

Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD)

Hermes Pineda Santis¹, Biol; Diego Pareja Molina¹, Biol; Martha Olivera Ángel¹, MV, Dr. Cien. Agr; Juan Builes Gómez², Biol, MSc.

¹Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción Universidad de Antioquia AA 1226. Medellín, Colombia.

²Laboratorio Genes Ltda. CC Monterrey Oficina 612. Medellín, Colombia
hpinedas@agronica.udea.edu.co

(Recibido: 21 julio, 2004; aceptado: 19 enero, 2004)

Resumen

*La información sobre la relación taxonómica entre especies de peces es fundamental para una identificación de las poblaciones naturales. La familia Characidae es un grupo de peces ampliamente distribuido en Centro y Suramérica el cual debe ser identificado, clasificado y preservado. En este estudio fue utilizado el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD) para evaluar la relación taxonómica en cuatro especies tropicales de peces continentales localizados en el territorio colombiano, los cuales pertenecen a la familia Characidae; subfamilia Bryconinae: *Brycon moorei* y *Brycon henni*; y subfamilia Serrasalminae: *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus*. Treinta y cuatro de cuarenta iniciadores con secuencias de diez nucleótidos al azar (RAPD) produjeron 2.129 fragmentos amplificados de ADN, de los cuales 428 fueron identificados como marcadores específicos que discriminaron entre géneros y especies. El perfil de fragmentos mostró que *Brycon moorei* se separó del grupo de *Brycon henni*, y dentro de este último grupo fue posible discriminar entre muestras de dos diferentes cuencas; ríos Magdalena y río Cauca. *Piaractus brachypomus* y *Colossoma macropomum* se separaron de forma independiente y distante de la subfamilia Bryconinae. Además, dentro del grupo de *Piaractus brachypomus* fue posible discriminar entre individuos provenientes de medio natural o de cultivo. La técnica de RAPD permitió un acercamiento a la sistemática de estas especies con miras a una apropiada identificación.*

Palabras clave: *Brycon spp., Colossoma spp., Piaractus spp., sistemática.*

Introducción

La genética molecular tiene un impacto significativo en el campo de la taxonomía en muchas áreas de la biología actual, entre ellas, la caracterización y relación de las especies, y los mecanismos de especiación (12). Las especies de peces, en el orden de los Characiformes, son morfológicamente diversas debido a variantes en la forma del cuerpo, estructura de la mandíbula, número y disposición de los dientes y en la anatomía interna (33), lo que hace confusa y tediosa su identificación mediante la comparación de los caracteres continuos o discretos. Adicionalmente, la escasa información acerca de la relación filogenética dentro de muchos grupos de peces, y el desconocimiento preciso de la diversidad íctica en

vastas regiones de Centro y Suramérica no han permitido hacer una recopilación definitiva en muchos de ellos (32). En el orden Characiformes no hay un consenso sobre la clasificación de las familias, y hay diferentes puntos de vista sobre la interrelación de las subfamilias, aún así, las revisiones de Vari y Malabarba (32) y Orti y Vari (27) proveen una alternativa taxonómica relevante sobre sus posibles relaciones (15). La familia Characidae es actualmente considerada como una entidad no monofilética (14, 25), pero existen algunos subgrupos monofiléticos bien soportados, como es el caso de la subfamilia Serrasalminae, el cual incluye los géneros *Colossoma*, *Piaractus*, *Mylossoma*, *Myleus*, *Serrasalmus*,

Pristobrycon, entre otros (16, 17, 26). Otro género considerado como monofilético es *Brycon* (18), con gran distribución en ríos de Centro América, y las cuencas de Suramérica como Paraná, Orinoco y Amazonas (13).

Los primeros registros sobre la fauna íctica colombiana fueron realizados por europeos alrededor del año 1750, en los cuales se describieron los peces mayores y más comunes para la alimentación; más recientemente, Dalh (4) y Gery (10) realizaron descripciones morfológicas y ecológicas de gran importancia científica en varias especies nativas siguiendo los cursos de los ríos Magdalena y Cauca (2). Actualmente, se han hecho pocos estudios para conocer la base genética de los peces colombianos y su relación taxonómica con miras a una precisa definición de los individuos como especie.

El concepto de especie, unidad fundamental de clasificación, se refiere a un organismo en la nomenclatura científica plenamente identificado, que deja por fuera otras definiciones como subespecie, semiespecie, superespecie o especie compleja que no reflejan la realidad objetiva de la clasificación (24). En este estudio se sigue la definición de especies biológicas evolutivas como «grupos de individuos (poblaciones) que bajo condiciones naturales están reproductivamente aisladas, o potencialmente lo son, de otros grupos similares, y como tales son linajes evolutivos separados por discontinuidad irreversible», el cual resume los conceptos de especies evolutivas (20) y biológicas (21).

La técnica de Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD), ha sido una herramienta útil para establecer relaciones filogenéticas entre organismos cercanamente relacionados (3, 11, 19), por lo que se considera apropiada para obtener un acercamiento a la relación filogenética en peces (Characiformes, Characidae). RAPD consiste de una amplificación de pequeños fragmentos de ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) esparcidos a lo largo del genoma, utilizando un único iniciador de secuencia arbitraria (34, 35). Es un método sensible para detectar variación, sin embargo, su propiedad de dominante y su inestabilidad en la repetición debido a la calidad del ADN, rango de temperaturas y condiciones de PCR han limitado su uso; sin embargo, una vez estandarizados los procesos su valor informativo es relevante (12).

El interés de este estudio fue evaluar la relación taxonómica de cuatro especies de peces, pertenecientes a la familia Characidae; subfamilias Serrasalminae y Bryconinae, localizados en aguas continentales colombianas, para contribuir a su identificación y clasificación taxonómica mediante el uso de la técnica de RAPD.

Materiales y métodos

Especies

Individuos de cuatro especies de la familia Characidae fueron considerados para el análisis de relación taxonómica, siguiendo la clasificación registrada hasta Diciembre de 2003 en el GENBANK (9); dos especies pertenecen a la subfamilia Bryconinae; *Brycon moorei*, conocida como Dorada y *Brycon henni*, identificada como Sabaleta. El género *Brycon spp.* es un grupo de peces de aguas continentales con alrededor de cuarenta especies válidas según la taxonomía clásica (13), once de las cuales han sido reportadas en los ríos Amazonas, Atrato, Cauca, Dagua, San Juan, Sinú, Magdalena, Meta, Mira, Orinoco y Patía en Colombia (1, 13). Las otras dos especies de la subfamilia Serrasalminae; *Colossoma macropomum*, identificada como Cachama Negra y *Piaractus brachypomus*, conocida como Cachama Blanca, son originarias de pequeños y grandes ríos que fluyen a las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas, y actualmente son de alto valor comercial en la acuicultura colombiana (28).

Origen de las muestras

Los 105 individuos utilizados fueron identificados mediante sus características externas siguiendo la taxonomía descrita por Dalh (4) y Gery (10). El número de individuos por subfamilia y origen se relacionan en la tabla 1.

Extracción de ADN

De cada individuo se obtuvo 1 ml de sangre, en un tubo que contenía TNES (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0, SDS 1%) (7). El ADN genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Miller *et al* (22), con las siguientes modificaciones; a 30 ml de sangre, se adicionaron 500 ml de tampón de lisis (TNES) y 20 ml de proteinasa K (20 mg/ml). La solución se dejó en baño maría por 24

horas a 56°C, luego se adicionaron 100 ml de 5 M NaCl seguido de vortex por 20 segundos, se centrifugó a 14000 rpm durante cinco minutos. Al sobrenadante se le adicionó el mismo volumen de isopropanol 100%, se mezcló por inversión y se dejó dos horas a -20°C, luego se centrifugó a 14000 rpm durante cinco minutos, el precipitado obtenido fue lavado con 300 ml de etanol 70%, centrifugado nuevamente y eliminado el sobrenadante, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 70

ml de agua ultrapura. La calidad del ADN se observó mediante la migración de la muestra en un gel de agarosa 1% en un campo eléctrico constante de 80 V durante 30 minutos, y su cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (PerkinElmer®, USA). Para conocer la variación genética total en cada muestra, se preparó para cada una de ellas una mezcla de ADN que contenía 10 ml (50 ng/ml) de cada uno de los individuos que integraron cada grupo.

Tabla 1. Relación de especies, origen y número de individuos en este estudio.

Espece	Origen	Número de individuos
Subfamilia Bryconinae		
Genero Brycon spp.		
1. Brycon moorei	Río Magdalena (Inmediaciones de Montería) 75° 53' W 8° 45' N	5
2. Brycon henni	Estación Piscícola de San Carlos (Antioquia) 74° 59' W 6° 11' N	10
3. Brycon henni	Río Piedras (Jericó - Antioquia) 75° 47' W 5° 47' N	10
4. Brycon henni	Quebrada la Humarada 1 (Puerto Berrío - Antioquia) 74° 24' W 6° 29' N	10
5. Brycon henni	Quebrada la Humarada 2 (Puerto Berrío - Antioquia) 74° 24' W 6° 29' N	10
6. Brycon henni	Quebrada la Clara (Gómez Plata - Antioquia) 75° 13' W 6° 41' N	10
7. Brycon henni	Quebrada Guaracú (San Jerónimo - Antioquia) 75° 43' W 6° 26' N	10
Subfamilia Serrasalminae		
Genero Colossoma spp.		
8. Colossoma macropomum	Estación Piscícola de San José del Nus (San Roque - Antioquia) 75° 1' W 6° 29' N	10
Subfamilia Serrasalminae		
Genero Piaractus spp.		
9. Piaractus brachypomus	Estación Piscícola de San José del Nus (San Roque - Antioquia) 75° 1' W 6° 29' N	10
10. Piaractus brachypomus	Estación Piscícola A (Villavicencio - Meta) 73° 38' W 4° 9' N	15
11. Piaractus brachypomus	Estación Piscícola B (Villavicencio - Meta) 73° 38' W 4° 9' N	15
12. Piaractus brachypomus	Estación Piscícola C (Villavicencio - Meta) 73° 38' W 4° 9' N	5
13. Piaractus brachypomus	Estación Piscícola D (Villavicencio - Meta) 73° 38' W 4° 9' N	10
Total		105

Condiciones de amplificación

La reacción de amplificación de ADN fue realizada en un termociclador PTC 100 (MJ Research®), con el siguiente rango de temperaturas modificado de Yu y Pauls (36): un ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido

de 35 ciclos: 94°C por 35 segundos, 36°C por 35 segundos y 72°C por un minuto. El volumen de reacción fue de 25 ml que contenía: 10 ng de ADN molde, 10 pmol del iniciador de RAPD a probar, 1 unidad de Taq

ADN polimerasa (Promega[®], USA), 0.2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Promega[®], USA), 2 mM de MgCl (Promega[®], USA) y 2.5 ml de tampón Taq 10X. Un control negativo, con todos los reactivos excepto el DNA molde, fue incluido en todas las amplificaciones. Las condiciones de reacción fueron estandarizadas con resultados similares en los casos repetidos.

Detección de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida al 4%. Para conocer el tamaño de cada uno de los fragmentos de ADN obtenido se utilizó un marcador de peso molecular de ADN (30), y su visualización se hizo mediante tinción con plata (Promega[®], USA) siguiendo el protocolo descrito por Dinesh *et al.*, (5). La lectura de los geles fue realizada por dos personas de forma independiente.

Análisis de los datos

Dos kits de 20 iniciadores cada uno (OPA y OPB) con un tamaño de 10 nucleótidos por iniciador, con al menos 60-70% de contenidos de GC, fueron adquiridos de Operon Technologies[®], USA. Sólo se consideraron los fragmentos intensos y reproducibles entre 222 y 2.645 pb (véase Figura 1), los cuales fueron registrados como 1 (presencia) ó 0 (ausencia). Los iniciadores de RAPD que no produjeron fragmentos nítidos fueron OPA-12, OPB-02, OPB-03, OPB-09, OPB-16 y OPB-19.

Los valores de Distancia Genética se calcularon mediante la fórmula de Nei y Li (23):

$$DG_{ij} = 1 - [2n_{ij} / (n_i + n_j)]$$

\ donde n_{ij} es el número total de fragmentos compartidos por dos grupos, y n_i y n_j son el número total de fragmentos en los grupos i y j , respectivamente. El soporte de ramas, el cual representa la confiabilidad de la relación existente entre los grupos comparados (6, 8) del dendrograma Neighbour Joining (NJ) (29) fue obtenido mediante 10.000 réplicas con el programa de computador PAUP* 4.0 (31).

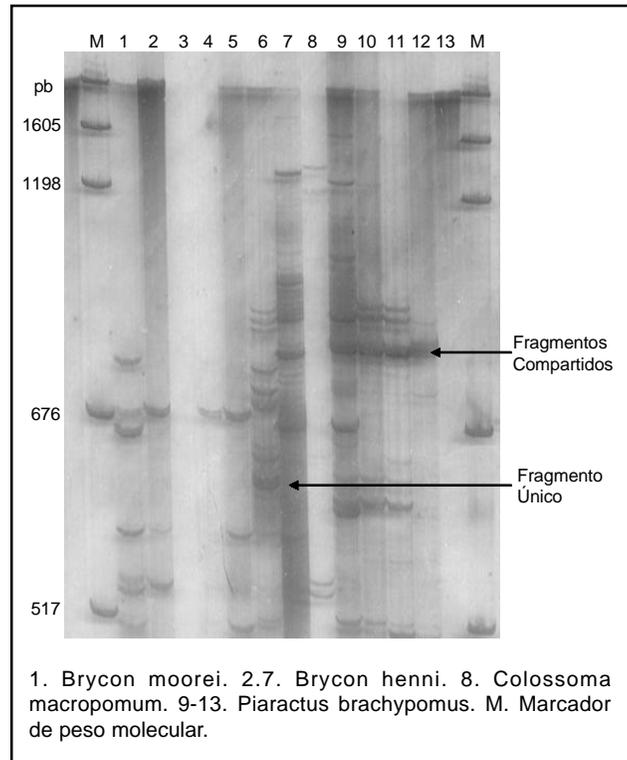


Figura 1. Fragmentos de RAPD obtenidos en varias especies de peces colombianos. Iniciador OPA-10.

Resultados

Treinta y cuatro (85%) de los cuarenta diferentes iniciadores de RAPD utilizados, produjeron 2.129 fragmentos amplificados reproducibles y consistentes de ADN, de los cuales 428 correspondieron a fragmentos únicos (véase Tabla 2), sugiriendo un alto número de fragmentos amplificados para estas subfamilias de peces.

Subfamilia Bryconinae

Brycon moorei presentó una mayor cantidad de fragmentos totales y únicos (238 y 94, respectivamente), con relación a los encontrados en *Brycon henni* (véase Tabla 2), los iniciadores que discriminaron entre las dos especies fueron OPA-03, OPA-04 y OPB-17, y las distancias genéticas oscilaron entre 0.26 y 0.51 (véase Tabla 3). En el grupo de individuos de *Brycon henni*, un número mayor y menor de fragmentos se registró en los individuos de las muestras de la quebrada La Humarada 1 y La Guaracú con 211 y 19 fragmentos, respectivamente (véase Tabla 2). Así mismo, un número mayor y menor de fragmentos únicos se presentó en los individuos

provenientes del río Piedras y la quebrada La Guaracú con 34 y 0 fragmentos con porcentajes que oscilaron entre 17.2 y 0%, respectivamente (véase Tabla 2). De otra parte, la mayor y menor distancia genética encontrada oscilaron entre los individuos de las muestras de las quebradas La Humarada 2 y La Guaracú (DG= 0.47) y La Humarada 1 y La Humarada 2 (DG= 0.07), respectivamente (véase Tabla 3).

Subfamilia Serrasalminae

Los individuos de la muestra de *Colossoma macropomum* presentaron 264 y 103 fragmentos

totales y únicos, respectivamente (véase Tabla 2), un número superior con relación al obtenido en los individuos de las muestras de *Piaractus brachypomus*. Las distancias genéticas entre las dos especies oscilaron entre 0.24 y 0.54 (véase Tabla 3), y los iniciadores que los discriminaron fueron OPB-14, OPB-18 y OPB-20. En las muestras de *Piaractus brachypomus*, se presentó un número mayor de fragmentos totales y únicos (261 y 57, respectivamente), en los individuos de la muestra de la estación piscícola de San José del Nus, y menor en los individuos de la estación piscícola C (46 y 7, respectivamente) (véase Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los fragmentos de ADN amplificados por PCR obtenidos con 34 iniciadores RAPD en cuatro especies de peces tropicales.

Lugares de muestreo	No. de fragmentos totales registrados	No. promedio de fragmentos por iniciador	No. de fragmentos únicos	Porcentaje de fragmentos únicos
Brycon moorei				
1. Río Magdalena	238	7.0	94	39.5
Brycon henni				
2. Estación Piscícola en San Carlos	208	6.1	32	15.4
3. Río Piedras	198	5.8	34	17.2
4. Quebrada La Humarada 1	211	6.2	14	6.6
5. Quebrada La Humarada 2	190	5.6	17	8.9
6. Quebrada La Clara	134	3.9	13	9.7
7. Quebrada La Guaracú	19	0.6	0	0
Colossoma macropomum				
8. Estación Piscícola San José del Nus	264	7.8	103	39.0
Piaractus brachypomus				
9. Estación Piscícola San José del Nus	261	7.7	57	21.8
10. Estación Piscícola A	130	3.8	18	13.8
11. Estación Piscícola B	61	1.8	12	19.7
12. Estación Piscícola C	46	1.4	7	15.2
13. Estación Piscícola D	169	5.0	27	16.0
Total	2129	—	428	—

El dendrograma NJ obtenido en este estudio presentó valores de 61, 72 y 84 para discriminar entre las especies comparadas, esto es, *Brycon henni*, *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* y *Brycon moorei*, respectivamente (véase Figura 2). Igualmente, se discriminó entre individuos de una

misma especie con diferente origen, (p.e. el soporte de rama 88 separó los individuos de *Brycon henni* provenientes de dos diferentes cuencas, y el soporte de rama 81 apartó los individuos de *Piaractus brachypomus* provenientes del medio natural y del cultivo (véase Figura 2).

Tabla 3. Distancia Genética de Nei y Li (23) entre cuatro especies de la familia Characidae obtenidos mediante la amplificación de 34 iniciadores de RAPD.

Origen de las muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Brycon moorei													
1. Río Magdalena	—												
Brycon henni													
2. Estación Piscícola San Carlos	0.27	—											
3. Río Piedras	0.26	0.18	—										
4. Quebrada La Humarada 1	0.28	0.12	0.11	—									
5. Quebrada La Humarada 2	0.30	0.14	0.12	0.07	—								
6. Quebrada La Clara	0.29	0.20	0.15	0.13	0.11	—							
7. Quebrada La Guaracú	0.51	0.46	0.41	0.44	0.47	0.37	—						
Colossoma macropomum													
8. Estación Piscícola San José del Nus	0.26	0.29	0.26	0.29	0.29	0.29	0.67	—					
Piaractus brachypomus													
9. Estación Piscícola San José del Nus	0.26	0.23	0.28	0.24	0.27	0.31	0.55	0.24	—				
10. Estación Piscícola A	0.31	0.28	0.30	0.29	0.30	0.31	0.50	0.32	0.15	—			
11. Estación Piscícola B	0.56	0.40	0.41	0.39	0.38	0.34	0.65	0.54	0.32	0.20	—		
12. Estación Piscícola C	0.55	0.56	0.50	0.53	0.52	0.50	0.48	0.53	0.40	0.24	0.25	—	
13. Estación Piscícola D	0.29	0.27	0.35	0.33	0.33	0.33	0.54	0.28	0.16	0.16	0.24	0.22	—

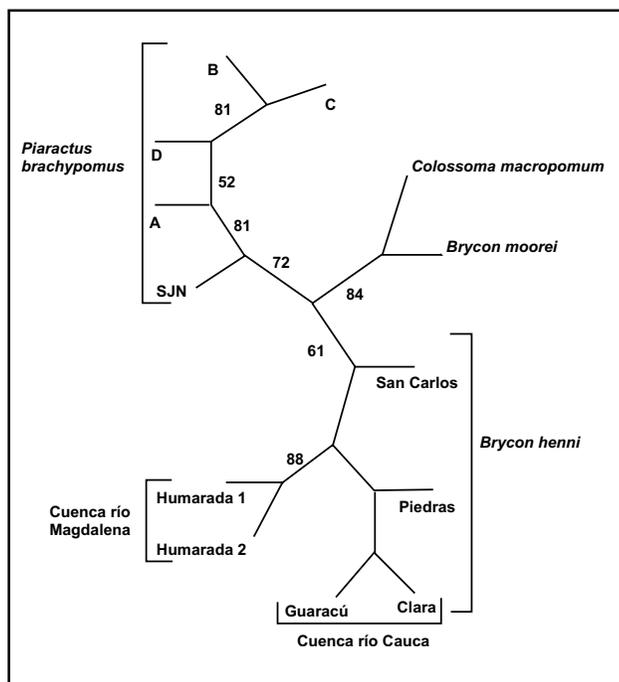


Figura 2. Dendrograma radial Neighbour-Joining (NJ) mostrando la relación entre cuatro especies de peces de la familia Characidae. Soporte de ramas 10.000 réplicas.

Discusión

El número de fragmentos totales de ADN amplificados por iniciadores de RAPD indicaron que existe una considerable variación genética para las

especies estudiadas, pocas veces reportado en especies ícticas, lo cual contribuye a resolver las relaciones taxonómicas entre especies. Los fragmentos únicos pueden ser considerados como marcadores moleculares específicos, responsables de la variación y capaces de discriminar entre géneros y especies dentro de la familia Characidae debido a la secuencia del iniciador utilizado (véase Figura 2).

Los fragmentos únicos de RAPD obtenidos separaron los individuos de *Brycon moorei* del grupo general de individuos *Brycon henni* (véase Figura 2), lo cual confirmó la relación taxonómica realizada mediante caracteres morfológicos por Dahl (4), Gery (10) y Howes (13). Por otra parte, se obtuvieron fragmentos únicos capaces de diferenciar individuos de *Brycon henni* procedentes de dos diferentes cuencas, ríos Cauca y Magdalena (véase Figura 2), lo que confirmó el poder discriminatorio de los iniciadores de RAPD. Algunas de las muestras reúnen condiciones atípicas que no permitieron su agrupamiento a las fuentes naturales de donde se originaron (véase Figura 2), debido a la intervención del hombre como cruces indiscriminados entre individuos de diferente procedencia (estación piscícola de San Carlos), y la construcción de represas antes de la desembocadura que altera el patrón de fragmentos original (río Piedras).

Este estudio confirmó la separación taxonómica de los géneros *Piaractus spp.* y *Colossoma spp.* propuesto por Machado Allison (17) mediante características morfométricas, y Orti *et al* (26) por medio de la comparación de secuencias de ARN ribosomal. Los individuos de *Piaractus brachypomus* obtenidos de las estaciones piscícolas en los Llanos Orientales (A, B, C y D), presentaron un menor número de fragmentos totales y únicos respecto a los individuos de la muestra control (SJN) (véase Tabla 2), debido posiblemente, a una intensa labor de reproducción artificial y al cruzamiento de un mismo grupo de reproductores cercanamente relacionados, ocasionando una homogeneización o aparición de fragmentos comunes en los descendientes (28).

Si bien el soporte de ramas no alcanzó el nivel de confiabilidad de 95% (8), el número de réplicas utilizado (10.000), proporcionó para cada bifurcación de especies una buena certeza de la relación existente entre ellas.

La técnica de RAPD fue apropiada para discriminar entre especies del género *Brycon spp.* (*Brycon moorei* vs *Brycon henni*), e individuos *Brycon henni* de dos diferentes cuencas (ríos Magdalena y Cauca); así mismo, para diferenciar individuos pertenecientes a la subfamilia Serrasalminae, géneros *Piaractus spp.* y *Colossoma spp.* y separar individuos de *Piaractus brachypomus* provenientes del medio natural o del cultivo.

Agradecimientos

Agradecemos a las siguientes personas por su colaboración con la toma de muestras; Amparo Echeverry, Camilo Prieto, Fabián Marín, Gustavo Lenis, Javier Cardona, Lucy Arboleda y Nora Salazar. Este trabajo tuvo el apoyo económico del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) Universidad de Antioquia, COLCIENCIAS (contrato N° 1115-09-10859) y Laboratorio Genes Ltda, Medellín.

Summary

Contribution taxonomic relationship of the among four fish species of the family Characidae by the use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

*Information on taxonomic relationship among fish species is fundamental for an identification of wild populations. The family Characidae is a fish group widely distributed in Central and South America which must be identified, classified and preserved. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in this was used study to evaluate the taxonomic relationship in four tropical freshwater fish species located in Colombian territory, which belong to the family Characidae; subfamily Bryconinae: *Brycon moorei* and *Brycon henni*; and subfamily Serrasalminae: *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus*. Thirty four out of forty primers with sequences of ten nucleotides at random (RAPD) yielded 2.129 amplified DNA fragments, 428 of them were identified as specific markers that discriminated between genus and species. The fragment profiles showed that *Brycon moorei* got apart from the *Brycon henni* group, and inside this last group was possible to discriminate between samples from two different riverbasins; Magdalena and Cauca rivers. *Piaractus brachypomus* and *Colossoma macropomum* got apart from each other and distant from the subfamily Bryconinae. Furthermore, inside the *Piaractus brachypomus* group was possible to discriminate among individuals from the wild or the culture. The RAPD technique allowed an approach to the systematics in these species toward an appropriate identification.*

Key words: *Brycon spp.*, *Colossoma spp.*, *Piaractus spp.*, sistemáticas.

Referencias

1. Álvarez López F, Duque Pérez J. La Sabaleta y su cultivo en estanques. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Sede Medellín. 1989. 45p.
2. Cala P. La ictiofauna dulceacuícola de Colombia: una visión histórica y su estado actual. Rev Acad Colom Ccias 1987; 16:69-84.

3. Callejas C, Ochando MD. Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* 2002; 89:36-43.
4. Dahl G. Los peces del norte de Colombia. Bogotá. Litografía Arco. 1971.
5. Dinesh KR, Lim TM, Chua KL, Chan WK, Phang VPE. RAPD analysis: an efficient method of ADN fingerprinting in fishes. *Zoological Sc.* 1993; 10:849-854.
6. Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann Statist*, 1979; 7:1-26.
7. Estoup A, Presa P, Kreig F, Vaiman D, Guyomard R. (CT)_n and (GT)_n microsatellite: a new class of genetic markers for Brown trout (*Salmo trutta L.*). *Heredity* 1993; 7:1029- 1039.
8. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783-791.
9. GENBANK. Taxonomic relationship among species. Diciembre 2003. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
10. Gery J. Characoids of the world. New Jersey. Publications Inc. Ltd. 1977.
11. Gomes C, Dales RBG, Oxenford HA. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Mol Ecol* 1998; 7:1029-1039.
12. Hillis DM, Moritz C, Mable BK. Eds. Molecular systematics. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 655pp. 1996.
13. Howes G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull. Br Mus (Nat Hist) Zool.* 1982; 43:1-47.
14. Lucenas CAS. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussao dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo. 1993; pp. 158.
15. Lundberg JG. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: Malabarba LR *et al.* (eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil. 1998; pp49-68.
16. Machado Allison A, Fink WL. Sinopsis de las especies de la familia Serrasalminae presentes en la cuenca del Orinoco: claves, diagnosis e ilustraciones. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 1995. 102p.
17. Machado Allison A. Estudios sobre la familia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte I. Discusión sobre la condición monofilética de la subfamilia. *Acta Biol Venez* 1983; 11:145-196.
18. Malabarba MC. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé formation. Sao Paulo, Brazil. In: Malabarba LR *et al.* (eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil. 1998.
19. Mamuris Z, Stamatis C, Bani M, Triantaphyllidis C. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA. *J Fish Biol.* 1999; 55: 572-587.
20. Mayden RL, Wood RM. Systematics, species concepts and the evolutionary significant unit in biodiversity and conservation biology. *Am. Fish. Soc. Symp.* 1995; 17:58-113.
21. Mayr E, Ashlock PD. Principles of systematic zoology. New York. McGraw-Hill. 1991. 475p.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16:1215.
23. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76:5269-5273.
24. Nelson JS. Editorial and introduction: the species concept in fish biology. *Rev Fish Biol and Fisheries* 1999; 9:277-280.
25. Ortí G, Meyer A. The radiation of Characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst Biol* 1997; 46.
26. Orti G, Petry P, Porto JIR, Jegu M, Meyer A. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J Mol. Evol.* 1996; 42: 169-182.
27. Ortí G, Vari RP. Characiformes. In: D. & W. Maddison (eds), *The tree of life: a distributed Internet project containing information about phylogeny and biodiversity*. Internet address: URL: <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>. 1996.
28. Pineda Santis H, Pareja Molina D, Builes Gómez J, Olivera Ángel M. Análisis de la variación genética en *Piaractus brachipomus* (Pisces: Characidae) en estaciones piscícolas colombianas mediante RAPD. En revisión.
29. Saitou N, Nei M. The Neighbor Joining method: a method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4:406-425.
30. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 3^a ed. V. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. 2001.
31. Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4.0. Sunderland (MA). Sinauer Ass., 1996.
32. Vari L, Malabarba LR. Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR *et al.* (eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil. 1998; pp1-11.
33. Vari L. Higher level phylogenetic concepts within Characiforms (Ostariophysi), a historical review. In: Malabarba LR *et al.* (eds). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil. 1998; pp111-122.
34. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 7213-7218.
35. Williams JGK, Kubelik MK, Licak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 1990; 18: 6531-6535.
36. Yu K, Pauls KP. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res* 1993; 20:2606.