundo Ward (2009), é possível discriminar as espécies de peixes através dos valores de distância intra e interespecífica. Para a variação intraespecífica, a distância genética seria representada por valores $\leq 3\%$ e interespecífica por valores $\geq 3\%$. A variação intraespecífica em *Ageneiosus* variou de 0,00 % em *Ageneiosus polystictus* a 1,35% em *Ageneiosus aff. brevis*. (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de variação a posteriori da distância genética intra e interespecífica das espécies de *Ageneiosus*.

	Intra	Interespecífica																
Espécies	D /SD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>A. sp. n. "Walsh"</i>	0,32 ± 0,09																	
2 <i>A. inermis</i>	0,50 ± 0,13	12,60																
3 <i>A. polystictus</i>	0,00 ± 0,00	13,38	5,74															
4 <i>A. atronasus</i>	0,93 ± 0,23	13,79	10,75	11,82														
5 <i>A. sp. n. "piperatus"</i>	-	16,03	11,14	11,45	10,68													
6 <i>A. ucayalensis</i>	0,71 ± 0,15	13,12	8,91	11,86	10,93	12,35												
7 <i>A. uranophthalmus</i>	0,77 ± 0,24	13,34	9,30	12,05	11,03	12,25	0,89											
8 <i>A. dentatus</i>	0,29 ± 0,12	12,89	8,85	11,95	11,01	12,15	0,53	0,75										
9 <i>A. vittatus</i>	0,89 ± 0,30	13,17	9,21	11,83	10,67	12,20	0,82	0,81	0,75									
10 <i>A. sp. n. "projetada"</i>	0,74 ± 0,25	12,66	9,15	11,85	10,61	12,19	0,77	1,02	0,63	0,87								
11 <i>A. sp. n. "anal curta"</i>	-	13,30	8,39	11,44	10,62	11,81	0,88	1,12	0,76	1,07	1,11							
12 <i>A. rondoni</i>	0,17 ± 0,07	12,88	8,94	10,69	11,29	13,30	9,22	9,64	8,86	9,51	9,11	9,27						
13 <i>A. sp. n. "brevis"</i>	1,35 ± 0,39	12,51	10,94	11,24	11,62	13,92	9,52	9,92	9,41	9,66	9,51	9,43	8,94					
14 <i>A. piperatus</i>	0,00 ± 0,00	15,89	12,17	13,06	13,83	13,61	11,95	12,50	11,96	12,29	12,04	12,04	9,86	12,07				
15 <i>A. brevis</i>	0,53 ± 0,30	18,92	12,76	12,06	13,58	14,16	10,90	10,98	10,88	11,00	11,22	10,88	13,66	13,63	12,74			
16 <i>A. militaris</i>	-	13,80	12,13	10,42	11,23	12,53	9,22	9,54	9,13	9,39	9,26	9,16	12,50	11,94	12,83	12,29		
17 <i>A. sp. n. "atronasus"</i>	0,00 ± 0,00	14,68	11,49	11,14	11,94	11,86	11,26	11,32	11,20	11,25	11,41	11,23	11,14	12,18	13,37	12,35	11,03	

Os valores de variação interespecífica variaram de 0,53% a 18,92%. As espécies que apresentaram valores abaixo do esperado estão em vermelho na tabela 1. Estas espécies foram: *A. uranophthalmus* e *A. ucayalensis* (0,89%); *A. dentatus* e *A. ucayalensis* (0,53%); *A. vittatus* e *A. ucayalensis* (0,82%); *A. sp. n. “projetada”* e *A. ucayalensis* (0,77%); *A. sp. n. “anal curta”* e *A. ucayalensis* (0,88%); *A. dentatus* e *A. uranophthalmus* (0,75%); *A. vittatus* e *A. uranophthalmus* (0,81%); *A. sp. n. “projetada”* e *A. uranophthalmus* (1,02%); *A. sp. n. “anal curta”* e *A. uranophthalmus* (1,12%); *A. vittatus* e *A. dentatus* (0,75%); *A. sp. n. “projetada”* e *A. dentatus* (0,63%); *A. sp. n. “anal curta”* e *A. dentatus* (0,76%); *A. sp. n. “projetada”* e *A. vittatus* (0,87%); *A. sp. n. “anal curta”* e *A. vittatus* (1,07%); *A. sp. n. “anal curta”* e *A. sp. n. “projetada”* (1,11%).

Foi construída uma árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) com base na distância de K2P (figura 1). Dentro dessa árvore, foram reconhecidos oito agrupamentos com ramos bem suportados: grupo 1 (*Ageneiosus inermis*); grupo 2 (*A. polystictus*); grupo 3 (*A. sp. n. “anal curta”*, *A. dentatus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. vittatus*); grupo 4 (*A. atronasus*); grupo 5 (*A. aff. brevis*); grupo 6 (*A. piperatus*); grupo 7 (*A. rondoni*) e grupo 8 (*A. sp. n. “Walsh”*).

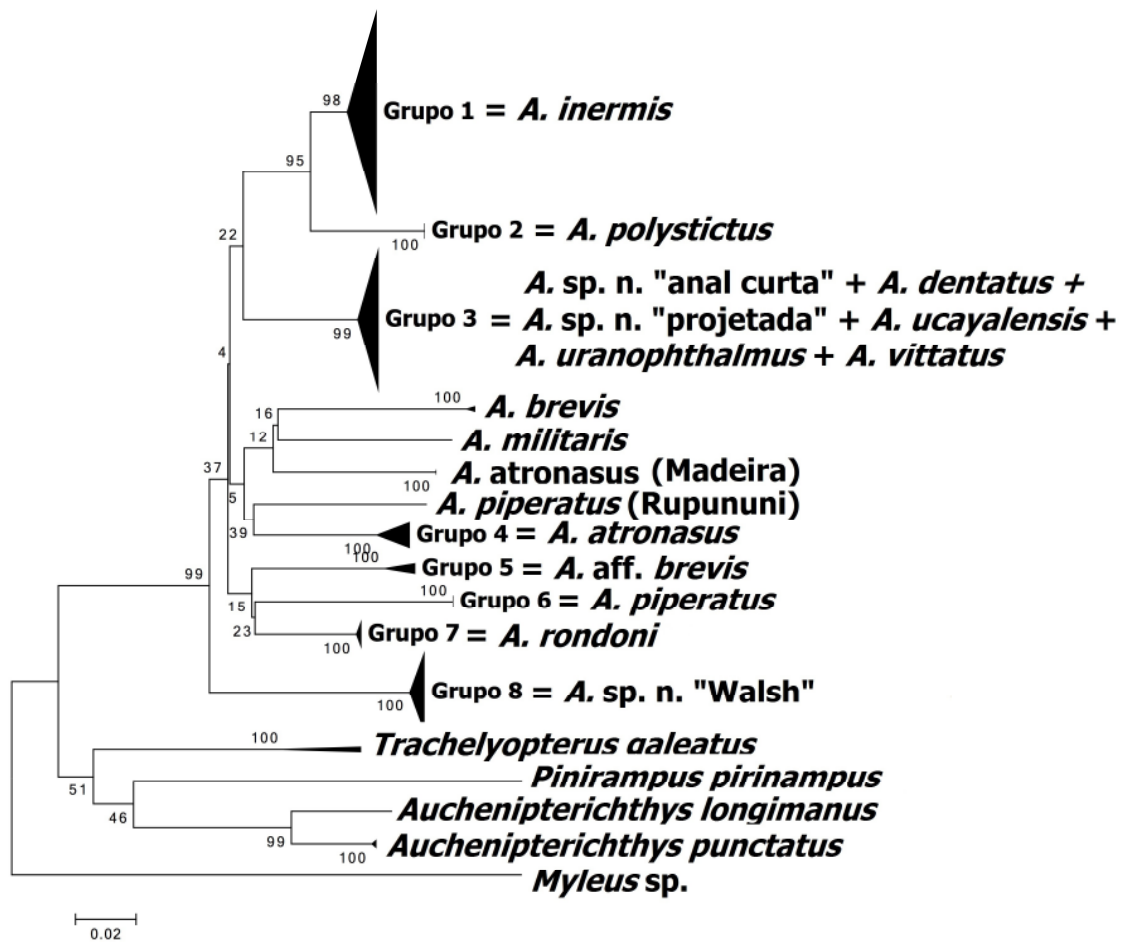


Figura 2 – Visão geral da árvore de agrupamento de vizinhos construída com 210 exemplares distribuídos em 18 espécies de *Ageneiosus*.

O grupo 1 representa exemplares da espécie *Ageneiosus inermis*, exceto 2 exemplares do Tapajós (18774 e 17687). Neste grupo foi observada a presença de dois exemplares de *A. polystictus* (23049 e 19635). Dentro do grupo 1, devido ao alto valor de suporte dos ramos (98), os exemplares identificados provisoriamente como *Ageneiosus* sp. estão sendo considerados como *A. inermis*. No grupo 2, observa-se que as amostras representam a espécie *A. polystictus* com valor de suporte de 100 exceto um exemplar identificado como *A. inermis* (100806), (figura 2). A espécie de *A. polystictus* pode ser confundida com juvenis de *Ageneiosus inermis* vice-versa, pois são muito pigmentados, exibindo grandes manchas escuras sobre todo o corpo e nas nadadeiras (Ribeiro com. pess.). Portanto, através do DNA *barcode* foi possível identificar corretamente as espécies *Ageneiosus inermis* e *A. polystictus*.

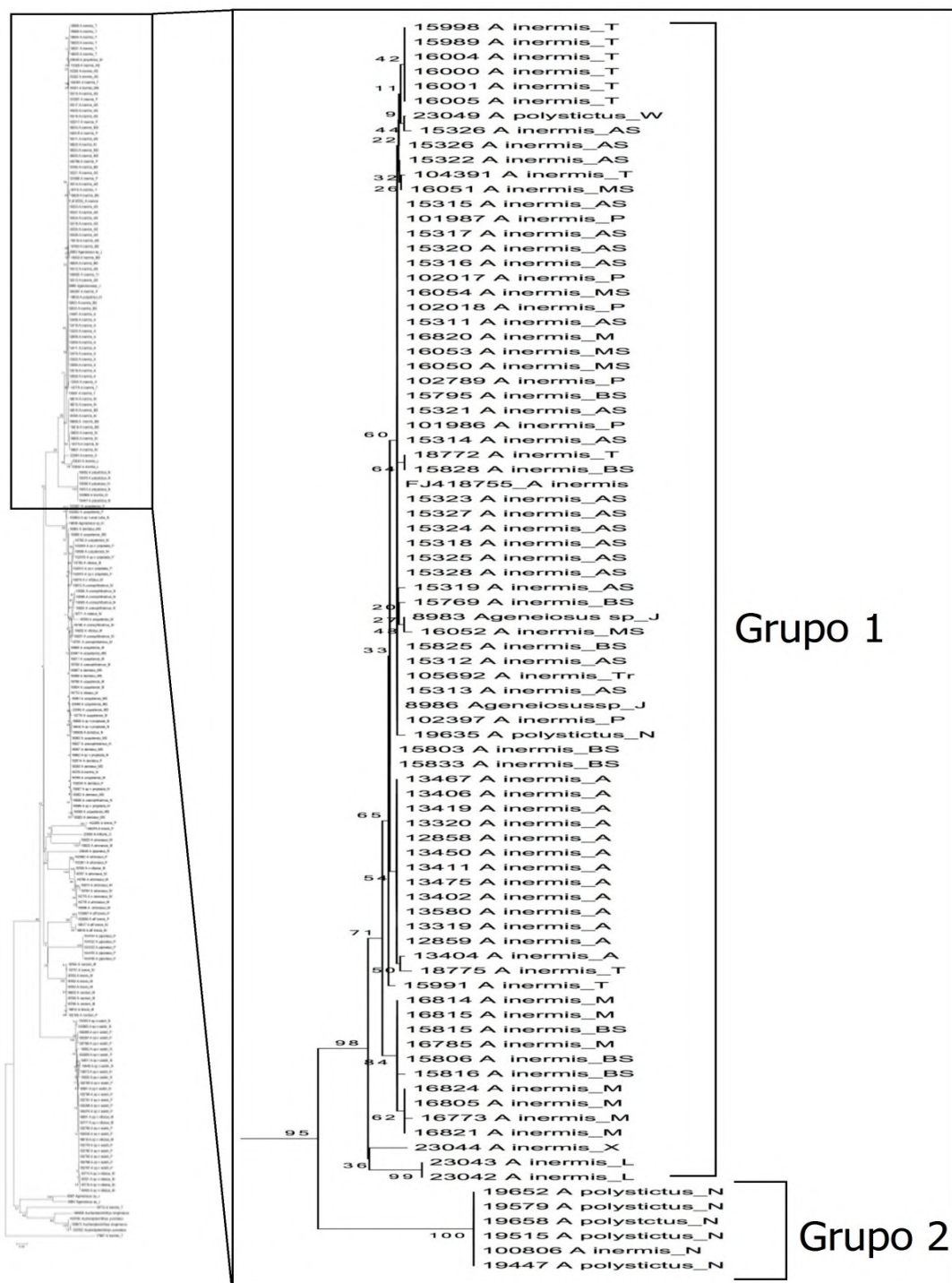


Figura 3 – Lado esquerdo, árvore de agrupamento de vizinhos e lado direito destacando o grupo 1 *Ageneiosus inermis* e grupo 2 *Ageneiosus polystictus* com as respectivas localidades: T- rio Tapajós; W – rio Waini, AS – Alto Solimões; MS – Médio Solimões; P – rio Purus; M – rio Madeira; BS – Baixo Solimões; J – rio Juruá; Tr – rio Trombetas; A – rio Araguaia; X – rio Xingu; L – rio Litaine; N – rio Negro.

O grupo 3 apresentaseis espécies de *Ageneiosus* (*A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. dentatus*, *A. vittatus*, *Ageneiosus* sp. n. “projetada” e *A. sp. n. “anal curta”*) demonstrando que não há um valor de suporte alto nos ramos que separe distintamente essas espécies (figura 3). Isso é observado também nos valores baixos de variação interespecífica (variação entre essas espécies foi de 0,53% a 1,12%). Ainda no grupo 3 apresenta 2 exemplares *Ageneiosus* sp. (19036) e *A. inermis* (16376). No restante dos ramos, *A. brevis*(102279 e 102280) do rio Purus, *A. militaris* do rio Uruguai (23050) e dois exemplares de *A. atronatus*(16822 e 16823) ficaram separados.

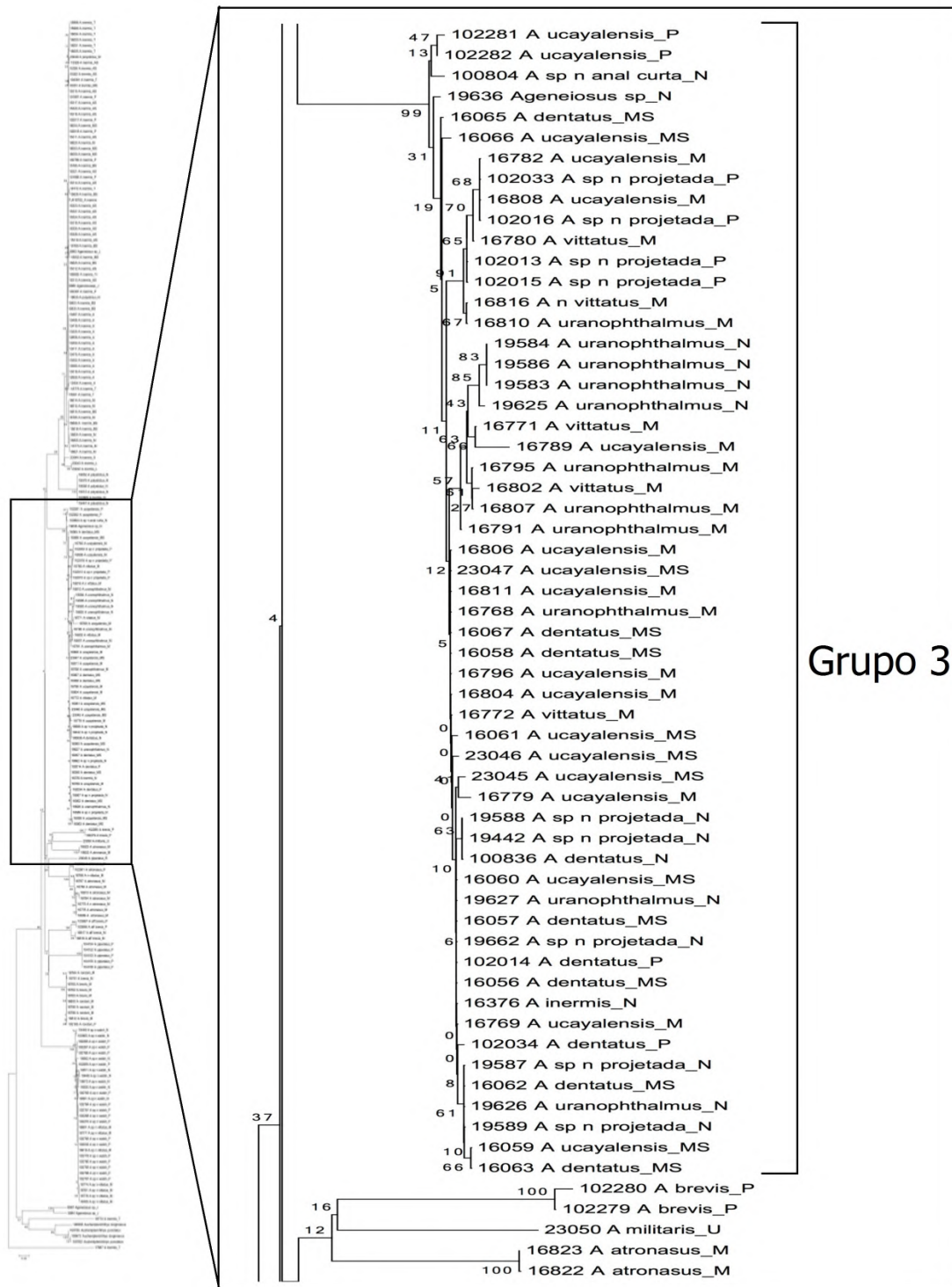


Figura 4– Lado esquerdo, árvore de agrupamento de vizinhos elado direito destacando o grupo 3 que representa seis espécies: *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. vittatus* com as respectivas localidades: P – rio Purus; N – rio Negro ; MS – Médio Solimões; M – rio Madeira; U- rio Uruguai;

O grupo 4 representa a maioria dos exemplares de *A. atronasus*, houve separação por drenagem do rio Purus com o rio Madeira. A localidade do rio Purus o suporte no ramo de 99 mostrando-se distinta do rio Madeira com suporte de 92. Dois exemplares identificados como *A. atronasus* provenientes do rio Madeira (16822 e 16823) não se agruparam dentro da espécie. Ainda dentro do grupo 4, o exemplar 16766 foi identificado erroneamente e a amostra 16775 identificado como espécie nova dentro do grupo *A. atronasus*, porém não representa uma espécie nova (figura 4).

Na árvore, o grupo 5 representa *Ageneiosus* aff. *brevis* com valores de suporte alto nos ramos, e ainda, apresenta distinção geográfica entre os amostrados nos rios Madeira com 95 (amostras 16818 e 16817) e Purus com 99 (103996 e 103997). O grupo 6 representa a espécie *A. piperatus* com suporte do ramo bem suportado (100), exceto 1 exemplar (23048) do rio Rupununi de localidade distante, esta se agrupou com *A. atronasus*.

O grupo 7 representa a espécie *A. rondoni*, com a identificação a priori foi observado um valor de variação intraespecífica maior que 3% em *A. brevis*, e de variação interespecífica baixa entre *A. brevis* e *A. rondoni*. Com esse resultado, reavaliamos o exemplar e seus caracteres morfológicos através de fotos de voucher da UNIR (figura 5) e comparamos com o voucher do INPA (figura 6), e constatamos que o exemplar identificado como *A. brevis* na UNIR em questão foi identificado pelo INPA como *A. rondoni*, pelas pequenas pintas sobre os lados do corpo.

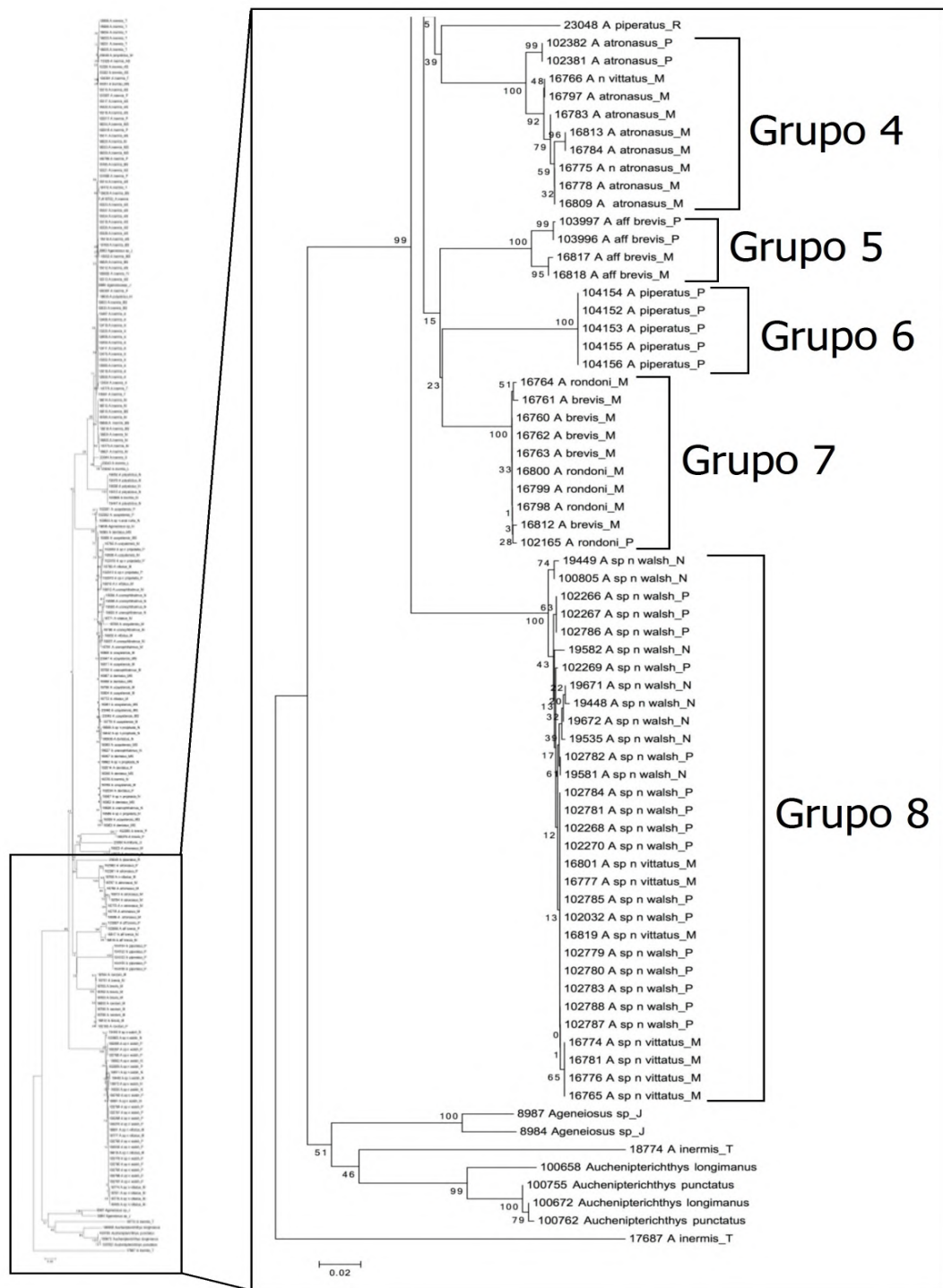


Figura 5 – Lado esquerdo, árvore de agrupamento de vizinhos e lado direito destacando o grupo 4 - *Ageneiosus atronatus*, grupo 5 - *A. aff. brevis*, grupo 6 - *A. piperatus*, grupo 7 - *A. rondoni* e grupo 8 - *A. sp. n. "Walsh"* com as respectivas localidades: R – rio Rupununi; P – rio Purus; M – rio Madeira; N – rio Negro; J- rio Juruá; T- rio Tapajós.



Figura 6 – Exemplar da UNIR (UFRO-I 016312), identificado como *Ageneiosus brevis*.



Figura 7 – Exemplar do INPA (INPA 41635), representando *Ageneiosus rondoni*.

O grupo 8 representa *Ageneiosus* sp. n. “Walsh” com suporte do ramo alto (100), dentro grupo observa-se 7 exemplares (16801, 16777, 16819, 16774, 16781, 16776 e 16765) identificados como *A. sp. n. vittatus*, com esta identificação *a priori* foi observado um valor de variação intraespecífica maior que 3% acima do esperado. Assim, o *voucher* de *Ageneiosus* sp. n. *vittatus* (figura 7) foi re-verificado e constatamos que este é na verdade *A. sp. n. “Walsh”* (figura 8) pela duas faixas escuras ao longo dos lados do tronco.



Figura 8 – Exemplar da UNIR (UFRO-I 007660), identificado como *Ageneiosus* sp. n. “vittatus”.



Figura 9 - Exemplar do INPA (INPA 41761), representando, *Ageneiosus* sp. n. “Walsh”.

Foi verificado as sequências nucleotídicas das espécimes que agruparam com o grupo externo com as sequências depositadas no BOLD (*Barcode of Life Data System*). Duas espécimes (8987 e 8984) mostraram similaridades de 95% e 98,71%, respectivamente com *Trachelyopterus galeatus*. Foi verificado posteriormente através das fotos que realmente são da espécie *Trachelyopterus galeatus*. A amostra 18774 mostrou similaridade de 96% com *Pinirampus pirinampu* e 17687 similaridade de 89% com *Myleus* sp.

Atualmente no banco do BOLD representa quatro espécies de *Ageneiosus* (*A. inermis*, *A. militaris*, *A. pardalis* e *A. ucayalensis*), considerando 10 espécies do gênero *Ageneiosus* válidos, o banco representa 40% do gênero, com este trabalho, acrescenta para o banco 80% do gênero no total, isso sem inclusão de possíveis espécies novas.

Para descobrimento de espécies crípticas, são levadas em consideração as características morfológicas idênticas e a taxa de variação intraespecífica acima de 3% (Bergsten *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2012). Não constatamos nenhuma espécie críptica, porém, presente estudo levou em consideração a variação intraespecífica como sinal de identificação errada, como foi mostrado em *Ageneiosus rondoni* e *A. sp. n. "Walsh"*.

No caso do grupo 3 (*Ageneiosus. sp. n. "anal curta"*, *A. ucayalensis*, *A. dentatus*, *A. uranophthalmus*, *A. vittatus* e *A. sp. n. "projetada"*), os taxons foram identificados corretamente, mostrando uma variação intraespecífica baixa. Entretanto, ao observar suas taxas interespecíficas, seus valores estão abaixo do 3% e essas espécies taxonomicamente apresentam variações morfológicas distintas mas apresentaram poucas diferenças moleculares. Neste caso, houve compartilhamento de haplótipos, pelo fato de o marcador ser de herança materna e pelas espécies ocorrerem na mesma área geográfica.

Ferraris (2007) considera a espécie *Ageneiosus rondoni* sinônimo de *A. brevis*, entretanto, as amostras identificadas como *A. brevis* (102280 e 102279) do rio Purus na figura 3 é distinta do grupo 7 considerado como *A. rondoni* na figura 4, assim demonstrando que são espécies diferentes.

CONCLUSÃO

A análise molecular se mostrou eficiente no reconhecimento e delimitação de dez das dezoito espécies identificadas como gênero *Ageneiosus*. Foi possível identificar espécies pela análise molecular através do DNA *barcode* com os seguintes resultados: *Ageneiosus sp.* em sua maioria é *A. inermis* com exceção de 2 exemplares; *Ageneiosus aff. atronatus* é *A. atronatus*; *Ageneiosus aff. vittatus* é *A. sp. n. "Walsh"* e a distinção das espécies de *A. brevis* e *A. rondoni*, confirmando identificação pelo DNA *barcode* e pelos *vouchers*. Dois exemplares de *A. polystictus* foram demonstrados que pertencem a *A. inermis*, pelo fato de essas espécies apresentarem muitas similaridades morfológicas. As espécies *Ageneiosus sp. n. "anal curta"*, *A. ucayalensis*, *A. dentatus*, *A. uranophthalmus*, *A. vittatus* e *A. sp. n. "projetada"* formam um complexo de espécies, necessitando um estudo mais profundo. A presente análise mostrou a importância da manutenção de exemplares *voucher* e a aplicabilidade do método *barcode* para confirmações taxonômicas *a posteriori*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Frank Ribeiro pela identificação das espécies, a Carolina Doria (UNIR), a Bárbara Calegari (PUCRS), Celeste Nakayama (INPA) e Mark Sabaj (ANSP) pelas amostras cedidas, aos projetos Sisbiota e Br-BOL financiados pelaFAPEAM/CNPq e à Capes pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J(1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.

Arce HM, Reis RE, Geneva AJ, Sabaj Pérez MH(2013) Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(3), 560–577.

Ardura, A, Linde, AR, Moreira, JC, Garcia-Vazquez, E (2010) DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143(6), 1438–1443.

Bergsten J, Bilton DT, Fujisawa T, Elliott M, Monaghan MT, Balke M, Vogler AP(2012) The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Systematic Biology*, 61(5), 851–869.

Bhattacharjee MJ, LaskarBA, Dhar B, Ghosh SK(2012) Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. *PloS One*, 7(11), e49950.

Betancur-R R, Armbruster JW (2009) Molecular clocks provide new insights into the evolutionary history of Galeichthyine sea catfishes. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 63(5), 1232–43.

De Salle R, Amato G(2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews. Genetics*, 5(September), 702–712.

Eigenmann, CH, Eigenmann RS(1890) A revision of the South American Nemathognathi or

catfishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1: 1- 508.

Felsenstein J(1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Ferraris CJ Jr(1988) The Auchenipteridae: Putative monophyly and sistematics, with a classification of the neotropical Doradoid catfishes (Ostariophysi: Siluriformes). Unpublished Ph.D dissertation. University of New York, New York. 229p.

Ferraris CJ Jr. (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR(2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–21.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR(2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, S96-S99.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W(2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14812–7.

Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN(2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548.

Jörger KM, Norenburg JL, Wilson NG, Schrödl M(2012) Barcoding against a paradox? Combined molecular species delineations reveal multiple cryptic lineages in elusive meiofaunal sea slugs. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 245.

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura: Brasil 2011. *IBAMA. Brasília*. 60pp.

Nelson JS(2006) *Fishes of the world*. Wiley & Sons, Inc., Alberta, Canada. 601pp.

Paithankar KR, Prasad KSN(1991) Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*. 19: 6: 1346.

de Pinna MCC(1998) Phylogenetic Relationships of Neotropical Siluriformes: Historical Overview and Synthesis of Hypotheses. Pp. 279-330. *In*: Malabarba, L. R., Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs*, Porto Alegre, 603pp.

Platt A, Woodhall R, George AJr(2007) Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, 43(1), 58–62.

Rapp Py-Daniel LH, Cox Fernandes C(2005) Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. *Acta Amazônica*, 35(1): 97-110.

Ratmuangkhwang S, Musikasinthorn P, Kumazawa Y(2014) Molecular phylogeny and biogeography of air sac catfishes of the *Heteropneustes fossilis* species complex (Siluriformes: Heteropneustidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 82–91.

Ribeiro FRV, Rapp Py-Daniel LH(2010) *Ageneiosus uranophthalmus*, a new species of auchenipterid catfish (Osteichthyes: Siluriformes) from river channels of the central Amazon basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 8(1), 97–104.

Ribeiro FRV(2011) Sistemática do gênero *Ageneiosus* La Cépède (Siluriformes: Auchenipteridae). Unpublished Ph.D dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 355p.

Saitou N, Nei M(1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.

Sambrook J, Russell D(2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 18.125pp.

Sullivan JP, Lundberg JG, Hardman M(2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 636–62.

Sullivan JP, Muriel-cunha J, Lundberg JG(2013) Phylogenetic Relationships and Molecular Dating of the Major Groups of Catfishes of the Neotropical Superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes) Published By: *The Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 162, 89–110.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S(2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–9.

Thompson, JD, Higgins, DG, Gibson TJ(1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.

Walsh SJ(1990) A Systematic Revision of the Neotropical Catfish Family Ageneiosidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville. 363p.

Ward RD(2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1077–85.

Hashimoto, S., Rapp Py-Daniel, L.H. & Batista, J.S. Relações filogenéticas dentro do gênero *Ageneiosus* com marcadores mitocondriais*

* Manuscrito em preparação para *Molecular Phylogenetic and Evolution*

RESUMO

Dentro da ordem dos Siluriformes, a família Auchenipteridae possui uma distribuição restrita aos rios da América do Sul e Panamá. Dentro desta, o gênero *Ageneiosus* se destaca pela ampla distribuição e em diversidade de espécies. O presente estudo teve como objetivo investigar a relação filogenética dentro do gênero utilizando como base as sequências de DNA mitocondriais, COI e ATPase. A análise filogenética utilizou a técnica de verossimilhança e de inferência bayesiana que recuperaram relações evolutivas distintas. Este gênero apresenta monofilia dentro do gênero *Ageneiosus* e seis espécies mostram relações entre elas: *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A.* sp. n. “projetada” e *A. vittatus*. Há evidências da existência do “clado *Tympanopleura*” que representa o agrupamento das espécies mais recentes e com relações estritas.

Palavras-chave: sistemática molecular, COI, ATPase, Auchenipteridae, *Ageneiosus*.

INTRODUÇÃO

A região Neotropical representa a maior diversidade de peixes de água doce do mundo com cerca de 3.600 espécies pertencentes às ordens Characiformes e Siluriformes. A ordem Siluriformes está representada por cerca de 15 famílias e agrupa mais de 1.650 espécies válidas (Reis *et al.*, 2003; Nelson 2006; Lévêque *et al.*, 2008). Auchenipteridae possui 21 gêneros e 103 espécies válidas e tem sua distribuição restrita aos rios da América do Sul e Panamá. Dentro desta, o gênero *Ageneiosus* se destaca com 11 espécies válidas (Ferraris, 2007).

A atual composição dentro do gênero *Ageneiosus* já teve status de família Ageneiosidae (Miranda Ribeiro, 1911; Eigenmann e Allen, 1942; Gosline, 1945; Van der Stigchel, 1946; Fowler, 1951; Chardon, 1968; Miranda Ribeiro, 1968). Em 1972, Britski estudando aspectos morfológicos das relações filogenéticas de Ageneiosidae e Auchenipteridae, Ageneiosidae foi retirado o status de família mas mantido no nível de gênero. No trabalho de Ferraris (1988) foi considerado pertencente dentro da família Auchenipteridae. Os trabalhos de Curran (1989) e Walsh (1990) tratavam ainda o gênero como uma família, porém, com o trabalho de Pinna (1993) o gênero passou a fazer parte novamente da família Auchenipteridae. Em trabalhos mais recentes, *Ageneiosus* foi reconhecido como grupo monofilético dentro da família Auchenipteridae, com suporte tanto morfológico (Soares-Porto, 1996; Akama, 2004; Birindelli, 2014) quanto molecular (Sullivan *et al.*, 2006; Arceet

al., 2013; Sullivan *et al.*, 2013).

O gênero *Ageneiosus* passou por três revisões taxonômicas. A primeira revisão taxonômica foi feita por Eigenmann e Eigenman(1890), durante a análise dos Nematognathi da América do Sul. Estes autores consideraram onze espécies válidas (*A. armatus*, *A. atronasus*, *A. axillaris*, *A. caucanus*, *A. brevifilis*, *A. brevis*, *A. dawalla*, *A. dentatus*, *A. porphyreus*, *A. ucayalensis* e *A. valenciennesi*). Na segunda revisão do gênero, realizada por Walsh (1990), foram reconhecidas dez espécies (*A. brevis*, *A. piperatus*, *A. atronasus*, *A. pardalis*, *A. vittatus*, *A. valenciennesi*, *A. ucayalensis*, *A. polystictus*, *A. brevifilis* e *A. marmoratus*) e uma espécie ainda não descrita da bacia do rio Amazonas.

Mais de 39 nomes específicos já foram propostos para o gênero, sendo que a maioria constitui sinônimos das 11 espécies consideradas válidas (Ferraris, 2007). Na revisão mais recente do gênero, Ribeiro(2011), considera que o gênero é composto por 13 espécies válidas: *A. atronasus*, *A. brevis*, *A. dentatus*, *A. inermis*, *A. magoi*, *A. militaris*, *A. pardalis*, *A. piperatus*, *A. polystictus*, *A. rondoni*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. vittatus*. Além destas, o autor apontou mais seis espécies como espécies novas e não formalmente descritas, totalizando 19 espécies.

O gênero está distribuído por toda a região da América do Sul, embora com algumas espécies com distribuições conhecidas mas limitadas como: *Ageneiosus militaris*, na região da bacia do Paraná-Paraguai; *A. pardalis* na região trans-Andina; *A. magoi* na bacia do rio Orinoco; e outras ocorrendo mais amplamente como: *A. atronasus* e *A. dentatus* por toda a bacia Amazônica. A espécie *A. inermis* se destaca por ocorrer em toda a América do Sul, do sul do Brasil até ao leste dos Andes.

No mesmo trabalho, Ribeiro (2011) observou existência de dois clados bem distintos dentro do gênero que ele denominou informalmente de “clado *Tympanopleura*” e “clado *Ageneiosus*” (figura 1). No primeiro clado, ele incluiu as espécies que atingem menor tamanho corporal (entre 56 a 165 mm de comprimento padrão) e que apresentam bexiga natatória grande e não ossificada. Enquanto que no outro clado, o tamanho corporal é maior (chegando até 490 mm) e a bexiga natatória reduzida e ossificada.

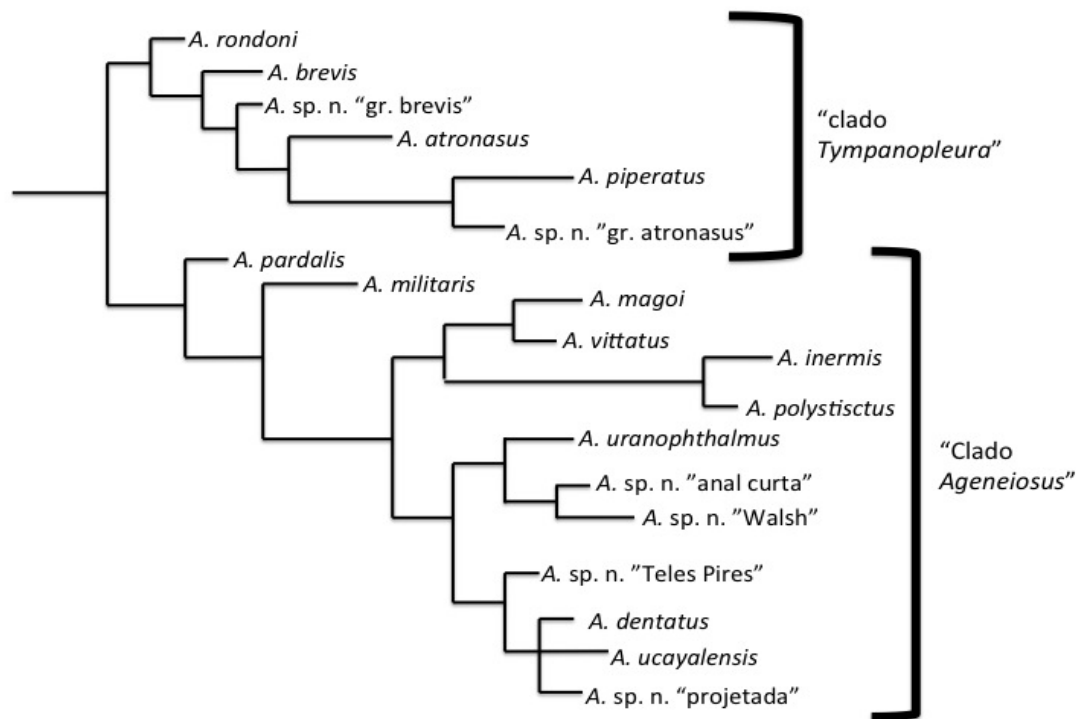


Figura 1 – Filogenia de caracteres morfológicos proposta por Ribeiro (2011) para o gênero *Ageneiosus*.

Estudos moleculares têm sido amplamente utilizados como ferramenta para elucidar diversas questões como: resolução ou identificação de grupos com conflitos taxonômicos (Martin e Bermingham, 2000), a relação filogenética de famílias Ictaluridae (Hardman, 2005), Ariidae (Betancur e Armbruster, 2009), Doradidae (Moyer *et al.*, 2004; Arce *et al.*, 2013) e Heteropneustidae (Ratmuangkhwang *et al.*, 2014), bem como na datação a nível de família (Sullivan *et al.*, 2013). Porém, nenhum estudo teve a abordagem da família Auchenipteridae ou do gênero *Ageneiosus*.

O genoma mitocondrial de peixes é constituído por cerca de 17.000 pares de bases (pb), sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do RNA ribossomal, 22 genes de RNA transportador, as subunidades I, II e III do citocromo *c* oxidase, a subunidade 6 e 8 da ATP sintetase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH (Garesse *et al.*, 1997; Meyer, 1993; Miya *et al.*, 2003; Ballard e Withlock, 2004). O DNA mitocondrial é um eficiente marcador molecular para análises intra e inter-específicas, podendo ter aplicações em diversos tipos de estudos, tais como em biogeografia histórica (Eberhard e Bermingham,

2005), análises de zonas de hibridação, estimativas do grau de variabilidade genética (Ward e Holmes, 2007), caracterização de estrutura populacional, relações filogenéticas (Bromham *et al.*, 2002) e estudos de conservação genética (Bickford *et al.*, 2007; Ardura *et al.*, 2010).

A mitocôndria possui um genoma próprio, composto por uma única molécula circular e com o tamanho variando entre 15 a 20 kilobases (kb). O DNAmt é geneticamente mais eficiente do que o DNA nuclear (Attardi, 1985; Gray, 1989), não contendo sequências duplicadas, sem íntrons e com os genes geralmente separados por menos do que 10 pb (Wolstenholme e Clary, 1985).

O gene citocromo *c* oxidase subunidade I é o gene que ajuda a diferenciar as espécies e tem sido utilizado como DNA *barcode* (ou código de barras de DNA). Este gene foi escolhido pelo seu papel central no metabolismo e, portanto, sua presença em quase todos os eucariontes. Além disso, apresenta uma maior taxa evolutiva comparada aos genes codificados pelo núcleo e por ser mais adequado para discriminar táxons estreitamente relacionados (Hebert *et al.* 2003). O gene ATP sintetase (ATPase), de subunidades 6 e 8, é responsável pela codificação de uma enzima que hidroliza o ATP e funciona como um transportador de energia em todas as atividades básicas das células que requerem energia. Este gene é conservado em relação a outros genes mitocondriais, por isso ele é utilizado para determinar relações filogenéticas (Vergara-Chen *et al.*, 2009), filogeografia (Habib *et al.*, 2012; Borba *et al.*, 2013) e também estimar divergências intra-específicas (Frederico *et al.*, 2012).

O presente estudo tem como objetivo investigar a relação filogenética dentro do gênero *Ageneiosus* com base nas sequências de DNA mitocondriais de COI e ATPase; estabelecer o posicionamento filogenético das espécies do gênero *Ageneiosus* e investigar se existem realmente dois grandes clados dentro do gênero (segundo hipótese de Ribeiro 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Foram examinados espécies de *Ageneiosus* ao longo da distribuição do gênero provenientes das coleções de tecido do INPA, UNIR e ANSP, assim como foram coletados alguns exemplares e depositados na Coleção de Peixes do INPA (Anexo 2). A abrangência geográfica das amostras está representada na figura 2. Foram adicionadas ainda as espécies de

Auchenipterichthys longimanus (2 exemplares) e *A. punctatus* (2 exemplares) como grupo externo para enraizar a topologia da árvore. A identificação segue a classificação taxonômica de Ribeiro, 2011.

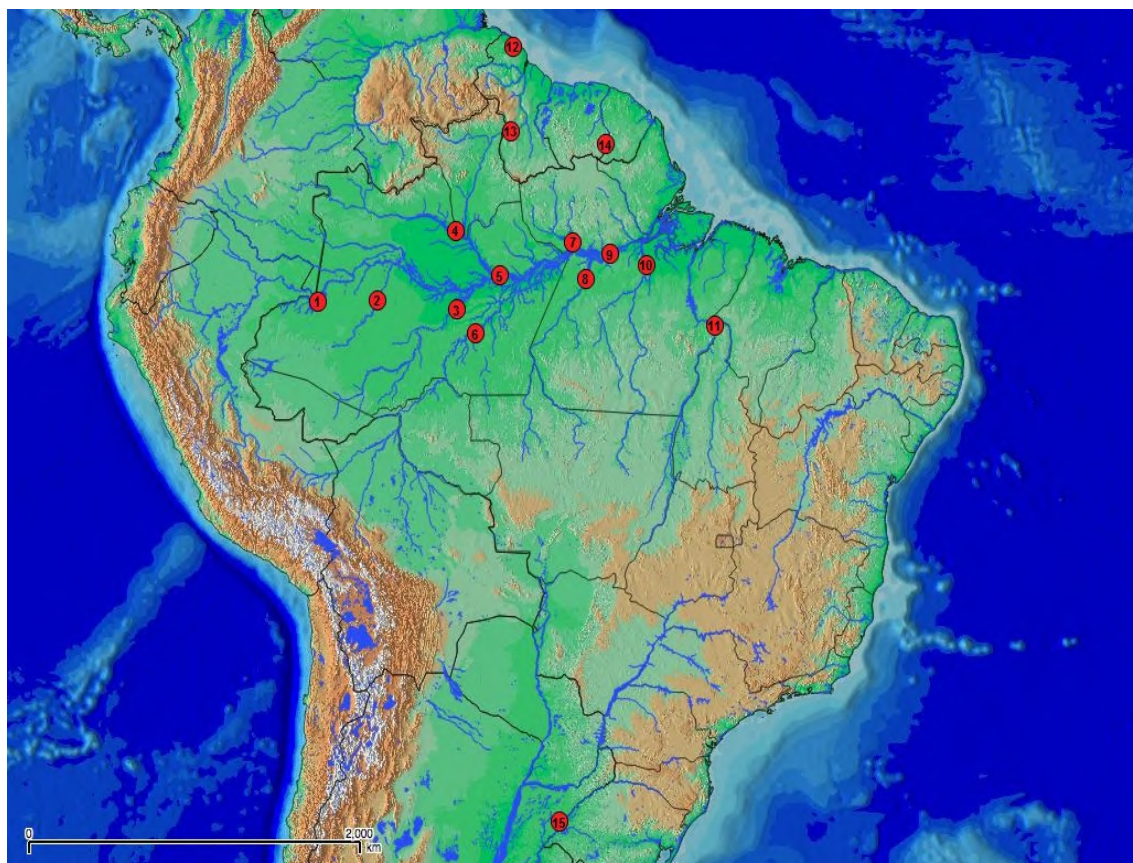


Figura 2 – Mapadas drenagens onde os exemplares distribuídos em 16 espécies de *Ageneiosus* foram amostradas: 1- Alto rio Amazonas; 2- rio Juruá; 3- rio Purus; 4- rio Negro; 5- Médio Amazonas (Manaus); 6- rio Madeira; 7- rio Trombetas; 8- rio Tapajós; 9- Baixo Amazonas (Santarém); 10- rio Xingu; 11- rio Araguaia; 12- rio Waini; 13- rio Rupununi; 14- rio Litani; 15- rio Uruguai;

Procedimentos laboratoriais

A extração do DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001). O gene COI foi amplificado utilizando os *primers* de Ivanova *et al.*, (2007) e o gene ATPase com os *primers* de Sivasundar (2001). Tanto COI quanto ATPase foi amplificado usando volume final da reação de 15 µL, utilizando 1 µL de 10 a 50 ng de DNA total; 1,5 µL de Tampão 10x; 1,2 µL de MgCl₂ a 25mM; 2,5 µL dNTP a 1mM; 0,2 µL de cada *primer* a

5uM; 0,3 µL de *Taq* DNA Polimerase a 5U/µL; e água milli-Q para completar o volume da reação.

Para o COI, o DNA foi submetido a um termociclador durante 35 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. Para a ATPase foi 93 °C por 1 minuto de desnaturação, 51°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C para extensão durante 1 minuto e 30 segundos por 30 ciclos.

O produto amplificado para os dois genes foi purificado pelo método de precipitação em etanol com Polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20% (Paithankar e Prasad, 1991). Em seguida, para inserir fluorescência BigDye™ v.3.1 foi utilizado a reação de sequência pelo método de Platt *et al.* (2007). Posteriormente a reação foi precipitada pelo método etanol/isopropanol para retirada de produto não incorporado e re-suspensa em formamida para então ser eletro-injetada no analisador de DNA ABI 3130 xL (*Applied Biosystems*).

Análise dos dados

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no Genbank (*National Center for Biotechnology Information*) através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Foram encontradas as sequências nucleotídicas de *Ageneiosus inermis* (FJ418655) (Ardura *et al.*, 2010) para COI e o *A. atronatus* (DQ990633) para ATPase (Betancur *et al.*, 2007). A edição das sequências foi realizada com auxílio do programa Geneious V. R6 (Biomatters), disponível em <http://www.geneious.com/>; os alinhamentos múltiplos das sequências foram feitos utilizando o ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) no próprio programa e foram traduzidas em aminoácidos para verificar possível códon de parada.

O Teste de Homogeneidade de Partição (THP) (Farris *et al.*, 1995) foi feita no programa PAUP (Swofford, 2003) para concatenar ou não os dois genes para a análise filogenética. Caso o teste apresente valor não significativo, os dois genes podem ser concatenados, porém, caso o teste for significativo os dois genes devem ser analisados separadamente. Para testar o melhor modelo evolutivo foi utilizado o programa MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004) e a escolha do modelo pelo critério de AIC (*Akaike Information Criterion*) (Posada e Buckley, 2004).

Para análise de verossimilhança foi utilizada o programa RAxML (Stamatakis, 2014), usando resultado do modelo obtido no MrModelTest, com o *bootstrap* de 10.000

pseudoréplicas. Na análise Bayesiana, foi utilizado o programa Mr. Bayes (Huelsenbeck *et al.*, 2001) com o modelo evolutivo do MrModeltest e foi rodado em 4 cadeias frias, por 8.000.000 de gerações e descartando as primeiras 2.500 cadeias (*burnin*).

Para verificar a homogeneidade dos dados amostrados tanto no RAxML e no Mr.Bayes foi utilizado o programa Tracer (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Para visualização das árvores foi utilizado o FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

RESULTADOS

Sequências dos genes ATPase e COI

Foram gerados sequencias de DNA do gene mitocondrial COI com 620 pb de 104 indivíduos e o gene ATPase com 832pb de 100 exemplares de *Ageneiosus*. O THP não foi significativo $p=0,368$, sendo $\alpha=0,05$, porém, as árvores foram analisadas tanto separadamente quanto com os dois genes concatenados. O modelo obtido pelo MrModeltest pelo critério AIC foi GTR (Tavaré, 1986), em COI com distribuição gamma (GTR+G), para ATPase com sítios invariáveis e com distribuição gamma (GTR+I+G), e para dados concatenados com distribuição gamma (GTR+G) .

Análises filogenéticas

As árvores foram obtidas tanto com a Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesianacom os genes COI (figura 3) e ATPase (figura 4) e com dado concatenado (figura 5). Os exemplares foram agrupados em espécies com suporte dos ramos $\geq 75\%$ em Máxima Verossimilhança(MV) e $\geq 95\%$ em Inferência Bayesiana (IB). As espécies formaram um grupo monofilético dentro do gênero *Ageneiosus* mostrando que *Auchenipterichthys longimanus* e *A. punctatus* formam grupo externo de *Ageneiosus*.

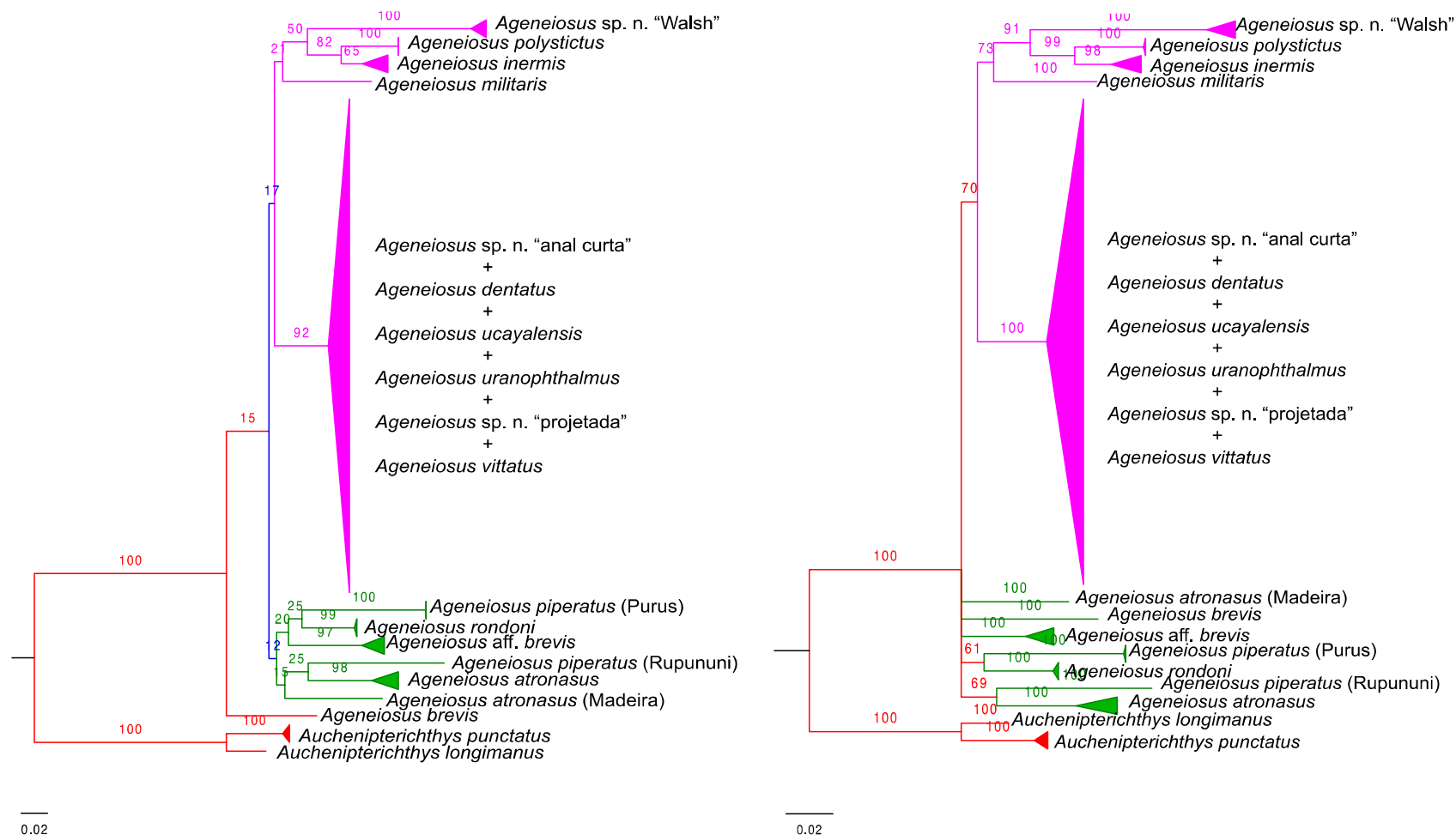


Figura 3– Árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (lado esquerdo) e de Inferência Bayesiana (lado direito) do gênero *Ageneiosus* geradas com sequencias nucleotídicas de COI.

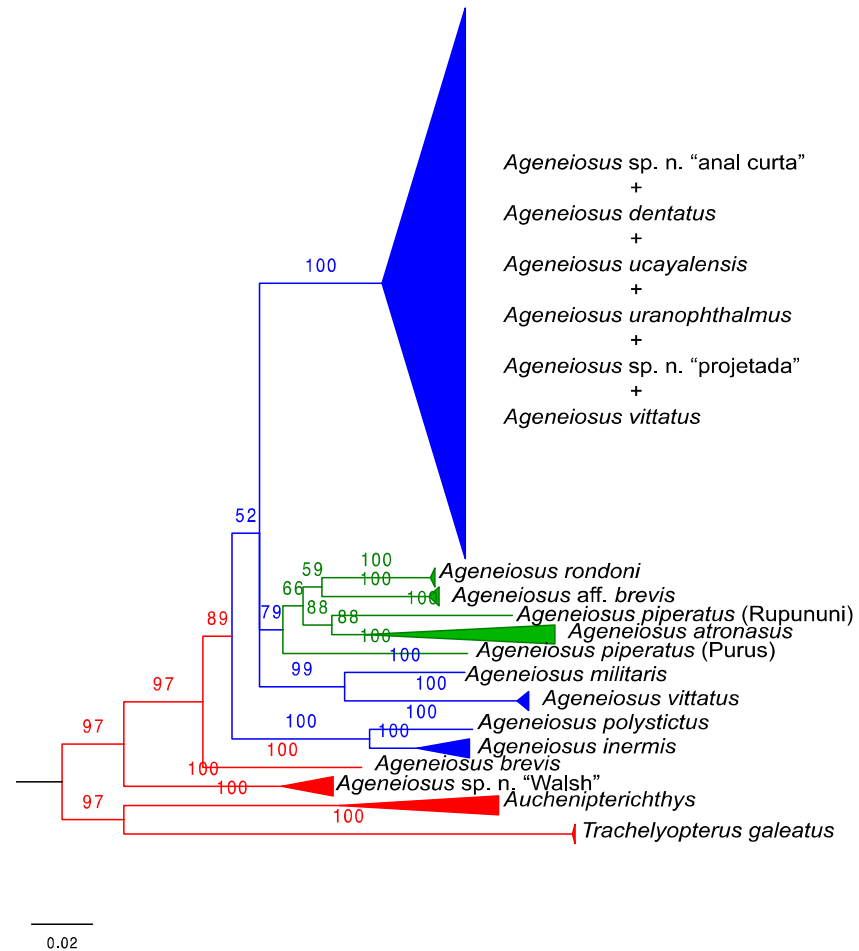
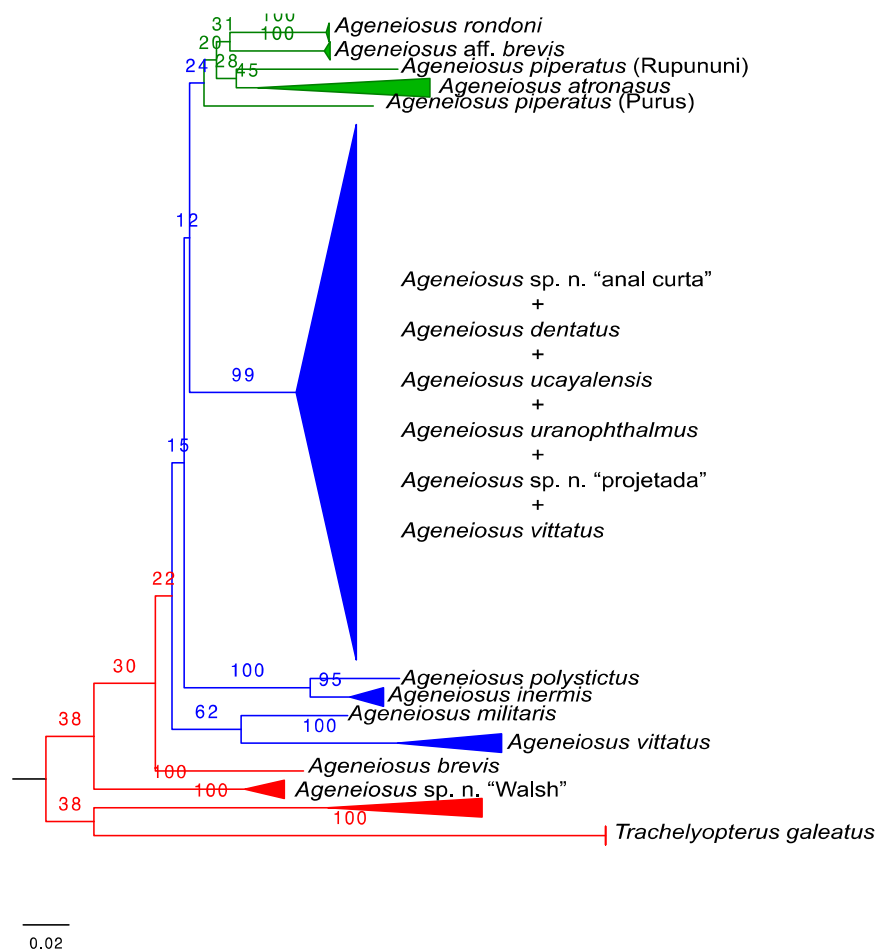


Figura 4 – Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (lado esquerdo) e de Inferência Bayesiana (lado direito) do gênero *Ageneiosus* geradas com sequencias nucleotídicas de ATPase.

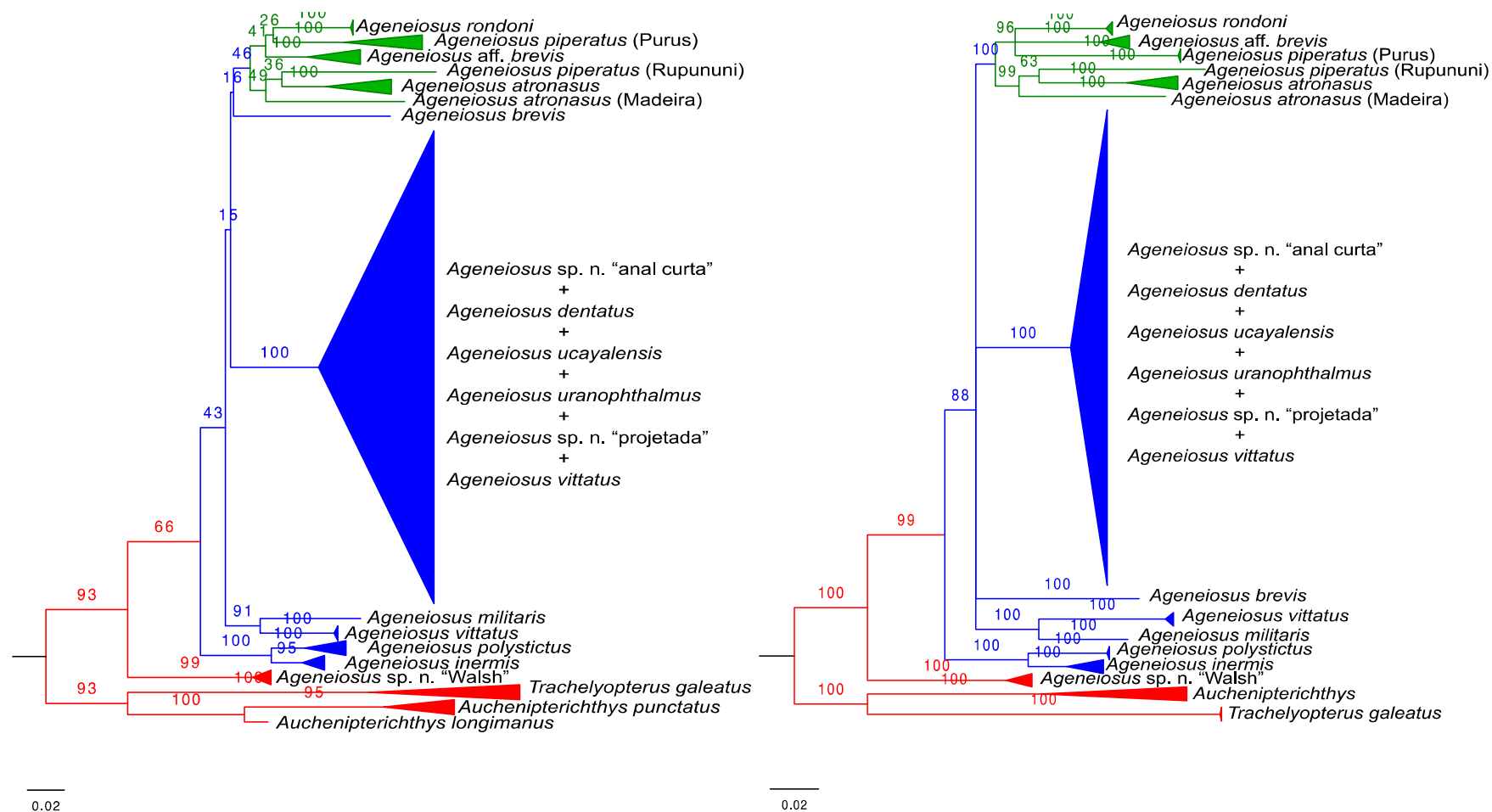


Figura 5 – Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (lado esquerdo) e de Inferência Bayesiana (lado direito) do gênero *Ageneiosus* gerada com os marcadores moleculares COI e ATPase concatenados.

As árvores feitas com o gene COI (figura 3), tanto de MV do lado esquerdo quanto a IB do lado direito, mostraram uma conformação parecida destacada tanto em rosa quanto em verde. Na MV demonstra que *Ageneiosus brevis* é o grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus*. Ainda foi observado dois grupos distintos: um agrupamento representado em rosa (*Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. vittatus* (*A. militaris* (*A. sp. n. “Walsh”* (*A. polystictus* + *A. inermis*)))) e outro representado em verde ((*A. piperatus* do Rupununi + *A. atronasus*) (*A. aff. brevis*(*A. piperatus* do Purus + *A. rondoni*))) que faz parte do agrupamento do “clado *Tympanopleura*”. Na IB houve uma politomia entre as espécies: *A. atronasus*, *A. brevis*, *A. sp. n. “gr. brevis”*, (*A. piperatus* do rio Purus + *A. rondoni*) e (*A. piperatus* do rio Rupununi + *A. atronasus*).

A árvore feita com o gene ATPase tanto na árvore MV quanto na IB, *Ageneiosus* sp. n. “Walsh” em seguida *A. brevis* mostra grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus*, destacado em vermelho na figura 4. O ramo destacado em verde que são representantes do “clado *Tympanopleura*” (*Ageneiosus piperatus* da localidade do rio Purus (*A. aff. brevis* + *A. rondoni*)(*A. piperatus* da localidade do rio Rupununi + *A. atronasus*)), apresenta a mesma conformação tanto MV quanto IB, entretanto, IB apresenta suporte maior em relação a MV. O ramo intermediário mostrado em azul, mostra-se a conformação divergente quanto a sua análise. Na MV está composto pelo grupo (*Ageneiosus militaris* + *A. vittatus*) como grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus* em seguida o grupo (*A. polystictus* + *A. inermis*) e depois o agrupamento (*A. sp. n. “anal curta”*, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. vittatus*). Enquanto que na IB, *A. inermis* e *A. polystictus* como grupo irmão de todos os outros do gênero, em seguida uma politomia com grupo (*A. militaris* + *A. vittatus*) e o agrupamento (*A. sp. n. “anal curta”*, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. vittatus*).

Ao observarmos as árvores concatenadas com a MV do lado esquerdo e IB do lado direito (figura 5) o *Ageneiosus* sp. n. “Walsh” é grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus* destacado em vermelho seguida do grupo (*A. polystictus* + *A. inermis*), seguida do grupo (*A. militaris* + *A. vittatus*), o agrupamento (*A. sp. n. “anal curta”*, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”*, *A. vittatus*) e *A. brevis*, na árvore de IB esses agrupamentos formaram uma politomia. As duas análises apresentam conformação parecida exceto o posicionamento do *A. brevis*. E os agrupamentos destacado em verde, o “clado *Tympanopleura*” (((*Ageneiosus piperatus* do Rupununi + *A. atronasus*) *A. atronasus*)(*A. rondoni* + *A. piperatus* do Purus) *A. aff. brevis*)) mantem a mesma

conformação.

Em todas as seis árvores demonstradas, *Ageneiosus inermis* é grupo irmão de *A. polystictus* e as espécies: *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”* e *A. vittatus* apresentam uma forte relação de agrupamento.

DISCUSSÃO

Clado *Ageneiosus*

As árvores foram analisadas tanto com os genes separadamente quanto concatenados, ainda que o teste de homogeneidade não tenha sido significativo. A árvore de COI bayesiana (figura 3 do lado, a direita) demonstra uma politomia, ou seja, não teve suporte nas relações entre as espécies *A. atronasus*, *A. brevis*, *A. aff. brevis*, *A. piperatus*, *A. rondoni* e *A. atronasus*, enquanto que a árvore de MV demonstra os relacionamentos porém o suporte é baixo.

Apesar das árvores de genes serem comparadas separadamente, isso mostra que o marcador ATPase tem taxa de evolução diferente e foi bastante importante para elucidar relações mais antigas entre os táxons quando comparado com o gene COI, e as análises de inferência bayesiana tem mais suporte no ramo porém não demonstra relações claras entre os grupos comparado com as de máxima verossimilhança.

O gene ATPase aparentemente demonstra suas relações dentro do gênero, considerando que as espécies *Ageneiosus* sp. n. “Walsh” e *A. breviss* são grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus*. Entretanto, mostraram divergências nas relações das espécies no caso *A. militaris* + *A. vittatus*, na análise na MV e *A. inermis* + *A. polystictus* na IB.

A árvore concatenada apresentou mais similaridades com a árvore do gene ATPase do que com a de COI, porém as posições nos ramos intermediários com alguma divergência. Em todas as seis árvores recuperadas as espécies *A. inermis* e *A. polystictus* apresentam uma forte relação de agrupamento. As duas espécies são as que atingem o maior comprimento dentro gênero, e morfologicamente, são muito parecidas. Ainda comparando as seis árvores, o ramo que contém as espécies: *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”* e *A. vittatus*, apesar de monofilético, não apresenta um relacionamento filogenético claro entre as espécies, pois essas espécies não apresentaram uma

delimitação nítida entre elas (figura 6). No entanto, este clado aparece em todas as análises demonstrando que existe um forte relacionamento entre essas espécies ou apontando para possíveis erros de identificação taxonômica.

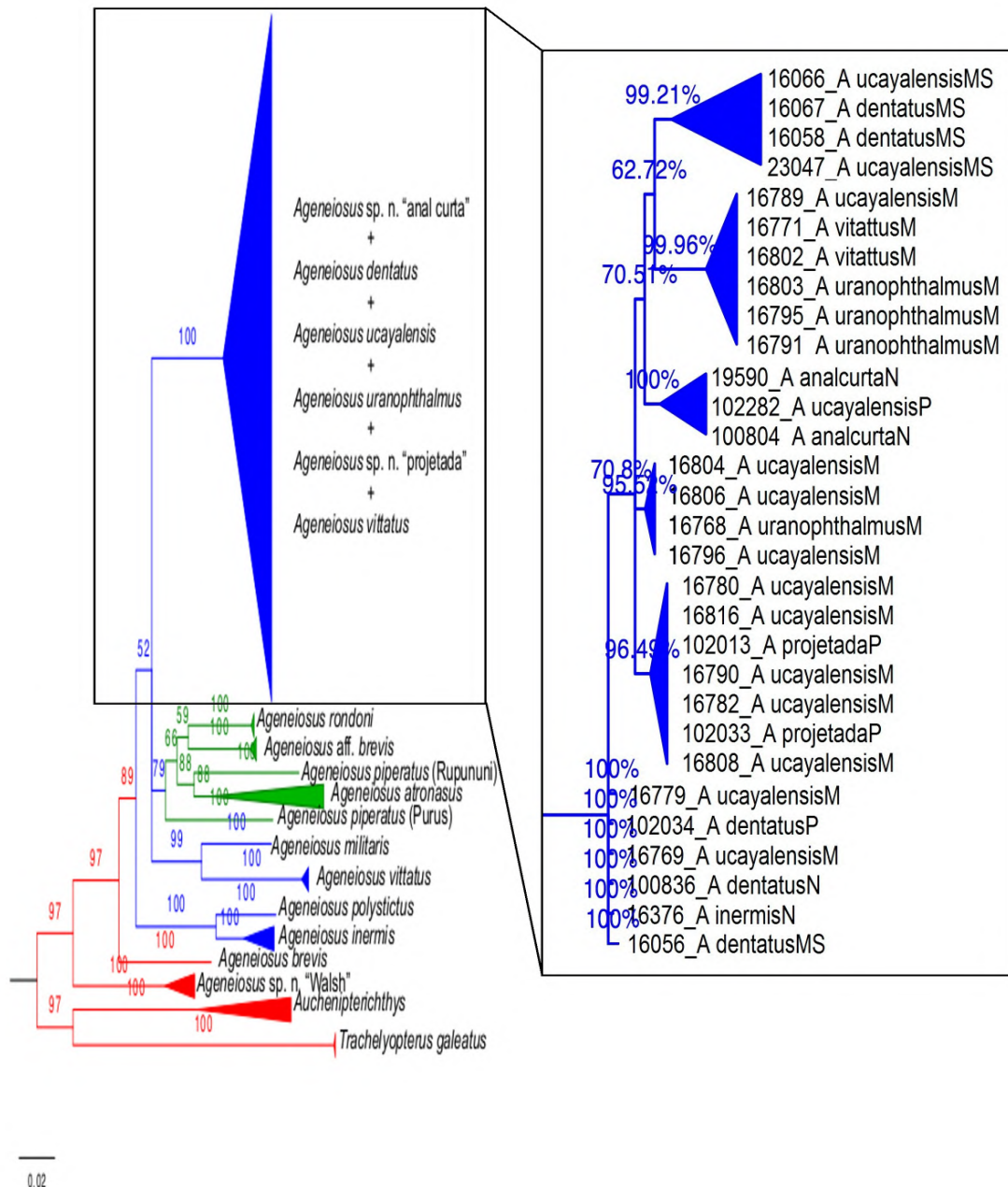


Figura 6 – Árvore de Inferência Bayesiana com o marcador ATPase em detalhe do ramo contendo as espécies: *A. sp. n. "anal curta"*, *A. dentatus*, *A. sp. n. "projetada"*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus* e *A. vittatus*.

Clado *Tympanopleura*

O gênero *Tympanopleura* foi proposto inicialmente em 1890 por Eigenmann para alocar uma nova espécie, *T. piperata*. Posteriormente, outras duas espécies foram descritas no gênero: *T. alta* por Eigenmann e Myers, em Myers 1928 e *T. nigricollis* por Eigenmann e Allen, em 1942. Em 2007, Ferraris sinonimizou essas espécies com *Ageneiosus piperata*, *A. brevis* e *A. atronatus* respectivamente.

Entretanto, Ribeiro (2011) propõe que o clado *Tympanopleura*, anteriormente sinonimizado com *Ageneiosus*, seja revalidado devido às características da bexiga natatória, nesse estudo o “clado *Tympanopleura*”, não pode ser totalmente descartada., observamos que este clado representa o agrupamento das espécies exceto *Ageneiosus brevis*. Esta espécie pode pertencer ou não a esse clado pois nas análises apareceram em posições diferentes nas árvores mostradas.

A espécie *Ageneiosus piperatus* do rio Rupununi é grupo irmão de *A. atronatus* tanto no marcador COI quanto no gene ATPase. Quanto a espécie *A. rondoni*, esta parece ser divergente quanto a sua relação, no COI, ela é mais relacionada com o *A. piperatus* do rio Purus e com o gene ATPase apresenta uma relação com *A. aff. brevis*.

Em síntese, as espécies formaram um grupo monofilético dentro do gênero *Ageneiosus*. A espécie *A. polystictus* é grupo irmão de *A. inermis* pois apresentaram nas seis árvores e com suporte. As duas atingem o maior tamanho dentro do gênero, e morfologicamente são muito parecidas. A espécie *Ageneiosus* sp. n. “Walsh” é grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus*. Porém, os ramos que apresentaram politomia devem ser investigados com outros genes e inclusão das espécies *A. magoi* e *A. pardalis* para análise da relação filogenética completa do gênero.

O gênero *Ageneiosus* mostra uma complexidade tanto na distribuição de habitat (como na espécie *A. inermis*) quanto na diversidade de espécies com relações complexas (como as espécies *Ageneiosus* sp. n. “anal curta”, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. “projetada”* e *A. vittatus*).

Porém, nesse estudo foi possível observar que o “clado *Tympanopleura*” não pode ser totalmente descartado, visto que, há evidências da existência do clado representado pelo

agrupamento dessas espécies: *Ageneiosus piperatus* do rio Rupununi é relacionado com *A. atronasus* e; *A. rondoni* relacionada com *A. sp.n. "gr. brevis"* e/ou *A. piperatus* do rio Purus.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Frank Ribeiro pela identificação das espécies, a Carolina Doria (UNIR), a Bárbara Calegari (PUCRS), Celeste Nakayama (INPA) e Mark Sabaj (ANSP) pelas amostras cedidas, aos projetos Sisbiota e Br-BOL financiados pelaFAPEAM/CNPq e à Capes pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akama, A., 2004. Revisão sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus* Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Unpublished Ph.D. Dissertation, University of São Paulo, São Paulo, 375 p.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Arce H, M., Reis, R.E., Geneva, A.J., Sabaj Pérez, M.H., 2013. Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(3), 560–77.
- Ardura, A., Linde, A.R., Moreira, J.C., Garcia-Vazquez, E., 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143(6), 1438–1443.
- Attardi, G., 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*, 93:93-145
- Ballard J.W.O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.

- Betancur-R, R., Acero P, A., Bermingham, E., Cooke, R., 2007. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), 339–57.
- Betancur-R, R., Armbruster, J.W., 2009. Molecular clocks provide new insights into the evolutionary history of Galeichthyine sea catfishes. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 63(5), 1232–43.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–55.
- Birindelli, J.L.O., 2014. Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi:Siluriformes).*Neotropical Ichthyology*, 12(3), 451–564.
- Borba, R.S.De, Zawadzki, C.H., Oliveira, C., Perdiges, A., Parise-maltempi, P.P., Alves, A.L., 2013. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes : Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, 11(1), 111–116.
- Bromham, L., Woolfit, M., Lee, M.S.Y., Rambaut, A., 2002. Testing the relationship between morphological and molecular rates of change along phylogenies. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 56(10), 1921–30.
- Cardoso, Y.P., Montoya-Burgos, J.I., 2009. Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: The Guyanas Region. *Molecular Ecology*, 18, 947–964.
- Chardon, M., 1968. Anatomie comparée de l'appareil de Weber et des structures connexes chez les Siluriformes. *Annales Musee Royal de l'Afrique Centrale, Sciences Zoologiques*, (Serie 8) 169: 1-277.
- Curran, D.J., 1989. Phylogenetic Relationships Among the Catfish Genera of the Family Auchenipteridae (Teleostei: Siluroidea).*Copeia*, (2): 408-419.

- Eberhard, J.R., Bermingham, E., 2005. Phylogeny and comparative biogeography of Pionopsitta parrots and Pteroglossus toucans. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 36: 288– 304.
- Eigenmann, C.H., Allen, W.R., 1942. Fishes of Western South America. I. The Intercordilleran and Amazonian lowlands of Peru. II. The high pampas of Peru, Bolivia and northern Chile. With a revision of the Peruvian Gymnotidae and, of the genus *Orestias*. The University of Kentucky, Lexington, xv + 494p.
- Eigenmann, C.H., Eigenmann, R.S., 1890. A revision of the South American Nemathognathi or cat-fishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1: 1-508.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, (10), 315–319.
- Ferraris, C.J.Jr., 1988. The Auchenipteridae: Putative monophyly and sistematics, with a classification of the neotropical Doradoid catfishes (Ostariophysi: Siluriformes). Unplubished Ph.D. Dissertation, University of New York, New York, 229p.
- Ferraris, C.J.Jr., 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.
- Frederico, R.G., Farias, I.P., Araújo, M.L.G., Charvet-Almeida, P., Alves-gomes, J.A., 2012. Phylogeography and Conservation Genetics of the Amazonian Freshwater Stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 71–80.
- Fowler, H.W., 1951. Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 6: 404-625.
- Garesse, R., Carrodegua, J.A., Santiago, J., Perez, M.L., Marco, R., Vallej, C.G., 1997. *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comparative Biochemistry Physiology*, 117: 357-366.
- Gosline, W.A., 1945. Catálogo dos Nematognatos de água doce da América do Sul e Central. Boletim do Museu Nacional, Rio de Janeiro, *Zoologia*, 33: 1-138.
- Gray, M.W., 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review Cell and Biology*, 5: 25-50.

- Habib, M., Lakra, W.S., Mohindra, V., Lal, K.K., Punia, P., Singh, R.K., Khan, A.A., 2012. Assessment of ATPase 8 and ATPase 6 mtDNA Sequences in Genetic Diversity Studies of *Channa Marulius* (Channidae: Perciformes). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 82(4): 497-501.
- Hardman, M., 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 37: 700-720.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series Biological Sciences*. 270: 596-599.
- Hubert, N., Renno, J.F., 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33, 1414–1436.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P., 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology, 294(December), 2310–2314.
- Ivanova, N.V., Zemlak, T.S., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548.
- Lévêque, C., Oberdorff, T., Paugy, D., Stiassny, M.L.J., Tedesco, P.A., 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 545–567.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F., 1998. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical south american rivers. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, 603: 14-48.
- Martin, A.P., Bermingham, E., 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of neotropical catfish. *Proceedings of the Royal Society*. 267: 1135-1141.
- Miranda Ribeiro, A., 1911. Fauna Brasiliense. Peixes IV (A). Eleuterobranchios Aspirophoros. Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro. 16: 1-504.
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. Pp.1-38. In: Hochachka, W.;

Mommsen, T. P., (Eds.). Molecular Biology Frontiers, biochemistry and molecular biology fishes. Vol 2. *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam.

Miranda-Ribeiro, P., 1968. Apontamentos Ictiológicos III. Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro (*Série Zoologia*), 263: 1-14.

Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B., Inoue, J.G., Mukai, T., Satoh, T.P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., Mabuchi, K., Shirai, S.M., Nishida, M., 2003. Major Patterns of Higher Teleostean Phylogenies: a New Perspective Based on 100 Complete Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1): 121-38.

Moyer, G.R., Burr, B.M., Krajewski, C., 2004. Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 551–575.

Myers, G.S., 1928. New fresh-water fishes from Peru, Venezuela, and Brazil. *Annals and Magazine of Natural History*, 10(2): 83-90.

Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*. Wiley & Sons, Inc., Alberta, Canada. 601pp.

Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Paithankar, K.R., Prasad, K.S.N., 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*. 19: 6: 1346.

de Pinna, M.C.C., 1998. Phylogenetic Relationships of Neotropical Siluriformes: Historical Overview and Synthesis of Hypotheses. Pp. 279-330. *In*: Malabarba, L. R., Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. *Edipucrs*, Porto Alegre, 603pp.

Platt, A., Woodhall, R., George, A.Jr., 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, 43(1): 58–62.

Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53(5): 793–808.

Ratmuangkhwang, S., Musikasinthorn, P., Kumazawa, Y., 2014. Molecular phylogeny and biogeography of air sac catfishes of the *Heteropneustes fossilis* species complex (Siluriformes: Heteropneustidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 82–91.

Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. Jr., 2003 (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. *Edipucrs*, Porto Alegre. 729pp.

Ribeiro, F.R.V., Rapp Py-Daniel, L.H.R., 2010. *Ageneiosus uranophthalmus*, a new species of auchenipterid catfish (Osteichthyes: Siluriformes) from river channels of the central Amazon basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 8(1), 97–104.

Ribeiro, F.R.V., 2011. Sistemática do gênero *Ageneiosus* La Cépède (Siluriformes: Auchenipteridae). Unpublished Ph.D. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 355p.

Sambrook, J.; Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 18125pp.

Sivasundar, A., Bermingham, E., Orti, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10(2), 407–417.

Soares-Porto, L.M. 1996. Análise filogenética dos Centromochlidae. Redefinição e revisão taxonômica de *Tatia* Miranda Ribeiro, 1911 (Osteichthys, Siluriformes, Doradoidea). Unpublished Ph.D. Dissertation, University of São Paulo, São Paulo, 278p.

Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312–1313.

Sullivan, J.P., Muriel-cunha, J., Lundberg, J.G., 2013. Phylogenetic Relationships and Molecular Dating of the Major Groups of Catfishes of the Neotropical Superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes) Published By: *The Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 162, 89–110.

Swofford, D. L. 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts.

Tavaré, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *In: Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis* (ed. Miura RM), pp. 57-86. American Mathematical Society, Providence, RI.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.

Van der Stigchel, J.W.R., 1946. The South American Nematognathi of the Museums at Leiden and Amsterdam, *E.J. Brill*, Leiden. 204pp.

Vergara-Chen, C., Aguirre, W.E., González-Wangüemert, M., Bermingham, E., 2009. A mitochondrial DNA based phylogeny of weakfish species of the Cynoscion group (Pisces: Sciaenidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(2), 602–7.

Walsh, S.J., 1990. A Systematic Revision of the Neotropical Catfish Family Ageneiosidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, 363p.

Ward, R.D., Holmes, B.H., 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 899–907.

Wolstenholme, D.R., Clary, D.O., 1985. Sequence Evolution of Drosophila Mitochondrial DNA. *Genetics*, 109, 725–744.

3. CONCLUSÃO GERAL

Em síntese, as espécies formaram um grupo monofilético dentro do gênero *Ageneiosus*. A análise molecular se mostrou eficiente no reconhecimento e delimitação das espécies do gênero *Ageneiosus*. Foi possível identificar espécies pela análise molecular:

- A distinção entre *A. polystictus* e *A. inermis* juvenil;
- Os agrupamentos entre as espécies de *A. atronasus*, *A. aff. brevis*; *A. piperatus*; *A. sp. n. "Walsh"*;
- Diferenças entre *A. brevis* e *A. rondoni*;
- As espécies *A. sp. n. "anal curta"*, *A. ucayalensis*, *A. dentatus*, *A. uranophthalmus*, *A. vittatus* e *A. sp. n. "projetada"* formam um complexo de espécies;

Quanto as relações filogenéticas:

- A espécie *A. polystictus* é grupo irmão de *A. inermis* pois apresenta um suporte no ramo e apresentaram em todas as árvores;
- Seis espécies apresentam relações complexas: *A. sp. n. "anal curta"*, *A. dentatus*, *A. ucayalensis*, *A. uranophthalmus*, *A. sp. n. "projetada"* e *A. vittatus*;
- Quanto as relações dentro do gênero, a espécie *A. sp. n. "Walsh"* é grupo irmão de todos os outros *Ageneiosus*. Porém, os relacionamentos devem ser investigados com outros genes e acrescentar as espécies *A. magoi* e *A. pardalis* faltante para se ter a filogenia completa do gênero para então saber a real divergência;

Nesse estudo foi possível observar que há evidências da existência do "clado *Tympanopleura*" pois representa o agrupamento dessas espécies: *Ageneiosus piperatus* do rio Rupununi é relacionado com *A. atronasus* e; *A. rondoni* relacionada com *A. sp. n. "gr. brevis"* e/ou *A. piperatus* do rio Purus.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akama, A. 2004. Revisão sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus* Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 375pp.
- Arce H, M.; Reis, R. E.; Geneva, A. J.; Sabaj Pérez, M. H. 2013. Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(3), 560–77.
- Ardura, A.; Linde, A. R.; Moreira, J. C.; Garcia-Vazquez, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143(6), 1438–1443.
- Attardi, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*, 93:93-145.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, Inc., USA. 511pp.
- Ballard J. W. O.; Whitlock M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.
- Barthem, R.; Goulding, M. 1997. Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos – Tefê, AM: *Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq*. 140pp.
- Batista, V.S.; Isaac, V.J.; Fabré, N.N.; Gonzalez, J.C.A.; Almeida, O.T.; Rivero, S.; Júnior, J.N.O.; Ruffino, M.L.; Silva, C.O.; Saint-Paul, U. 2012. Peixes e pesca no Solimões-Amazonas: uma avaliação integrada. *Brasília: Ibama/PróVárzea*. 276pp.
- Bickford, D.; Lohman, D. J.; Sodhi, N. S.; Ng, P. K. L.; Meier, R.; Winker, K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–55.
- Birindelli, J. L. O. 2014. Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, 12(3), 451–564.

- Borba, R. S. De; Zawadzki, C. H.; Oliveira, C.; Perdiges, A.; Parise-maltempi, P. P.; Alves, A. L. 2013. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes : Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. *Neotropical Ichthyology*, 11(1), 111–116.
- Britski, H. A. 1972. Sistemática e evolução dos Auchenipteridae e Ageneiosidade (Teleostei, Siluriformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 146pp.
- Bromham, L.; Woolfit, M.; Lee, M. S. Y.; Rambaut, A. 2002. Testing the relationship between morphological and molecular rates of change along phylogenies. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 56(10), 1921–30.
- Chardon, M. 1968. Anatomie comparée de l'appareil de Weber et des structures connexes chez les Siluriformes. *Annales Musee Royal de l'Afrique Centrale, Sciences Zoologiques*, (Serie 8) 169: 1-277.
- Curran, D. J. 1989. Phylogenetic Relationships Among the Catfish Genera of the Family Auchenipteridae (Teleostei: Siluroidea). *Copeia*, (2): 408-419.
- Diogo, R. 2003. Anatomy, Phylogeny and Taxonomy of Amphiliidae. Pp. 353-384. In: Catfishes. 2 volumes, Enfield, Science Publishers, Inc. 812p.
- Eberhard, J. R.; Bermingham, E. 2005. Phylogeny and comparative biogeography of Pionopsitta parrots and Pteroglossus toucans. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 36: 288– 304.
- Eigenmann, C. H. 1912. Some results from an ichthyological reconnaissance of Colombia, South America. *Indiana University Studies*, 16:1-27.
- Eigenmann, C. H.; Allen, W. R. 1942. Fishes of Western South America. I. The Intercordilleran and Amazonian lowlands of Peru. II. The high pampas of Peru, Bolivia and northern Chile. With a revision of the Peruvian Gymnotidae and, of the genus *Orestias*. The University of Kentucky, Lexington, xv + 494p.
- Eigenmann, C. H.; Eigenmann, R. S. 1890. A revision of the South American Nemathognathi or cat-fishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1: 1- 508.
- Ferraris, C. J. Jr. 1988. The Auchenipteridae: Putative monophyly and systematics, with a classification of the neotropical Doradoid catfishes (Ostariophysi: Siluriformes). Tese de

Doutorado.Universidade de Nova Iorque, Nova Iorque.229pp.

Ferraris, C. J. Jr. 2003. Family Auchenipteridae. *In*: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. Jr. (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. *Edipucrs*, Porto Alegre. 729pp.

Ferraris, C. J., Jr. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.

Fowler, H. W. 1951. Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 6: 404-625.

Frederico, R. G.; Farias, I. P.; Araújo, M. L. G. De; Charvet-Almeida, P.; Alves-gomes, J. A. 2012. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 10(1), 71–80.

Fréry, N.; Maury-Brachet, R.; Maillot, E.; Deheeger, M.; De Mérona, B.; Boudou, A. 2001. Gold-mining activities and mercury contamination of native Amerindian communities in French Guiana: Key role of fish in dietary uptake. *Environmental Health Perspectives*, 109(5), 449–456.

Garesse, R.; Carrodegua, J. A.; Santiago, J.; Perez, M. L.; Marco, R.; Vallej, C.G. 1997. *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comparative Biochemistry Physiology*, 117: 357-366.

Gosline, W. A. 1945. Catálogo dos Nematognatos de água doce da América do Sul e Central. Boletim do Museu Nacional, Rio de Janeiro, *Zoologia*, 33: 1-138.

Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history*. University California Press, Berkley, CA, USA. 280pp.

Gray, M. W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review Cell and Biology*, 5: 25-50.

Habib, M.; Lakra, W. S.; Mohindra, V.; Lal, K. K.; Punia, P.; Singh, R. K.; Khan, A. A. 2012. Assessment of ATPase 8 and ATPase 6 mtDNA Sequences in Genetic Diversity Studies of *Channa Marulius* (Channidae: Perciformes). *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, India Section B: Biological Sciences 82(4): 497-501.

Hahn, N. S.; Fugi, R.; Andrian, I. F. 2004. Trophic ecology of the fish assemblages. Pp. 247-259. *In*: Thomaz, S. M., Agostinho, A. A.; Hahn, N. S. (Eds.). The Upper Paraná River and its Floodplain: Physical aspects, Ecology and Conservation. *Backhuys Publishers*, Leiden. 393pp.

Hardman, M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 37: 700-720.

Hebert, P. D. N.; Ratnasingham, S.; de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series Biological Sciences*. 270: 596-599.

Jondeung, A.; Sangthong, P.; Zardoya, R. 2007. The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene*, 387(1-2), 49–57.

Jordan, D. S. 1923. A classification of fishes, including families and genera as far as known. Stanford University Publications, University Series, Biological Sciences 3(2): 77-243.

Júnior, H. F. J.; Tós, C. D.; Agostinho, Â. A.; Pavanelli, C. S. 2009. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, 7(4), 709–718.

La Cépède, B. G. E. 1803. Historie naturelle des poissons. Paris, Chez Plassan, Vol. 5. Imprimeur-Libraire. lxxvii + 803 p., 21 pls.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. 1995. *Princípios de bioquímica*. Editora Sarvier, São Paulo. 839pp.

Martin, A. P.; Bermingham, E. 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of neotropical catfish. *Proceedings of the Royal Society*. 267: 1135-1141.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. n. 2. p. 1-38.

- Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura: Brasil 2011. *IBAMA. Brasília*. 60pp.
- Miranda Ribeiro, A. 1911. Fauna Brasiliense. Peixes IV (A). Eleuterobranchios Aspirophoros. *Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*. 16: 1-504.
- Miranda-Ribeiro, P. 1968. Apontamentos Ictiológicos III. Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro (*Série Zoologia*), 263: 1-14.
- Miya, M.; Takeshima, H.; Endo, H.; Ishiguro, N. B.; Inoue, J. G.; Mukai, T.; Satoh, T. P.; Yamaguchi, M.; Kawaguchi, A.; Mabuchi, K.; Shirai, S. M.; Nishida, M. 2003. Major Patterns of Higher Teleostean Phylogenies: a New Perspective Based on 100 Complete Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1): 121-38.
- Moyer, G. R.; Burr, B. M.; Krajewski, C. 2004. Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 551–575.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc. Alberta, Canada. 601pp.
- de Pinna, M. C. C. 1993. High-level phylogeny of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi), with a new classification of the order. Tese de Doutorado. Universidade de Nova York, Nova York, 482pp.
- Rapp Py-Daniel, L.H.; Cox Fernandes, C. 2005. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. *Acta Amazônica*, 35(1): 97-110.
- Regan, C. T. 1911. The classification of teleostean fishes of the order Ostariophysi. 2. Siluroidea. *Annals and Magazine of Natural History* 8(8):553-577.
- Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. Jr. 2003 (*Eds.*). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. *Edipucrs*, Porto Alegre. 729pp.
- Ribeiro, F. R. V.; Rapp Py-Daniel, L. H. R. 2010. *Ageneiosus uranophthalmus*, a new species of auchenipterid catfish (Osteichthyes: Siluriformes) from river channels of the central Amazon basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 8(1), 97–104.
- Ribeiro, F. R. V. 2011. Sistemática do gênero *Ageneiosus* La Cépède (Siluriformes:

Auchenipteridae). Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 355pp.

Sá-Oliveira, J. C.; Maciel, A. G. P.; Araújo, A. S. De; Isaac-Nahum, V. J. 2014. Dieta do Mandubé, *Ageneiosus ucayalensis* (Castelnau, 1855), (Osteichthyes : Auchenipteridae) do Reservatório da Usina Hidrelétrica Coaracy Nunes, Ferreira Gomes-Amapá, Brasil. *Biota Amazônica*, 4(3), 73–82.

Stryer, L. 1988. *Bioquímica*. 3a edição: Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, Brasil. 595pp.

Sullivan, J. P.; Lundberg, J. G.; Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 636–62.

Van der Stigchel, J. W. R. 1946. The South American Nematognathi of the Museums at Leiden and Amsterdam, *E.J. Brill*, Leiden. 204pp.

Walsh, S. J. 1990. A Systematic Revision of the Neotropical Catfish Family Ageneiosidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). Tese de Doutorado. Universidade de Florida, Gainesville. 363pp.

Ward, R. D.; Holmes, B. H. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 899–907.

Wolstenholme, D. R.; Clary, D. O. 1985. Sequence Evolution of Drosophila Mitochondrial DNA. *Genetics*, 109, 725–744.

ANEXO 1

Lista de exemplares com DNA sequenciados e disponibilizados pela ANSP, Academy of Natural Science, Philadelphia; INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; MCP, Coleção de Peixes do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS; ROM, Royal Ontario Museum; UNIR, Universidade de Rondônia.

ESPÉCIE	N	DRENAGEM	MUNICÍPIO	LOCAL COLETA	Coordenadas Latitude	Coordenadas Longitude	VOUCHER
<i>Ageneiosus atronasus</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Cautário	12°12'5.2"S	64°35'27.6"W	UNIR 13955
<i>Ageneiosus atronasus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Cautário	12°12'5.2"S	64°35'27.6"W	UNIR 20239
<i>Ageneiosus atronasus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Karipunas Foz	9°11'30.6"S	64°37'27.1"W	UNIR 17923
<i>Ageneiosus atronasus</i>	2	Rio Madeira	Nova Olinda do Norte	Lago Sampaio	3°50'24.5"S	59°10'11.3"W	-
<i>Ageneiosus atronasus</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Reservatório antigo JFF	8°52'12.6"S	64°4'12.4"W	-
<i>Ageneiosus atronasus</i>	2	Rio Purus	Turiação	Rio Purus	4°59'27.7"S	62°58'0.5"W	INPA 41814
<i>Ageneiosus brevis</i>	3	Rio Madeira	Porto Velho	Karipunas Foz	9°11'30.6"S	64°37'27.1"W	UNIR 16312
<i>Ageneiosus brevis</i>	4	Rio Madeira	Nova Olinda do Norte	Lago Sampaio	3°50'24.5"S	59°10'11.3"W	-
<i>Ageneiosus brevis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Reservatório da UHE Santo Antonio	8°47'34.4"S	63°58'10.9"W	-
<i>Ageneiosus brevis</i>	2	Rio Purus	Turiação	Rio Purus, canal	5°00'56.0"S	62°58'58"W	INPA 41751
<i>Ageneiosus dentatus</i>	7	Baixo Solimões	Irlanduba	Catalão	3°09'49.3"S	59°54'42.7"W	-
<i>Ageneiosus dentatus</i>	2	Rio Purus	Turiação	Ig. Castanhalzinho	4°59'50"S	62°59'38"W	INPA 41634
<i>Ageneiosus dentatus</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Daraá	0°25'2.0"S	64°46'20.5"W	INPA 37768
<i>Ageneiosus inermis</i>	4	Rio Araguaia	Araguatins	Col. Pesc. Araguaatins	5°38'56.3"S	48°08'1.47"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Araguaia	Baião	Baião	2°47'27.9"S	49°40'56"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Negro	Manaus	Careiro/Ceasa	3°11'58.6"S	59°49'43.2"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	6	Baixo Solimões	Irlanduba	Catalão	3°9'49.3"S	59°54'42.7"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	2	Rio Araguaia	Sta Isabel	Com./pescador Sta Isabel	1°7'35.1"S	48°30'56.1"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Tapajós	Aveiro	Igapó na margem esquerda do rio	3°17'45.6"S	55°18'07.3"W	INPA 41615
<i>Ageneiosus inermis</i>	4	Rio Purus	Turiação	Ig. Castanhalzinho	4°59'50"S	62°59'38"W	INPA 41633
<i>Ageneiosus inermis</i>	5	Rio Araguaia	Itaipava	Itaipava	6°46'24.5"S	48°57'33.7"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Karipunas Foz	9°11'30.6"S	64°37'27"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Purus	Turiação	Lago Jacinto	05°43'18"S	63°14'04"W	INPA 41818
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Litanie	Sipalawini	Konya Kondre	3°17'24"S	54°04' 38"W	ANSP 187115
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Litanie	Sipalawini	Konya Kondre	3°17'24"S	54°04' 38"W	ANSP 189090

<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Trombetas	Oriximiná	Margem direita do rio Trombetas	1°27'57.5"	56°49'43" W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Pacaas Novas	10°51'45.6"S	65°16'14.8"W	UNIR 20214
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Purus	Turiação	Rio Ipixuna	5°42'12" S	63°17'37" W	INPA 41927
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Rio Jaciparaná, Montante	9°52'43"S	64°19'24.8"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Rio Machado, Montante	11°27'21.5"S	61°26'38.3"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Madeira	Manicoré	Rio Marmelos	6°8'47.3"S	61°47'11.6"W	UNIR 20425
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Madeira	Manicoré	Rio Marmelos	6°8'47.3"S	61°47'11.6"W	UNIR 20309
<i>Ageneiosus inermis</i>	9	Rio Tapajós	Itaituba/Jatobá	Rio Tapajós	5°9'33.1"S	56°50'51.9"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	3	Rio Tapajós	Itaituba	Rio Tapajós	4°17'0.2"S	55°59'15.2"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Xingu	Altamira	Rio Xingu	03°39'19.4"S	52°23'30.1"W	ANSP 193024
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	São Lorenzo	9°21'55.2"S	64°50'51.7"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Araguaia	Sta Isabel	Sta Isabel	1°7'35.1"S	48°30'56.1"W	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Calha do rio Dahará	00°24'57.2"S	64°46'11.4"W	INPA 37809
<i>Ageneiosus militaris</i>	1	Rio Uruguai	Itaqui	Rio Ibicuí	29°23'60"S	56°42'02.7"W	MCP 28423
<i>Ageneiosus piperatus</i>	1	Rio Rupununi	Lethem	Yupukari	3°39'47.0"S	59°20'27.5"W	ROM 86042
<i>Ageneiosus piperatus</i>	5	Rio Purus	Turiação	Rio Ipixuna	5°42'12"S	63°17'37"W	INPA 41946
<i>Ageneiosus polystictus</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Preto	0°07'11.3"S	64°05'46.6"W	INPA 46714
<i>Ageneiosus polystictus</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Paraná do rio Negro	0°22'44.4"S	65°13'13.3"W	INPA 46716
<i>Ageneiosus polystictus</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Ig. de água preta	0°22'59"S	65°11'12"W	INPA 46718
<i>Ageneiosus polystictus</i>	1	Rio Waini	Santa Cruz	Santa Cruz, abaixo	7°39'60"S	59°14'09.1"W	ROM 66265
<i>Ageneiosus polystictus</i>	3	Rio Negro	Barcelos	Rio Aracá	00°24'55.6"S	62°54'21.7"W	INPA 46725
<i>Ageneiosus rondoni</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Ig. do Arara	10°00'58.5"S	65°18'45.9"W	UNIR 9570
<i>Ageneiosus rondoni</i>	1	Rio Purus	Turiação	Ig. do Panelão	5°02'30"S	63°00'59"W	INPA 41761
<i>Ageneiosus sp.</i>	18	Alto Solimões	Tabatinga	Bodega de Tabatinga	4°15'25.1"S	69°56'59.6"W	-
<i>Ageneiosus sp.</i>	4	Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	Cruzeiro do Sul	7°38'20"S	72°39'54.8"W	-
<i>Ageneiosus sp.</i>	3	Baixo Amazonas	Santarém	Tablado, Lago Grande	2°31'41.3"S	56°29'11"W	-
<i>Ageneiosus sp.</i>	1	Baixo Amazonas	Santarém	Tablado, Lago Pacoval	2°17'36.1"S	54°39'18.3"W	-
<i>Ageneiosus sp.</i>	5	Baixo Amazonas	Santarém	Tablado, Santarém	2°24'59.9"S	54°42'09.9"W	-
<i>Ageneiosus sp. (juvenil)</i>	1	Rio Negro	Barcelos	Rio Demini	0°24'46"S	62°53'46.3"W	INPA 46729
<i>Ageneiosus sp. n. "anal curta"</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Darahá, calha	00°25'51"S	64°45'46"W	INPA 37811
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. atronasus"</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Rio Jaciparaná, Foz	9°12'08"S	64°23'14"W	-
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. brevis"</i>	2	Rio Purus	Turiação	Rio Purus	5°00'56"S	62°58'58"W	INPA 41751
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. brevis"</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Cautário	12°12'5.2"S	64°35'27.7"W	-
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. brevis"</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Reservatório antigo JAT	8°52'12.6"S	64°41'12.4"W	-

<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	3	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Preto	0°07'11.3"S	64°05'46.6"W	INPA 46715
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Boca do Rio Marauíá	0°22'16"S	65°11'12"W	INPA 46723
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	4	Rio Purus	Turiação	Ig. Castanhalzinho	4°59'50"S	62°59'38"W	INPA 41632
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	1	Rio Negro	Barcelos	Rio Demini	00°23'52.7"S	62°51'46.1"W	INPA 46726
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	2	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Preto	0°07'11.3"S	64°05'46.6"W	INPA 46713
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Daraá, boca	0°26'13.4"S	64°45'35.4"W	INPA 46722
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	1	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Calha do rio Dahará	0°24'57.2"S	64°46'11.4"W	INPA 37810
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	2	Rio Negro	Barcelos	Rio Jufari	0°07'11.3"S	64°05'46.6"W	INPA 46727
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	1	Rio Purus	Turiação	Ig. Castanhalzinho	4°59'50"S	62°59'38"W	INPA 41635
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	2	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Ig. de água preta	0°22'59"S	65°11'12"W	INPA 46719
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	10	Rio Purus	Turiação	Rio Ipixuna, boca do ig. Jiboia	5°42'12"S	63°17'37"W	INPA 41928
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	5	Rio Purus	Turiação	Rio Purus, canal	5°00'56"S	62°58'58"W	INPA 41702
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Belmonte Foz	8°38'33.7"S	63°50'58, 5"W	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Ig. Jatuarana 2	8°38'43.4"S	63°54'56,6"W	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Karipuna Montante	9°11'30.5"S	64°37'27.0"W	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Lagoa Cuniã	8°19'13.7"S	63°28'18.5"W	UNIR 17914
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Mutumparaná	9°36'38.5"S	64°55'30.9"W	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	3	Rio Madeira	Porto Velho	Rio Jaciparaná, Foz	9°12'08"S	64°23'14"W	UNIR 7088
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Aripuanã	Aripuanã	5°8'3.5"S	60°24'03.7"W	UNIR 8717
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Belmonte Foz	8°38'33.7"S	63°50'58.5"W	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	7	Baixo Solimões	Iranduba	Catalão	3°9'49.3"S	59°54'42.7"W	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Cautário	12°12'5.2"S	64°35'27.7"W	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Nova Olinda do Norte	Lago Sampaio	3°50'24.5"S	59°10'11.3"W	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Pacaas Novas	10°51'45.6"S	65°16'14.8"W	UNIR 16393
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Reservatório antigo JAT	8°52'12.6"S	64°04'12.4"W	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Reservatório da UHE Santo Antonio	8°47'34.4"S	63°58'10.9"W	UNIR 14113
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Rio Machado Foz	8°4'58.6"S	62°52'35.7"W	UNIR 7251
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	2	Rio Purus	Turiação	Rio Purus, canal	5°00'56"S	62°58'58"W	INPA 41698
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	3	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Rio Preto	0°07'11.3"S	64°05'46.6"W	INPA 46711
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	3	Rio Negro	Barcelos	Rio Aracá	0°24'8.5"S	62°56'01.6"W	-
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	3	Rio Madeira	Porto Velho	Cautário	12°12'5.24"S	64°35'27.7"W	UNIR 14299
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Reservatório da UHE Santo Antonio	8°47'34.47"	63°58'10.9"W	-
<i>Ageneiosus vittatus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Belmonte Foz	8°38'33.7"S	63°50'58.5"W	UNIR 7217
<i>Ageneiosus vittatus</i>	1	Rio Madeira	Porto Velho	Cautário	12°12'5.24"S	64°35'27.7"W	UNIR 16034
<i>Ageneiosus vittatus</i>	2	Rio Madeira	Porto Velho	Rio Jaciparaná (Foz Foz)	9°12'08"S	64°23'14"W	-
<i>Auchenipterichthys longimanus</i>	2	Rio Jatapu	Itacoatiara	Rio Jatapu	2°17'54"S	58°17'39.3"W	INPA 37269
<i>Auchenipterichthys punctatus</i>	2	Rio Negro	Sta Isabel do Rio Negro	Pé da cachoeira do Aracú	00°25'26"S	64°46'20.5"W	INPA 37765

ANEXO 2

Lista de exemplares utilizados com os marcadores COI e ATPase, disponibilizados pela ANSP, Academy of Natural Science, Philadelphia; INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; MCP, Coleção de Peixes do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS; ROM, Royal Ontario Museum; UNIR, Universidade de Rondônia.

ESPÉCIE	MUNICÍPIO	DRENAGEM	LOCAL COLETA	# DNA	COI	ATPse	VOUCHER
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16783	1	0	UNIR 13955
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16784	0	1	-
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16813	1	1	UNIR 20239
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Karipunas Foz	16797	1	1	UNIR 17923
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Nova Olinda do Norte	Rio Madeira	Lago Sampaio	16823	1	1	-
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório antigo JAT	16794	0	1	UNIR 14047
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório antigo JFF	16788	0	1	UNIR 3691
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório antigo JFF	16809	1	0	-
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus	102381	1	0	INPA 41814
<i>Ageneiosus atronasus</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus	102382	0	1	INPA 41814
<i>Ageneiosus brevis</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16793	0	1	-
<i>Ageneiosus brevis</i>	Nova Olinda do Norte	Rio Madeira	Lago Sampaio	16760	1	1	-
<i>Ageneiosus brevis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório da UHE Santo Antonio	16812	1	1	-
<i>Ageneiosus brevis</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus, canal	102280	1	1	INPA 41751
<i>Ageneiosus dentatus</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16056	0	1	-
<i>Ageneiosus dentatus</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16057	1	0	-
<i>Ageneiosus dentatus</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16058	0	1	-
<i>Ageneiosus dentatus</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16067	0	1	-
<i>Ageneiosus dentatus</i>	Turiação	Rio Purus	Ig. Castanhalzinho	102034	1	1	INPA 41634
<i>Ageneiosus dentatus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Pé da cachoeira do Aracú	100836	1	1	INPA 37768
<i>Ageneiosus inermis</i>	Araguatins	Rio Araguaia	Araguatins	13450	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Baião	Rio Araguaia	Baião	13580	1	0	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Careiro	Alto Amazonas	Careiro	16376	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16050	0	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16053	1	0	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Irlanduba	Alto Amazonas	Catalão	16054	0	1	-

<i>Ageneiosus inermis</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16767	0	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Araguatins	Rio Araguaia	Col. Pesc. Araguaatins	13319	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Santa Isabel	Rio Araguaia	Com./pescador Sta Isabel	12859	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Cruzeiro do Sul	Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	8994	0	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Aveiro	Rio Tapajós	Igapó da margem esquerda	104391	1	0	INPA 41615
<i>Ageneiosus inermis</i>	Turiação	Rio Purus	Ig. Castanhalzinho	101987	1	1	INPA 41633
<i>Ageneiosus inermis</i>	Itaipava	Rio Araguaia	Itaipava	13406	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Karipunas Foz	16815	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Turiação	Rio Purus	Lago Jacinto	102397	1	1	INPA 41818
<i>Ageneiosus inermis</i>	Nova Olinda do Norte	Rio Madeira	Lago Sampaio	16770	0	1	UNIR 8711
<i>Ageneiosus inermis</i>	Sipalawini	Rio Litanie	Konya Kondre	23042	1	1	ANSP 187115
<i>Ageneiosus inermis</i>	Oriximiná	Rio Trombetas	Ig. Água Fria	105692	1	0	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Guajará-Mirim	Rio Madeira	Pacaas Novas	16814	1	1	UNIR 20214
<i>Ageneiosus inermis</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Ipixuna	102789	1	1	INPA 41927
<i>Ageneiosus inermis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Rio Jaciparaná Montante	16773	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Presidente Médice	Rio Madeira	Rio Machado Montante	16820	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Manicoré	Rio Madeira	Rio Marmelos	16805	1	1	UNIR 20425
<i>Ageneiosus inermis</i>	Itaituba	Rio Tapajós	Rio Tapajós	15989	0	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Itaituba	Rio Tapajós	Rio Tapajós	16000	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Itaituba	Rio Tapajós	Rio Tapajós	18773	0	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Itaituba	Rio Tapajós	Rio Tapajós	18775	1	0	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Altamira	Rio Xingu	Rio Xingu	23044	1	1	ANSP 193024
<i>Ageneiosus inermis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	São Lorenço	16785	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Santa Isabel	Rio Araguaia	Sta Isabel	13475	1	0	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Itaituba	Rio Tapajós	Rio Tapajós	17688	1	0	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Tabatinga	Alto Solimoes	Bodega de Tabatinga	15321	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Cruzeiro do Sul	Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	8986	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Santarém	Baixo Amazonas	Tablado, Lago Grande	15828	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Santarém	Baixo Amazonas	Tablado, Lago Pacoval	15803	1	1	-
<i>Ageneiosus inermis</i>	Santarém	Baixo Amazonas	Tablado, Santarém	15806	1	1	-
<i>Ageneiosus militaris</i>	Itaqui	Rio Uruguai	Rio Ibicuí	23050	1	1	MCP 28423
<i>Ageneiosus piperatus</i>	Lethem	Rio Rupununi	Yupukari	23048	1	1	ROM 86042
<i>Ageneiosus piperatus</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Ipixuna	104152	1	1	INPA 41946
<i>Ageneiosus piperatus</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Ipixuna	104156	1	0	INPA 41946
<i>Ageneiosus polystictus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Preto	19579	1	0	INPA 46714
<i>Ageneiosus polystictus</i>	Barcelos	Rio Negro	Rio Demini	19635	1	0	-
<i>Ageneiosus polystictus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Paraná do rio Negro	19515	1	0	INPA 46716
<i>Ageneiosus polystictus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Calha do rio Dahará	100806	1	1	INPA 37809
<i>Ageneiosus polystictus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Ig. de água preta	19447	1	0	INPA 46718

<i>Ageneiosus polystictus</i>	Santa Cruz	Rio Waini	Santa Cruz	23049	1	1	ROM 66265
<i>Ageneiosus polystictus</i>	Barcelos	Rio Negro	Rio Aracá	19652	1	0	INPA 46725
<i>Ageneiosus rondoni</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Ig. do Arara	16764	1	1	UNIR 9570
<i>Ageneiosus rondoni</i>	Turiação	Rio Purus	Ig. do Panelão	102165	1	1	INPA 41761
<i>Ageneiosus rondoni</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Karipunas Foz	16800	1	1	UNIR 16312
<i>Ageneiosus rondoni</i>	Nova Olinda do Norte	Rio Madeira	Lago Sampaio	16787	0	1	UNIR 6868
<i>Ageneiosus sp.</i>	Cruzeiro do Sul	Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	8984	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. "anal curta"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Preto	19590	0	1	INPA 46712
<i>Ageneiosus sp. n. "anal curta"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Darahá, calha	100804	1	1	INPA 37811
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. atronasus"</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Rio Jaciparaná (Foz)	16775	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. brevis"</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário*	16818	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. brevis"</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório antigo JAT	16817	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. "gr. brevis"</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus	103997	1	0	INPA 41751
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Preto	19587	1	0	INPA 46715
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Boca do Rio Maraujá	19442	1	0	INPA 46723
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	Turiação	Rio Purus	Ig. Castanhalzinho	102033	1	1	INPA 41632
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	Turiação	Rio Purus	Ig. Castanhalzinho	102013	0	1	INPA 41632
<i>Ageneiosus sp. n. "projetada"</i>	Barcelos	Rio Negro	Rio Demini	19662	1	0	INPA 46726
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Preto	19580	0	1	INPA 46713
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Preto	19582	1	0	INPA 46713
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Daraá, boca	19535	1	0	INPA 46722
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Calha do rio Dahará	100805	1	1	INPA 37810
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Barcelos	Rio Negro	Rio Jufari	19671	1	0	INPA 46727
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Turiação	Rio Purus	Ig. Castanhalzinho	102032	1	1	INPA 41635
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Ig. de água preta	19449	1	0	INPA 46719
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Lagoa Cuniã	16801	1	1	UNIR 17914
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Ipixuna	102779	1	0	INPA 41928
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Ipixuna	102787	0	1	INPA 41928
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Rio Jaciparaná Foz	16781	1	1	UNIR 7088
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Manicoré	Rio Madeira	Rio Manicoré	16786	0	1	UNIR 7660
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus, canal	102266	1	0	INPA 41702
<i>Ageneiosus sp. n. "Walsh"</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus, canal	102270	0	1	INPA 41702
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Belmonte Foz	16819	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Ig. Jatuarana 2	16816	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Karipuna Montante	16766	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Lagoa Cuniã	16777	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Mutumparaná	16765	1	1	-
<i>Ageneiosus sp. n. vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Rio Jaciparaná (Foz)	16774	1	1	-

<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Aripuanã	Rio Madeira	Aripuanã	16769	1	1	UNIR 8717
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Belmonte Foz	16808	1	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Irاندوبا	Alto Amazonas	Catalão	16066	1	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Irاندوبا	Alto Amazonas	Catalão	23047	1	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16796	1	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Nova Olinda do Norte	Rio Madeira	Lago Sampaio	16779	1	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Guajará-Mirim	Rio Madeira	Pacaas Novas	16804	1	1	UNIR 16393
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório antigo JAT	16806	1	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório da UHE Santo Antonio	16789	1	1	UNIR 14113
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Rio Machado Foz	16782	1	1	UNIR 7251
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Manicoré	Rio Madeira	Rio Marmelos	16790	0	1	-
<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	Turiação	Rio Purus	Rio Purus, canal	102282	1	1	INPA 41698
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Rio Preto	19583	1	0	INPA 46711
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16768	1	1	UNIR 14299
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16791	1	1	-
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Ig. Jaturana	16803	0	1	UNIR 17223
<i>Ageneiosus uranophthalmus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Reservatório da UHE Santo Antonio	16795	1	1	-
<i>Ageneiosus vittatus</i>	Cruzeiro do Sul	Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	9000	0	1	-
<i>Ageneiosus vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Belmonte Foz	16780	1	1	UNIR 7217
<i>Ageneiosus vittatus</i>	Costa Marques	Rio Madeira	Cautário	16802	1	1	UNIR 16034
<i>Ageneiosus vittatus</i>	Porto Velho	Rio Madeira	Rio Jaciparaná Foz	16771	1	1	-
<i>Auchenipterichthys longimanus</i>	Itacoatiara	Rio Jatapu	Rio Jatapu	100658	1	1	INPA 37269
<i>Auchenipterichthys longimanus</i>	Itacoatiara	Rio Jatapu	Rio Jatapu	100672	1	1	INPA 37269
<i>Auchenipterichthys punctatus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Pé da cachoeira do Aracú	100755	1	1	INPA 37765
<i>Auchenipterichthys punctatus</i>	Santa Isabel do Rio Negro	Rio Negro	Pé da cachoeira do Aracú	100762	1	1	INPA 37765