

Diferenciación genética de *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* (Pisces, Merlucciidae) y antecedentes paleogeográficos de su área de distribución

Genetic differentiation of *Merluccius gayi gayi* and *Merluccius gayi peruanus* (Pisces, Merlucciidae) and paleogeographic antecedent of their distribution area

CRISTIAN HERNANDEZ^{1,2}, RICARDO GALLEGUILLOS³ & CIRO OYARZUN³

¹Universidad Católica de la Santísima Concepción, Facultad de Ciencias, Casilla 297, Concepción-Chile. ²Dirección actual: Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología, Casilla 114-D, Santiago-Chile, e-mail: chernand@genes.bio.puc.cl
³Universidad de Concepción, Departamento de Oceanografía, Casilla 160-C, Concepción-Chile.

RESUMEN

Se han planteado variadas hipótesis sobre relaciones taxonómicas entre las especies de *Merluccius*, proponiéndose la existencia de dos subespecies *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* en el Pacífico Sureste; aunque hasta el momento no existen evidencias suficientes que respalden tal hipótesis. En el presente trabajo se analizan las diferencias genéticas entre ambas subespecies mediante electroforesis de proteínas. Se procesaron 25 individuos de *M. gayi gayi* de la zona de Talcahuano (Chile) y 25 individuos de *M. gayi peruanus* del Puerto de Paita (Perú). Se detectó el producto génico de 33 loci homólogos. Los taxa presentan movilidad diferencial de los alelos en los loci monomórficos EM-2*, AP-1* y CA-1* y en el locus polimórfico EST-3*. *Merluccius gayi gayi* resultó ser el taxón con mayor variabilidad, con un polimorfismo de 24% y una media de heterocigosidad esperada de 0,072. *Merluccius gayi peruanus* presentó un polimorfismo de 18% y una media de heterocigosidad esperada de 0,037. La identidad genética entre los taxa fue 0,873, de donde se estima un tiempo de separación que va entre 900.000 y 2.000.000 de años (Pleistoceno). En conjunto con la información paleogeográfica, se postulan relaciones biogeográficas históricas.

Palabras clave: merluza, distancia genética, paleobiogeografía, Chile.

ABSTRACT

There are several hypotheses about the taxonomic relationships among the *Merluccius* species. These hypotheses have proposed the occurrence of two subspecies in the South-eastern Pacific (*Merluccius gayi gayi* and *Merluccius gayi peruanus*), however there are not sufficient evidences that support such hypotheses. In this work the genetic differences between the subspecies is analyzed using protein electrophoresis. Twenty-five individual of *M. gayi gayi* from Talcahuano (Chile) and the same number of *M. gayi peruanus* from the Port of Paita (Peru) were analyzed. It was detected the genic product of 33 loci homologous. The taxa showed a differential mobility in the monomorphic loci EM-2*, AP-1* and AC-1* and the polymorphic locus EST-3*. *Merluccius gayi gayi* exhibited a greater variability when compared to *M. g. peruanus* (24% of polymorphism and 0.075 mean heterozygosity waited for *M. g. gayi* and 18% of polymorphism and 0.042 mean heterozygosity waited for *M. g. peruanus*). The genetic identity among the taxa was 0.873, with an estimated separation time between 900,000 to 2,000,000 years (Pleistocene). The relationships between both taxa were analyzed in light of the historical biogeographical events.

Key words: hake, genetic distance, paleobiogeography, Chile.

INTRODUCCION

El género *Merluccius* (Rafinesque 1810) es el más diverso de la familia Merlucciidae, con 12 especies (Cohen et al. 1990), a las cuales se sumaría *M. hernandezii* (ver Mathews 1985), sien-

do considerado como un género conflictivo en cuanto sus relaciones taxonómicas y filogenéticas (Inada 1989, Paterson & Rosen 1989). Un ejemplo de esto lo presenta la especie *M. gayi* (Guichenot 1848), que inicialmente fue identificada como *Merlus gayi*. Kaup (1858) la incorpo-

ró al género *Merluccius*. Por la imprecisión de los límites geográficos, esta especie fue confundida con *M. hubbsi* Marini, 1933 de Argentina. Norman (1937) restringió su distribución conocida a las costas de Chile y Perú, llegando a confundirse con *M. angustimanus* Garman, 1899 de Panamá. Hildebrand (1946) describió la especie en detalle y discutió sus diferencias con *M. productus* (Ayres 1855) del Pacífico Norte, *M. hubbsi* y *M. angustimanus* (ver revisión de Inada 1981).

Ginsburg (1954) reconoció dos subespecies en *Merluccius gayi*: *M. gayi gayi* (Guichenot 1848) y *M. gayi peruanus* Ginsburg, 1954, que habitan aguas de Chile y Perú, respectivamente (Leible 1979). Leible (1979) analizó la morfometría de ambos taxa y no encontró diferencias significativas para la clasificación subespecífica, pero planteó que la separación geográfica aconsejaba mantener la nomenclatura trinomial. Sin embargo, Inada (1981) encontró diferencias significativas en dos caracteres merísticos (número de vértebras y de branquiespinas).

Las subespecies (*M. g. gayi* y *M. g. peruanus*) presentan una distribución alopátrica, con una separación geográfica superior a los 1.300 km (Leible 1979), la que se superpone con la cuenca de Chile-Perú. De hecho, al considerar las últimas revisiones en cuanto a la distribución de estas taxa se estimaría una separación mínima de 1.000 km, dado que el taxon del Perú (*M. g. peruanus*) se distribuye entre los 6°S y los 14°S (Espino et al. 1995) y el taxon de Chile (*M. g. gayi*) entre los 23° 39'S y los 47° 0'S (Aguayo 1995) (Fig. 1).

Las hipótesis biogeográficas que explicarían el origen de *M. gayi* han sido planteadas por Szidat (1955), Inada (1981), Kabata & Ho (1981), Fernández (1985), Ho (1990) y Stepien & Rosenblatt (1996). Exceptuando a Szidat (1955), quien plantea un origen desde el Pacífico, estos autores proponen que se habría originado desde un "stock" ancestral del Atlántico que migró hacia el Pacífico, a través del Istmo de Panamá.

Aunque, Kabata & Ho (1981) y Ho (1990), basados en información parasitológica, sugieren que este paso se habría dado en el Oligoceno (24 a 38 millones de años atrás); mientras que Inada (1981) utilizando información osteológica, y Stepien & Rosenblatt (1996) usando información genética, postulan el Plioceno (2 a 6 millones de años). Sin embargo, no se ha propuesto una hipótesis que intente explicar el origen de las subespecies.

Hasta el momento sólo se han realizado estudios de caracteres merísticos y morfométricos en la determinación de las subespecies de *M. gayi*, expresiones fenotípicas que pueden ser modifica-

das por la interacción genotipo-ambiente (Lewontin 1984). Por esta razón, el análisis de estos caracteres no descifran si lo que observamos es producto del ambiente y tiempo actual (escala de tiempo ecológico) ó de los ambientes ocupados por los organismos durante su historia evolutiva y las presiones selectivas del pasado (escala de tiempo evolutivo), que podrían haber provocado su diferenciación.

Entre los nuevos estudios posibles de realizar para resolver los problemas sistemáticos que encierran estas subespecies están los que utilizan información genética y los que utilizan información parasitológica. Con respecto a los primeros, Galleguillos et al. (1999) y Oyarzún (1997) determinaron la homogeneidad genética poblacional para *M. g. gayi* en las costas de Chile. Con respecto a los últimos, existen avances en la comparación de la parasitofauna de merluzas de Chile (George-Nascimento 1996) y en la descripción de la parasitofauna de la merluza del Perú (Durán & Oliva 1980). En el presente trabajo se analiza la diferenciación genética de ambos taxa, se estima el tiempo de separación de las subespecies y se discute los resultados considerando los antecedentes paleogeográficos del área de distribución.

MATERIALES Y METODOS

Para analizar la diferenciación genética de los taxa se tomó una muestra de 25 individuos de *M. g. gayi* de la zona de Talcahuano (Chile) (36° 42' 14" S; 73° 05' W) y se recolectaron 25 individuos

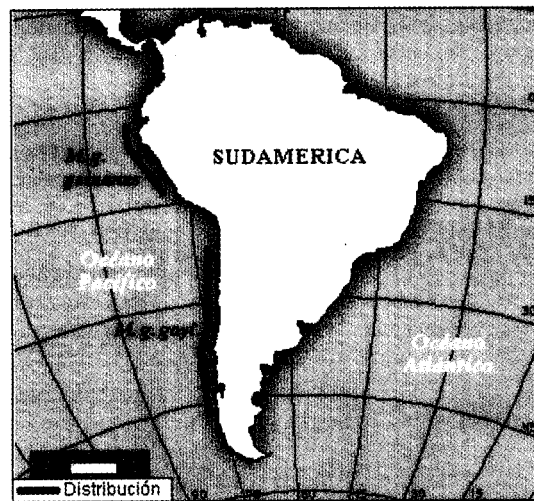


Fig. 1. Distribución geográfica (trazos negros) de las subespecies *M. gayi peruanus* y *M. gayi gayi*. Geographical distribution (black outlines) of the subspecies *M. gayi peruanus* and *M. gayi gayi*.

TABLA 1

Sistemas enzimáticos estandarizados para las merluzas, código internacional (E.C.), soluciones tampón empleadas y loci resueltos. Donde: P = Polimórfico, M = Monomórfico, - = Sin actividad

Enzymatic systems for hakes, international code (EC), solutions employed tampon and loci solved. In which: P = polymorphic, M = Monomorphic, - = Non activity

Enzima	EC	Tampón	Locus	<i>M. g. gayi</i>	<i>M. g. peruanus</i>
Alcohol deshidrogenasa	1.1.1.1	Tris cítrico pH 7,0	ADH-1*	M	M
			ADH-2*	M	M
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.2	Tris cítrico pH 7,0	IDH-1*	M	M
Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa	1.1.1.8	Tris cítrico pH 7,0	G3PDH-1*	M	M
			G3PDH-2*	M	M
Sorbitol deshidrogenasa	1.1.1.14	Histidina pH 7,0	SDH-1*	M	M
			SDH-2*	M	M
Lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	Histidina pH 7,0	LDH-1*	M	M
			LDH-2*	M	M
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	Tris cítrico pH 7,0	MDH-1*	M	M
			MDH-2*	P	P
Enzima málica	1.1.1.40	Tris cítrico pH 7,0	EM-1*	M	M
			EM-2*	M	M
Fosfo gluconato deshidrogenasa	1.1.1.49	Tris cítrico pH 7,0	6PGDH-1*	M	M
Tetrazolio oxidasa	1.15.1.1	Tris cítrico pH 7,0	TO-1*	M	M
Aspartato aminotransferasa	2.6.1.1	Tris cítrico pH 7,0	AAT-1*	M	M
Fosfoglucomutasa	2.7.5.1	Tris cítrico pH 7,0	PGM-1*	P	P
Esterasa	3.1.1.1	Poulik pH 8,6	EST-1*	-	M
			EST-2*	M	M
			EST-3*	P	P
			EST-4*	M	M
Amino peptidasa	3.1.3.1	Litio pH 8,3	AP-1*	M	M
			AP-2*	M	M
			AP-3*	-	M
Anhidrasa carbónica	4.2.1.1	Litio pH 8,3	CA-1*	M	M
			CA-2*	P	M
			CA-3*	M	M
Glioxalasa	4.4.1.5	Poulik pH 8,6	GLIOX-1*	M	M
Fosfoglucoisomerasa	5.3.1.9	Tris cítrico pH 7,0	GPI-1*	P	P
			GPI-2*	M	M
Proteínas totales	—	Litio pH 8,3	PT-0*	-	M
			PT-1*	M	M
			PT-2*	M	M
			PT-3*	M	M
			PT-4*	P	P
			PT-5*	P	M

de *M. g. peruanus* del Puerto de Paita en Perú (5° 05' S; 81° 10' W).

Las merluzas se mantuvieron a -20° C. A cada individuo se le extrajo un trozo de músculo esquelético. Posteriormente, se homogeneizó y centrifugó una porción de cada trozo y el sobrenadante se absorbió con papel filtro, para ser montado en un gel de almidón al 12 % y aplicar la técnica de electroforesis horizontal. Las proteínas fueron teñidas siguiendo las técnicas histoquímicas de Harris & Hopkinson (1976) y Ward & Galleguillos (1983). Se determinó el

tampón con mejor resolución, los loci de cada taxón y el carácter monomórfico o polimórfico de cada locus (Tabla 1). La nomenclatura de las enzimas está de acuerdo a las sugerencias de Shaklee et al. (1990). Los alelos de cada locus se denominaron según su aparición en el gel desde el origen, como A, B y C respectivamente. Se consideró polimórfico a aquellos loci cuya frecuencia del alelo más común fue menor o igual a 0,95.

Se compararon los taxa en cuanto a su heterocigosidad y polimorfismo, además, se calcularon los índices estándar de Identidad (I) y

Distancia genética (D) (Nei 1978), utilizando el programa BIOSYS 1.7 (Swofford & Selander 1989). A partir de estos índices se calculó el tiempo de separación de acuerdo a la hipótesis del reloj molecular (Nei 1978), usando las estimaciones de tiempo propuestas por Vawter et al. (1980) y por Smith & Coss (1984).

RESULTADOS

Para la subespecie *M. g. gayi* se determinaron 27 loci enzimáticos y 5 loci de proteínas estructurales (Tabla 1). Se observaron 5 loci enzimáticos polimórficos (MDH-2*, PGM-1*, EST-3*, CA-2*, GPI-1*). De éstos, el locus GPI-1* fue el que presentó la mayor heterocigosidad esperada de acuerdo a Hardy-Weinberg (0,49) y sólo el locus PT-4* no se ajustó a las frecuencias esperadas ($P = 0,04$) (Tabla 2). Esta subespecie presentó la mayor variabilidad genética, tanto por su polimorfismo (24%) como por su media de heterocigosidad esperada según Hardy-Weinberg ($0,072 \pm 0,018$).

En *M. g. peruanus* se analizaron 6 loci de proteínas totales y 29 loci enzimáticos, de los cuales 3 resultaron polimórficos (PGM-1*, EST-3*, GPI-1*). Todos los loci de este taxón se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,1$) (Tabla 2). El valor de heterocigosidad esperado más alto se determinó para el locus GPI-1* (0,44). Respecto de la variabilidad genética, esta subespecie presentó un polimorfismo de 18% y una media de heterocigosidad esperada de $0,037 \pm 0,018$, valores más bajos que los encontrados para *M. g. gayi*.

Del total de loci observados, 3 monomórficos (EM-2*, AP-1* y CA-1*) y uno polimórfico (EST-3*) no presentaron alelos compartidos por los dos taxa, constituyéndose en marcadores genéticos de tipo diagnóstico. Ambos taxa presentaron alelos únicos para otros marcadores, aunque de baja frecuencia (Tabla 2). Cabe destacar que los loci EST-1*, AP-3* y PT-0*, sólo se observaron en *M. g. peruanus*, constituyéndose en caracteres diagnósticos para este taxón. Las diferencias en variabilidad genética presentadas y las diferencias en migración de los alelos, permitió determinar una identidad genética (I) de 0,873 y una distancia genética (D) de 0,136, lo que llevado a tiempo de separación, de acuerdo a la hipótesis del reloj molecular, correspondería a una divergencia evolutiva de 900.000 a 2.000.000 de años entre *M. g. gayi* y *M. g. peruanus*.

DISCUSION

Los valores relativamente bajos de heterocigosidad observados en el presente trabajo coinciden con los obtenidos en otras especies de merluzas (Shaklee et al. 1982). Es así como *M. g. peruanus* posee una heterocigosidad muy semejante a la encontrada para *M. productus* ($0,041 \pm 0,012$) (Stepien & Rosenblatt 1996), pero más baja que la obtenida para las especies *M. australis* (Hutton 1872) ($0,044 \pm 0,016$) (Hernández 1996), *M. capensis* (0,051), *M. paradoxus* (0,063) (Grant et al. 1988), *M. hubbsi* ($0,066 \pm 0,02$) y para una muestra de *M. g. gayi* ($0,051 \pm 0,015$) del Pacífico Sureste (Stepiens & Rosenblatt 1996). Por otra parte, la muestra de *M. g. gayi* analizada en este estudio presentó valores de heterocigosidad y polimorfismo mayores a los encontrados para todas las especies citadas más arriba. La homogeneidad genética de *M. g. gayi* en la costa de Chile ha sido verificada por Galleguillos et al. (1999), lo que también ha sido reafirmado mediante análisis del ADN mitocondrial (Oyarzún 1997). También la variabilidad morfológica ha sido analizada presentándose patrones de variabilidad propios de una especie de amplia distribución latitudinal (Oyarzún 1997), sin llegar a constituir grupos discretos.

La distribución alopatrica de los grupos geográficos que componen la especie *M. gayi*, la información genético poblacional, el número de branquiespinas y el número promedio de sustituciones alélicas que es el resultado de la evolución independiente de los taxa (Nei 1978, Ayala & Kiger 1980, Buth 1984), permiten confirmar la categoría a lo menos subespecífica para las merluzas Chilena y Peruana.

Los valores de distancia genética obtenidos para estas subespecies, se asemejan a los encontrados en el reconocimiento subespecífico para miembros de la familia Pleuronectidae (Ward & Galleguillos 1983) y para el género *Lepomis* (Avise & Smith 1977). Por otra parte, la existencia de tres loci únicos para *M. g. peruanus* permiten reafirmar su condición subespecífica, concordando con la propuesta original de Ginsburg (1954).

El valor de distancia genética encontrado, es muy similar al informado por Stepien & Rosenblatt (1996) para la comparación entre las especies *M. gayi* y *M. productus* ($D = 0,132$). Pero menor al informado por los mismos autores al comparar *M. gayi* con *M. hubbsi* ($D = 0,276$) y *M. hubbsi* con *M. productus* ($D = 0,367$), y menor que los informados por Hernández (1996) entre *M. australis* y *M. g. gayi* ($D = 0,430$) y *M. australis* con *M. g. peruanus* ($D = 0,330$). Esta situación podría estar demostrando que en realidad los taxa de merluzas

del Pacífico Oriental se encuentran en una etapa avanzada de especiación y que su estatus taxonómico corresponde al nivel subespecífico. Aunque se requiere de otros estudios, como la comparación del ADN mitocondrial, para sustentar o rechazar un nivel taxonómico específico.

Según lo propuesto por Inada (1981), Kabata & Ho (1981), Fernández (1985), Ho (1990) y Stepien & Rosenblatt (1996), los taxa de merluzas del Pacífico Oriental se habrían originado de una población ancestral que migró inicialmente hacia el Pacífico a través del Istmo de Panamá, el cual

TABLA 2

Frecuencias alélicas de los loci polimórficos y monomórficos diagnósticos, coeficiente de exceso o deficiencia de heterocigotos con respecto a lo esperado según Hardy-Weinberg (d) y nivel de significancia de la desviación. ($P < 0,05 = (*)$)

Allelic frequency of the polymorphic and diagnostic monomorphic loci, coefficients for heterozygote deficiency or excess with respect to Hardy-Weinberg equilibrium (d) and level of significance of the deviation. ($P < 0,05 = (*)$)

Locus	Alelo	<i>M. g. gayi</i>	(d)	<i>M. g. peruanus</i>	(d)
EM-2*	A	-----		1,000	
	B	1,000		-----	
AP-1*	A	1,000		-----	
	B	-----		1,000	
CA-1*	A	-----		1,000	
	B	1,000		-----	
G3PDH-2*	A	0,977		1,000	
	B	0,023		-----	
MDH-2*	A	0,917		0,960	
	B	0,021		-----	
	C	0,063	0,050	0,040	0,021
PGM-1*	A	0,917		0,900	
	B	0,042		0,060	
	C	0,042		-----	
	D	-----	0,044	0,040	0,061
EST-3*	A	-----		0,940	
	B	-----		0,060	
	C	0,875		-----	
	D	0,125	0,119	-----	0,043
CA-2*	A	0,700		1,000	
	B	0,300	0,286	-----	
GPI-1*	A	-----		0,020	
	B	0,600		0,700	
	C	0,400	-0,347	0,280	0,091
GPI-2*	A	1,000		0,980	
	B	-----		0,020	
P.T-4*	A	0,700		0,760	
	B	0,300	0,400(*)	0,240	0,289
P.T-5*	A	0,722		1,000	
	B	0,278	-0,192	-----	

se cerró en el Plioceno, hace 3 millones de años (Kennett 1982).

El nivel de diferenciación genética encontrado para las subespecies de *M. gayi*, equivale a una separación de entre 900.000 y 2.000.000 de años, lo que permitiría establecer que la población ancestral, estuvo ligada inicialmente a la plataforma continental del norte del Perú, y su migración hacia el sur estuvo inicialmente restringida por la gran cuenca Chile-Perú, evento geográfico formado antes del Mesozoico. Esta barrera geográfica restringiría la plataforma continental, zona a la cual se asocian las especies de merluzas por hábitos alimenticios y reproductivos (Stepien & Rosenblatt 1996). De acuerdo a los tiempos de separación estimados, esta barrera pudo haber sido flanqueada durante alguno de los períodos interglaciales en que subió el nivel del mar durante el Pleistoceno. Esta hipótesis es respaldada por la información paleogeográfica, ya que según Cecioni (1970), durante el Pleistoceno el mar avanzó en áreas de las costas del norte de Chile y el sur del Perú, lo que habría permitido la formación de bahías y la extensión de la plataforma continental sumergida hacia tierras que antes estaban emergidas. Esto último, habría sido el puente que permitió la migración hacia las costas de Chile. Estas bahías sólo se han registrado en basamentos pleistocénicos, lo que hace pensar que desaparecieron a finales de esta época, reincorporándose la barrera que constituiría el evento vicariante que permitió el origen de *M. g. gayi* en la subdivisión Sur del Pacífico Sur-Este y de *M. g. peruanus* en la subdivisión Norte del Pacífico Sur-Este (Fig. 1). Cabe destacar que esta hipótesis difiere con lo propuesto por Stepien & Rosenblatt (1996) acerca de la tolerancia diferencial a las temperaturas relativas como barrera que habría producido la especiación de las merluzas del Pacífico Este, pero concuerda con la revisión de Lindberg (1991) en cuanto a la importancia de las glaciaciones Pleistocénicas para el intercambio histórico de la biota marina entre el hemisferio Sur y Norte.

AGRADECIMIENTOS

Los autores dedican este trabajo a la memoria de Yeny Rojas Concha (Q.E.P.D.) a quien agradecen su ejemplo de dedicación al estudio, su entusiasmo por las buenas causas y su alegría y respeto por los demás. Agradecemos a Marcela Astorga y a Javier Monsalves por la ayuda prestada en la realización del estudio, a Lilian Troncoso, Rodrigo González y Mario George-Nascimento por las correcciones y sugerencias al manuscrito. Igual-

mente agradecemos al Dr. Alberto Arrizaga por las gestiones hechas para obtener las muestras del Perú. Este trabajo fué financiado por el proyecto FONDECYT N°1950057.

LITERATURA CITADA

- AGUAYO HM (1995) Biology and fisheries of Chilean hakes (*M. gayi* and *M. australis*). En: Alheit J & TJ Pitcher (eds) Biology, fisheries and markets: 305-338. Chapman & Hall, Great Britain.
- AVISE J C & MH SMITH (1977). Gene frequency comparisons between sunfish (Centrarchidae) populations at various stages of evolutionary divergence. Systematics Zoology 26: 319-335.
- AYALA FJ & JA KIGER (1980) Modern genetics. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. 752 pp.
- BUTHD (1984) Allozymes of the Cyprinid fishes, variation and application. En: Turner BJ (ed) Evolutionary genetics of fishes: 583-585. Plenum Press, New York.
- CECIONI G (1970) Esquema de Paleogeografía Chilena. Editorial Universitaria, S.A., Santiago, Chile. 143 pp.
- COHEN D, T INADA, T IWAMOTO & N SCIALABBA (1990) Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fisheries Synopsis 125: 1-442.
- DURAN LE & M OLIVA (1980) Estudio parasitológico en *Merluccius gayi peruanus* Gingsburg, 1954. Boletín Chileno de Parasitología 35: 18-21.
- ESPINO M, R CASTILLO & F FERNANDEZ (1995) Biology and fisheries of Peruvian hakes (*M. gayi peruanus*). En: Alheit J & TJ Pitcher (eds) Biology, fisheries and markets: 339-364. Chapman & Hall, Great Britain.
- FERNANDEZ J (1985) Estudio parasitológico de *Merluccius australis* (Hutton, 1872) (Pisces: Merlucciidae): Aspectos sistemáticos, estadísticos y zoogeográficos. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, Chile 56: 31-41.
- GALLEGUILLOS R, L TRONCOSO, C OYARZUN, M ASTORGA & M PEÑALOZA (en prensa) Genetic differentiation of the common hake populations *Merluccius gayi gayi* (Guichenot, 1848) off the Chilean coast. Hydrobiologia.
- GEORGE-NASCIMENTO M (1996) Populations and assemblages of parasites in hake, *Merluccius gayi*, from the southern Pacific Ocean: stock implications. Journal of Fish Biology 48: 557-568.
- GINSBURGI (1954) Whittings on the coast of the American continents. Fishery Bulletin U.S. 56: 187-208.
- GRANT WS, I BECKER & R LESLIE (1988) Evolutionary divergence between sympatric species of southern African hakes, *Merluccius capensis* and *Merluccius paradoxus*. I. Electrophoretic analysis of proteins. Heredity 61: 13-20.
- HARRIS H & DA HOPKINSON (1976) Handbook of enzymes electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Company, Amsterdam. 205 pp.

- HERNANDEZ C (1996) Diferenciación genética y relaciones biogeográficas históricas entre los taxa de merluzas del Pacífico Sur Oriental: *Merluccius australis*, *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* (Pisces, Gadiformes, Merlucciidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Regional Talcahuano. 50 pp.
- HILDEBRAND SF (1946) A descriptive catalogue of the shore fishes of Perú. U.S. National Museum Bulletin. 189 pp.
- HO J (1990) Phylogeny and biogeography of hakes (*Merluccius*; Teleostei): A cladistic analysis. Fishery Bulletin U.S. 88: 95-104.
- INADA T (1981) Studies on the merluccid fishes. Bulletin of Far Seas Fishery Research Laboratory (Shimizu) 18: 1-172.
- INADA T (1989) Current status of the systematics of Merlucciidae. En: Cohen DM (ed) Papers on the systematics of Gadiform fishes: 197-208. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series 32.
- KABATA Z & JS HO (1981) The origin and dispersal of hake (Genus *Merluccius*: Pisces: Teleostei) as indicated by its copepod parasites. Oceanography and Marine Biology Annual Review 19: 381-404.
- KAUP J (1858) Uebersicht der Familie Gadidae. Archiv Naturgeschichte Berlin 24:85-93.
- KENNETT J (1982) Marine geology. Prentice Hall, USA. 813 pp.
- LEIBLE M (1979) Análisis taxonómico de las subespecies de *Merluccius gayi* (Teleostomi, Gadiformes). Acta Zoológica Lilloana 35: 667-677.
- LEWONTIN RC (1984) La diversidad humana. Biblioteca Scientific American, Prensa Científica S.A., Barcelona-España. 179 pp.
- LINDBERG D (1991) Marine biotic interchange between the northern and southern hemispheres. Paleobiology 17: 308-324.
- MATHEWS CP (1985) Meristic studies of the Gulf of California species of *Merluccius*, with a description of a new species. Journal of Natural History 19: 697-718.
- NEI M (1978) Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 283-292.
- NORMAN JR (1937) Coast Fishes. Part II. The Patagonian Region. Discovery Reports 16: 1-150.
- OYARZUN C (1997) Análisis de la diferenciación poblacional: El caso de *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848) de la costa de Chile. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción. 93 pp.
- PATERSON C & D ROSEN (1989) The Paracanthopterygii revisited: order and disorder. En: Cohen DM (ed) Papers on the systematics of Gadiform fishes: 5-36. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series 32.
- SHAKLEE JB, CS TAMURA & RS WAPLES (1982) Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science 36: 141-157.
- SHAKLEE JB, FW ALLENDORF, DC MORIZOT & GC WHITT (1990) Gene nomenclature for protein coding loci in fish. Transactions of the American Fisheries Society 119: 2-15.
- SMITH DG & RG COSS (1984) Calibrating the molecular clock: Estimates of ground squirrel divergence made using fossil and geological time markers. Molecular Biology and Evolution 1: 249-259.
- STEPIEN CA & RH ROSENBLATT (1996) Genetic divergence in antitropical pelagic marine fishes (*Trachurus*, *Merluccius*, and *Scomber*) between North and South America. Copeia 3: 586-598.
- SWOFFORD DL & RB SELANDER (1989) Biosys 1.7. a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Illinois National History Survey, Illinois. 43 pp.
- SZIDAT L (1955) La fauna parásitos de *Merluccius hubbsi* como carácter auxiliar para la solución de los problemas sistemáticos y zoogeográficos del género *Merluccius*. Comunicaciones del Instituto Nacional de Investigaciones de Ciencias Naturales, Buenos Aires, Ciencias Zoológicas 3: 1-54.
- VAWTER AT, R ROSENBLATT & GC GORMAN (1980) Genetic divergence among fishes of the Eastern Pacific and the Caribbean: support for the molecular clock. Evolution 34: 705-711.
- WARD RD & RA GALLEGUILLOS (1983) Biochemical systematics and genetic variation in flatfish of the family Pleuronectidae. En: Oxford GS & D Rollins (eds) Protein polymorphism; Adaptive and taxonomic significance: 165-178. The Systematic Association Special Volume 24, Academic Press, London and New York.