

Inv. Pesq.	44 (3)	págs 461-470	diciembre, 1980
------------	--------	--------------	-----------------

Taxonomía numérica del género *Merluccius* (Rafinesque, 1810) a partir de la electroforesis del miógeno *

por

J. LLEONART y O. AGELL **

INTRODUCCIÓN

El género *Merluccius* comprende un conjunto de especies y entidades taxonómicas de menor jerarquía, cuya delimitación e identificación no es siempre sencilla. Los caracteres merísticos y morfométricos utilizados tradicionalmente son muchas veces de observación difícil (por ejemplo, el número de vértebras o la estructura del cráneo) o subjetivos y poco fiables (como las manchas de la membrana branquióstega o la coloración general del cuerpo). Los intervalos de variación señalados por los taxonomistas para cada especie presentan solapamientos considerables (FRANCA, 1962; LOZANO CABO, 1965; MAURIN, 1968). Esto se refleja en las vacilaciones en la clasificación taxonómica de tan importante género (ANGELESCU & *alt.*, 1958). Todo ello permite evidenciar que la causa del problema no es de origen puramente técnico sino que tiene raíces zoogeográficas y bioecológicas.

En el presente trabajo se aplica la técnica de electroforesis en la discriminación taxonómica de algunas especies del género. Es ya muy practicada la aplicación de estas técnicas a la taxonomía de muchos grupos animales (SIBLEY, 1960; TSUYUKI & *alt.*, 1965; TANIGUCHI, 1969; ODENSE & *alt.*, 1971) e incluso de otras especies de merluza (JONES & MACKIE, 1970).

En este trabajo, utilizamos para la interpretación de los electroforegramas los métodos de taxonomía numérica divulgados por SNEATH & SOKAL (1973).

Los objetivos de este trabajo entran en la línea de la contribución al es-

* Recibido el 24 de enero de 1980.

** Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona Paseo Nacional s/n. Barcelona-3.

tudio taxonómico del género *Merluccius* partiendo de las proteínas del miógeno. En este sentido, dichos objetivos no abarcan la revisión o el establecimiento de la clasificación; no obstante es bien conocida la importancia de la diferenciación proteica en el estudio de las relaciones filéticas base de la clasificación, y desde este punto de vista las electroforesis son parte necesaria, aunque no suficiente.

EL GÉNERO *Merluccius* Rafinesque, 1810

Según el *Check-list of fishes of the North-eastern Atlantic and of the Mediterranean* (CLOFNAM) (HUREAU & MONOD *ed.*, 1973) la familia Merlucciidae incluye los géneros *Merluccius*, *Lyconus* y *Macruronus*, aunque estos dos últimos bajo el epígrafe *incertae sedis*; GREENWOOD & *alt.* (1966) incluye los géneros *Lyconus* y *Macruronus* en la familia Macrouridae. En realidad las familias Gadidae, Macrouridae y Merlucciidae (partenecientes al orden de los Gadiformes) son muy próximas entre sí, y antiguamente se encontraban unidas en una sola.

Las especies del género *Merluccius* son de hábitat epibentónico, aunque ciertos autores las consideran pelágicas (MOHR, 1965; WOODHEAD, 1965); en cualquier caso, las diferencias de orden biológico son bastante pequeñas y únicamente se pueden observar diferencias importantes en cuanto a su distribución geográfica y, en algunos casos, a la profundidad en que se encuentran.

El número de especies aceptado para el género *Merluccius* es de alrededor de 15, pero varía según los autores. Por ejemplo, ANGELESCU & *alt.* (1958) dan 13 especies y 7 subespecies, mientras que LOZANO CABO (1965) propone 9 especies y 10 subespecies.

En este trabajo seguiremos la nomenclatura de CADENAT (1950), según el cual existen seis especies de merluza en el Atlántico oriental y Mediterráneo, las cuales son, de norte a sur (fig. 1):

Merluccius merluccius
Merluccius senegalensis
Merluccius cadenati
Merluccius polli
Merluccius paradoxus
Merluccius capensis

Sin embargo, FRANCA (1962) las considera como subespecies de *Merluccius merluccius*. Siguiendo a CADENAT (1950) y LEIACONNOUX (1952), consideraremos la especie *Merluccius merluccius* compuesta por dos subespecies: *M. m. mediterraneus*, de área de distribución limitada al Mediterráneo, y *M. m. atlanticus*, propia del Atlántico, aunque esta división no está reconocida por el CLOFNAM (HUREAU & MONOD, *ed.*, 1973).

En este trabajo se han analizado cinco unidades taxonómicas: tres especies y las dos subespecies de *Merluccius merluccius*; no se han considerado *M. polli* y *M. paradoxus*. Estas unidades son, pues:

Merluccius merluccius mediterraneus
Merluccius merluccius atlanticus
Merluccius senegalensis
Merluccius cadenati
Merluccius capensis

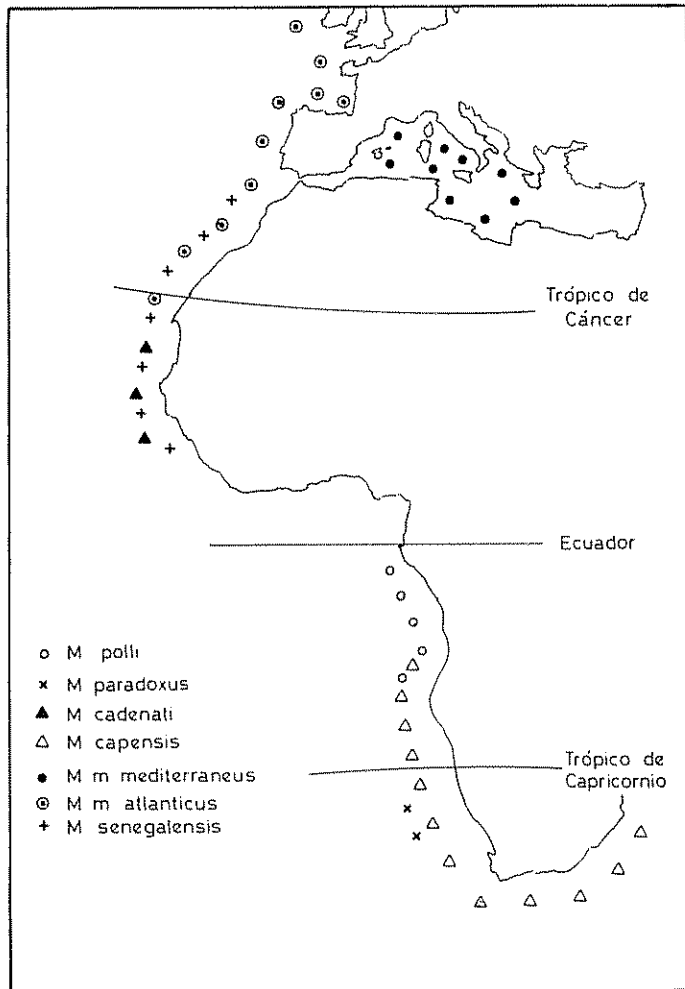


FIG 1. Esquema de la distribución de la merluza (*Merluccius* sp) del Atlántico Oriental y el Mediterráneo

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares cuyas muestras fueron analizadas, se conservaron congelados a -18°C por períodos comprendidos entre los 35 y los 60 días; períodos que caen dentro de los márgenes admitidos por ARIAS (1973), JONES & MACKIE (1970) y MOREL (1974).

La porción muscular escogida para extraer la fracción proteica a analizar corresponde a la región dorsal delantera del animal, sobre la línea lateral.

La fracción proteica analizada comprende las proteínas solubles de la miofibrilla, que corresponden a la mioglobina y a gran cantidad de enzimas del metabolismo oxidativo de la glucosa.

Se utilizó la técnica electroforética llamada de gel con SDS, la cual se basa en la separación de complejos moleculares de proteína y dodecil sulfato sódico (SDS), unidos por fuerzas hidrofóbicas. Se procede a extraer las cadenas proteicas y se las trata con SDS, el cual se adhiere a ellas en cantidad proporcional a su longitud y, por consiguiente, a su peso molecular. El SDS es un detergente aniónico que, sometido al campo electroforético, arrastra a cada proteína asociada a una velocidad directamente proporcional al peso molecular de la proteína (WEBER & OSBORN, 1969).

La resolución de este método es suficientemente fina como para discernir proteínas que se diferencien en su composición por un solo aminoácido.

La extracción proteínica se llevó a término mediante la técnica descrita por ARIAS (1973), consistente en triturar el músculo y disolver sus componentes solubles y, por métodos físicos, separar las fracciones lipídicas. La técnica electroforética empleada es la descrita por LAEMMLI (1970) y AMES (1974) los cuales la utilizaron para separar proteínas de microorganismos. El aparato en el cual se han llevado a término las migraciones electroforéticas es el descrito por STUDIER (1973).

Los geles con las migraciones ya realizadas se sometieron a la tinción por medio de las soluciones indicadas por FAIRBANKS & *alt.* (1971).

Para valorar las distintas concentraciones de cada una de las bandas formadas y teñidas se midió su densidad óptica por medio de un densímetro Vitatron modelo MPSS 940.000, y los resultados fueron interpretados gráficamente mediante un terminal de registro.

Una vez obtenidos los distintos gráficos indicativos de las concentraciones de proteínas de distinto peso molecular, para todas las especies estudiadas, se digitalizaron tomando en la escala de migración (equivalente a la de los pesos moleculares) doce puntos, siempre en los mismos valores de abscisas, procurando que fueran los más representativos de las características generales de las curvas obtenidas. Para cada uno de estos puntos, se midió la densidad óptica observada mediante una escala relativa, tomando como cero el punto de mínimo valor en cada curva. El resultado de este procedimiento es una tabla de tantas columnas como puntos de migración leídos, y tantas filas como

muestras analizadas; cada elemento de esta tabla representa, en forma relativa, la densidad óptica (equivalente a la concentración de proteína) de la muestra-fila para el peso molecular o punto de migración-columna. Una tabla de este tipo es adecuada para ser analizada por métodos numéricos del tipo que describen SNEATH & SOKAL (1973).

Por medio de la clasificación aglomerativa jerárquica se han estudiado los grupos del género *Merluccius* en función de la similitud o disimilitud de los espectros electroforéticos obtenidos y digitalizados del modo descrito. Con este objetivo se han elegido tres coeficientes que miden la semejanza de todos los pares de especies posibles; estos coeficientes son: el coeficiente de correlación lineal de Bravais-Pearson, el coeficiente de correlación no paramétrica de Spearman y la distancia euclidiana. El algoritmo de agregación utilizado es el que SNEATH & SOKAL (1973) describen con el acrónimo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages), que es el que simplifica de manera más objetiva la matriz de distancias o similitudes (LEONART, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fig. 2 se muestra el esquema de un electroforegrama, y en la 3 las curvas obtenidas al representar gráficamente las concentraciones proteicas de las bandas obtenidas por electroforesis de muestras de las distintas especies.

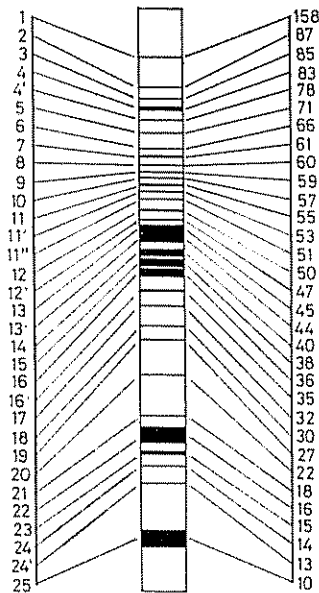


FIG. 2. Esquema del electroforegrama del gel con SDS del género *Merluccius*. El número de la derecha es el peso molecular $\times 10^{-3}$ de la proteína que constituye la banda; el de la izquierda es un número convencional asignado a la banda. Las 12 bandas analizadas numéricamente en este trabajo son: 4, 7, 11, 12, 13, 13', 14, 15, 16, 16', 22 y 25.

Los dendrogramas que muestran las relaciones entre las especies según los distintos coeficientes utilizados aparecen en la figura 4. Obsérvese que los dos índices de correlación, el paramétrico y el no paramétrico, dan estructuras idénticas de relaciones entre las distintas especies, y, sin embargo, la distancia euclidiana proporciona unas relaciones muy distintas.

Se puede apreciar en el dendrograma basado en la distancia euclidiana una gran semejanza entre *Merluccius capensis* y *M. merluccius mediterraneus*; esto se debe sin lugar a dudas a la elevada densidad óptica de los dos últimos picos del electroforegrama; de hecho, el penúltimo pico sólo se muestra de manera muy aparente en estas dos especies. La distancia euclidiana es muy

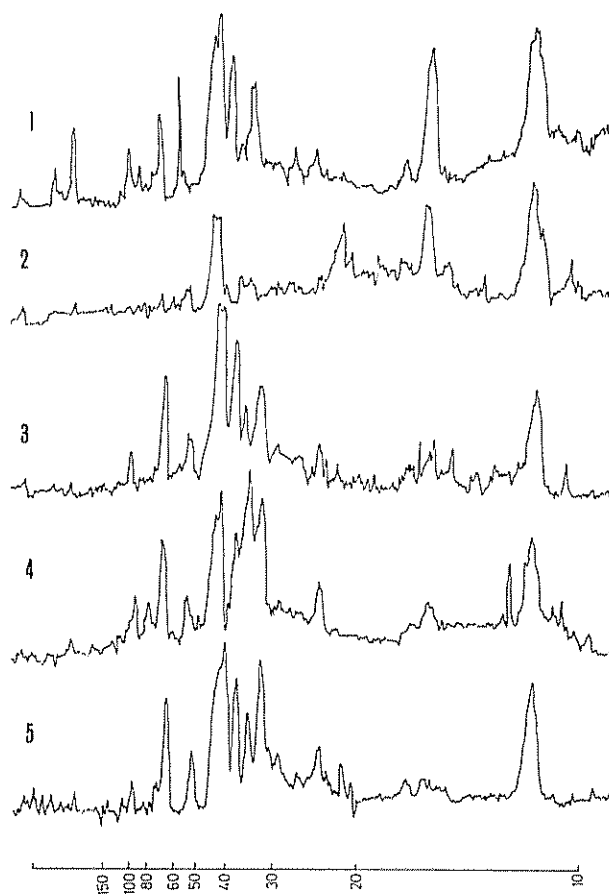


FIG. 3. Fotodensitogramas característicos de cada especie o subespecie de merluza analizada. 1 *M. merluccius mediterraneus*. 2 *M. capensis*. 3 *M. merluccius atlanticus*. 4 *M. senegalensis*. 5 *M. cadenati*. La escala adjunta señala los pesos moleculares $\times 10^{-3}$ de las proteínas propias de las distintas posiciones

sensible a las magnitudes absolutas y ésta es la causa más importante de la semejanza de estas especies en el dendrograma, semejanza sorprendente si tenemos en cuenta que las áreas de distribución de estas especies son precisamente las más alejadas. Sin embargo, algunos autores han observado anteriormente semejanzas notables entre estas especies: LE DANOIS (citado por FRANCA, 1952) y HICKLING (1933), citado por ANGELESCU & *alt.* (1958) opinan que

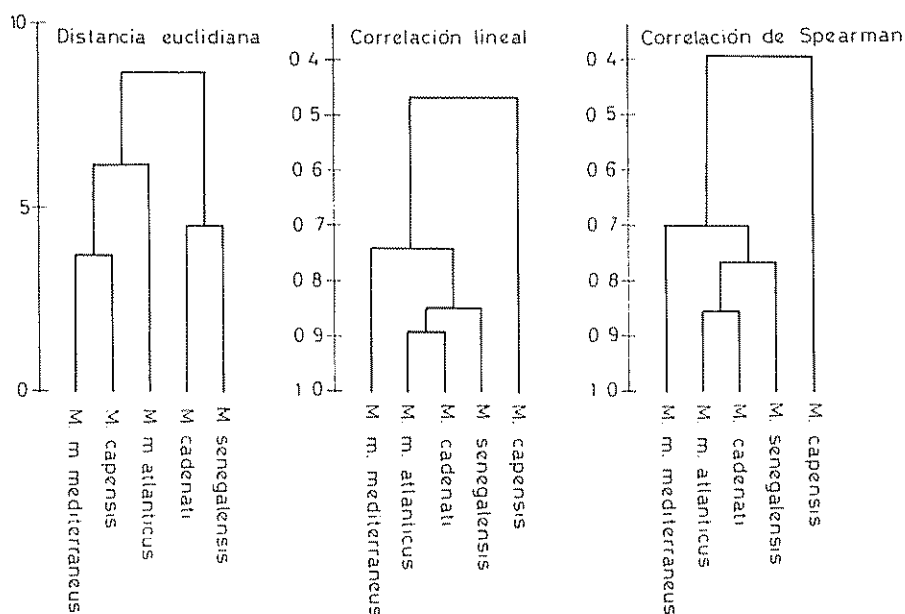


FIG. 4. Dendrogramas obtenidos para clasificar las especies y subespecies de merluza según los distintos coeficientes usados. El algoritmo aplicado en todos los casos es el UPGMA

M. merluccius se extendía hasta Africa del Sur. SMITH (1949) afirma que *M. capensis* es muy parecida a la merluza europea *M. merluccius*. El análisis llevado a cabo basándose en la distancia euclidiana está de acuerdo con estas observaciones obtenidas con distinta metodología, dándole, además, un carácter objetivo y cuantificado.

En términos generales podemos decir que *M. capensis* es, desde el punto de vista de las proteínas musculares, muy distinta de *M. merluccius*; sin embargo, ambas especies comparten un rasgo distintivo muy particular que las agrupa entre sí y las separa del resto de las especies estudiadas. Aun así, se deberían realizar estudios con *M. polli* y *M. paradoxus* para tener el abanico completo, del género en el Atlántico. El problema se puede plantear desde el

punto de vista filético en relación con la posibilidad de convergencia evolutiva de las especies geográficamente extremas, o bien con la posibilidad de homología por diferenciación de las especies geográficamente intermedias.

Los resultados de los análisis de las matrices de correlaciones tienen más sentido geográfico que el anterior; en los dos casos *M. capensis* queda aislado del resto, mientras que el grupo de especies septentrionales queda asociado como muestra la figura 4. Evidentemente estos resultados son más generales que los anteriores, es decir, que los coeficientes de correlación no conceden más peso a los valores de densidad más elevados, y por lo tanto, todo el espectro de densidades intervienen por igual en la estructuración de los grupos; dicho de manera poco formal, la distancia euclidiana da un gran peso a unos pocos valores especialmente elevados, mientras que las correlaciones toman en cuenta por igual todos los valores del espectro, cualquiera que sea su valor absoluto. La disyuntiva de decidir qué característica es más importante para clasificar especies: el tener espectros parecidos en términos generales, o tener partes muy diferenciadas del espectro muy parecidas, es una cuestión que se debe plantear en términos muy generales y a un nivel mucho más teórico antes de proceder a interpretaciones empíricas.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Sr. D. LLORIS por la lectura crítica del manuscrito. También queremos agradecer al Sr. A. ARRIZAGA sus comentarios y sugerencias.

SUMMARY

NUMERICAL TAXONOMY OF GENUS *Merluccius* DERIVED FROM THE ANALYSIS OF MUSCLE PROTEIN ELECTROPHOREGRAMS. — The genus *Merluccius* includes a set of taxonomic units which not always are well defined; there is not agreement among taxonomists about species division. The origin of these problems is more related to zoogeographical and bioecological causes than to technical difficulties.

SDS electrophoresis of muscle proteins of several species was made. The species analyzed are from South East Atlantic (*M. capensis*), North East Atlantic (*M. senegalensis*, *M. cadenati* and *M. merluccius atlanticus*) and Mediterranean (*M. merluccius mediterraneus*) waters. Electrophoregrams were digitalized and the data obtained were analyzed by methods of automatic classification. Three measures of taxonomic similarity were calculated: Bravais-Pearson correlation coefficient, non parametric Spearman rank correlation coefficient and euclidean distance. The UPGMA algorithm was used to obtain the dendrograms which show the relationships among species.

The results with both correlation coefficients showed the same patterns and could be interpreted from a geographical point of view. Euclidean distance showed a strange relationship between the geographical extreme species *M. capensis* and *M. merluccius mediterraneus*. This pattern was due to the existence of one extra peak in the electrophoregram. Whereas correlation coefficients attribute equal weight to all points of the profile, euclidean distance is very influenced by points with high absolute values; this effect must be considered in order to interpret correctly taxonomic relationships among species of *Merluccius*.

BIBLIOGRAFÍA

- AMES, G. F. — 1974 Resolution of bacterial proteins by polyacrilamide gel electrophoresis on slabs. *J. Biol. Chem.* 249: 634-644.
- ANGELESCU, V., F. S. GNERI & A. NANI — 1958 La merluza del mar argentino (biología y taxonomía). *Secretaría de Marina, Servicio de Hidrografía Naval* H 1004: 224 pp.
- ARIAS, E. — 1973 La electroforesis de disco en la identificación de peces y del grado de frescura del pescado *Publ. Tec. Patr. «I. Cierva»* Madrid.
- CABENAT, J. — 1950 Note sur les merlus de la côte occidentale d'Afrique *Congr. Pêches, Pêcheries Un franc O. M. Inst. col.*, Marseille: 128-130.
- FAIRBANKS, G. & alt — 1971 Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606-2617.
- FRANCA, P. — 1962 Taxonomie des *Merluccius* de l'Atlantique Oriental *Mems. Ita Invest. Ultramar*, 2.^a ser. 36: 7-48.
- GREENWOOD, M. H., D. E. ROSEN, S. H. WEITZMAN & G. S. MYERS — 1966. Phyletic studies of teleostean fishes with provisional classification of living forms *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 131: 341-455.
- HICKLING, C. F. — 1937. The natural History of the hake. Part IV *Fish Invest.* London ser 2: 13 (2).
- HUREAU, J. C. & IH. MONOD. (ed.) — 1973. *Check-list of the fishes of the north-eastern Atlantic and of the Mediterranean*. UNESCO, Paris 2 vols., XXII + 683 + 331 pp.
- JONES, B. W. & I. M. MACKIE — 1970 An application of electrophoretic analysis of muscle myogens to taxonomic studies in the genus *Merluccius* *Comp Biochem Physiol* 32: 267-273.

- LAEMMLI, U. K. — 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LETACONNOUX, R. — 1952. Note sur le merlu de la côte d'Afrique. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 18 (2): 223.
- LLEONARI, J. — 1979. La comunitat epibentónica del banc canàrio-saharià. Tesis. Universidad de Barcelona, 457 pp.
- LOZANO CABO, F. — 1965. Las merluzas atlánticas. *Publ. Técn. Ita. Estud. Pesca*, 4: 11-31.
- MAURIN, C. — 1968. Les merlus des côtes nord et nord-ouest d'Afrique (Atlantique et Méditerranée). *Inst. Sci. Tech. Pêch. Mar.*
- MOHR, R. — 1965. Changes in the behavior of fish due to environment and motivation and their influence on fishing. *Spec. Publ. ICNAF*, 6: 775-779.
- MOREL, M. — 1974. Identification des espèces de poissons par électrophorèse des protéines du muscle. *Science et Pêche*, 234: 1-16.
- ODENSE, P. H., T. C. LEUNG & Y. M. MAC DOUGALL. — 1971. Polymorphism of lactate dehydrogenase (LDH) in some gadoid species. *Cons. Int. Explor. Mer. Rapp. Proc. Verb.* 161: 75-79.
- SIBLEY, C. G. — 1960. The electrophoretic patterns of avian-egg white protein as taxonomic characters. *The Ibis*, 102: 215-284.
- SMITH, J. L. B. — 1949. *The sea fishes of South Africa*. Central News Agency. Cape Town. 550 pp.
- SNEATH, P. H. A. & R. R. SOKAL. — 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman & Co. San Francisco. 573 pp.
- STUDIER, F. W. — 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.*, 79: 237-248.
- TANIGUCHI, N. — 1969. Comparative electrophoregrams of muscle proteins of three species of lizard fishes referable to the genus *Saurida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35 (9): 237-248.
- TSUYUKI, H., E. ROBERTS & W. E. VANSTONE. — 1965. Comparative zone electrophoregrams of muscle myogens and blood hemoglobins of marine and freshwater vertebrates and their application to biochemical systematics. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 22 (1): 203-213.
- WEBER, K. & M. OSBORN. — 1969. The reliability of macromolecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406.
- WOODHEAD, P. M. J. — 1965. Effects of light upon behavior and distribution of demersal fishes in the north Atlantic. *Spec. Publ. ICNAF*, 6: 267-288.