



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRAFICAS
CASILLA 2407 - CONCEPCION - CHILE



INFORME FINAL

PROYECTO FIP 96-30

**“IDENTIFICACION DE UNIDADES DE
STOCK EN EL RECURSO MERLUZA DE
COLA EN EL AREA DE DISTRIBUCION DE
LA PESQUERIA”**

Unidad Ejecutora:

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
CASILLA 2407 - CONCEPCION - CHILE



PROYECTO FIP 96-30

**“IDENTIFICACION DE UNIDADES DE STOCK
EN EL RECURSO MERLUZA DE COLA EN EL AREA DE
DISTRIBUCION DE LA PESQUERIA”**

AUTORES

**Ricardo Galleguillos G. Coordinador U de C.
Rolando Montoya U de C.
Lilian Troncoso G. U de C.
Marcelo Oliva U. de Antofagasta
Ciro Oyarzún G. U de C.**

AYUDANTES

**Santiago Gacitúa
Alejandra Espejo
Martha Henrst
Carmen Gloria Narvaez
Claudio Martínez
Isabel Ballón**

RESUMEN EJECUTIVO

En el proyecto FIP N° 96-30 “Identificación de unidades de stock en el recurso merluza de cola en el área de distribución de la pesquería”, se utilizaron diferentes metodologías para cumplir con el objetivo general del proyecto que establece: Identificar unidades de stock en el recurso merluza de cola (*Macruronus magellanicus*), explotado en la zona centro sur y sur austral.

Unas de las metodologías usadas que entrega información exclusivamente genética es el análisis de las proteínas mediante técnicas de electroforesis, la cual entrega el genotipo de cada uno de los individuos, permitiendo comparar la información de diferentes loci que son variables a nivel poblacional. En el presente estudio se analizaron 26 sistemas enzimáticos con un total de 38 loci, de los cuales cuatro resultaron polimórficos. Para estos últimos, se analizaron electroforéticamente 2226 ejemplares de las zonas de pesca Sur-Austral y Centro-Sur y se entregan las frecuencias génicas y genotípicas para cada locus. Los resultados establecieron que desde el punto de vista de los marcadores genéticos proteínicos no es posible diferenciar stock en *M. magellanicus*.

Otra metodología que se utilizó en este estudio corresponde al estudio genético de la región D-loop mitocondrial de poblaciones de merluza de cola (*Macruronus magellanicus*), utilizando la técnica de amplificación de genes específicos mediante PCR y su posterior análisis con enzimas de restricción (PCR-RFLP). Cabe mencionar que esta técnica se está usando ampliamente en estudios genéticos de tipo poblacional y sistemático. En nuestro país estas son técnicas que recién se empiezan a aplicar y esta es la segunda especie de merluza que se analiza en las costas de Chile.

Se extrajo el ADN genómico de 111 ejemplares, de los cuales se efectuó el análisis completo para 83 individuos extraídos desde las zona Centro-sur (Talcahuano) y Sur-Austral (Coyhaique y Punta Arenas), detectándose 6 haplotipos distintos para el segmento D-loop amplificado y digerido con la enzima de restricción Hinf I.

La región D-loop analizada tiene un largo total de 1600 pb. La variabilidad genética (Polimorfismo) demuestra ser semejante para ambas zonas muestreadas, el haplotipo N° 3, que es el más común para ambas, tiene una frecuencia de 76.7 % para la zona Norte y un 77.5 % para los ejemplares de la zona Sur. El otro haplotipo que le sigue en abundancia corresponde al designado como N° 4, con una frecuencia de 11,63 % en la zona Norte y 7.5 % en la Sur. Al igual que ocurre en el estudio de isoenzimas, la frecuencia de haplotipos estudiada en la especie mediante PCR-RFLP de la región D-loop mitocondrial no es posible determinar genéticamente la presencia de stocks diferentes.

En el presente proyecto se usó en paralelo a las metodologías antes descritas, la morfología de la especie, para este efecto se analizaron 712 ejemplares de merluza de cola provenientes de las zonas centro-sur y sur-austral. Las 21 variables consideradas corresponden al diseño del entramado sobre la secuencia de hitos morfológicos, analizadas mediante una aproximación multivariada, en este caso manova y análisis de componentes principales (ACP), sobre una matriz de varianza-covarianza; previo a los análisis, los datos fueron transformados a $\log_{10}(x)$. Los resultados más claros provienen del ACP, en donde es evidente que existe una mayor variabilidad intralocalidad que entre las localidades. Removidos los tamaños extremos de cada colección, las merluzas de cola analizadas se presentan como un solo gran grupo morfológico, con la posible existencia de un gradiente latitudinal de tamaños hacia el sur, propio y característico de especies de amplia distribución latitudinal que mantienen un flujo génico.

El análisis parasitológico de 450 ejemplares de *Macruronus magellanicus*, provenientes de la pesquería sur austral (Coihayque y Punta Arenas) y de la pesquería Centro-Sur (Talcahuano), demostró la presencia de 15 taxa de parásitos metazoos, con un total de 24205 individuos parásitos. Los parásitos corresponden a *Chondracantus australis* y *Neobrachiella* sp. (Copepoda), *Elytrophalloides oatesi*, *Gonocerca phycidis*, *Derogenes varicus* y Digenea gen. sp. (Digenea), *Hepatoxylon trichiuri*, *Scolex pleuronectis*, *Cleistobothrium crassiceps*, *Grillotia dollfusi*, *Pseudophyllidea* gen. sp. (Cestoda), Anisakidae y *Ascarophis* (?) sp (Nematoda), *Corynosoma* sp. y *Acanthocephala* gen. sp. (Acanthocephala). La fauna de parásitos está compuesta por especies comunes a otros peces de la Familia Merluccidae, así como a parásitos de muy baja especificidad parasitaria.

La evidencia parasitológica, basada en análisis univariado sobre prevalencia e intensidad media de infección, sugiere la existencia de un solo stock para las zonas analizadas, detectándose procesos de migración de la especie de sur a norte.

Se concluye finalmente que la especie *Macruronus magellanicus* (merluza de cola) en el área de la distribución de la pesquería, no constituye stocks diferenciados al aplicar varias metodologías de análisis.

INDICE GENERAL

Resumen Ejecutivo	i
Indice General	iv
Indice de Figuras y Tablas	v
Antecedentes	1
Objetivos generales	3
➤ Objetivos específicos	3
1. Electroforesis de Proteínas de <i>M. magellanicus</i>	4
➤ Introducción	4
➤ Materiales y Métodos	5
➤ Resultados	5
2. Análisis del ADN mitocondrial de <i>M. magellanicus</i>	6
➤ Introducción	6
➤ Materiales y Métodos	7
➤ Resultados	10
3. Análisis morfométrico de <i>M. magellanicus</i>	12
➤ Materiales y Métodos	12
➤ Resultados	15
4. Análisis parasitológico de <i>M. magellanicus</i>	19
➤ Introducción	19
➤ Materiales y Métodos	21
➤ Resultados	22
5. Análisis y Discusión de Resultados	26
6. Conclusiones	29
7. Referencias bibliográficas	30
8. Anexos	

INDICE TABLAS

- Tabla 1.1 Sistemas enzimáticos obtenidos en *M. Magellanicus*
- Tabla 1.2 Frecuencias alélicas para 4 loci analizados
- Tabla 1.3 Matriz de Identidad y Distancia genética
- Tabla 2.1 Número de individuos de *M. magellanicus* por haplotipo
- Tabla 3.1 Cantidad de individuos por localidad y muestreo analizados para morfometría
- Tabla 3.2 Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre localidades.
- Tabla 3.3 Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona Centro-Sur.
- Tabla 3.4 Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona Sur-Austral.
- Tabla 3.5 Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre localidades para individuos del mismo rango de tallas.
- Tabla 3.6 Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona Centro-Sur para individuos del mismo rango de tallas.
- Tabla 3.7 Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona Sur-Austral para individuos del mismo rango de tallas.
- Tabla 3.8 Comparación de muestras de la zona Centro-Sur y Sur-austral, mediante MANOVA.
- Tabla 4.1 Características de las muestras de *M. Magellanicus*
- Tabla 4.2 Listado de especies de parásitos presentes en Merluza
- Tabla 4.3 Prevalencia e Intensidad media de infección

INDICE FIGURAS

- Figura 2.1 Amplificación de un fragmento de 1700 pb de la región Dloop del ADN mitocondrial de *M. Magellanicus*.
- Figura 2.2 Amplificaciones del fragmento Dloop de ejemplares de la zona Sur Austral, digeridos con Hinf I
- Figura 2.3 Amplificaciones del fragmento Dloop de ejemplares de la zona Sur Austral, digeridos con Hinf I
- Figura 2.4 Amplificaciones del fragmento Dloop de ejemplares de la zona Centro-Sur, digeridos con Hinf I.
- Figura 2.5 Amplificaciones del fragmento Dloop de varios individuos que representan los diferentes haplotipos obtenidos en *M. magellanicus*.
- Figura 2.6 Amplificaciones de un fragmento ATCO
- Figura 2.7 Amplificaciones de un fragmento de ADN nuclear. Digestión del fragmento ITS-2.
- Figura 3.a Distribución de los principales hitos morfológicos para la construcción de la red
- Figura 3.b Red de medidas consideradas para los análisis morfométricos
- Figura 3.1 Distribución de frecuencias de tallas para ambas localidades
- Figura 3.2 Distribución de frecuencias de tallas para cada muestreo
- Figura 3.3 Histogramas de variables morfológicas en la zona Centro-Sur
- Figura 3.4 Histogramas de variables morfológicas en la zona Sur-Austral
- Figura 3.5 Relación entre las variables medidas y la variable $M_{\bar{u}}$ en ambas localidades.
- Figura 3.6 Ordenación de los puntajes del análisis de componentes principales por localidad
- Figura 3.7 Ordenación de los puntajes del análisis de componentes principales por muestra en la zona Centro-Sur.

- Figura 3.8 Ordenación de los puntajes del análisis de componentes principales por muestra en la zona Sur-Austral.
- Figura 3.9 Ordenación de los puntajes del ACP en la separación por localidades utilizando mismo rango de tallas.
- Figura 3.10 Ordenación de los puntajes del ACP en la separación por muestra para la zona Centro-Sur, utilizando mismo rango de tallas.
- Figura 3.11 Ordenación de los puntajes del ACP en la separación por muestra para la zona Sur-Austral, utilizando mismo rango de tallas.

ANTECEDENTES

La distribución de la merluza de cola, *Macruronus magellanicus*, en el territorio chileno se encuentra desde el extremo austral hasta el Golfo de Arauco. Dentro del área de pesca demersal sur-austral, comprendida entre los 43° y 57° Sur, es considerado uno de los recursos más abundantes.

Es necesario mencionar que la cantidad de desembarque que se obtiene en la pesquería centro-sur, entre Valdivia y Talcahuano es bastante grande comparada con la sur-austral. Se puede establecer que la flota de cerco que opera sobre la merluza de cola en la zona de Talcahuano, se restringe al periodo primavera verano, situación dada principalmente por la migración que ocurre en las poblaciones de jurel. Por esta razón la pesquería de la merluza de cola se puede considerar un recurso de oportunidad para la flota industrial de cerco de la zona centro-sur, (Cubillos, 1998).

En general, se establece que la mayor abundancia de merluza de cola se encuentra en la zona sur-austral estructurando un solo stock. La presencia de la merluza de cola y el aumento de la disponibilidad en la zona centro-sur durante la primavera, correspondería a una muestra migracional de la merluza, a partir de una fracción del stock sur-austral (Cubillos, 1998).

Estudios llevados a cabo en la pesquería sur austral (Young *et al.*, 1998), en el ciclo de madurez reproductiva de *Macruronus magellanicus*, muestra un periodo bien definido de maduración que se inicia en mayo, alcanzando plena madurez en julio, terminando con un periodo corto de desove durante los meses de agosto y septiembre. Siendo concordantes la histología con el índice gonádico.

Durante los últimos años es claro el interés demostrado por los investigadores en biología de peces en aproximarse a las investigaciones genético poblacionales en peces marinos y específicamente investigar con diferentes técnicas el establecimiento e identificación de poblaciones discretas o unidades de stock, que permitan a los administradores de recursos tener mas antecedentes para diseñar una política de explotación.

Actualmente existen metodologías que usan exclusivamente información genética para aproximarse a la identificación de diferencias poblacionales como son los resultados que entregan las proteínas, usadas frecuentemente en las investigaciones genético poblacionales donde es posible analizar las frecuencias génicas de diferentes loci polimórficos y compararse entre diferentes poblaciones o presuntos stock. Actualmente han entrado al escenario de los estudios poblacionales técnicas que permiten analizar directamente las variaciones a nivel del ADN tanto nuclear como mitocondrial.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar unidades de stock en el recurso merluza de cola (*Macruronus magellanicus*), explotado en la zona centro sur y sur austral.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Definir fundamentalmente los indicadores a utilizar en la determinación de diferencias entre unidades de stock del recurso merluza de cola.

Identificar los indicadores que aporten mayor variabilidad entre zonas para la merluza de cola y determinar su grado de variación intralocal.

1.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

Los peces no existen como poblaciones homogéneas continuas, más bien se comportan como un conjunto de poblaciones que presentan una variabilidad de características. Cuando el flujo génico es mínimo o prácticamente nulo, estas poblaciones pueden llegar a presentar niveles de diferenciación que bajo ciertas condiciones pueden mantenerse en el tiempo (Spanakis *et al.*, 1989). Estudios realizados mediante electroforesis de proteínas han permitido obtener los niveles de variación genética en especies con amplios rangos de distribución geográfica que han permitido estimar los niveles de diferenciación genética entre especies alopátricas.

De acuerdo a las bases especiales del Proyecto, el concepto de unidad de stock que se utilizará en el presente proyecto es “grupo de peces que se mantienen temporalmente o espacialmente aislados unos de otros y que son genéticamente distintos, debido a su aislamiento reproductivo”

La especie objetivo de este proyecto es la merluza de cola *Macruronus magellanicus*. En el presente informe se entregan los resultados del análisis genético proteínico basado en la determinación de frecuencias génicas para los loci polimórficos y una comparación de éstas entre las muestras de merluza de las distintas localidades. En la propuesta técnica se estableció la comparación de la pesquería de la zona Sur -Austral y la zona Centro-Sur

MATERIALES Y METODOS

Para el análisis de electroforesis de proteínas las muestras de *Macruronus magellanicus* se obtuvieron de las áreas de pesca de Talcahuano (Zona Centro-Sur, 36°41'S; 73°06'W), y de la Zona Sur-Austral, se decidió hacer el análisis separados para la zona de Coyhaique (45°33'S; 72°06'W), y Punta Arenas (53°08'S; 70°55'W).

A cada merluza se le extrajo un trozo de músculo e hígado, los que fueron congelados a -20°C. Cada tejido fue homogeneizado con agua destilada y luego centrifugado a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante fue absorbido con papel filtro e insertado en una matriz de almidón al 12%. Así, las proteínas se separaron en forma relativa de acuerdo a su carga neta, al pasar una corriente eléctrica a través del gel. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron teñidas específicamente según la metodología de Harris & Hopkinson (1977) con modificaciones.

La estimación de las frecuencias genotípicas y génicas se establecieron utilizando el programa computacional BIOSYS 1.7 (Swofford & Selander, 1989), obteniéndose además, el χ^2 para determinar equilibrio de Hardy-Weinberg, los valores de desviación del este equilibrio (D) y los valores de F(st) de Wright.

RESULTADOS

La caracterización genética de la especie *M. magellanicus* se basó en 26 sistemas enzimáticos con un total de 38 loci. De los cuales 34 resultaron monomórficos y cuatro polimórficos (*G3PDH*, *PGM*, *IDH*, *AAT*). Los nombres de cada sistema enzimático, el tampón utilizado para su estandarización y el tejido en que se probó, se muestran en la Tabla 1.1

Para todos los sistemas enzimáticos estudiados se utilizaron muestras de músculo esquelético y de hígado. Considerándose como tejido adecuado aquel que presentó la mejor resolución, en este sentido, el músculo fue considerado para el análisis de los sistemas variables.

Se analizaron electroforéticamente 2226 ejemplares considerando los 4 sistemas polimórficos. El rango por locus fluctuó entre 288 y 755. Las frecuencias alélicas obtenidas para cada

muestra y para cada uno de los loci polimórficos y el detalle del número de ejemplares por zona y por locus polimórfico se entregan en la Tabla 1.2.

El análisis genético mostró que las frecuencias génicas observadas no fueron diferentes de las esperadas, por lo que se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores de heterocigosidad observada fueron bajos para los loci *IDH*, *G3PDH* y el valor de *Fst* promedio obtenido para los cuatro loci fue de 0.003, cuyo rango de variación de este parámetro fluctúa entre 0.002 y 0.008 valores muy bajos que indican una nula separación genética entre las muestras.

La Tabla 1.3 entrega un análisis de similitud genética (Nei, 1972), con valores de identidad genética que fluctúan entre 0.999 y 1. Según estos resultados no se observan diferencias genéticas entre las merluzas de las tres localidades.

2.- ANALISIS DE LA REGION D LOOP DEL ADN MITOCONDRIAL

INTRODUCCION

El ADN mitocondrial es probablemente la parte más estudiada del genoma en los últimos años desde el punto de vista de los estudios poblacionales y evolutivos. El ADNmt es una molécula pequeña circular que cuenta con 16.000 a 20000 pares de bases, es una doble hebra que se encuentra en las mitocondrias.

Una de las características importantes de ADNmt. es que se hereda citoplasmáticamente traspasándose a través de las hembras. Considerando que la contribución paterna es pequeña o nula, los procesos de recombinación en el genoma mitocondrial son desconocidos. Si el huevo fertilizado llega a ser hembra, toda su descendencia heredará las mutaciones y por lo tanto el stock descendiente de la hembra mutada, será reconocida a través del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción o por la secuenciación del ADN mitocondrial.

La presencia de nuevas variantes está restringida por mecanismos estocásticos de tal manera que las poblaciones locales tendrán unos pocos haplotipos variantes. Si la tasa de dispersión es la

misma para machos y hembras, entonces el ADNmt podría ser un excelente indicador de la subdivisión de las poblaciones.

Es bien conocido que el genoma mitocondrial contiene una serie de genes que codifican proteínas, ARN ribosomal, ARN de transferencia y la región control llamada D-loop con 1000-2000pb en longitud y contiene el origen de la replicación del ADNmt.

Aunque el contenido y el orden de los genes mitocondriales son algo conservativos en términos de tiempo, ocurren fenómenos evolutivos con relativa rapidez. En los Primates el índice evolutivo es de alrededor 1% por millón de años, que nos da un valor 10 veces mayor que la variación que podríamos esperar en el ADNnuclear. Índices similares de variación han sido encontrados en otras especies.

En muchos organismos el ADNmt está sujeto a un proceso de mutaciones acumulativas en períodos mucho más cortos que en genes de origen nuclear. El ADNmt tiene algunas regiones con una elevada tasa de variación, es el caso de la región D-loop, del citocromo b y otras regiones intergénicas que nos proveen de innumerables marcadores y por lo tanto aparecen como muy útiles para estudios sistemáticos y poblacionales.

La merluza de cola *Macruronus magellanicus* se convierte en la segunda especie nativa a la cual se le estudia el ADNmt, siendo la primera la merluza común *Merluccius gayi* (Oyarzún, 1997).

MATERIALES Y METODOS

1.- Obtención de las muestras: Las muestras de Merluza de cola provienen de las zonas Centro-Sur (Talcahuano) y Sur.Austral (Coyhaique). Se obtuvo un total de 111 muestras de tejido muscular esquelético, preservadas bajo congelación a -20 °C, hasta la extracción de ADN.

2.- Extracción de DNA: El Protocolo de extracción de ADN modificado para peces por Grewe *et al* (1993), fue descrito inicialmente por Doyle & Doyle (1987) para extraer ADN desde vegetales, dicho método usa CTAB, como detergente catiónico.

Se pesaron 50 mg de tejido muscular esquelético, el que fue triturado en seco sobre un mortero de loza, agregándole 400 µl de CTAB (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio). Posteriormente se traspasó a tubos Eppendorf y se agregaron 10 µl de Proteinasa K (10 mg/ ml) para inactivar las nucleasas que pudieran hidrolizar el ADN durante la extracción.

Los tubos fueron incubados por 20 min. en un baño a 65 °C y remacerados dentro del mismo tubo eppendorf, manteniendo la misma temperatura hasta completar 2 horas.

La primera desproteinización se realizó con una solución de 500 µl de Sevac (24 partes de Cloroformo: 1 parte de alcohol Isoamílico). Se agitó durante un minuto y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos.

La fase acuosa (superior) fue retirada y extraída con 500 µl de Fenol saturado con Tris: Sevac (1:1) y se prosigue de igual manera que en el paso anterior. Nuevamente se extrajo con 500 µl de Sevac, y finalmente se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos para separar las fases orgánicas de la acuosa.

La fase acuosa superior fue retirada y precipitada con 500µl de Isopropanol enfriado a -20 °C. y almacenada a 4°C por al menos 60 minutos.

Finalmente, se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos, eliminándose el sobrenadante y lavando el pellet de ADN con 500-600 µl de etanol al 70% previamente enfriado a -20 °C. Este pellet fue secado al aire por mas de 1hora y disuelto en 50-100 µl de tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1mM pH = 8,0). La solución concentrada se almacenó a -20°C y las diluciones fueron guardadas brevemente a 4°C hasta su amplificación por PCR.

3.- Amplificación- PCR: Para la amplificación del segmento mitocondrial D-loop, se utilizó una mezcla de amplificación de 24 µl, que contenía el tampón de amplificación 1X, MgCl₂ 2 mM, los cuatro dNTPs 0,1 mM; 0,5 µM de cada partidor, 1 unidad de Taq ADN polimerasa (5 U/µl) y 1µl de ADN (20-50 mg de ADN).

El par de *primers* utilizados en la amplificación del D-loop corresponden al L-19 cuya secuencia es 5' - CCA CTA GCT CCC AAA GCT A -3' y 12SAR-H cuya secuencia es 5' -ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT -3'. El tamaño del producto amplificado es de aproximadamente 1600 pb.

Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador Perkin Elmer modelo 480, que utiliza la siguiente secuencia de cambios de temperatura como programa para la amplificación de este sector del ADN mitocondrial: 1 ciclo de preamplificación a 95 °C por 10 minutos (denaturación), 60 °C por 30 segundos (Annealing) y 72 °C por 2 minutos (alargamiento de los partidores), seguido de 40 ciclos (95 °C por 30 segundos, 54 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos) y finalmente 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos y 4 °C por tiempo indefinido.

El fragmento amplificado fue visualizado e identificado sobre un gel de agarosa al 2%, utilizando como marcadores de peso molecular pBR322 y ϕ x 174, previamente digeridos con Hae III y Pst I, respectivamente. Luego, fue teñido con una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/ml, observado en un transiluminador U.V Vilber Lourmat (230V; 50Hz) y finalmente fotografiado con película Polaroid 667.

4.- Análisis de Restricción: Para la digestión de las muestras amplificadas (D-loop), se utiliza la enzima de restricción Hinf I con su tampón NEB 2. A 10 μ l de la mezcla de amplificación se agregan 1.5 μ l de tampón NEB 2 y 1.0 μ l de la endonucleasa de restricción Hinf I y se completa a 15 μ l con agua destilada, se llevan a un baño María a 37 °C durante 3 horas. La reacción se detiene agregando 2.0 μ l de solución de siembra que contiene púrpura de bromocresol, glicerol 50% y tampón Tris-acetato pH 7.9.

Los fragmentos digeridos fueron analizados en un gel de agarosa al 3%, aplicando un voltaje de 60 V por 120 minutos. Luego se sumerge el gel en la solución de bromuro de etidio por 30 min. El resultado de la digestión se observa bajo luz U.V y finalmente se fotografía con película Polaroid. Cada haplotipo encontrado fue numerado de acuerdo al número de fragmentos generados por la enzima Hinf I (1-6).

5. Análisis estadísticos.

Para estimar la homogeneidad de las frecuencias genotípicas entre muestras, se utilizó un análisis de χ^2 y un test aleatorio Monte Carlo.

RESULTADOS

De las 111 muestras extraídas sólo 92 dieron amplificación positiva (82.9 %) y se digirieron con Hinf I sólo 83 (43 de Talcahuano y 40 de la zona Sur- Austral). El tamaño del fragmento amplificado es aproximadamente de 1600 pb. (Fig. 2.1).

En la digestión de todas las muestras utilizadas para ambas zonas, se encontraron 6 haplotipos para la región D-loop digerida con la enzima de restricción Hinf I, indicando un alto grado de polimorfismo.

Dos individuos de la zona Sur-Austral no presentaron cortes al ser tratados con la enzima. Este haplotipo fue considerado como el Haplotipo N° 1, presentando el fragmento de 1600 pb, con una frecuencia de un 5,0 % para la zona Sur y 0% para la zona Norte (Fig. 2.3).

El Haplotipo N° 2, presenta dos fragmentos de 1400 y 200 pb. En la zona Norte este haplotipo tiene una frecuencia de un 9,28 % y un 5,0 % para la zona Sur. Considerado como el tercer haplotipo más frecuente para ambas zonas (Fig.2.2 ranura 1; Fig 2.3 ranura 16, Fig 2.5 ranura 2).

El Haplotipo N° 3 presenta tres fragmentos de 1100-300-200 pb. En la zona Norte este haplotipo presenta una frecuencia de un 76,7 % y una frecuencia de 77,5 % para la zona Sur. Es por lo tanto, el haplotipo más común en las dos zonas estudiadas (Figs. 2.2, 2.3 y 2.5)

El Haplotipo N° 4 tiene cuatro fragmentos de 850 -300 -250 y 200 pb; los fragmentos de 250 y 300 pb co-migran, observándose como una banda de mayor fluorescencia. Este haplotipo presenta una frecuencia de un 11,63 % para la zona Norte y una frecuencia de un 7,5 % para la zona Sur. Es el segundo haplotipo más común (Fig. 2.2 ranura 3; Fig. 2.5 ranura 4).

El Haplotipo N° 5 presenta tres fragmentos de 850-550 y 200 pb, tiene una frecuencia de un 2,32% para la zona Norte y de 0% para la zona Sur. Este haplotipo es considerado como *haplotipo raro*, por tener una sumatoria molecular de los fragmentos que alcanzan a los 1950 pb mayor que los 1700 pb de los otros haplotipos (Fig. 2.3 ranura 5 y Fig. 2.5 ranura 6)

El Haplotipo N° 6 presenta cuatro zonas de fluorescencia 1100-350/300-240 y 200 pb generados por la enzima Hinf I, no está presente en la zona Norte y para la zona Sur tiene una frecuencia de un 2,5 %. Este haplotipo junto al haplotipo N° 1, se presentan sólo en la zona Sur-Austral en baja frecuencia (Fig. 2.4 ranura 12 y Fig. 2.5 ranura 7).

La Tabla 2.1 muestra el número de individuos obtenidos por haplotipo, el análisis de χ^2 realizado para estos datos entrega un valor de 2,92 para 5 grados de libertad y un $p < 0,71$, lo que indicaría que no se observan diferencias significativas entre los ejemplares de Talcahuano y los provenientes de la zona Sur-Austral. El análisis de Montecarlo dio como resultado que las muestras de las dos zonas estudiadas, no presentan diferencias significativas ($p > 0.5$).

La Figura 2.6 muestra en las ranuras 2, 3, 4, y 7 el fragmento ATCO cuyo tamaño aproximado se estima en 700 pares de bases, posiblemente pueda ser digeridos para generar un patrón claro e informativo. En las ranuras 4, 5 y 8 se muestra el mismo fragmento pero en 3 individuos distintos, se observa un menor grado de amplificación. La amplificación del fragmento ATCO del ADN mitocondrial, ubicado entre los genes de ATPasa 6 de la subunidad III de la citocromo oxidasa, utilizando los partidores L8562 y H9432, descritos por Chow e Inoue (1993) se incluye como una actividad extra no comprometida dentro del proyecto. Lo consideramos como un aporte importante para futuros estudios en la especie.

En la Figura 2.7 se muestra la amplificación y digestión del fragmento ITS-2 a partir de la región del ADN ribosomal. El fragmento posee alrededor de 600 pares de bases (Meyer 1994). Las enzimas de restricción utilizadas corresponden a Hae III, HhaI, Msp I, Rsa I, Hinf I y Nci I. Se observa que la enzima RsaI no digiere el fragmento. Esta actividad no estaba contemplada llevarla a cabo en la proposición de técnica, pero se consideró importante para tenerla como antecedente de futuros estudios de la especie.

3. ANALISIS MORFOLOGICO

MATERIALES Y METODOS

A cada ejemplar se le midió la longitud total y las siguientes medidas morfométricas (Fig. 3):

Acrónimo Medida

- A. 1-2: Longitud cabeza (al extremo del supraoccipital)
- B. 1-9. Longitud Mandíbula superior
- C. 1-8. Longitud inicio mandíbula-inserción aleta pectoral
- D. 1-7. Longitud inicio mandíbula - inserción aleta pélvica
- E. 2-3. Longitud extremo del supraoccipital - inicio aleta dorsal I
- F. 2-9. Longitud extremo del supraoccipital - final mandíbula
- G. 2-8. Longitud extremo del supraoccipital - inserción aleta pectoral
- H. 2-7. Longitud extremo del supraoccipital - inserción aleta pélvica
- I. 3-4. Longitud base aleta dorsal I
- J. 3-9. Longitud inicio aleta dorsal I - final mandíbula
- K. 3-8. Longitud inicio aleta dorsal I - inserción aleta pectoral
- L. 3-7. Longitud inicio aleta dorsal I - inserción aleta pélvica
- M. 3-6. Longitud inicio aleta dorsal I- inicio aleta anal
- N. 4-5. Longitud base aleta dorsal II
- O. 4-8. Longitud inicio aleta dorsal II - inserción aleta pectoral
- P. 4-7. Longitud inicio aleta dorsal II- inserción aleta pélvica
- Q. 4-6. Longitud inicio aleta dorsal II- inicio aleta anal
- R. 5-8. Longitud inserción aleta pectoral - final columna vertebral
- S. 5-6. Longitud base aleta anal
- T. 6-7. Longitud inserción aleta pélvica - inicio aleta anal
- U. 6-8. Longitud inserción aleta pectoral - inicio aleta anal
- V. 7-8. Longitud inserción aleta pectoral - inserción aleta pélvica
- W. 7-9. Longitud final mandíbula - inserción aleta pélvica
- X. 8-9. Longitud final mandíbula - inserción aleta pectoral

Algunos ejemplares llegaron con la región caudal cortada, lo que trajo como consecuencia que tres de las variables consideradas no pudieran ser medidas. De todos modos, a esos ejemplares se les registró la longitud total que presentan para el análisis general, y pudieron ser utilizados para el resto de las medidas. Como consecuencia de lo anterior, aquellas medidas que implicaban el extremo posterior de cada pez se han excluido del análisis (N, R, S).

Análisis de los Datos

Análisis Estadístico

Las variables morfométricas están altamente correlacionadas, debido a que todas están regidas por el proceso de crecimiento del organismo. Por esto, la comparación de la morfometría de cada especie entre localidades se realizó utilizando análisis multivariado. En primer lugar, se utilizó un Análisis de Componentes Principales (ACP, Morrison 1967) como técnica exploratoria. El despliegue de cada organismo sobre la base de su puntaje en los primeros componentes principales permite identificar grupos de individuos de diferente morfometría. Además, este despliegue permite identificar individuos de características anómalas o mediciones erróneas, pues aparecen distanciadas de los grupos principales. Por último, el ACP permite corroborar de manera tentativa la validez de los supuestos de las posteriores pruebas de hipótesis.

El ACP y el MANOVA se llevaron a cabo en los programas computacionales SYSTAT 5.0 y 7.01 (Morrison 1988).

Como se estableció anteriormente, las observaciones morfométricas están altamente correlacionadas, con coeficientes lineales de correlación simple frecuentemente por sobre 0,9. Esto hace a las observaciones morfométricas candidatas ideales para el análisis multivariado lineal. De hecho, los análisis univariados no son recomendables en estos casos, puesto que mucha de la varianza de las observaciones se encuentra a la forma de covarianza entre variables, y por lo tanto al analizar a cada variable por separado se pierde una enorme cantidad de información útil para el análisis. En otras palabras, mucha de la covarianza va a formar parte de la varianza del error cuando la varianza total sea particionada entre error y tratamientos en un análisis univariado. El análisis multivariado, toma en cuenta las covarianzas entre variables y tiene entonces una mayor capacidad de detectar diferencias donde realmente existen.

Dado la natural diferencia que pueden encontrarse en la estructura de tallas entre las distintas muestras, ha sido usual la estandarización dividiendo todas las medidas por la longitud máxima (ya sea la longitud total o la longitud estándar, según corresponda) como una manera de quitar o disminuir el efecto de la talla sobre los análisis. Desgraciadamente eso no se logra, y en el mejor de los casos removería sólo el efecto de una sola de las variables. De allí que la aproximación recomendada es la transformación de los datos al logaritmo (en base 10) de cada una de las medidas y luego trabajar sobre una matriz de Varianza-Covarianza y no sobre la matriz de correlación en donde el efecto talla sería más notorio.

RESULTADOS

En la Figura 3a se muestra la distribución de los hitos morfológicos, y en la Fig. 3b la red de medidas consideradas para los análisis morfométricos.

Se analizaron un total de 712 individuos provenientes de la zona centro-sur (Talcahuano) y sur-austral (Punta Arenas y Coyhaique). Los primeros individuos recolectados en la zona centro-sur fueron notablemente más pequeños que los muestreados en la zona sur-austral, situación que influyó marcadamente los análisis preliminares. Dicha situación se corrigió en los muestreos posteriores. En la Figura 3.1 se presentan en conjunto las distribuciones de talla para ambas localidades. La moda que se ubica en torno a los 40 cm, corresponde a la primera muestra de Talcahuano.

La distribución de frecuencias de tallas (longitud estándar) por cada muestreo y localidad, se presentan en la Fig. 3.2. Para esos gráficos se consideraron sólo aquellos peces que estaban completos, es decir que contaban al menos con el pedúnculo caudal que posibilitaba estimar la longitud estándar ($n=637$).

La variación en longitud, presentada por cada una de las variables en las dos zonas, se presentan en sus medidas crudas, en las Figs. 3.3 y 3.4. Se muestra la distribución de frecuencias de cada una de las 21 variables consideradas en los análisis para cada localidad. La zona sur-austral presenta un patrón de distribución para cada variable aproximadamente normal con una sola moda principal (Fig. 3.4). En cambio, para la zona centro-sur el patrón de distribución para cada variable es mucho menos claro que para la zona sur-austral, observándose para cada variable por lo menos 2 modas (Fig. 3.3), lo cual se puede explicar como diferencias en la composición de tallas de las muestras de dicha localidad.

Debido a la gran diferencia en la estructura de tallas de las muestras, se graficaron para ambas localidades, las distintas medidas morfológicas en función de la mayor longitud medida entre dos puntos (variable M), no utilizando la talla o longitud estándar (Fig 3.5). Esto se debe a que como se explicó anteriormente no todos los peces poseían el extremo caudal lo que hacía imposible obtener la longitud estándar o total, ni las medidas que relacionaban el extremo caudal con los otros hitos morfológicos. Lo anterior, se realizó con el fin de no dejar muestras fuera de los análisis y teniendo en cuenta que debido al tipo de transformación realizado ($\log_{10}X$), no se necesita la talla de los ejemplares utilizados para los

análisis posteriores. El cambio que se realizó fue excluir de los análisis aquellas variables que asociaran el extremo caudal con otro punto, las cuales fueron la variable N (longitud inicio II aleta dorsal - final columna vertebral), R (longitud inserción aleta pectoral - final columna vertebral) y S (Longitud inicio aleta anal - final columna vertebral), con esto la matriz se redujo de 24 a 21 variables con las que posteriormente se realizaron los análisis.

En todas las variables se aprecia una clara correlación con la variable M (Fig. 3.5). Además, en cada gráfico se observa que la localidad 1 (zona centro-sur) se ubica en la parte inferior de la distribución y la localidad 2 hacia la parte superior de dicha distribución, con una amplia zona de superposición. La segregación se debe a que los ejemplares provenientes de la zona centro-sur presentan tamaños más pequeños analizados, en tanto que entre los provenientes de la zona sur-austral, se presentan los ejemplares más grandes encontrados; la diferencia es especialmente marcada en el primer grupo de peces de la zona Centro-Sur.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP, Morrison, 1967) exploratorio considerando las 21 variables utilizadas en los análisis para las localidades y para los muestreos, que consistió en el despliegue de cada organismo en base a su puntaje en los primeros componentes principales lo que permite identificar grupos de individuos de diferente morfometría. Además, este despliegue permite identificar individuos de características anómalas o mediciones erróneas, pues aparecen distanciadas de los grupos principales. Por último, el ACP permite corroborar de manera tentativa la validez de los supuestos de las posteriores pruebas de hipótesis.

El ACP exploratorio general realizado (Fig 3.6), muestra una tendencia a la separación entre los ejemplares provenientes de la zona centro-sur de aquellos que provienen de la zona sur-austral a lo largo de la primera componente principal la cual explica un 94.1% de la varianza total (Tabla 3.2). Pero en el mismo gráfico se observa que es sólo un grupo de los individuos de la zona centro-sur el que se separa del resto de los datos, permaneciendo el resto muy mezclados con los individuos de la zona sur-austral. Dicha separación de sólo un grupo de individuos de la zona centro-sur, probablemente sea el reflejo de las dos modas observadas en la distribución de frecuencias para cada variable (Fig. 3.3), producto de el pequeño tamaño de los peces de la primera muestra de Talcahuano.

Por otro lado, al realizar el ACP exploratorio para los muestreo en cada localidad. Se observa que para la zona centro-sur existe una separación clara entre las tres muestras consideradas a lo largo de la

primera componente principal, la cual explica el 96% de la varianza total (Fig. 3.7; Tabla 3.3). En cambio, para la zona sur-austral no existe una separación clara entre los muestreos registrados en ninguna de las dos primeras componentes, aun cuando la primera explica un 88.2% de la varianza total (Fig. 3.8; Tabla 3.4).

Debido a que una fracción de los ejemplares provenientes de la zona centro-sur, presentaron tamaños corporales marcadamente menores a los de la zona sur-austral, al realizar el análisis de componentes principales dichos individuos se separan del resto de los peces provenientes de la otra localidad e incluso de aquellos que son de la misma zona centro-sur pero de distinto muestreo. Sin embargo, dicha separación, como fue sugerido por el revisor en el informe de avance, se debe solamente al efecto del tamaño de los peces, el cual no fue totalmente removido por la transformación de los datos realizada. Con el fin de lograr una comparación más real se tomaron sólo aquellos individuos que estuvieran dentro del rango de tamaños de 39 cm como mínimo y 86 cm de longitud total como máximo. Como consecuencia de la reducción anterior se eliminaron 83 individuos de la zona centro-sur correspondientes casi en su totalidad al primer muestreo y 28 de la zona sur austral.

De acuerdo a lo anterior, los nuevos resultados de los análisis de componentes principales entregan una homogeneidad entre ambas localidades, quedando sólo algunos individuos con una tendencia a separarse a lo largo de la primera componente principal (Fig. 3.9; Tabla 3.5). Para la variación intralocal en la zona centro-sur, se observa una separación (no tan marcada) a lo largo de la primera componente la cual aun es por efecto del tamaño (Fig. 3.10; Tabla 3.6). En cambio para la zona sur-austral se observa una gran homogeneidad de los datos igual que lo observado para el total de los individuos (Fig. 3.11; Tabla 3.7).

En cuanto al MANOVA (ver tabla 3.8) el test T^2 de Hotelling, indica que se trataría de dos grupos significativamente distintos. Pero es necesario mencionar que de las 21 variables consideradas en el análisis, 10 de ellas presentan valores de probabilidad superiores al 0.05 en tanto 11 variables presentan valores de p menores a 0.05. Al parecer esta prueba es muy susceptible a los valores extremos.

Consideradas entonces, las dos aproximaciones metodológicas, el ACP ha permitido mostrar lo que ocurre cuando en algunas de las muestras existe una distribución de tallas muy sesgada, situación que se corrige al reanalizar la información utilizando las tallas que son comparables, aun cuando las modas de las distribuciones se mantengan distintas, efecto que sigue siendo decisivo en el MANOVA.

Los resultados indican que se está en presencia de un solo grupo morfológico, pero que al parecer existiría un gradiente latitudinal en torno a encontrar los ejemplares mayores hacia el sur.

4. ANALISIS PARASITOLÓGICO

INTRODUCCION

Un método alternativo para definir la existencia de unidades de stock, está dado por el uso de parásitos como marcadores biológicos, técnica que ha sido aplicada en una serie de estudios relacionados no sólo con peces, sino también con otros organismos marinos (Leaman & Kabata 1987; Dailey & Vogelbein, 1991). Indudablemente, la integración de dos o más técnicas de discriminación de stock, originará resultados de una muy alta confiabilidad.

El uso de la fauna de parásitos que albergan distintos tipos de hospedadores, fue considerado por primera vez como una valiosa herramienta en estudios zoogeográfico, por Von Ihering en 1902 (Szidat, 1955). Sin embargo, su aplicabilidad práctica en términos de auxiliares en estudios ecológicos, sistemáticos y pesqueros de sus hospedadores es mucho más reciente (Manter, 1955; Szidat, 1960; Polyanski, 1961). La utilidad de la fauna de parásitos como marcadores biológicos, en estudios de separación de unidades poblacionales, queda claramente explicitada en los postulados de Noble y Noble (1982) al indicar que .."Cuando una especie de huésped se divide en dos o más grupos geográficamente separados en diferentes ambientes, (entonces) sus respectivas faunas de parásitos exhibirán diferencias". Intentos por develar problemas en estudios de poblaciones de peces, tales como separación de stock, rutas migratorias y reclutamiento han sido realizados entre otros por Margolis (1965) quien utiliza el conjunto de parásitos de salmones del género *Oncorhynchus*, como fuente de información sobre dieta y distribución oceánica. Pippy (1969), utiliza el acantocéfalo *Pomporhynchus laevis* como marcador en *Salmo salar*, Scott (1969) analiza sin éxito la fauna de digeneos para determinar poblaciones aisladas de *Argentina silus* y Leaman & Kabata (1987) utilizan el copépodo *Neobrachiella robusta* en identificación de stock de *Sebastes alutus*. Para las costas de América sur-occidental, se han desarrollado muy pocos estudios que plantean el uso de parásitos como marcadores biológicos: George-Nascimento & Arancibia (1992) intentan caracterizar stock ecológicos de jurel (*Trachurus symmetricus murphyi*) en la costa Chilena, George-Nascimento (1996) propone la existencia de dos stock ecológicos de la merluza común en las costas de Chile, Mackenzie (1989) discrimina stock de sardinas (*Sardinops sagax*) en aguas costeras de Perú y Ecuador y Oliva *et al.* (1992) definen una relación entre reclutamiento e infección parasitaria en la cabrilla *Paralabrax humeralis*.

Recientemente, Oliva y Ballón (1998) sobre la base de información parasitológica, determinaron la existencia de tres unidades poblacionales de merluza (*Merluccius gayi*) para las costas de Chile y Perú.

Se han propuesto una serie de criterios que deben considerarse al definir parásitos como indicadores biológicos (Kabata, 1963; MacKenzie, 1983; Moser, 1983, 1991; Lester, 1990). Integrando los diversos criterios, estos pueden resumirse en:

- 1.- El parásito debe ser común en una población y raro o estar ausente en otra (s).
 - 2.- Debe tener un ciclo de vida corto (directo), infectando un solo huésped en su ciclo vital.
 - 3.- La infección debe ser de relativamente larga duración y cubrir al menos la escala de tiempo del estudio.
 - 4.- La incidencia (prevalencia) de infección debe permanecer relativamente constante.
 - 5.- Condiciones ambientales a través de toda el área de estudio deben corresponderse con los límites de tolerancia del parásito.
 - 6.- No se deben considerar ectoparásitos que sean fácilmente desprendibles o que no dejen evidencias de su presencia, ya que pueden perderse en la captura o durante el manipuleo.
 - 7.- El método de examen debe considerar un mínimo de disección y preferible un alto nivel de especificidad por un hábitat definido.
 - 8.- El parásito debe ser fácilmente detectable e identificable.
 - 9.- El parásito no debe tener marcados efectos patológicos, ya que de lo contrario originará mortalidades selectivas o cambios conductuales en el huésped, afectando su valor como marcador.
- Estos criterios han sido aceptados en su globalidad. Sin embargo, estos no son estrictos, y dependerán fundamentalmente del tipo de estudio poblacional a realizar. De esta manera, Mackenzie (1983) indica que en trabajos de separación de stock deben utilizarse de preferencia parásitos con ciclo de vida simple, ya que el uso de aquellos con ciclos complejos, requieren una gran cantidad de información sobre su biología. Para efectos de este estudio, en el que resulta de interés determinar marcadores biológicos de unidades poblacionales discretas, se enfatizará en la búsqueda de parásitos metazoos marcadores que reúnan las siguientes condiciones:

- 1.- Que sean fácilmente identificables y con una alta especificidad por un hábitat.
- 2.- Que su recolección requiera un mínimo de disección.

- 3.- Que su presencia sea común en una zona y escasa o ausente en otras.
- 4.- Que idealmente tenga un ciclo de vida directo, lo que implica que su transmisión ocurra al interior de la unidad y no se transmita a unidades discretas diferentes.

El uso de parásitos como marcadores biológicos en peces del género *Macruronus* no ha sido documentado. De hecho, la información sobre parásitos de la especie *Macruronus magellanicus*, no sólo es escasa, sino también fragmentaria, e incluye los trabajos de Dumitrescu (1979) que menciona la presencia de un cestodo adulto del género *Botriocephalus*, la larva del cestodo *Hepatoxylon trichiuri* y un nematodo del género *Anisakis*. Aparentemente la cita del cestodo *Botriocephalus* sp. es errónea y correspondería a *Clestobothrium crassiceps*, ya que el mismo cestodo *Botriocephalus* es indicado como parásito de la merluza *Merluccius* spp. de la zona de las Islas Malvinas. Otros artículos referido a parásitos de *M. magellanicus* incluyen a Gibson (1976), quien registra la presencia de los Hemiuridos *Derogenes varicus* y *Elytrophalloides oatesi*, esta última especie ha sido citada, como *Ellytrophallus merluccii* por Suriano & Sutton, (1981) para poblaciones de *Macruronus magellanicus* de las Islas Malvinas (Bray, 1990). Digeneos son también citados por Gaevskaya & Kovaleva (1978) quienes indican la presencia del hemiurido *Brachyphallus parvus*. Parásitos de *Macruronus magellanicus* en aguas chilenas, han sido mencionados por Torres *et al.* (1983), quienes analizan 3 ejemplares obtenidos en la zona de Valdivia, encontrando los siguientes parásitos: larvas del cestodo *Grillotia heptanchi* y los anisakidos *Anisakis simplex*, *Anisakis physeteris*, *Pseudoterranova decipiens* e *Hysterothylacium* sp. Finalmente Riffo & George-Nascimento (1992) indican la presencia de *Anisakis* sp. e *Hysterothylacium* sp. en merluzas de cola de la zona de Talcahuano. Todos estos parásitos, corresponden a formas muy poco específicas, y difícilmente pueden ser considerados como parásitos propios de *M. magellanicus*.

MATERIALES Y METODOS.

Los peces, una vez obtenidos desde los puertos base (Zona Centro Sur: Puerto de Talcahuano, Zona Sur austral: puertos de Coyhaique y Punta Arenas) fueron inmediatamente congelados (-18° C), para su envío en cajas isotérmicas, al laboratorio de Parasitología Marina del Instituto de

Investigaciones Oceanológicas de la Universidad de Antofagasta. Una vez en el laboratorio se procedió al análisis de la muestra, la que incluye la determinación de la longitud total, con una precisión de 1 cm. Posteriormente se procedió a la búsqueda de ectoparásitos en superficie corporal y cavidad branquial. Cada pez fue disectado y previa determinación del sexo, se separaron los diversos órganos, incluido branquias. Cada órgano fue aislado en una cápsula petri y cuidadosamente analizado, bajo lupa, en busca de parásitos metazoos. Para cada ejemplar, se llenó una ficha parasitología que permite identificar los parásitos presentes, en términos cuali y cuantitativos.

Para cada parasitosis, se determinó la prevalencia (porcentaje de individuos parasitados por una especie en particular de parásitos) e intensidad media de infección (número promedio de parásitos de una determinada especie, en la muestra, considerando sólo peces parasitados). El producto de ambos descriptores es igual a la abundancia media (Bush *et al.* 1997).

Análisis estadísticos incluyeron pruebas univariadas (Análisis de varianza) para determinar si la talla media de los peces de ambas zonas difiere significativamente. La misma prueba se aplicó para determinar si la talla media de machos y de hembras, difiere significativamente entre localidades. La prueba "G" de bondad de ajuste logarítmico se usó para determinar si la prevalencia de infección, para cada una de las parasitosis consideradas importantes, difiere entre localidades. Un ANOVA, previa transformación ($\log n+1$) se aplicó para determinar si la intensidad media difiere entre localidades. Las mismas pruebas fueron aplicadas para comparar ambos descriptores, en peces del mismo sexo pero de distintas localidades.

RESULTADOS

Se analizó un total de 450 ejemplares de *Macruronus magellanicus*, provenientes de Talcahuano (172) y Coyhaique - Punta Arenas (278), el tamaño de la muestra, asegura que los posibles efectos debido a este factor son descartables (Gregory & Blackburn, 1991) y que aparecerán representados todas aquellas especies con prevalencias al menos del 5% (McDaniel, 1979). El total de taxa parasitarios (metazoa) alcanzó a 15, con un total de 24205 individuos, el 79.6% de los cuales correspondieron a nematodos. Las características de las muestras se indican en la Tabla 4.1. Las

características cuantitativas de la fauna parasitaria, tanto para ejemplares provenientes de Talcahuano como aquellos de la zona sur austral, se indican en la tabla 4.2.

La fauna parasitaria obtenida incluye los siguientes grupos taxonómicos:

COPEPODA

Chondranchantus australis, copépodo común en peces de la Familia Merluccidae, ha sido registrado (en ocasiones como *Chondracanthus palpifer*) en *Merluccius gayi* y *Merluccius australis*. Su presencia en *Macruronus magellanicus* no había sido registrada anteriormente, pese a que la especie fue descrita por Ho (1991) como parásito de *Macruronus novaezelandiae*. Se ha obtenido desde las dos zonas.

Neobrachiella sp. Copépodo que se obtuvo en una oportunidad, en la zona centro sur. Este género presenta un amplio espectro de hospedadores y la forma *Neobrachiella insidiosa* es propia de peces del género *Merluccius* (Kabata, 1979).

DIGENEA

Elytrophalloides oatesi. Especie común en peces australes. Ha sido registrada anteriormente en *M. magellanicus*, por Suriano y Sutton (1981) como *Ellytrophallus merluccii* y al menos bajo otras cinco denominaciones específicas diferentes en otros peces australes (Gibson, 1976; Bray, 1990). Registros de este digeneo en Merluza de cola, corresponden a especímenes obtenida desde las Islas Malvinas. Este parásito se obtuvo desde ambas localidades.

Gonocerca phycidis. Especie de amplia ocurrencia en diversos tipos de peces marinos. Ha sido registrada en las costas atlánticas de Norte América, en el Atlántico norte, Australia y región sub-antártica (Bray, 1976). Se obtuvo desde ambas localidades.

Derogenes varicus. Una de las especies de digenea de más amplia distribución, ha sido registrada en *Merluccius* en las costas de Chile y se obtuvo en ambas localidades.

Digenea gen. sp. Parásito presente en ambas localidades. Su posición sistemática no ha podido ser aclarada aún.

CESTODA

Hepatoxylon trichiuri. Larvas de este cestodo Trypanorhyncha son relativamente comunes en peces australes, no había sido registrada anteriormente en *M. magellanicus*. Es una larva de gran

tamaño y fácilmente detectable. Ha sido propuesta como posible indicador poblacional para *Merluccius gayi* (Oliva y Ballón, 1998). Se ha obtenido desde ambas localidades.

Scolex pleuronectis Estadio larval de cestodos tetraphyllideos no identificados, conforma un conjunto o complejo de especies de taxonomía conflictiva. Es una forma común en peces marinos. No había sido registrada anteriormente en *M. magellanicus*. Especímenes de este cestodo se han obtenido sólo en la zona sur austral.

Clestobothrium crassiceps. cestodo común a todas las especies de *Merluccius*, no había sido registrado anteriormente como *C. crassiceps* en *M. magellanicus*. Sin embargo, la errada cita de *Bothriocephalus* sp. tanto en *Merluccius spp.* y *Macruronus magellanicus* de la zona de las Islas Malvinas (Dumitrescu, 1979), hace pensar que se trata en realidad de *C. crassiceps*, ya que no ha sido registrada la presencia de *Bothriocephalus* sp. en merlucidos. Sólo se ha registrado en la zona sur austral. Puede ser un parasitismo accidental.

Grillotia dollfusi . Forma larval de cestodos Trypanorhyncha que alcanzan el estado adulto en elasmobranquios. Su presencia es escasa y sólo se ha detectado en Punta Arenas. Torres *et al.* (1993) la detectaron en la zona de Valdivia, infectando 1 de tres especímenes de *M. magellanicus* analizados.

Pseudophyllidea no identificado. Presenta similitudes con larva de *Diphyllobothrium*. Sin embargo, no es posible asignar con seguridad su filiación. Larvas de Pseudophyllideos no son raras en peces marinos. Ha sido detectadas sólo en la zona sur austral.

NEMATODA

Anisakidae. Se ha considerado el conjunto de especies de la Familia Anisakidae, propios de peces marinos, bajo una denominación global, dada la magnitud, en términos cuantitativos, de esta parasitosis, la segunda de mayor importancia cuantitativa, obteniéndose un total de 5701 individuos, con un máximo de 433 ejemplares de Anisakidae en un pez. Estos parásitos son de muy común ocurrencia en peces marinos y su alta abundancia en Merluzas de cola, sugiere que este pez es un predador tope en su ambiente, acumulando las larvas acarreadas por otros peces que le sirven de alimento.

Ascarophis (?) sp. Corresponde a una forma de nematodo no bien conocida, cuya identidad no ha sido aún aclarada. Es la parasitosis más importante, habiéndose recolectado un total de 13561 ejemplares, con un máximo de 502 individuos.

ACANTHOCEPHALA

Corynosoma sp. Larvas cistacanto del Género *Corynosoma*, son comunes en peces marinos. Fueron detectadas con mayor prevalencia en Talcahuano. No han sido registradas previamente en *M. magellanicus*

Acanthocephala gen. sp. (adulto no identificado). Corresponde a una forma adulta, presente sólo en la zona sur-austral. Acantocefalos adultos no habían sido registrados anteriormente en *M. magellanicus*

ESTRUCTURA POR TALLAS DE LA MUESTRA.

La tabla 4.1 indica las características de las muestras, en términos de talla según sexo y localidad. Pese a que la talla media, considerando la totalidad de las muestras para cada localidad, no difiere significativamente (centro sur = 64.1 cm [d.s. = 9.8], sur austral = 64.6 [d.s. = 12.6], $F_{1,448} = 0.251$, $P = 0.617$). Sin embargo, al comparar la talla media de machos y hembras de una misma localidad, estas resultan ser significativamente diferentes, siendo en ambos casos los machos de menor talla (centro sur: machos = 62.4 cm [d.s.=8.54], hembras = 65.9 cm [d.s.= 9.85] $F_{1,164} = 5.901$ $P = 0.016$; sur austral: machos = 62.1 cm [d.s. =10.43], hembras = 68.8 cm, [15.08], $F_{1,260} = 16.51$, $P < 0.001$). Al comparar la talla media para cada sexo entre localidades, estas no resultan diferir significativamente (machos: $F_{1,182} = 0.037$, $P = 0.847$; hembras: $F_{1,242} = 2.71$, $P = 0.101$).

Para evitar posibles efectos del sexo del hospedador, más aún al considerar que estos difieren significativamente en cuanto a talla en cada localidad, se procedió a realizar análisis univariado para cada sexo, entre localidades. Los análisis se realizaron sólo sobre aquellas especies consideradas importantes, es decir con prevalencias de infección igual o superior al 5% en alguna de las localidades, estas especies son el copépodo *Chondracanthus australis*, los digeneos *Elytrophalloides oatesi* y *Gonocerca phycidis*, el cestodo *Hepatoxylon trichiuri* y los nematodos Anisakidae y *Ascarophis* sp.

PREVALENCIA DE INFECCION

En la tabla 4.3, se indica los valores de prevalencia de infección e intensidad media de infección para las 6 parasitosis mayores y consideradas de relevancia. La comparación de prevalencia para

cada sexo entre localidades, indica que para hembras, esta no difiere entre localidades para todas las especies consideradas, en cambio para machos ocurren diferencias altamente significativas para todas, menos dos (*Chondracanthus australis* y *Hepatoxylon trichiuri*) parasitosis. En este caso, los mayores valores de prevalencia de infección ocurren todos para la zona sur-austral. La intensidad media de infección sigue un patrón diferente: tres especies no presentan diferencias significativas, para hembras, entre zonas (*C. australis*, *E. oatesi* y Anisakidae) las restantes difieren significativamente, con mayores valores en la zona sur austral. Por el contrario, machos presentan sólo una parasitosis con valores de intensidad media que no difiere entre zonas (Anisakidae). Todas aquellas parasitosis que difieren significativamente, presentan mayores valores en la zona sur-austral, con excepción de *C. australis* con mayor intensidad media en la zona centro-sur.

5.- ANALISIS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Las técnicas que entregan información exclusivamente de origen genético, han demostrado ser bastante consistentes en la merluza de cola al estimar una alta homogeneidad entre los ejemplares muestreados para las zonas Sur-Austral y Centro-Sur. Por una parte los marcadores proteínicos, expresado en cuatro sistemas polimórficos y 34 sistemas monomórficos muestran para la especie un valor bajo de variabilidad genética, al compararse con otras especies de peces de origen demersal.(Ward *et al.* 1994). Los valores del parámetro F_{st} que mide el grado de diferenciación poblacional, como los valores de identidad genética no dejan duda alguna que la merluza de cola muestra un alto grado de homogeneidad genética entre ejemplares obtenidos desde dos zonas de su distribución en las pesquerías de la costa de Chile.

Por otra parte la otra técnica utilizada para probar la variabilidad genética directa a nivel de la molécula del ADN y específicamente del ADN mitocondrial, información que se reconoce muy útil para medir niveles de diferenciación (Park and Moran, 1995), debido a su alta tasa de mutación en comparación con los genes del ADN nuclear, demuestran en la merluza de cola, niveles de variación no significativo entre las muestras de las zonas Sur-Austral y Centro- Sur.

De acuerdo con Sinclair & Iles (1989), las especies del género *Merluccius* en general se encuentran pobremente estructuradas a nivel de constituir poblaciones. Esta situación se repite en general en muchas especies marinas considerando que prácticamente no existen barreras geográficas que eviten la migración y el intercambio génico entre los individuos de la especie, también permite un extenso flujo génico la gran dispersión larval que permite la homogenización en especies con amplio rango de distribución geográfica.

Junto a los métodos genéticos se investigaron los antecedentes que entrega la morfología y la parasitología, caracteres que en diferentes grados tienen una importante influencia del ambiente.

El análisis morfométrico muestra que la variabilidad intralocalidad puede ser mayor que la variabilidad entre las localidades. Ese efecto puede aun ser más marcado si alguna de las muestras es demasiado homogénea en su composición de tamaños, particularmente si corresponde a algunos de los extremos del espectro de tamaños. Como el ACP trabaja con la matriz de Varianza-Covarianza, es explicable que una muestra de peces homogénea y de tallas pequeñas, pueda presentar sólo una fracción reducida de toda la covariación potencial. Son clarificadoras las figuras en donde se presenta la correlación de cada una de las medidas versus la medida M, todos los puntos correspondientes a los peces pequeños, se ubican perfectamente en la primera porción de las rectas (Fig. 3.5).

Lo anterior también sirve para demostrar lo incorrecto que sería estandarizar los datos por algunas de las medidas mayores (longitud total o longitud estándar), ya que cada variable tiene su propia relación de alometría con las demás variables. La estandarización comentada asume que todas las variables covarían del mismo modo con la longitud estándar, lo que es absolutamente incorrecto. De allí lo acertado que resulta la transformación logarítmica.

Es notable entonces, que luego de removidos del análisis aquellos individuos cuyas tallas extremas no están representadas recíprocamente en las muestras que se comparan, el ACP muestra la homogeneidad morfológica entre ambos grupos (Centro-sur vs. Sur-austral, Fig. 3.9).

De acuerdo a la información entregada por los análisis parasitarios, los parásitos metazoos de *Macruronus magellanicus*, son comunes a ambas zonas de pesca, de modo que diferencias cualitativas no son evidentes, y bajo este criterio no se debería aceptar la hipótesis de la existencia

de diferentes stocks. Las características poblacionales de las parasitosis, analizadas por sexo entre localidades, dada la significativa diferencia en tallas de los sexos por localidades y ausencia de diferencias en talla media por sexo entre localidades, muestra un comportamiento disímil entre sexos. Así, la prevalencia de infección para hembras, entre localidades no difiere significativamente para ninguna parasitosis, pero si difiere para algunas en el caso de machos (Tabla 4.3). Estas diferencias estarían sugiriendo que machos y hembras están diferencialmente expuestos, (como población) a procesos infecciosos. Con excepción de la infección originada por larvas de *H. trichiuri*, que no muestra diferencias significativas en prevalencia de infección entre localidades para ejemplares macho, todas las otras parasitosis que difieren corresponden a endohelminos tróficamente transmitidos. Esta situación estaría indicando que las diferencias observadas serían consecuencia de una selectividad por la dieta entre machos y hembras, más que a razones que apunten a un proceso de aislamiento poblacional. De modo similar, diferencias significativas en intensidad media de infección para todas las parasitosis tróficamente transmitidas (con excepción de Anisakidae) para machos, sugiere que habría también una selectividad en la dieta entre localidades, o menor disponibilidad en el ambiente, de los organismos que conforman la dieta de las merluzas macho y que acarrean las formas transmisibles de esos parásitos. Al considerar, siempre para machos, que las mayores intensidades medias, para las parasitosis tróficamente transmitidas, ocurren en la zona sur-austral, no se puede descartar que los parásitos sean adquiridos en esta zona y los mismos se pierdan en procesos de migración hacia el norte. Esta explicación es plausible sobre todo para digeneos y *Ascarophis* sp., ya que corresponden a formas intestinales, normalmente de corta residencia, y cuya población se sustenta por procesos continuos de reinfección (Oliva y Guerra, 1987). Este patrón no es tan claro para hembras, sin embargo de las tres especies que presentan diferencias significativas (también mayores en la zona sur-austral) dos parásitos corresponden a formas intestinales (*Ascarophis* sp. y *Gonocerca phycidis*).

Los antecedentes parasitológicos ahora obtenidos, no permiten postular, la existencia de stocks de *Macruronus magellanicus* en las zonas sur-austral y centro-sur, pero la evidencia parasitaria parece sugerir procesos de migración de la especie, los que ocurrirían desde el sur hacia el norte.

6.- CONCLUSIONES

- La información genética obtenida mediante marcadores genéticos proteínicos, al comparar los ejemplares provenientes de la zona Sur-Austral y Centro Sur, muestra una alta homogeneidad genética para la merluza de cola *Macruronus magellanicus*.
- La variabilidad genética analizada a nivel del ADN mitocondrial a través de las técnicas de amplificación de la región D-loop mitocondrial mediante PCR y su posterior digestión con enzimas de restricción demostraron que existe una variabilidad al interior de cada zona pero con una alta homogeneidad genética interlocalidad.
- La información morfológica analizada, considerando un total de 21 variables, permite concluir que no hay evidencias que permitan estructurar la merluza de cola en diferentes stocks.
- El análisis cualitativo de la fauna parasitaria en *Macruronus magellanicus* indica que para ambas zonas de muestreo no existen diferencias.
- Se concluye en esta investigación que la merluza de cola *Macruronus magellanicus* constituye un solo stock en la distribución de la pesquería en las costas de Chile.

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BRAY, R. 1990 Hemiuridae (Digenea) from amrine fishes of the southern Indian Ocean: Dinurinae, Ellytrophallidae, Glomericirrinae and Plerurinae. *Systematic Parasitology* 17: 183-217.
- BUSH, A.O., LAFFERTY, K. D., LOTZ, J. M. AND A. W. SHOSTAK. 1997. Parasitology meets Ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* 83(4):575-583.
- CUBILLOS, L. 1998. Estudio Biológico-Pesquero de merluza de cola en el área de distribución de la pesquería Pelágica centro-sur. Informe Final FIP N° 96- 19 INPESCA. 158pp.
- CHOW, S. & S. INOUE. 1993. Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bulletin of the National Research Institute of Far Seas Fisheries*, 30: 207-225.
- DAILEY MD & WK VOGELBEIN 1991 Parasite fauna of three species of antartic whales with reference to their use as potential stock indicators. *Fish. Bull.* 89: 355-366.
- DOYLE, J.J. & J.L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11-15.
- DUMITRESCU E 1979 La parasitation des especes *Macruronus magellanicus* et *Merluccius* spp de la zone des Iles Falkland. *Cercetari Marine I.R.C.M.* 12:233-238
- GAEVSKAYA A & A. KOVALEVA. 1978. Materials on fish trematode in the south-western Atlantic. *Vestnik Zoologii* 3:60-66 (en Ruso)
- GEORGE-NASCIMENTO M. & H ARANCIBIA 1992 Stock ecológicos del jurel (*Trachurus symmetricus murphyi* Nichols) en tres zonas de pesca frente a Chile, detectados mediante comparación de su fauna parasitaria y morfometría. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 65: 453-470.
- GEORGE-NASCIMENTO M. 1996. Populations and assemblages of parasites in hake *Merluccius gayi*, from the southeastern Pacific Ocean: stock implications. *J. Fish Biol.* 48:557-568
- GIBSON D. 1976 Monogenea and Digenea of fishes. *Discovery Report* 36:179-266
- GREGORY R. D. & T. M. BLACKBURN. 1991. Parasite prevalence and host sample size. *Parasitology Today* 7: 316-318.
- GREWE, P.M., KRUEGER, C.C., AQUADRO, C.F., BERMINGHAM, E., KINCAID, H.L. & B. MAY. 1993. Mitochondrial DNA variation among lake trout strains stocked into Lake Ontario. *Canadian journal of fisheries and aquatic science* 50: 2397 - 2403.
- HO, J.S. 1991. Two species of Chondracanthid Copepods (Poecilostomatoida) parasitic on commercial fishes in the Pacific. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 35(1/3):1-10

- INNES, B.H., P. M. GREWE, R.D: WARD. 1998. PCR-based genetic identification of marlin and other billfish.. Submitted.
- KABATA Z. 1963 Parasites as biological tags. Int. Comm. Northwest Atl. Fish., Spec. Publ. 4:31-37.
- KABATA Z. 1979. Parasitic copepoda of British fishes. The Ray Society. Vol 152.. 468pp + 2031 figs.
- KHAN, R.A. & C. TUCK. 1995. Parasites as biological indicators of stocks of Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52 (Suppl.1):195-201.
- LEAMAN BM & Z. KABATA 1987 *Neobrachiella robusta* (Wilson, 1912) (Copepoda: Lernaepodidae) as a tag for identification of stocks of its host, *Sebastes alatus* (Gilbert, 1890) (Pisces: Teleostei). Can J. Zool. 65: 2579-2582.
- LESTER RJG 1990 Reappraisal of the use of parasites for fish stock identification. Australian Jour. Mar. Freshwater Res. 41: 855-864
- LOVE, M.S. 1980. Isolation of olive rockfish, *Sebastes serranoides*, populations off Southern California. Fish. Bull. 77:975-983.
- MACKENZIE K 1989 Parasites as biological tags for pacific sardines *Sardinops sagax* (Jennyns) in coastal waters of Ecuador and Perú Inf. DAFS Mar Lab. Aberdeen Escocia
- MACKENZIE K. 1983 Parasites as biological tags in fish population studies. Adv. Applied Biology 7: 251-331.
- MANLY, B. F.J. 1991. Randomization and Monte Carlo methods in Biology. Chpman & Hall Eds. 281 pp.
- MANTER, H 1955 The zoogeography of trematodes of marine fishes. Exp. Parasit. 4:62-86.
- MATTIUCCI, S., NASCETTI, G., CIANCHI, R., PAGGI, P., MARGOLIS, L.,BRATTEY, J., WEBB, S., D'AMELIO, S, ORECCHIA, P. & L. BULLINI. 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda: Ascaridoidea, Anisakidae). J. Parasitol. 83:401-416.
- MARGOLIS, L 1965 Parasites as an auxiliary source of information about the biology of pacific salmons (Genus *Oncorhynchus*). J. Fish. Res. Bd. Canada 22: 1387-1395.
- MCDANIEL D. 1979 Procedures for the detection and identification of certain fish pathogen. American Fisheries Society. Fish Health Section. Fish Health Blue Book 118 pp.
- MEYER, A. 1994. Molecular phylogenetic studies of fish. in: A.R. Beaumont (Ed.) Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. Chapman & Hall, London. : 219-248.

- MOSER M 1983 Parasites as biological tags for herring. Can. Manuscr. Rep. Fish. Aquat. Sci 1700: 125-127
- MOSER M 1991 Parasites as biological tags. Parasitology Today 7: 182-185.
- NOBLE E & G NOBLE 1982 Parasitology. The biology of animal parasites. 5th Ed. Lea & Febiger Philadelphia. 522 pp.
- OLIVA, M. & C. GUERRA. 1987. Infección por *Lecithochirium* sp. (trematoda:Hemiuridae) en *Gymnothorax porphyrea* (Pisces:Teleostei) del Archipiélago de Juan Fernández. Estud. Oceanol. 6: 103-107.
- OLIVA ME, BORQUEZ AS & A OLIVARES 1992 Sexual status of *Paralabrax humeralis* (Serranidae) and infection by *Philometra* sp. (Nematoda: Dracunculoidea). J. Fish Biol. 40: 979-980.
- OLIVA, M. & I. BALLÓN. 1998. Metazoan parasites of the Chilean hake *Merluccius gayi* as a tool for stock discrimination. Fisheries Bulletin (in rev.)
- OVENDEN, JR 1990 Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. Australian J. Mar. Freshwater Res. 41: 835-854
- OYARZUN, C, 1997. Análisis de la diferenciación Poblacional . El caso de *Merluccius gayi* (Guichenot,1848), de la costa de Chile.Tesis de Doctorado. Universidad de Concepción. 93 pp.
- PIPPY, JHC 1969 *Pomphorhynchus laevis* (Zoega) Muller, 1776 (Acanthocephala) in atlantic salmon (*Salmo salar*) and its use as a biological tag. J. Fish. Res. Bd. Canada 26: 909-919.
- PARK, L.K. & p. MORAN. 1995. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In Molecular Genetics in Fisheries, Ed. R. Carvalho and T. Pitcher Chapman and Hall. London . 133pp.
- POLYANSKI, YI 1961 Ecology of parasites of marine fishes. In: "Parasitology of fishes" (Dogiel, VA; Petrushevsky GK and YI Polyanski eds) 48-83. Syesis 16:5-22.
- RIFFO, R, & M. GEORGE-NASCIMENTO. 1992. Variaciones de la abundancia de larvas de *Anisakis* sp. e *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) en la merluza de cola *Macruronus magellanicus* Lonnberg, 1862: la importancia del sexo, tamaño corporal y dieta del hospedador. Estud. Oceanol. 11: 61-78.
- SANKURATHRI, C, KABATA, Z. & D. WHITTAKER. 1983. Parasites of the Pacific hake *Merluccius productus* (ayres, 1855) in the Strait of Georgia in 1974-1975. Syesis 16:5-22
- SCOTT, JS 1969 Trematode populations in the Atlantic Argentine *Argentina silus* and their use as biological indicators. J. Fish. Res. Bd. Canada 26: 879-891.

- SINCLAIR, M & T.D. ILES. 1989. Population regulation and speciation in the oceans. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 45: 165-175.
- SMITH, P.J. 1990. Protein electrophoresis for identification of Australian fish stock. *Australian Jour. Mar. Freshwater Res.* 41: 823-834
- SPEARE, P. 1994. Relationships among black marlin *Makaira indica*, in Eastern Australian coastal waters, inferred from parasites. *Aust. J. Mar. Freshwater Res* 45:535-549
- STANLEY, R.D., D.L. LEE. & D.J. WHITAKER. 1992. Parasites of Yellowtail rockfish, *Sebastes flavidus* (Ayres, 1862) (Pisces: Teleostei), from the Pacific coast of North America as potential biological tags for stock identification. *Can. J. Zool.* 70:1086-1096.
- SURIANO DM Y CA SUTTON 1981 Contribución al conocimiento de la fauna parasitológica argentina VII. Digeneos de peces de la plataforma del mar argentino. *Revista del Museo de la Plata (Nueva Serie)* 12: 261-271
- SZIDAT, L. 1955 La fauna de parásitos de *Merluccius hubbsi* como carácter auxiliar para la solución de problemas sistemáticos y zoogeográficos del género *Merluccius* L. *Inst. Nac. Invest. Cs. Nat. Mus. Argentino Cs. Naturales "Bernardino Rivadavia"* 3(1) 53 pp.
- SZIDAT, L. 1960 La parasitología como ciencia auxiliar para develar problemas hidrobiológicos, zoogeográficos y geofísicos del Atlántico Sur. *Libro Homenaje E. Caballero. UNAM-México.* 577-594.
- TORRES P., CONTRERAS A, REVENGA J & N. FRITZ. 1993 Helminth parasites in fishes from Valdivia and Tornagaleones River estuaries in the south of Chile. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 88:491-492
- WARD, R.D., M. WOODWARK & D.O.F. SKIBINSKY. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.*, 44: 213-232
- YOUNG, Z., J. CHONG, H. ROBOTHAM, P. GALVEZ, H. GONZALEZ. 1998. Análisis de la pesquería de Merluza de cola en la zona Sur-Austral. *Informe Final Proyecto FIP 96-37. Instituto de Fomento Pesquero.* 97 pgs. y Anexo.

ANEXOS

Tabla 1.1.- Sistemas enzimáticos analizados para *Macrouronus magellanicus*

ENZIMA		E.C. N°	LOCI	TAMPON	TEJIDO
Alcohol deshidrogenasa	ADH	1.1.1.1	2	A	M-H
Glicerol 3 fosfato Deshidrogenasa	G3PDH*	1.1.1.8	2	A	M-H
Sorbitol Deshidrogenasa	SDH	1.1.1.14	1	C	H
Lactato Deshidrogenasa	LDH	1.1.1.27	2	A	M
Malato Deshidrogenasa	MDH	1.1.1.37	2	A	M-H
Enzima Malica	ME	1.1.1.40	1	C	M-H
Isocitrato Deshidrogenasa	IDH*	1.1.1.42	1	A	M-H
Fosfogluconato Deshidrogenasa	PGD	1.1.1.44	1	A	M
Glucosa Deshidrogenasa	GDH	1.1.1.47	2	B	M
Glucosa 6 P Deshidrogenasa	G6PDH	1.1.1.49	1	D	H
Gliceraldeido P. Deshidrogenasa	GAPDH	1.2.1.12	2	B	M-H
Xantina oxidasa	XOD	1.2.3.2	1	C	H
L Glutamato Deshidrogenasa	GLUD	1.4.1.3	1	A	M
Tetrazolio oxidasa	TO	1.15.1.1	1	C	M-H
Aspartato amino transferasa	AAT*	2.6.1.1	1	B	M-H
Creatina Quinasa	CK	2.7.3.2	2	A	M
Fosfoglucomutasa	PGM*	2.7.5.1	1	A-B	M
Esterasa (naftil acetato)	EST	3.1.1.1	3	C	M
Glioxalasa	GLIO	3.1.2.6	1	D	M
Leucina amino peptidasa	LAP	3.4.11.1	1	E	M-H
Peptidasa A	PEP- A	3.4.11.13	2	C	M-H
Aldolasa	ALD	4.1.2.13	1	A	M
Anhidrasa Carbónica	CA	4.2.1.1	2	C	M
Fumarasa	FUM	4.2.1.2	1	C	M
Aconitasa	ACO	4.2.1.3	1	A	M
Fosfoglucoisomerasa	PGI*	5.3.1.9	2	A-B	M-H

• *Polimórfico

• (M) Músculo

• (H) Hígado

(A): Tris cítrico pH 7, (B): Tris Edta Borato 8.0, (C) Litio pH 8.0, (D) Poulik discontinuo pH 8.2

(E) Tris discontinuos pH 5.1-6.0

Tabla 1. 2.- Frecuencias alélicas, Heterocigosidad observada (Ho), valor de χ^2 para equilibrio de Hardy-Weinberg, índice de desviación del equilibrio (D). Las poblaciones de merluza de cola *M. magellanicus* se indican por localidad y por número.

LOCUS	TALCAHUANO			COYHAIQUE			PTA. ARENAS	
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>G3PDH-2</i>								
(N)	62	63	60	156	90	62	108	25
A	0.992	0.984	0.975	0.984	0.989	0.968	0.977	0.98
B	0.008	0.016	0.025	0.016	0.0055	0.016	0.009	0.02
C	-	-	-	-	0.0055	0.016	0.014	-
Ho	0.045	0.031	0.049	0.033	0.022	0.063	0.046	0.040
χ^2	0	0.008	0.026	0.94	0.006	0.051	0.048	0
D	0	0.008	0	0.013	0.003	0.017	0.013	0
<i>IDH</i>								
(N)	62	63	40	141	88	40	98	25
A	1.000	1.000	0.988	0.986	1.000	0.988	1.000	1.000
B			0.012	0.014		0.012		
Ho			0.025	0.028		0.025		
χ^2			0	0.03		0		
D			0.017	0.013		0		
<i>AAT</i>								
(N)		60	60		54	60		54
A		0.942	0.95		0.972	0.975		0.963
B		0.058	0.05		0.028	0.025		0.037
Ho		0.111	0.096		0.055	0.049		0.072
χ^2		0.196	0.137		0.029	0.026		0.059
D		0.053	0.044		0.019	0.017		0.029
<i>PGM</i>								
(N)	62	106	99	156	101	96	110	25
A	0.960	0.958	0.955	0.926	0.936	0.948	0.936	0.960
B	0.040	0.033	0.040	0.071	0.050	0.026	0.055	0.040
C	-	0.009	0.005	0.003	0.014	0.016	0.009	-
D	-	-	-	-	-	0.010	-	-
Ho	0.081	0.082	0.088	0.135	0.123	0.101	0.127	0.078
χ^2	0.087	0.184	0.199	0.022	0.942	0.260	0.47	0.021
D	0.034	0.032	0.037	0.011	0.073	0.032	0.054	0.021

Tabla 2.1 Número de individuos para cada haplotipo en *M. magellanicus*

Haplotipos	Centro Sur	Sur Austral
1	2	0
2	2	4
3	31	33
4	3	5
5	0	1
6	1	0

Tabla 3.1. Número de individuos por localidad y muestreo de merluza de cola utilizados para el análisis morfométrico.

LOCALIDAD	n
Zona Centro-Sur 1	88
Zona Centro-Sur 2	111
Zona Centro-Sur 3	70
TOTAL Z. Centro-Sur	269
Zona Sur-Austral 1	146
Zona Sur-Austral 2	206
Zona Sur-Austral 3	90
TOTAL Z. Sur-Austral	443
n TOTAL	712

Tabla 3.2. Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre localidades en merluza de cola (V. E. = varianza explicada).

Variable	CP1	CP2	CP3
A	0,100	0,007	0,009
B	0,101	0,007	0,005
C	0,098	0,012	0,009
D	0,103	0,003	0,009
E	0,116	0,002	-0,008
F	0,102	0,011	0,008
G	0,101	0,023	-0,022
H	0,109	-0,012	-0,006
I	0,106	0,000	0,004
J	0,104	0,008	0,005
K	0,105	0,007	-0,025
L	0,106	-0,015	-0,009
M	0,109	-0,004	0,000
O	0,107	-0,001	-0,009
P	0,104	-0,010	-0,009
Q	0,109	-0,007	-0,003
T	0,111	0,002	0,000
U	0,112	-0,004	0,002
V	0,117	-0,042	0,009
W	0,106	0,007	0,015
X	0,099	0,016	0,019
V. E. (%)	94,057	1,475	1,016
V. E. (% acum.)	94,057	95,532	96,548

Tabla 3.3. Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona centro-sur (V. E. = varianza explicada).

Variable	CP1	CP2	CP3
A	0,123	0,002	0,005
B	0,125	0,003	0,003
C	0,123	0,007	0,005
D	0,124	-0,002	0,003
E	0,132	0,006	0,005
F	0,123	0,002	0,001
G	0,120	0,013	-0,026
H	0,124	-0,016	-0,008
I	0,121	0,012	0,011
J	0,124	0,003	0,002
K	0,116	0,002	-0,027
L	0,119	-0,018	-0,011
M	0,127	0,005	0,005
O	0,122	0,007	-0,004
P	0,119	-0,005	-0,007
Q	0,125	0,001	0,002
T	0,137	0,011	0,006
U	0,134	0,005	0,009
V	0,132	-0,044	0,008
W	0,125	-0,002	0,004
X	0,125	0,008	0,009
V. E. (%)	96,435	0,949	0,644
V. E. (% acum.)	96,435	97,384	98,028

Tabla 3.4. Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona sur-austral (V. E. = varianza explicada).

Variable	CP1	CP2	CP3
A	0,069	0,007	-0,009
B	0,067	0,008	-0,004
C	0,069	0,010	-0,008
D	0,073	0,004	-0,011
E	0,082	0,004	0,013
F	0,069	0,014	-0,011
G	0,077	0,024	0,024
H	0,079	-0,011	0,005
I	0,076	-0,004	-0,007
J	0,072	0,011	-0,007
K	0,075	0,014	0,021
L	0,077	-0,014	0,008
M	0,076	-0,009	0,003
O	0,073	0,000	0,005
P	0,073	-0,011	0,009
Q	0,077	-0,011	0,006
T	0,073	-0,004	0,005
U	0,075	-0,008	0,001
V	0,081	-0,040	-0,010
W	0,076	0,009	-0,020
X	0,069	0,015	-0,019
V. E. (%)	88,179	3,015	2,108
V. E. (% acum.)	88,179	91,194	93,302

Tabla 3.5. Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre localidades, utilizando individuos del mismo rango de tallas. (V. E. = varianza explicada).

Variable	CP1	CP2	CP3
A	0,067	0,008	0,010
B	0,066	0,008	0,004
C	0,065	0,013	0,008
D	0,069	0,004	0,009
E	0,079	0,002	-0,013
F	0,067	0,012	0,009
G	0,071	0,024	-0,023
H	0,075	-0,012	-0,005
I	0,069	-0,002	0,007
J	0,069	0,009	0,005
K	0,072	0,006	-0,024
L	0,074	-0,015	-0,008
M	0,071	-0,005	0,001
O	0,069	-0,003	-0,007
P	0,069	-0,010	-0,008
Q	0,071	-0,008	-0,003
T	0,069	0,002	0,000
U	0,071	-0,005	0,002
V	0,079	-0,042	0,010
W	0,070	0,007	0,015
X	0,065	0,018	0,018
V. E. (%)	87,408	3,297	2,141
V. E. (% acum.)	87,408	90,705	92,846

Tabla 3.6. Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona centro-sur, utilizando individuos del mismo rango de tallas. (V. E. = varianza explicada).

Variable	CP1	CP2	CP3
A	0,083	0,003	0,006
B	0,083	0,003	0,004
C	0,080	0,007	0,004
D	0,083	-0,003	0,002
E	0,091	0,011	0,008
F	0,084	0,003	0,000
G	0,083	0,017	-0,028
H	0,089	-0,015	-0,010
I	0,075	0,009	0,012
J	0,084	0,004	0,002
K	0,083	0,005	-0,024
L	0,087	-0,016	-0,012
M	0,083	0,004	0,007
O	0,079	0,006	-0,001
P	0,091	-0,005	-0,007
Q	0,084	0,000	0,004
T	0,084	0,012	0,010
U	0,085	0,004	0,011
V	0,096	-0,045	0,006
W	0,083	-0,003	0,002
X	0,080	0,009	0,006
V. E. (%)	92,567	2,154	1,397
V. E. (% acum.)	92,567	94,721	96,118

Tabla 3.7. Componentes de carga de las 21 variables morfométricas con las tres primeras componentes principales para la diferenciación entre muestras de la zona sur-austral, utilizando individuos del mismo rango de tallas. (V. E. = varianza explicada).

Variable	CP1	CP2	CP3
A	0,059	0,008	-0,010
B	0,056	0,009	-0,004
C	0,059	0,010	-0,006
D	0,061	0,005	-0,010
E	0,073	0,004	0,015
F	0,058	0,015	-0,011
G	0,066	0,023	0,025
H	0,067	-0,011	0,006
I	0,066	-0,005	-0,012
J	0,061	0,011	-0,007
K	0,064	0,012	0,020
L	0,065	-0,014	0,009
M	0,064	-0,010	0,002
O	0,062	-0,001	0,002
P	0,062	-0,011	0,007
Q	0,064	-0,012	0,006
T	0,061	-0,005	0,004
U	0,063	-0,009	0,000
V	0,068	-0,039	-0,009
W	0,063	0,010	-0,018
X	0,058	0,016	-0,017
V. E. (%)	84,526	4,018	2,762
V. E. (% acum.)	84,526	88,544	91,306

Tabla 3.8. Morfometría de merluza de cola: Resultados del MANOVA al comparar muestras de la Zona Centro-Sur con la Zona Sur-Austral.

Univariate F Tests

Effect	SS	df	MS	F	P
A	0.000	1	0.000	0.067	0.796
Error	2.855	599	0.005		
B	0.001	1	0.001	0.262	0.609
Error	2.861	599	0.005		
C	0.015	1	0.015	3.324	0.069
Error	2.783	599	0.005		
D	0.003	1	0.003	0.611	0.435
Error	2.961	599	0.005		
E	0.093	1	0.093	11.995	0.001
Error	4.630	599	0.008		
F	0.007	1	0.007	1.416	0.234
Error	2.998	599	0.005		
G	0.003	1	0.003	0.408	0.523
Error	3.991	599	0.007		
H	0.043	1	0.043	7.191	0.008
Error	3.606	599	0.006		
I	0.038	1	0.038	6.254	0.013
Error	3.592	599	0.006		
J	0.014	1	0.014	2.851	0.092
Error	3.039	599	0.005		
K	0.123	1	0.123	20.800	0.000
Error	3.549	599	0.006		
L	0.071	1	0.071	12.117	0.001
Error	3.497	599	0.006		
M	0.021	1	0.021	4.101	0.043
Error	3.140	599	0.005		
O	0.103	1	0.103	20.135	0.000
Error	3.062	599	0.005		
P	0.054	1	0.054	10.489	0.001
Error	3.093	599	0.005		
Q	0.042	1	0.042	7.705	0.006
Error	3.278	599	0.005		
T	0.001	1	0.001	0.256	0.613
Error	3.276	599	0.005		
U	0.028	1	0.028	5.157	0.024
Error	3.215	599	0.005		
V	0.178	1	0.178	22.068	0.000
Error	4.825	599	0.008		
W	0.011	1	0.011	1.969	0.161
Error	3.353	599	0.006		
X	0.018	1	0.018	3.583	0.059
Error	3.048	599	0.005		

Multivariate Test Statistics

Wilks' Lambda =	0.596			
F-Statistic =	18.712	df =	21, 579	Prob = 0.000
Pillai Trace =	0.404			
F-Statistic =	18.712	df =	21, 579	Prob = 0.000
Hotelling-Lawley Trace =	0.679			
F-Statistic =	18.712	df =	21, 579	Prob = 0.000

Tabla 4.1. Características de las muestras de *M. magellanicus*.
a) Localidad Centro Sur b) Localidad Sur Austral

a)	TALLA				
	N	Mínima	Máxima	Media	Desv. Est.
JUL/98					
Machos	17	48	89	64,1	9,92
Hembras	47	43	91	67,3	9,34
Indet.	1	71	71	71	
AGO/98					
Machos	15	55	79	66,3	6,2
Hembras	39	41	80	66,3	8,6
Indet.	2	47	66	56,5	13,43
SEP/98					
Machos	37	43	79	60,1	7,93
Hembras	11	40	83	59	13,6
Indet.	3	40	45	42	2,64

b)	TALLA				
	N	Mínima	Máxima	Media	Desv. Est.
MAR/98					
Machos	32	46,5	101	67,7	12,83
Hembras	75	49	130	72,8	16,29
Indet.	18	46	76	61,7	8,65
ABR/98					
Machos	39	46,5	80	58,2	8,1
Hembras	37	47	81	60,9	9,42
Indet.	6	50	62	54,7	4,18
AGO/98					
Machos	41	46	75	60,3	6,92
Hembras	26	43	80	63,2	7,67
Indet.	4	62	74	65,8	5,56

Tabla 4.2 Listado de especies de parásitos obtenidos en *M. magellanicus*.

a) Localidad Centro Sur; b) localidad Sur Austral.

a) ESPECIE	Agosto 1998		Septiembre 1998		Octubre 1998	
	Prev.	Int.	Prev.	Int.	Prev.	Int.
<i>Chondracanthus australis</i>	24,6	2,1	26,8	1,3	51,0	3,6
<i>Neobrachiella sp.</i>	1,5	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ellytrophalloides oatesi</i>	43,1	7,5	19,6	3,2	3,9	1,5
<i>Gonocerca phycidis</i>	21,5	1,8	1,8	1,0	3,9	1,0
<i>Derogenes varicus</i>	1,5	3,0	3,6	2,5	0,0	0,0
<i>Digenea gen sp.</i>	3,1	1,0	3,6	1,0	0,0	0,0
<i>Hepatoxilon trichiuri</i>	66,2	2,9	73,2	2,3	49,0	2,2
<i>Scolex pleuronectis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cleistobothrium crassiceps</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudophillidea</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Grillotia dollfsi</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Anisakidae</i>	95,4	8,4	98,2	9,5	94,1	5,0
<i>Ascarophis ?</i>	75,4	21,0	92,9	22,7	98,0	22,3
<i>Corynosoma sp.</i>	6,2	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Acanthocephala gen sp.</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Prev = Prevalencia de infección, Int. = Intensidad media de infección

b) ESPECIE	Marzo 1998		Abril 1998		Agosto 1998	
	Prev.	Int.	Prev.	Int.	Prev.	Int.
<i>Chondracanthus australis</i>	27,2	1,8	35,4	1,6	4,2	1,3
<i>Neobrachiella sp.</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ellytrophalloides oatesi</i>	52,8	15,0	42,7	23,6	64,8	23,1
<i>Gonocerca phycidis</i>	0,0	0,0	19,5	3,8	66,2	6,5
<i>Derogenes varicus</i>	0,0	0,0	4,9	9,5	0,0	0,0
<i>Digenea gen sp.</i>	0,0	0,0	9,8	3,1	0,0	0,0
<i>Hepatoxilon trichiuri</i>	65,6	4,1	79,3	6,1	28,2	1,7
<i>Scolex pleuronectis</i>	1,6	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cleistobothrium crassiceps</i>	2,4	2,7	1,2	1,0	2,8	1,5
<i>Pseudophillidea (L)</i>	2,4	2,0	1,2	1,0	0,0	0,0
<i>Grillotia dollfsi</i>	4,8	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Anisakidae</i>	89,6	15,6	97,6	6,6	91,5	32,9
<i>Ascarophis ?</i>	89,6	29,5	97,6	66,7	93,0	24,1
<i>Corynosoma sp.</i>	1,6	1,5	0,0	0,0	2,8	2,5
<i>Acanthocephala gen sp.</i>	0,8	1,0	2,4	1,0	0,0	0,0

Tabla 4.3. Prevalencia e Intensidad media de infección para las especies más importantes, según sexo y localidad

Especies	Prevalencia hembras				Prevalencia machos			
	SA	CS	"G"	P	SA	CS	"G"	P
<i>Chondracanthus australis</i>	25,2	23,71	0,08	>> 0.05	24,11	33,68	2,31	> 0.05
<i>Ellytrophalloides oatesi</i>	23,76	27,84	0,46	>> 0.05	40,18	12,63	20,7	<< 0.05
<i>Gonocerca phycidis</i>	16,56	13,4	0,47	>> 0.05	33,93	4,22	32,2	<< 0.05
<i>Hepatoxilon trichiuri</i>	64,8	68,05	0,24	>> 0.05	54,46	43,16	2,63	> 0.05
<i>Anisakidae</i>	89,28	95,79	3,14	> 0.05	94,64	70,53	22,91	<< 0.05
<i>Ascarophis ?</i>	90,72	85,57	1,87	>> 0.05	95,53	67,37	30,42	<< 0.05

Especies	Intensidad media hembras				Intensidad media machos			
	SA	CS	F (gl)	P	SA	CS	F(gl)	P
<i>Chondracanthus australis</i>	1,5	1,7	0.18 (1,56)	0,7	1,4	3,3	5.11 (1,57)	0,0
<i>Ellytrophalloides oatesi</i>	24,3	6,8	2.46 (1,58)	0,1	20,6	4,8	5.37 (1,55)	0,0
<i>Gonocerca phycidis</i>	5,0	1,7	21.2 (1,34)	<0.001	6,3	1,5	7.76 (1,40)	0,0
<i>Hepatoxilon trichiuri</i>	5,3	2,6	15.9 (1,15)	<0.001	4,0	2,5	7.31 (1,10)	0,0
<i>Anisakidae</i>	14,7	8,2	0.23 (1,22)	0,6	20,1	7,4	2.16 (1,17)	0,1
<i>Ascarophis ?</i>	38,3	21,2	17.94 (1,21)	<0.001	45,5	24,1	4.97 (1,17)	0,0

SA = Pesquería Sur-Austral, CS = Pesquería Centro-Sur.

"G" = Valor del estadístico de Bondad de ajuste logaritmico

F (gl) = Valor del estadístico "F" y (grados de libertad)

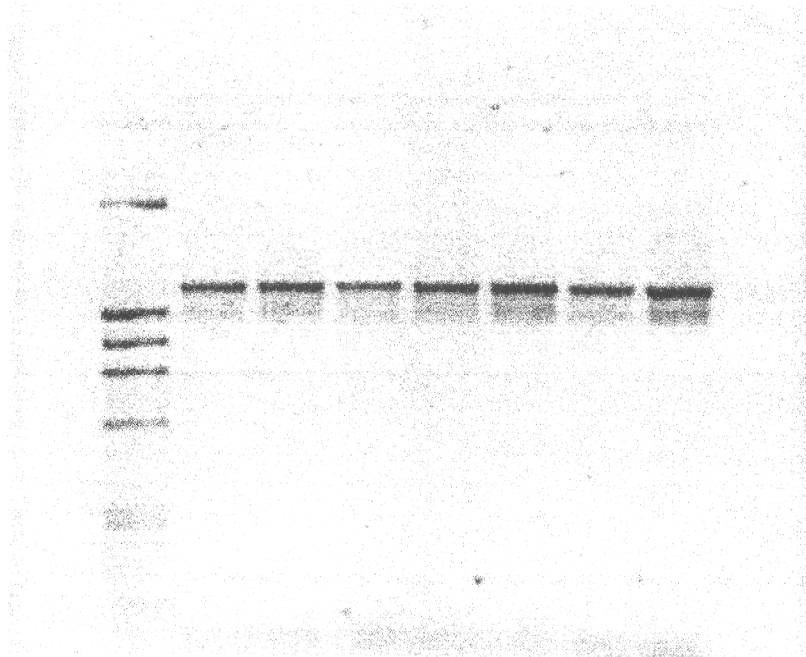


Fig. 2.1: Amplificación de un fragmento de 1600 pb de la región Dloop del ADNmt de *M. magellanicus*.

Ranura 1: marcador de pesos moleculares, ADN del plasmidio pBR 332 digerido con PstI y ADN del fago ϕ X174 digerido con HaeIII.

Ranuras 2 a 8: Fragmentos de la región Dloop amplificados.

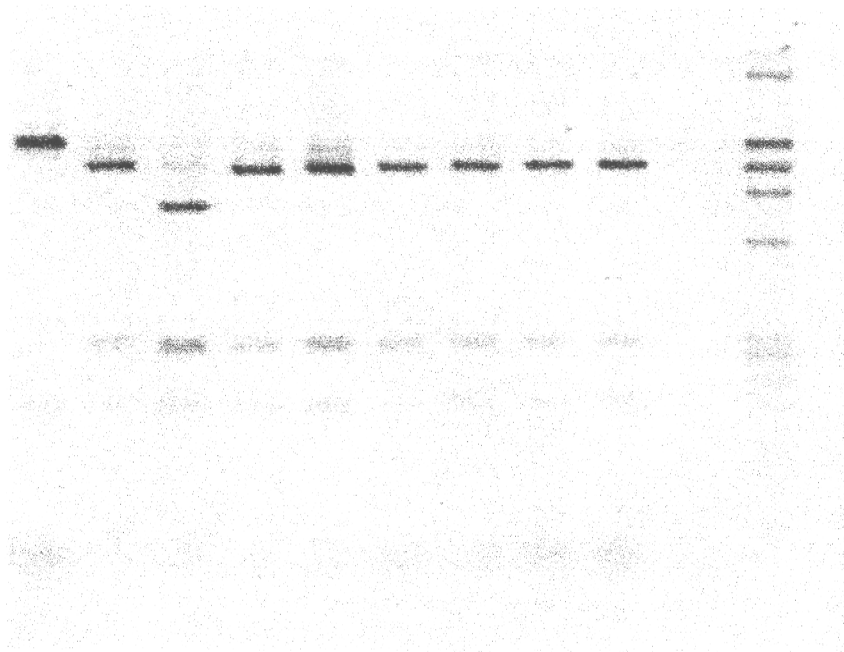


Fig. 2.2: Amplificaciones de fragmentos D loop de varios individuos de *M. magellanicus* de la zona Sur Austral, digeridos con la enzima de restricción Hinf I.

Ranura 11: marcador de peso molecular, ADN del plasmidio pBR 332 digerido con PstI y ADN del fago ØX 174 digerido con HaeIII

Ranura 1: *Haplotype 2*

Ranuras 2,4,5,6,7,8y9: *Haplotype 3*

Ranura 3: *Haplotype 4*

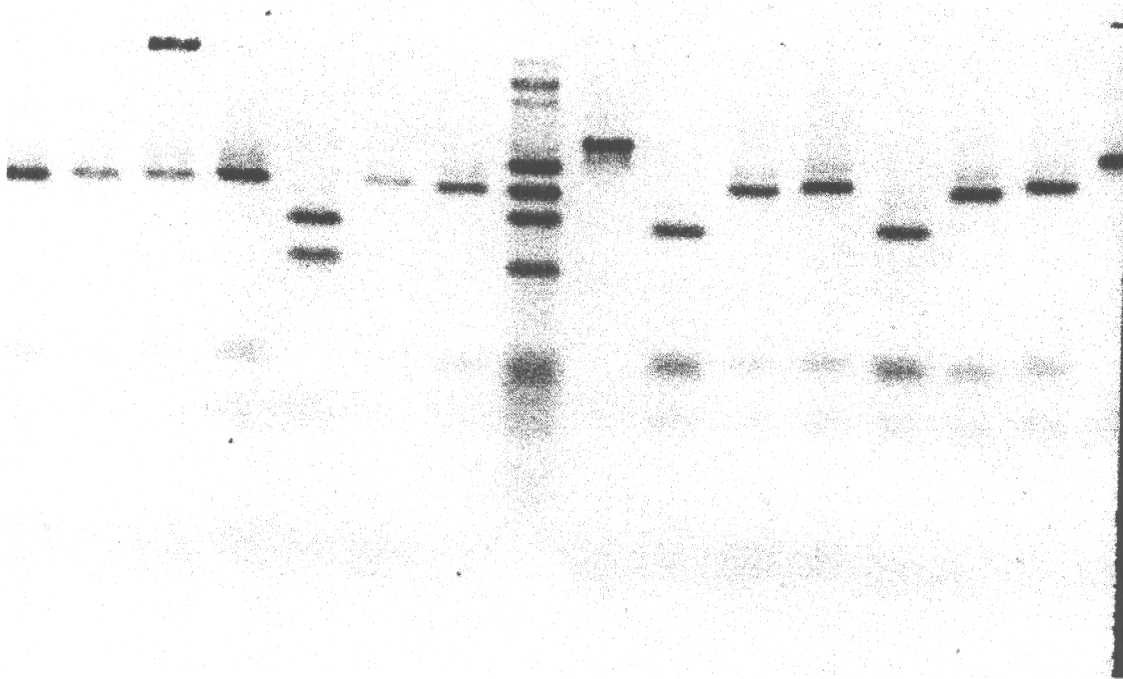


Fig. 2.3: Amplificaciones de fragmentos D loop de varios individuos de *M. magellanicus* de la zona Sur Austral, digeridos con la enzima de restricción Hinf I.

Ranura 8: marcador de peso molecular, ADN del plasmidio pBR 332 digerido con PstI y ADN del fago ØX 174 digerido con HaeIII

Ranuras 1,2,3,4,6,7,11,12,14,15: *Haplotipo 3*

Ranura 5: *Haplotipo 5*

Ranura 9: *Haplotipo 1*

Ranura 10,13: *Haplotipo 4*

Ranura 16: *Haplotipo 2*

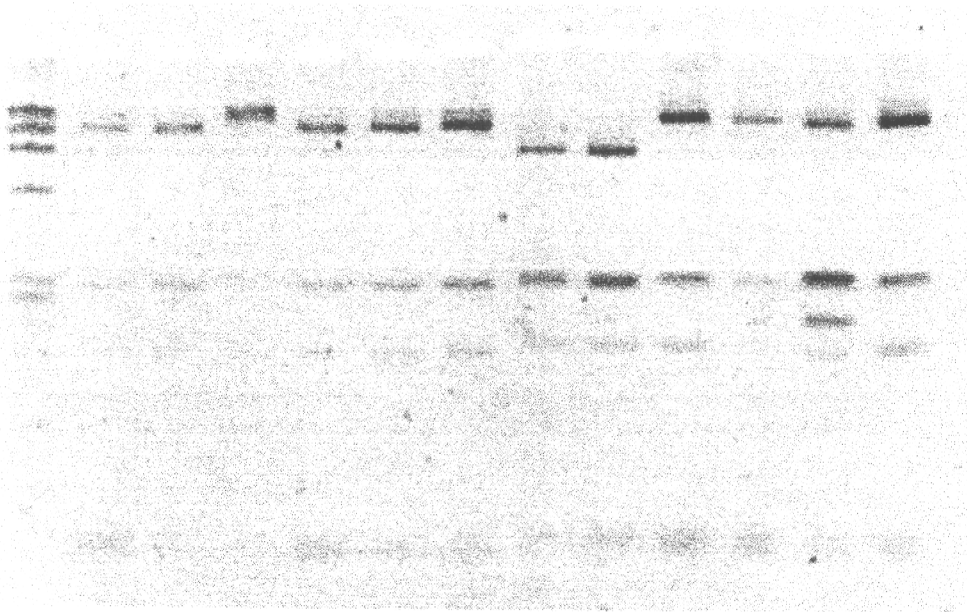


Fig. 2.4: Amplificaciones de fragmentos D Loop de varios individuos de *M. magellanicus* de la zona Centro-Sur, digeridos con la enzima de restricción Hinf I.

Ranura 1: marcador de tamaños moleculares, ADN del fago ϕ X 174 digerido con HaeIII

Ranuras 2,3,5,6,7,10, 11,13: *Haplotype 3*

Ranura 4: *Haplotype 2*

Ranuras 8,9: *Haplotype 4*

Ranura 12: *Haplotype 6*

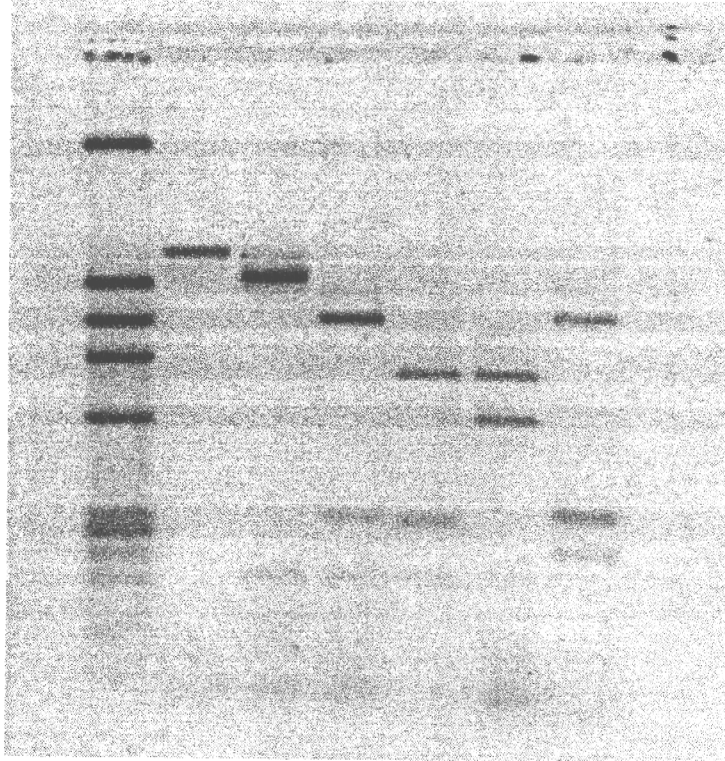


Fig. 2.5: Amplificaciones de fragmentos Dloop de varios individuos que representan los diferentes haplotipos

Ranura 1: marcador de peso molecular, ADN del plasmidio pBr 322 digerido con Pst I y ADN ØX 174 digerido con HaeIII.

Ranura 2: Fragmento amplificado del Dloop mitochondrial de 1600 pb de largo (representativo del haplotipo 1).

Ranuras 3-7: Haplotipos 2,3,4,5, y 6 respectivamente.

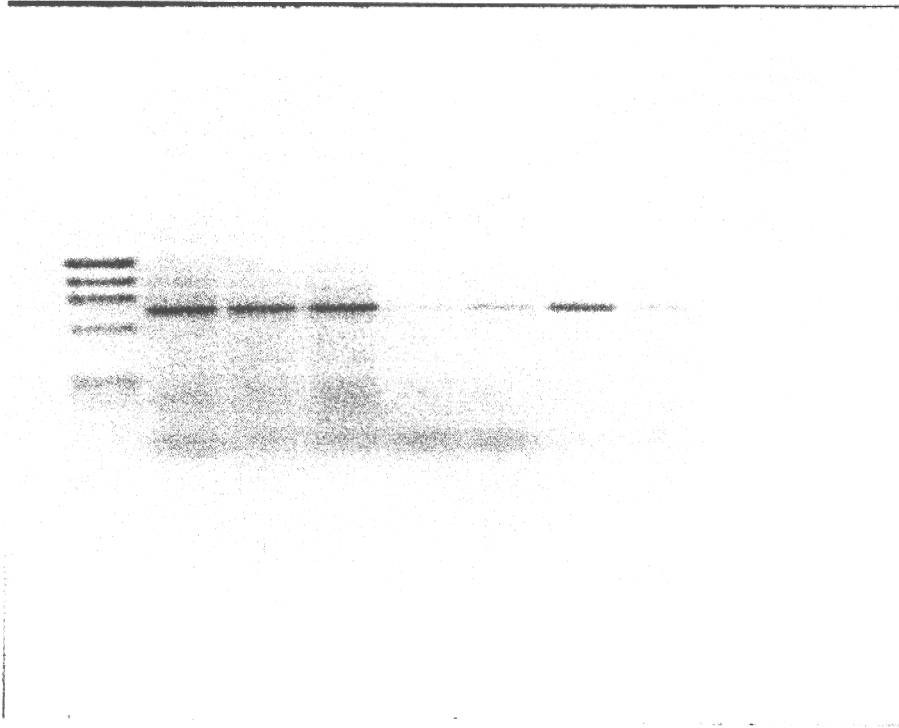


Fig. 2.6: Amplificación de un fragmento ATCO

Ranura 1: marcador de peso molecular, ADN del fago ϕ X 174 digerido con HaeIII

Ranura 2,3,4 y 7: Fragmento ATCO, para diferentes individuos de *M. magellanicus*

Ranura 4,5 y 8: El mismo fragmento descrito pero en 3 ejemplares diferentes, se observa una menor amplificación.

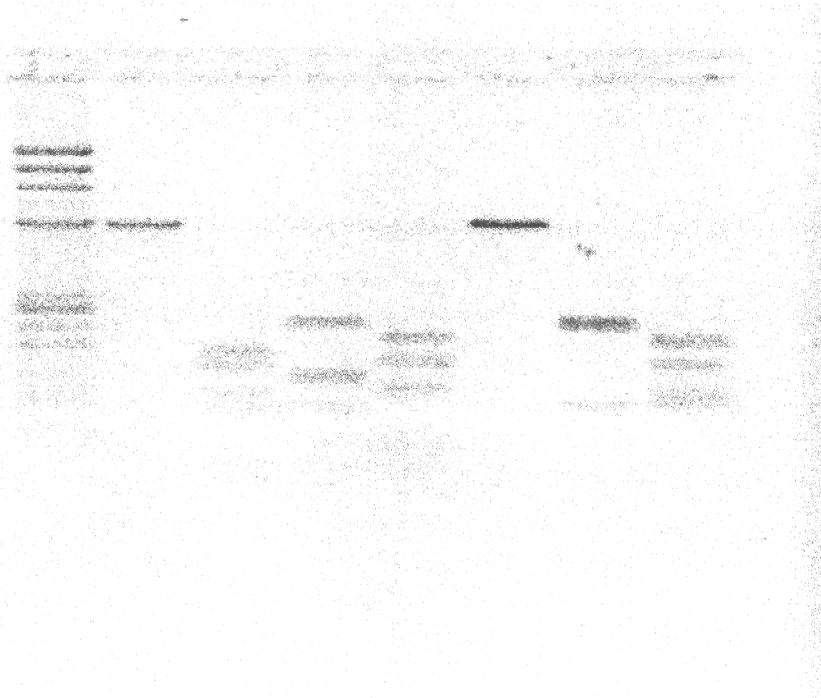
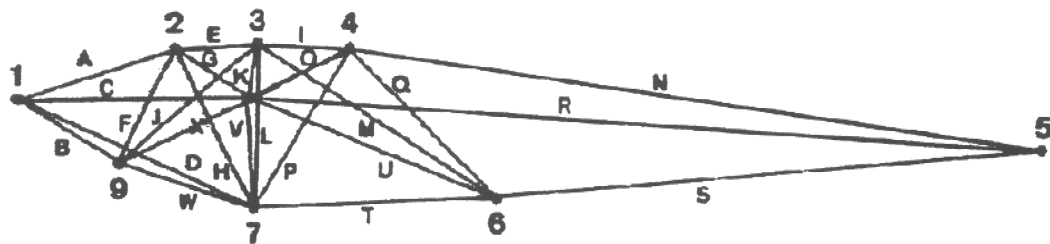
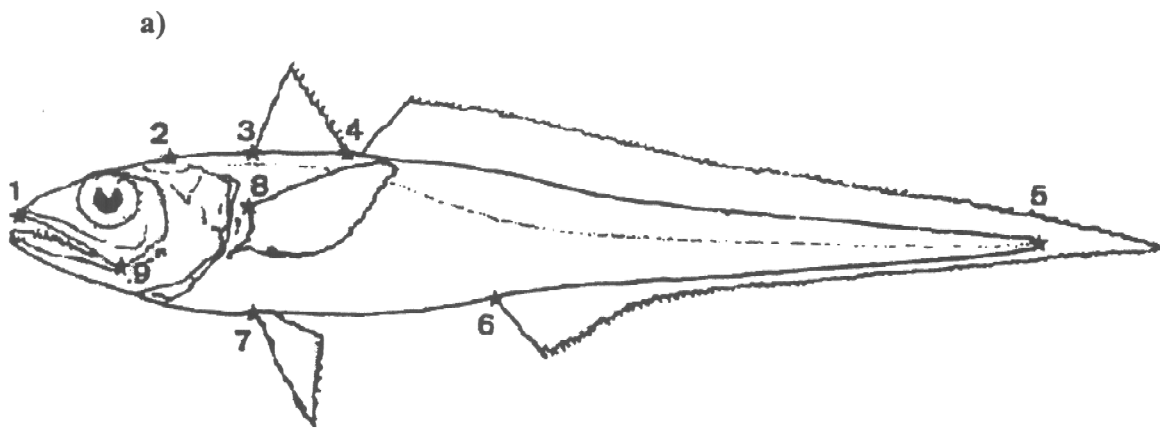


Fig. 2.7: Amplificación de un fragmento de ADN nuclear. Digestión del fragmento ITS-2 con 6 enzimas de restricción.

Ranura 1: marcador de peso molecular, ADN del fago ϕ X 174 digerido con HaeIII.

Ranura 2: Fragmento ITS-2 no digerido de 600 pb de largo.

Ranura 3 a 8: Fragmento ITS-2 digerido con HaeIII, HhaI, MspI, RsaI, HinfI y NciI, respectivamente.



b)

Fig. 3a: Distribución de los principales hitos morfológicos considerados para la construcción de la red.

Fig. 3b: Red de medidas consideradas para los análisis morfométricos.

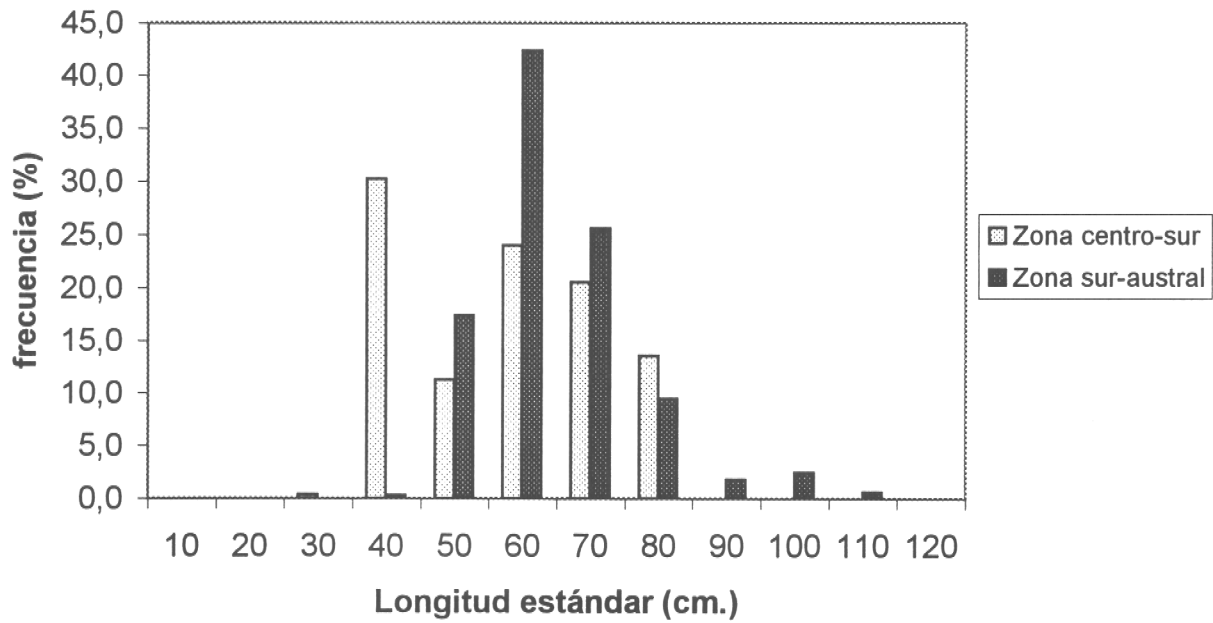


Fig. 3.1. Distribución de frecuencias de tallas en porcentaje, para ambas localidades.

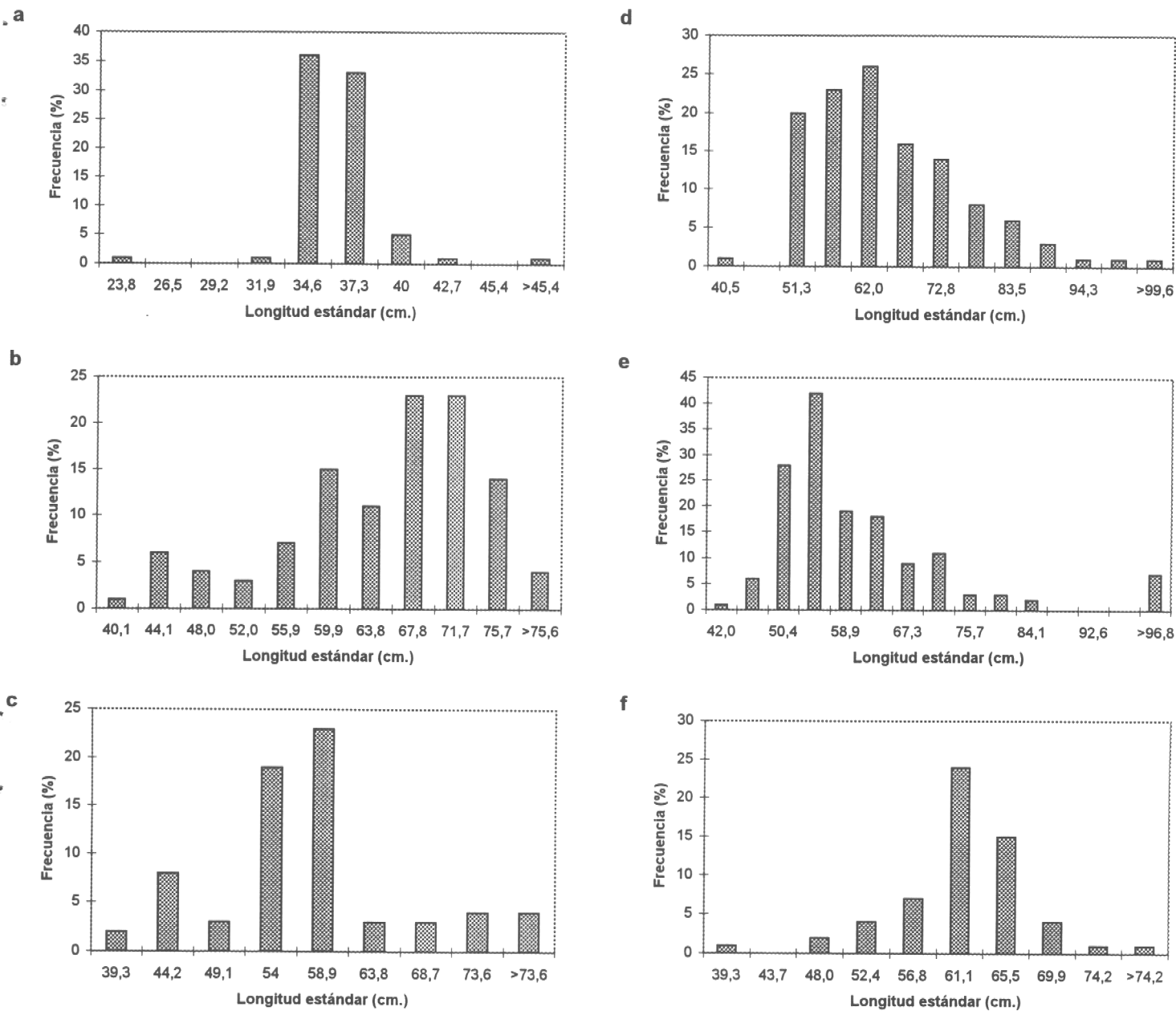


Fig. 3.2. Distribución de frecuencias de tallas (en porcentaje) para cada muestreo en ambas localidades (a= centro-sur 1; b= centro-sur 2; c= centro-sur 3: d= sur-austral 1; e= sur austral 2; f= sur-austral 3).

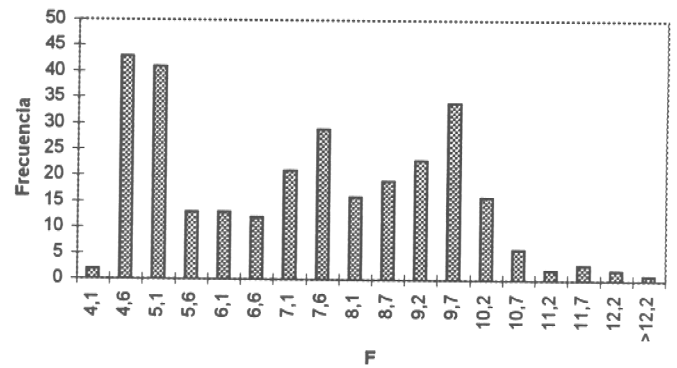
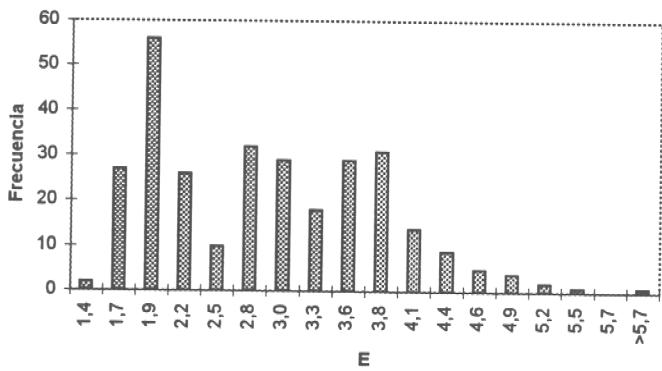
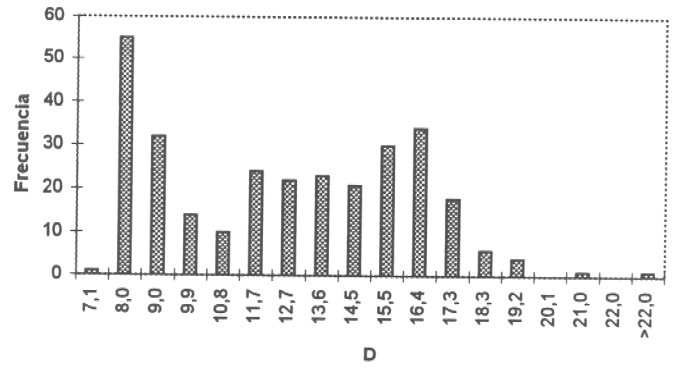
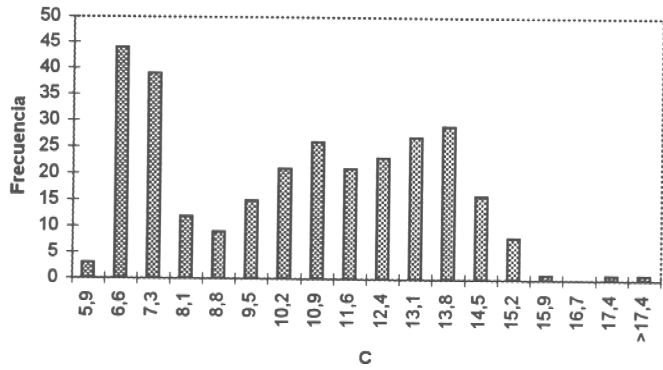
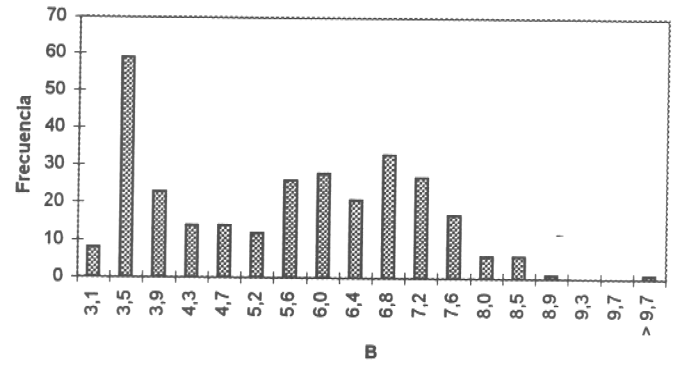
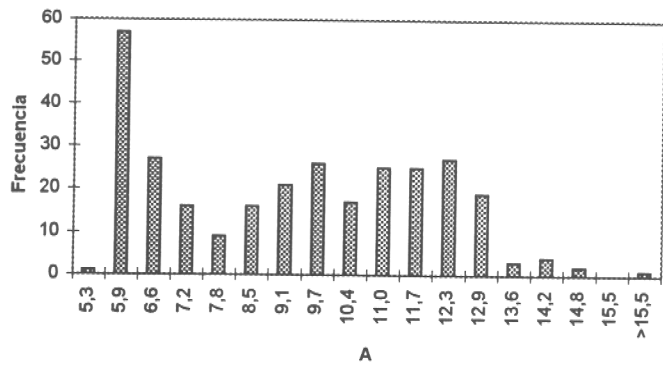


Fig.3.3 . Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Centro-Sur.

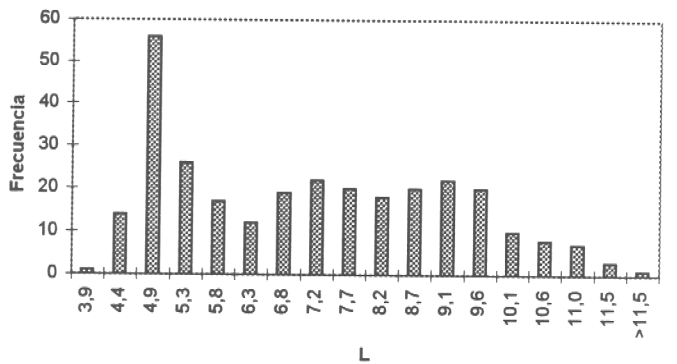
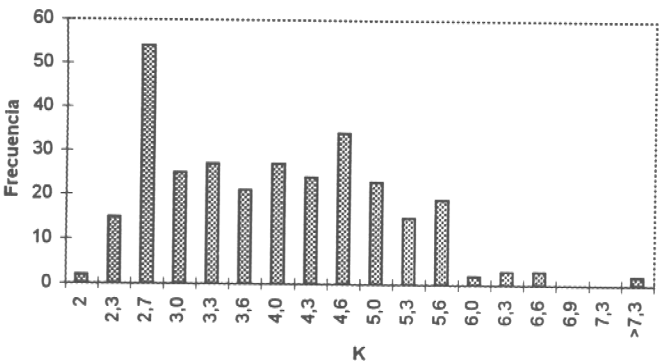
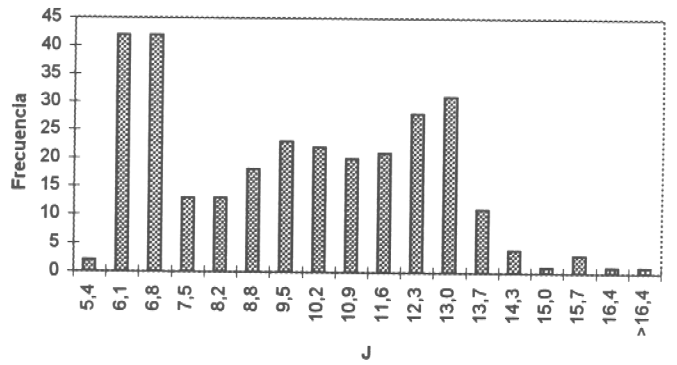
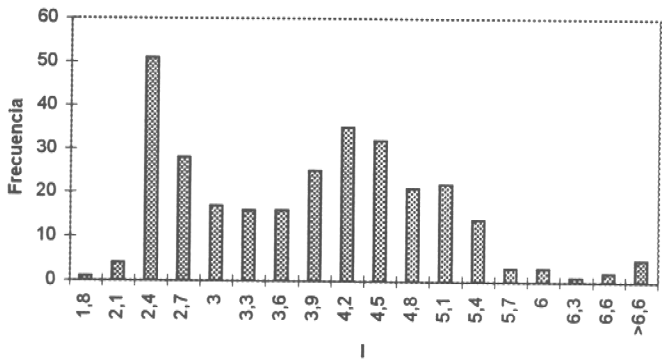
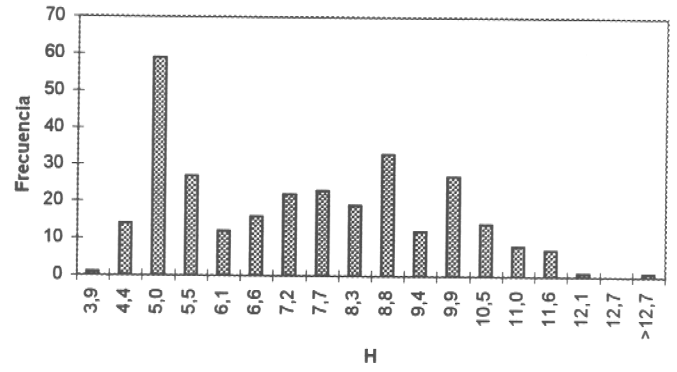
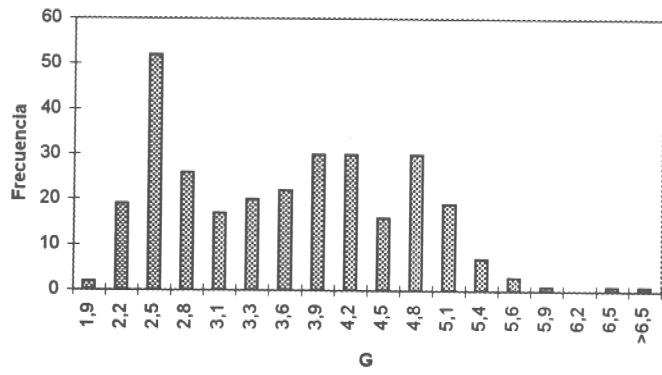


Fig. 3.3. (Cont). Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Centro-Sur.

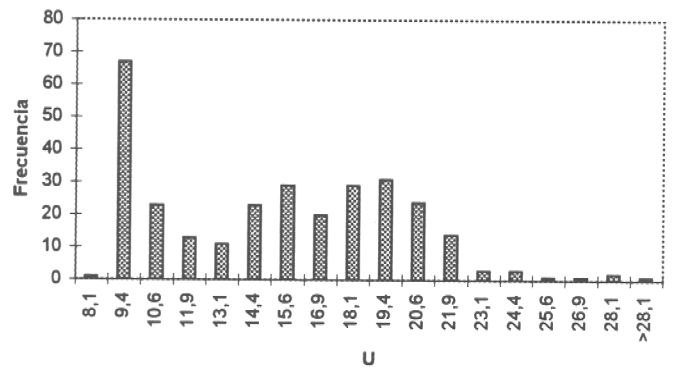
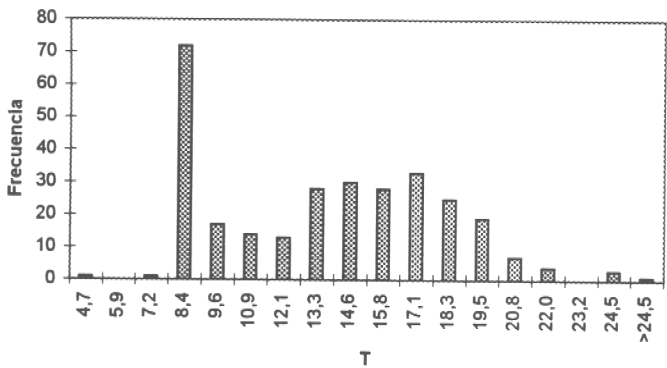
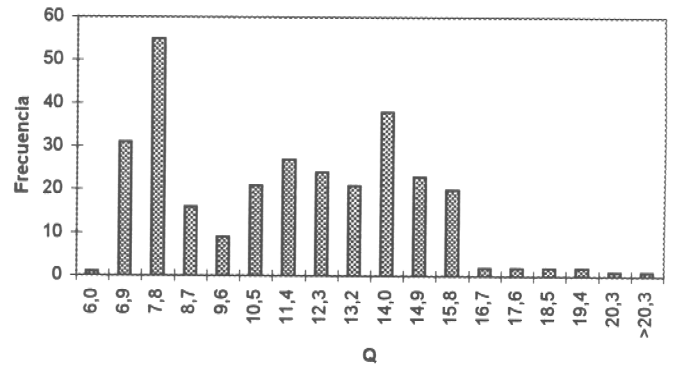
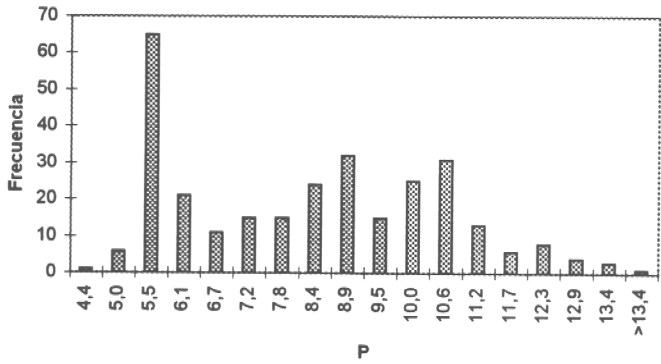
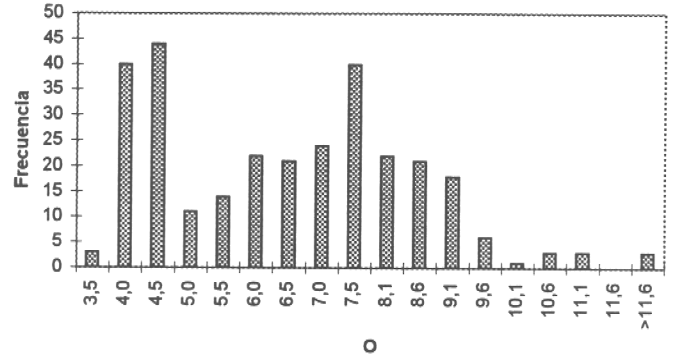
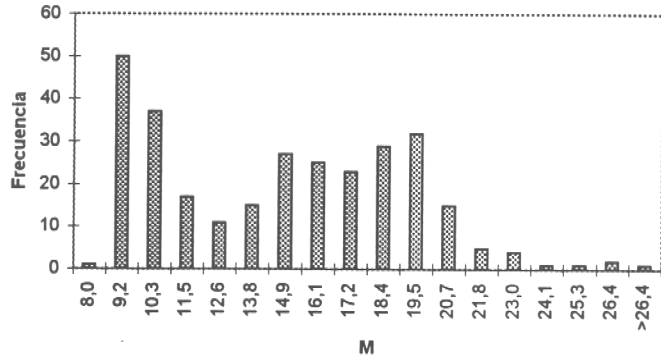


Fig. 3.3. (Cont). Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Centro-Sur.

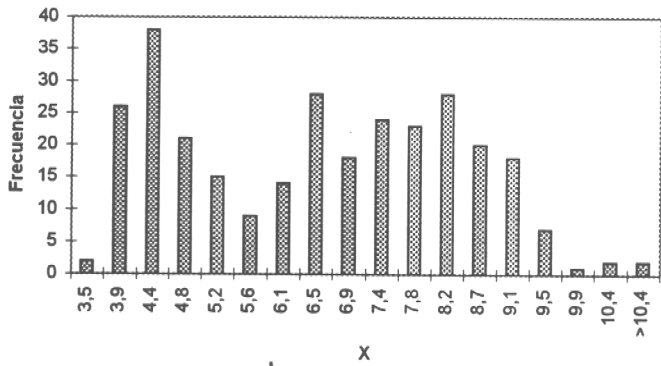
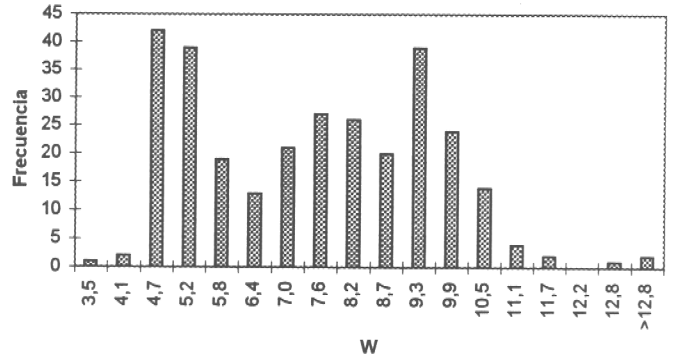
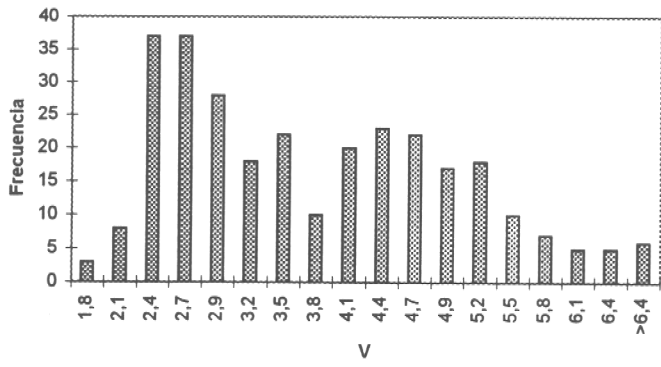


Fig.3.3. (Cont). Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Centro-Sur.

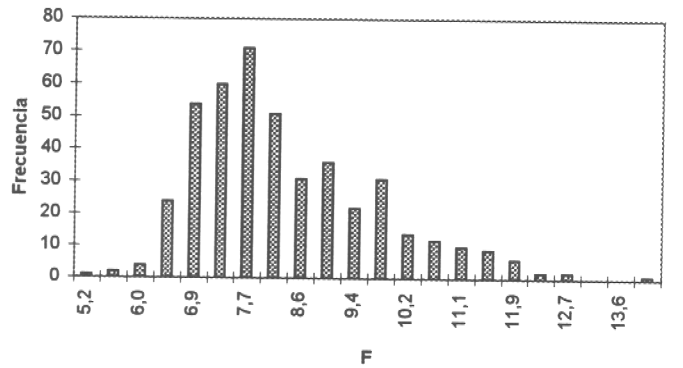
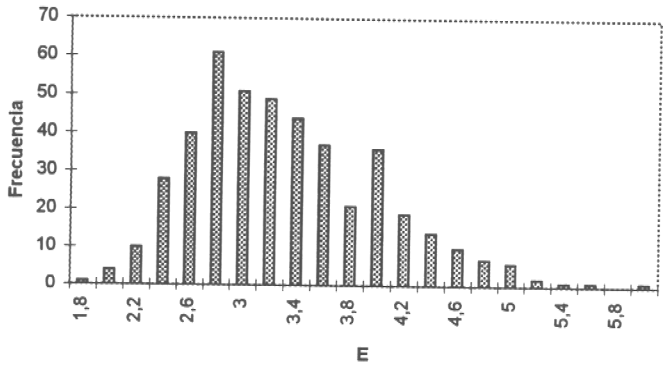
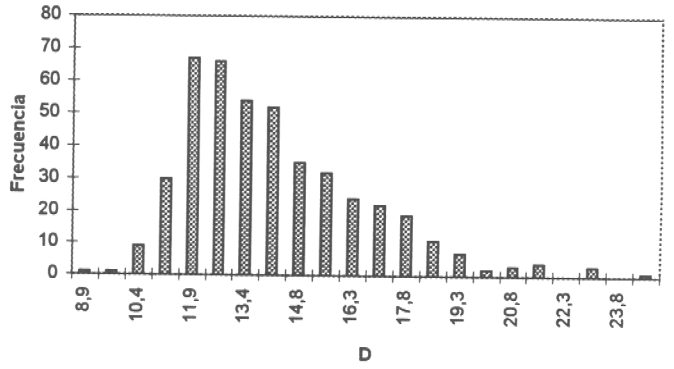
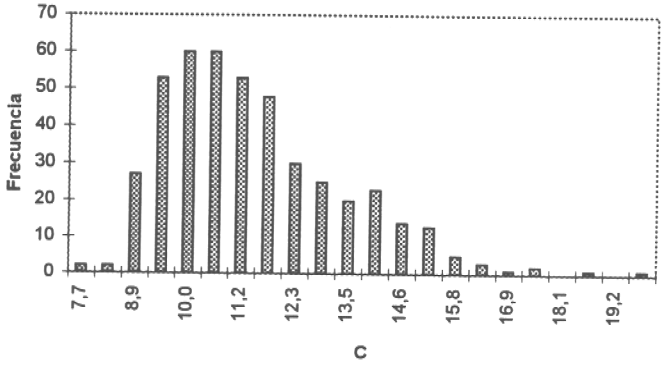
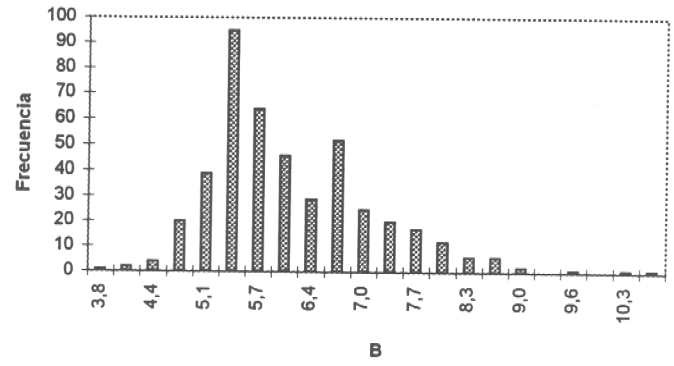
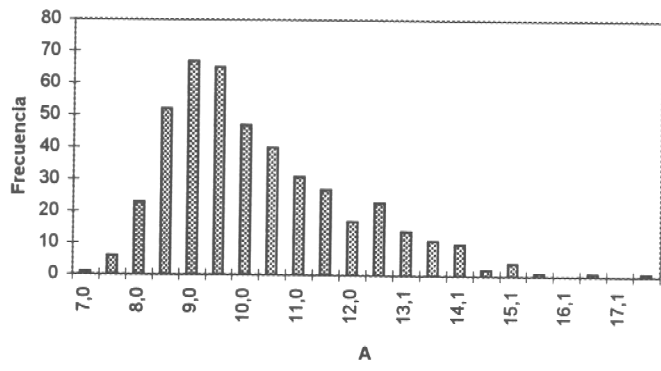


Fig.3.4. Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Sur-Austral.

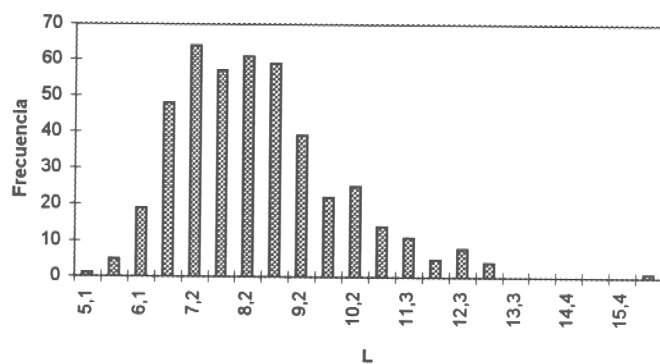
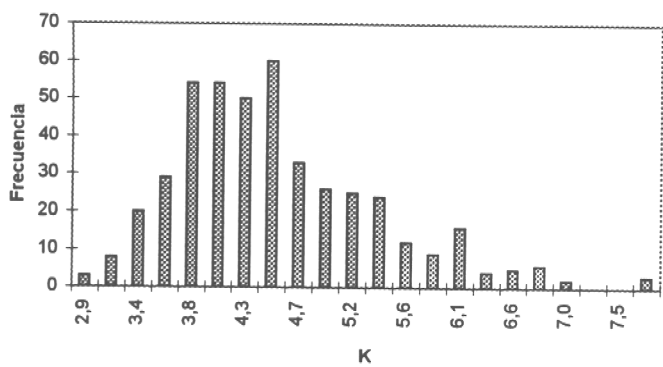
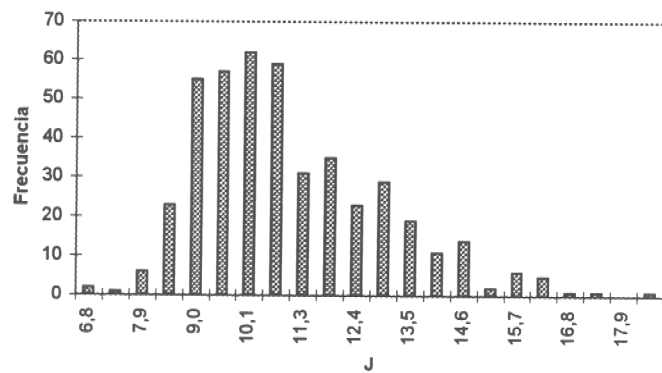
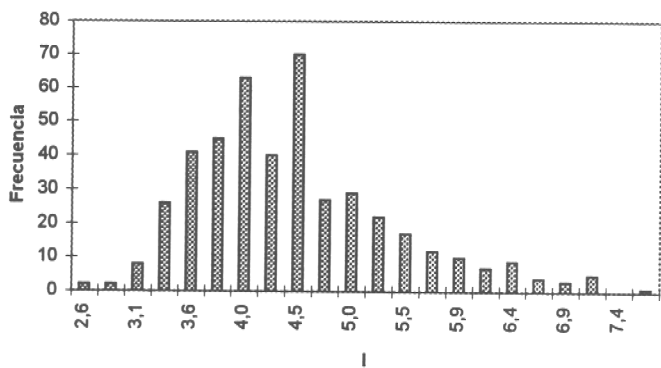
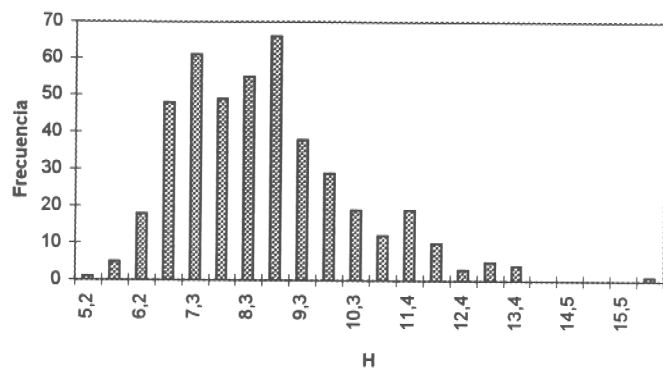
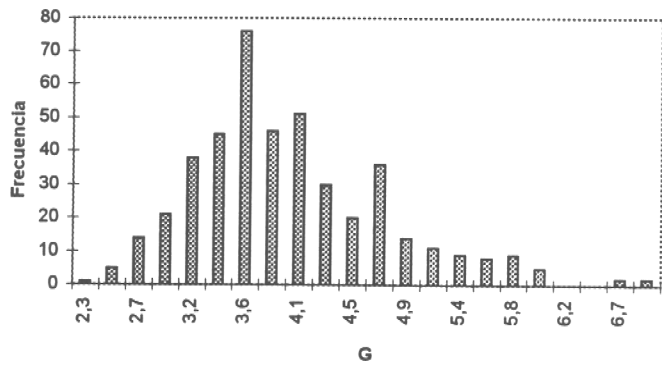


Fig.3.4. (Cont). Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Sur-Austral.

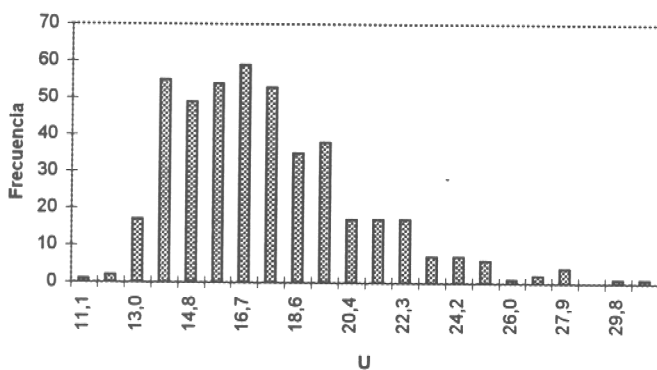
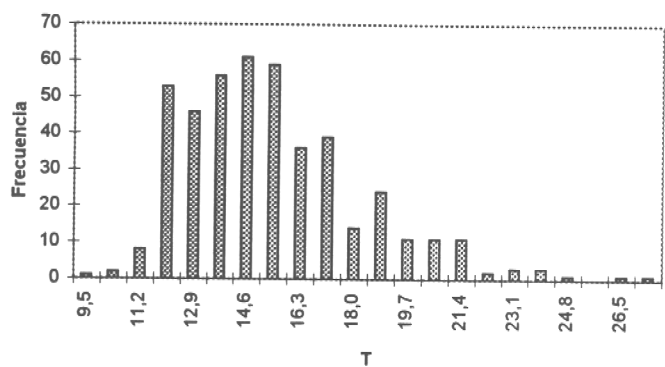
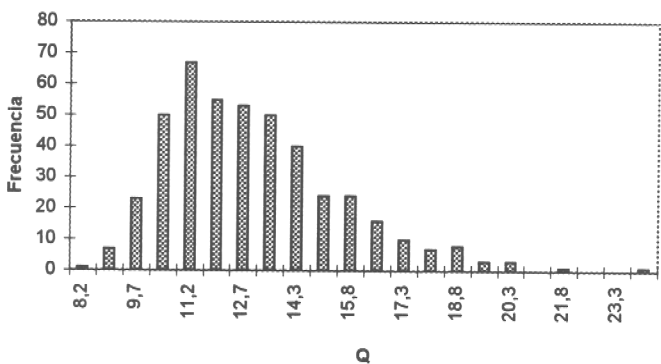
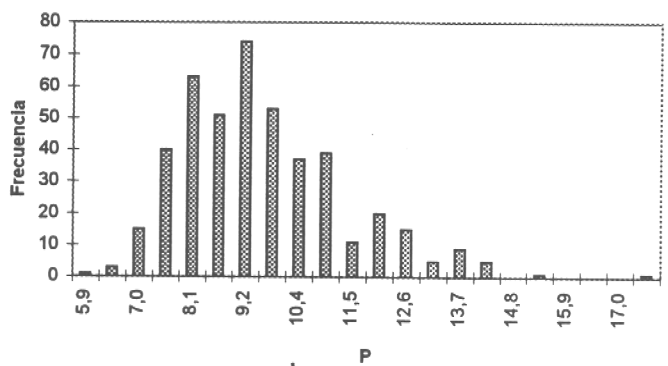
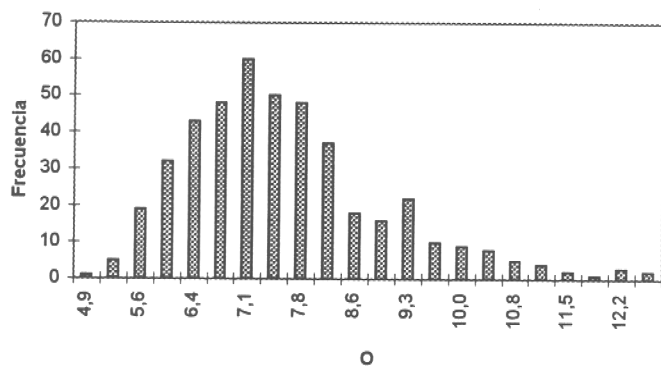
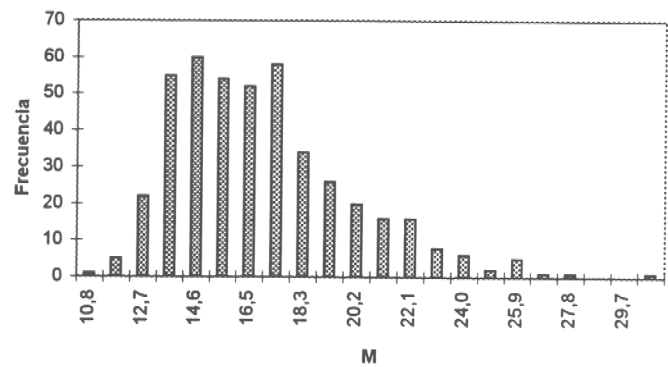


Fig.3.4. (Cont). Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Sur-Austral.

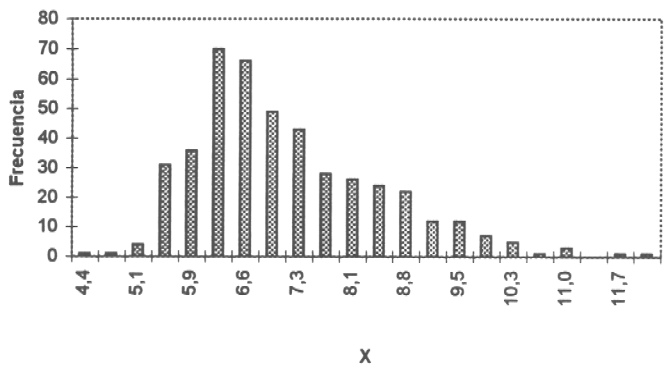
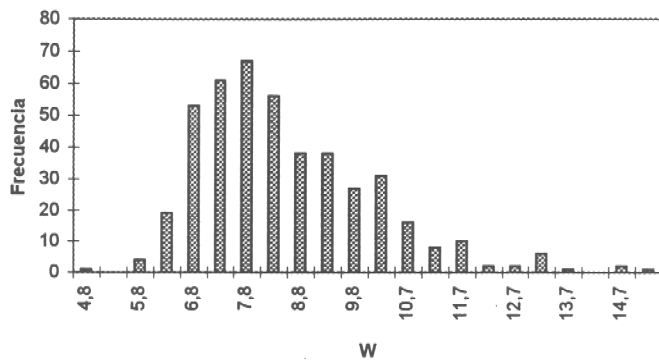
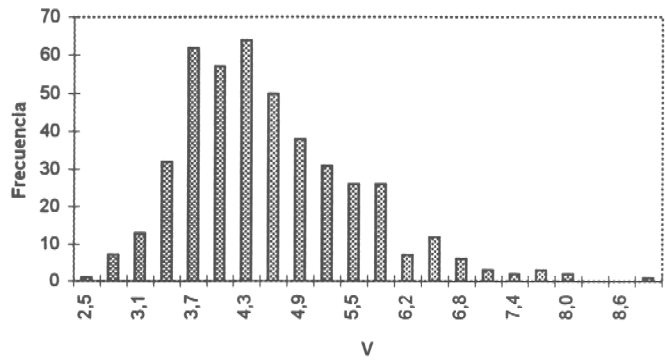


Fig.3.4. (Cont). Histogramas de variables morfológicas (longitudes en cm.) para merluzas de cola de la Zona Sur-Austral.

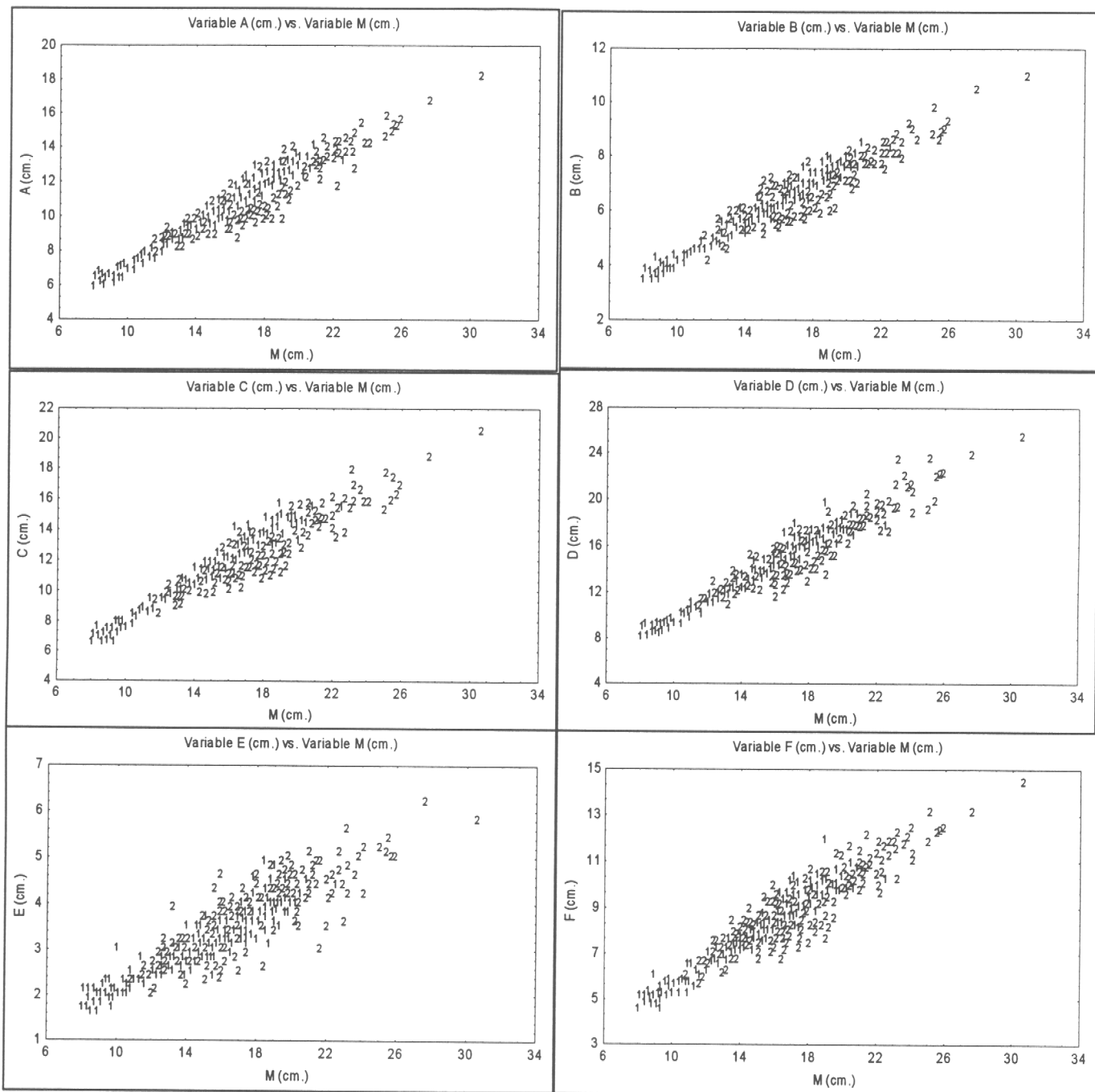


Figura 3.5. Relación entre las variables medidas y la variable M tomada como estándar para ambas localidades. (1=Zona Centro-Sur; 2= Zona Sur-Austral)

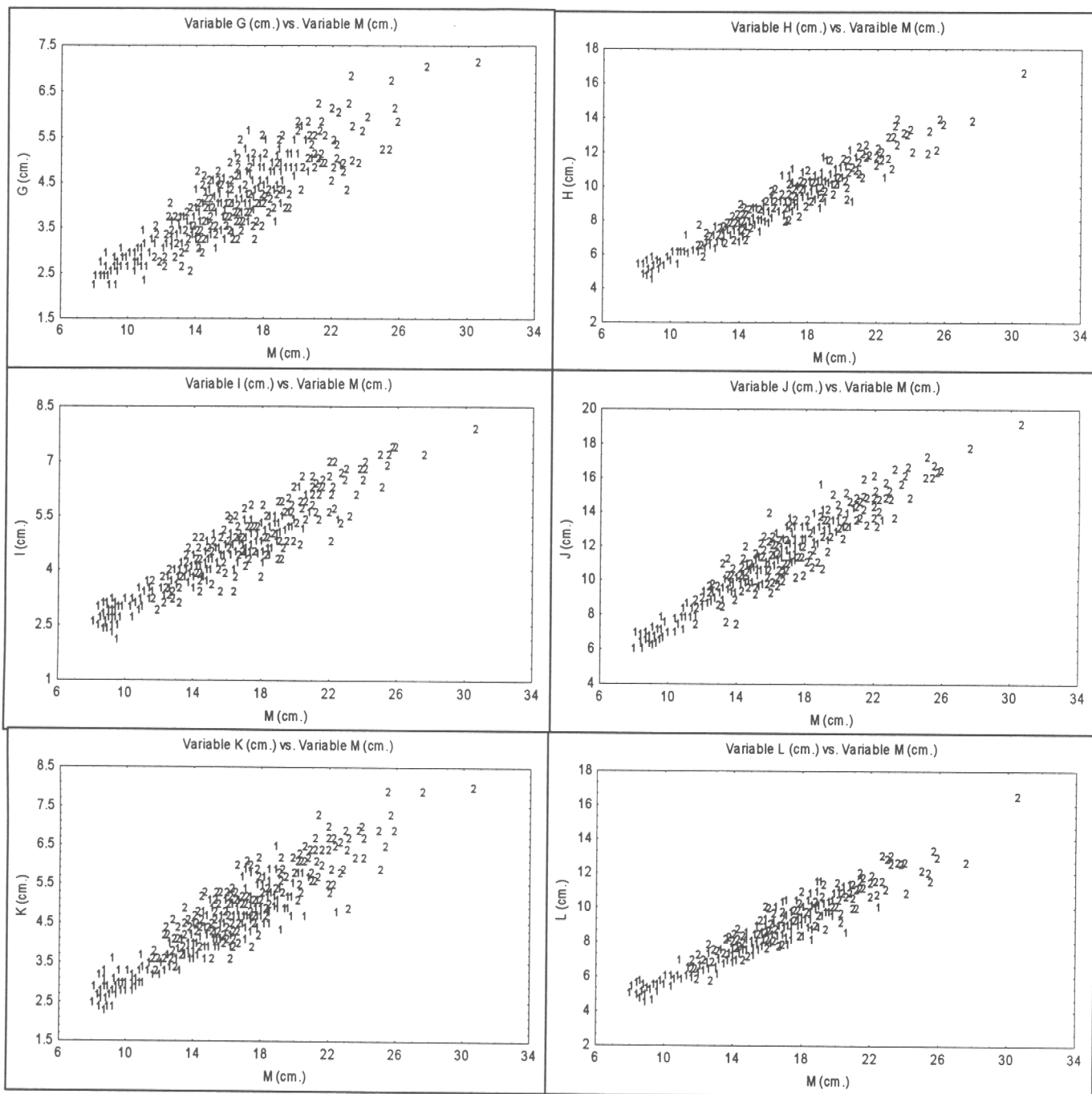


Figura 3.5. (Cont.) Relación entre las variables medidas y la variable M tomada como estándar para ambas localidades. (1=Zona Centro-Sur; 2= Zona Sur-Austral)

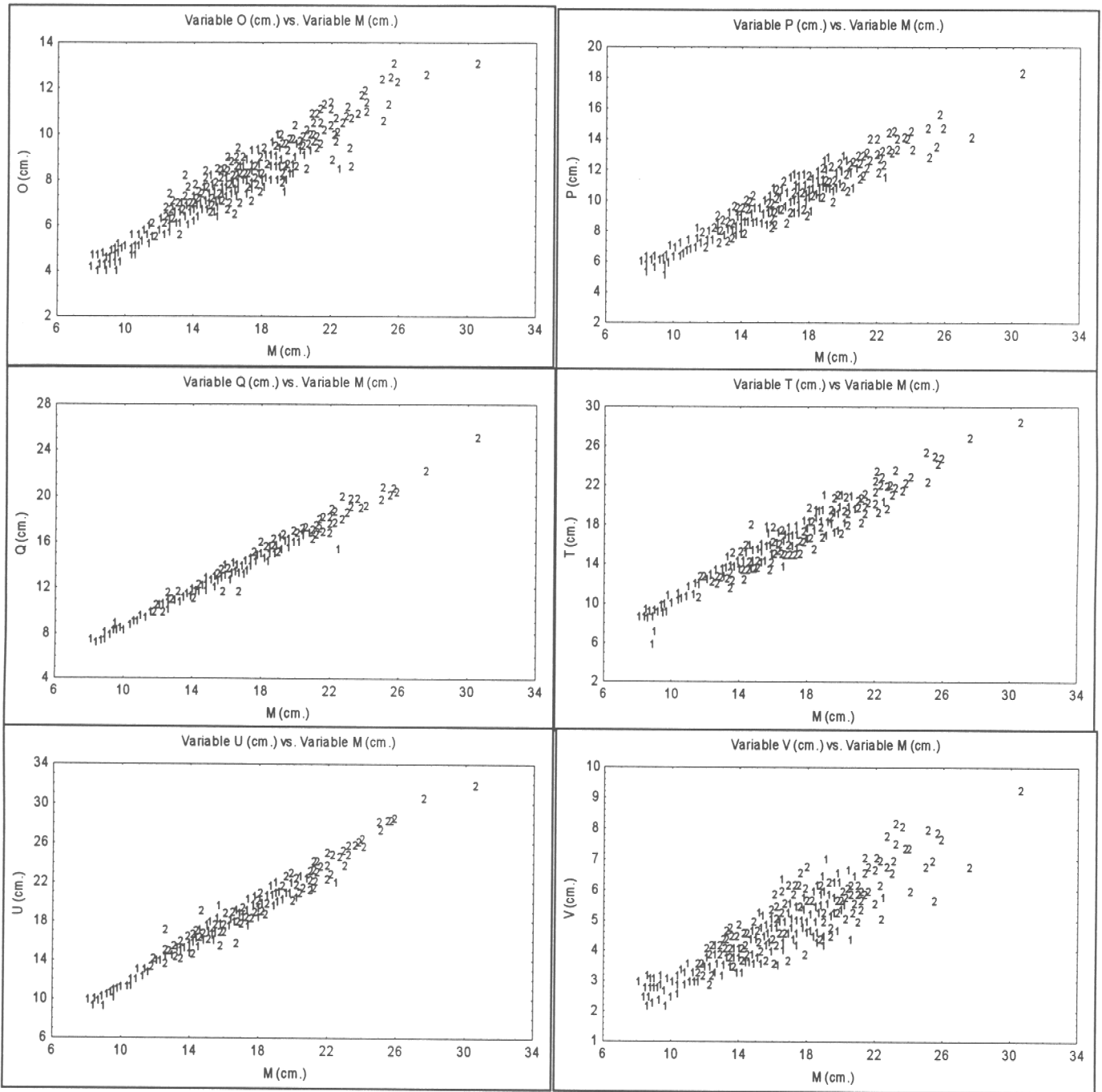


Figura 3.5. (Cont.) Relación entre las variables medidas y la variable M tomada como estándar para ambas localidades. (1=Zona Centro-Sur; 2= Zona Sur-Austral)

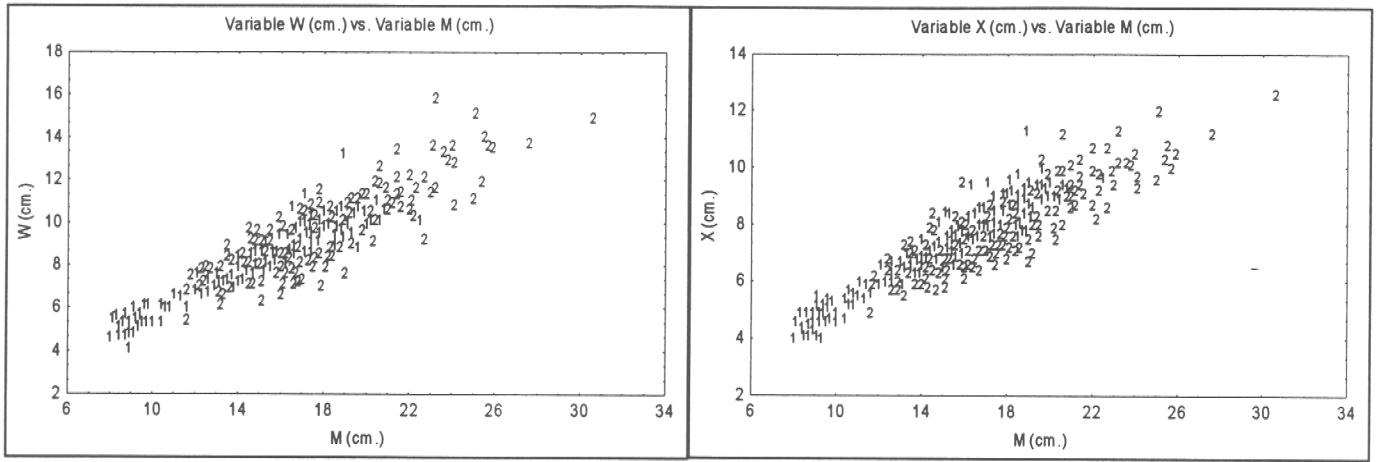


Figura 3.5. (Cont.) Relación entre las variables medidas y la variable M tomada como estándar para ambas localidades. (1=Zona Centro-Sur; 2= Zona Sur-Austral)

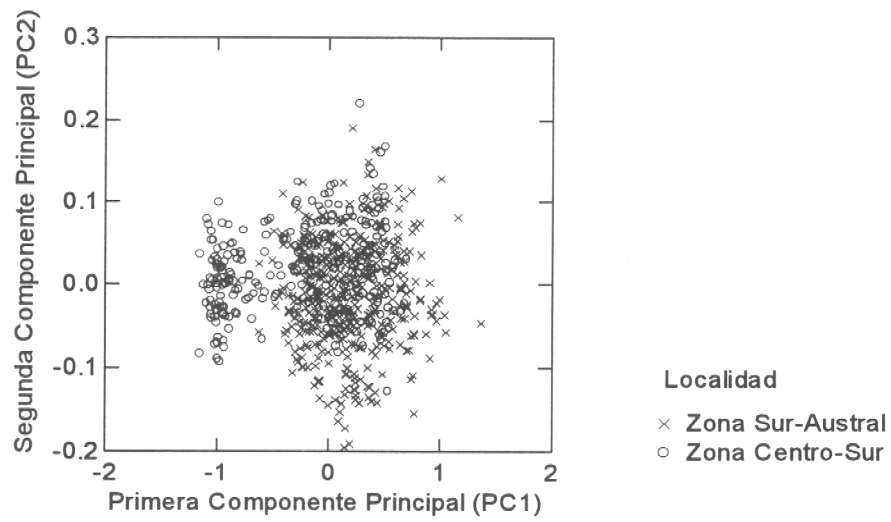


Fig 3.6. Ordenación de los puntajes de las dos primeras componentes principales de un ACP realizado sobre las 21 variables morfométricas de *M. magellanicus*, en la separación por localidades.

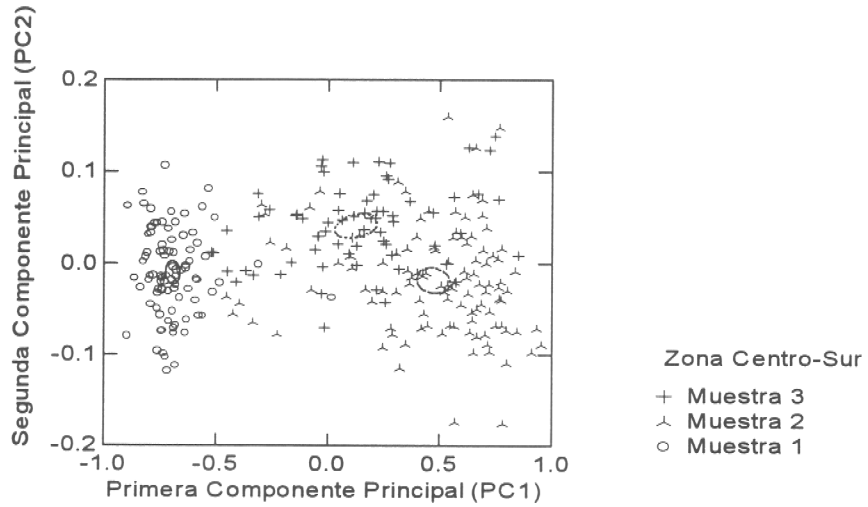


Fig 3.7. Ordenación de los puntajes de las dos primeras componentes principales de un ACP realizado sobre las 21 variables morfométricas de *M. magellanicus*, en la separación por muestra para la Zona Centro-Sur.

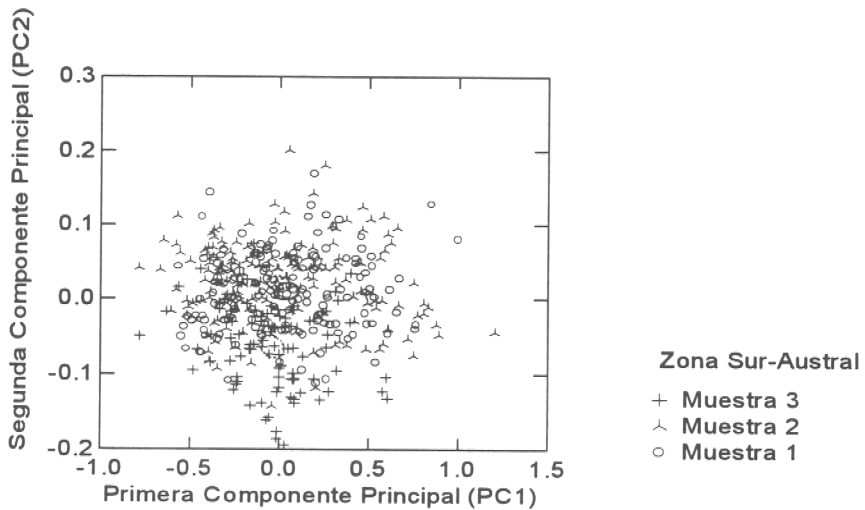


Fig 3.8. Ordenación de los puntajes de las dos primeras componentes principales de un ACP realizado sobre las 21 variables morfométricas de *M. magellanicus*, en la separación por muestra para la Zona Sur-Austral.

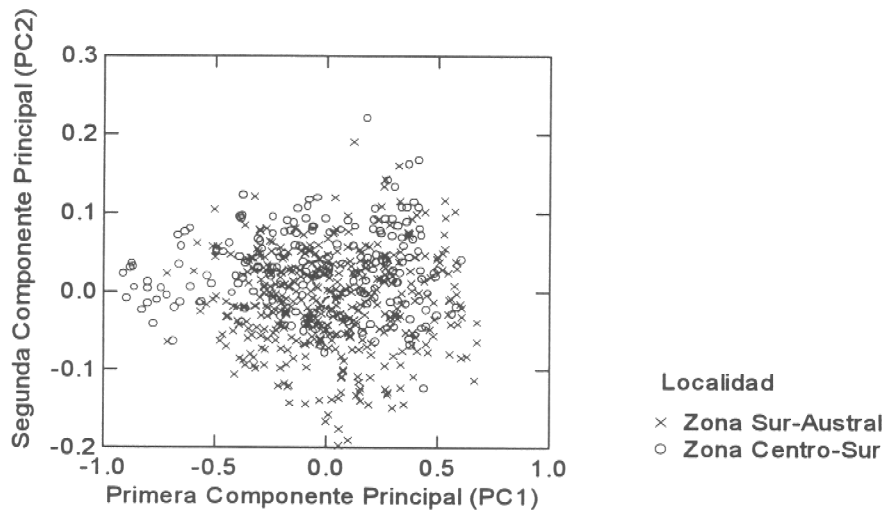


Fig 3.9. Ordenación de los puntajes de las dos primeras componentes principales de un ACP realizado sobre las 21 variables morfométricas de *M. magellanicus*, en la separación por localidades (utilizando los individuos del mismo rango de tallas).

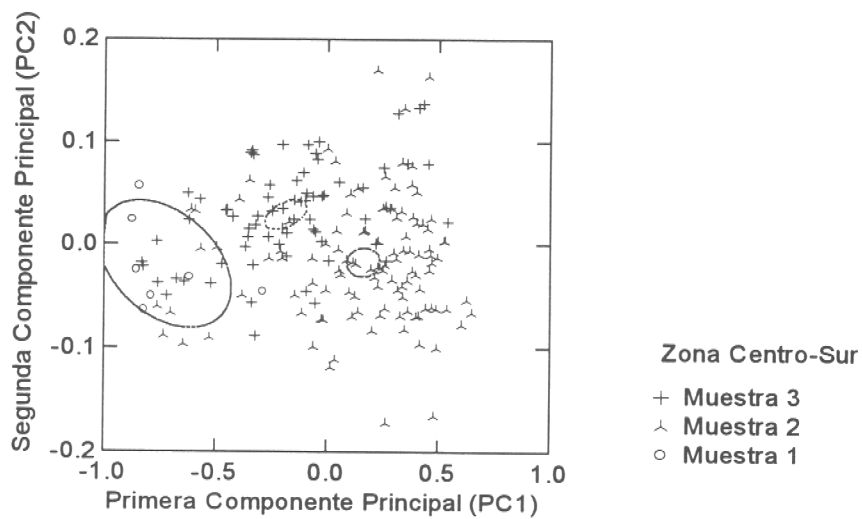


Fig 3.10. Ordenación de los puntajes de las dos primeras componentes principales de un ACP realizado sobre las 21 variables morfométricas de *M. magellanicus*, en la separación por muestra para la Zona Centro-Sur (utilizando los individuos del mismo rango de tallas).

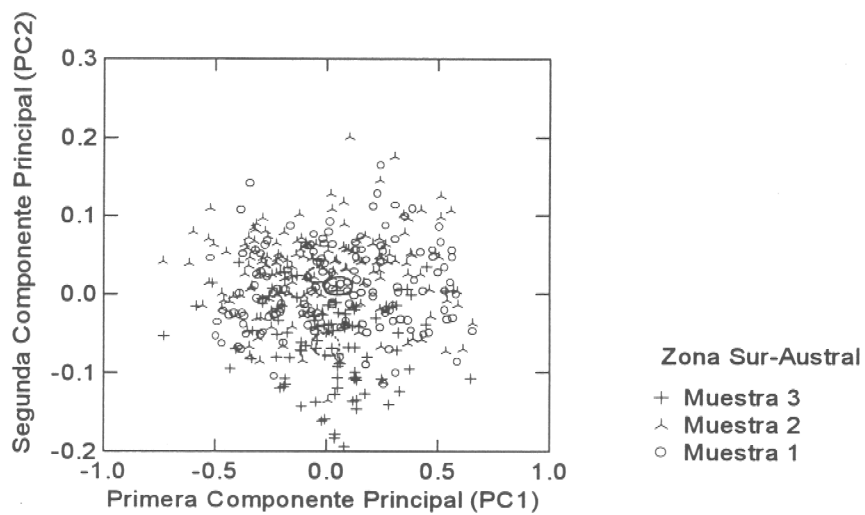


Fig 3.11. Ordenación de los puntajes de las dos primeras componentes principales de un ACP realizado sobre las 21 variables morfométricas de *M. magellanicus*, en la separación por muestra para la Zona Sur-Austral (utilizando los individuos del mismo rango de tallas).