

# IDENTIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS POR AMPLIFICACIÓN CRUZADA EN *ANADARA SIMILIS* (MOLLUSCA: ARCIDAE)

**Julián Andrés Gil Saavedra**

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia

Correo electrónico: [julian.gil.saavedra@correounivalle.edu.co](mailto:julian.gil.saavedra@correounivalle.edu.co)

**Jaime Cantera Kintz (Director)**

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: [jaime.cantera@correounivalle.edu.co](mailto:jaime.cantera@correounivalle.edu.co)

## RESUMEN

Los microsatélites son marcadores moleculares usados con frecuencia en estudios de genética de poblaciones, aunque su desarrollo es un proceso costoso y prolongado. Un método que permite ahorrar tiempo y dinero es la amplificación cruzada, que consiste en amplificar el ADN de una especie determinada (especie objetivo) utilizando cebadores diseñados para una especie cercana (especie fuente). Usando este método se evaluó en *Anadara similis* el contenido informativo de 24 *loci* microsatélites, desarrollados en *Anadara tuberculosa*. Para ello, se estandarizó la extracción de ADN de *A. similis* y se probaron diferentes protocolos de amplificación en PCR. Los resultados fueron observados en geles de poliacrilamida, analizados con el software UVIpro versión 12.4 y GenAlEx 6.5. Cinco cebadores resultaron adecuados para amplificar consistentemente microsatélites polimórficos en *A. similis*. Los *loci* polimórficos mostraron un promedio de 22,8 alelos por locus, una heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) entre 0,855 y 0,964, una heterocigosidad observada ( $H_o$ ) entre 0,346 y 0,800. Solo se encontró un locus en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW). Estos resultados muestran la utilidad de la amplificación cruzada con estos cebadores para futuros estudios de genética poblacional en esta especie.

*Palabras clave:* *Anadara*, microsatélite, diversidad genética.

## ABSTRACT

Microsatellites are molecular markers frequently used in population genetic studies despite of the high cost, and long time involved in developing them. One method to save money and time is cross-amplification, which is the DNA amplification of the target species using primers developed for a closely related species. Using this method, the information content of 24 microsatellite *loci* developed from *Anadara tuberculosa* to amplify microsatellite regions of *Anadara similis* was evaluated. To that end, DNA extraction was standardized in *A. similis* samples and different PCR amplification protocols were tested. Results were observed in polyacrylamide gels, analyzed with software UVIpro version 12.4 and GenAlEx 6.5. Five primers showed consistent amplification and were polymorphic in *A. similis*. The polymorphic *loci* showed an average of 22, 8 alleles *per locus*, an expected heterozygosity ( $H_e$ ) between 0,855 and 0,964, an observed heterozygosity ( $H_o$ ) between 0,346 and 0,800. Only found one locus in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). These results point out the usefulness of cross-amplification with these primers for future population genetics studies in this species.

*Keywords:* *Anadara*, microsatellite, genetic diversity.

## INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares corresponden a una amplia gama de herramientas para análisis directo e indirecto del ácido desoxirribonucleico (ADN), las cuales han sido implementadas en las últimas décadas, generando desarrollo de la genómica estructural (Astorga, 2008). Estos marcadores permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo; dicha variación genética detectada es conocida como polimorfismo y es la que permite separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores, identificar las poblaciones fuentes, estimar divergencias poblacionales e identificar el flujo génico entre bancos naturales o semilleros. La aplicación de estas herramientas ha impactado diversos ámbitos de la biología incluyendo la biología marina y la acuicultura, la cual ha sido revisada por diferentes autores (Liu & Cordes 2004, Wilson *et al.* 2005, Saavedra & Bachere 2006, Dupont *et al.* 2007). Para efectuar este tipo de estudios en especies de las cuales no se conoce su genoma, se han empleado diversos marcadores moleculares dominantes como los RAPDs, RFLP y la secuenciación de regiones altamente variables, sin embargo, los tipos de marcadores más adecuados debido al alto nivel de variabilidad detectada corresponden a los AFLP y microsatélites (Astorga 2008).

Los microsatélites, SSR (Simple sequence repeats) o STR (Short Tandem Repeats) consisten en unidades de 2 a 5 nucleótidos repetidas en tándem. Las regiones

adyacentes a estas zonas generalmente son conservadas, por lo cual es posible diseñar cebadores que permitan obtener miles de copias de estas zonas mediante amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction). Los resultados de este análisis pueden ser visualizados mediante gel de agarosa de alta resolución o mediante lectura automatizada en un secuenciador de ADN. El polimorfismo de los microsatélites se basa en la variación en el número de repeticiones en tándem de los alelos de un *locus*. Estos han llegado a ser muy utilizados por su alta abundancia en el genoma, alta variabilidad debida a su elevado número de alelos por *locus* y por su forma de herencia codominante, lo que permite aplicar una variedad de análisis estadísticos poblacionales (Astorga 2008). Aunque los microsatélites se usan habitualmente en estudios de genética de poblaciones su desarrollo es un proceso caro y que requiere mucho tiempo. Una estrategia que permite ahorrar tiempo y dinero es la llamada amplificación cruzada que consiste en amplificar el ADN de una especie determinada (especie objetivo) usando cebadores que han sido diseñados para una especie diferente (especie fuente) (López-Vinyallonga, *et al.* 2011). Últimamente, y cada vez con mayor frecuencia, se intenta la amplificación cruzada con cebadores de una especie en otra distinta, obteniéndose en algunos casos resultados positivos (Schlötterer *et al.* 1991, Kijas *et al.* 1995, Kayser *et al.* 1996, González 2003, Strecker 2006, Chan 2007, Chang *et al.* 2008, Küpper *et al.* 2008, Lin *et al.* 2008).

Esta investigación se centra, en la identificación de polimorfismos en *Anadara*

*similis* (Adams 1852) (especie objetivo), a partir de amplificación cruzada de microsatélites de *A. tuberculosa* (Sowerby 1833) (especie fuente) los cuales fueron diseñados previamente por Quesada *et al.* 2014. Estos moluscos bivalvos poseen una amplia distribución en la costa del Pacífico Oriental. *A. similis* se distribuye desde Corinto en Nicaragua hasta Tumbes en Perú (Keen 1971), se encuentra enterrada generalmente dentro del lodo de manglares, sobre fondos blandos de la zona sublitoral, entre 15 y 50 cm de profundidad (Fisher *et al.* 1995). El sustrato apropiado para su desarrollo normal es limo-arcilloso (Mora 1990).

En Colombia, esta especie se encuentra en los bosques de manglar de la costa Pacífica que comprende alrededor de 35 municipios situados en los departamentos de Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño (Borda & Cruz 2004). En estas zonas estos bivalvos son los más explotados y de ellos se benefician las comunidades que habitan esta región. Sin embargo, actualmente el recurso además de ser utilizado para consumo y comercio local, está siendo comercializado al vecino país del Ecuador, lo que ha aumentado sus niveles de explotación llevándola a ser incluida en el Libro Rojo de Invertebrados Marinos de Colombia en categoría de vulnerable (Ardila *et al.* 2002), por la alta probabilidad de sobreexplotación. La información existente en Colombia sobre el estado actual de *A. similis* es reducida. Además, de los pocos artículos relacionados con la piangua, ninguno investiga sobre aspectos genéticos de la especie, encontrándose solamente estudios sobre aspectos biológicos (Borrero 1982, Herrán

1983, Lucero 2007), aspectos económicos y ecológicos (Squires *et al.* 1975, Betancourt & Cantera 1978, Cantera 1978, Rodríguez 1985, Prah *et al.* 1990) e información pesquera del recurso (MacKenzie 2001, Borda & Cruz 2004, Silva & Carrillo 2004).

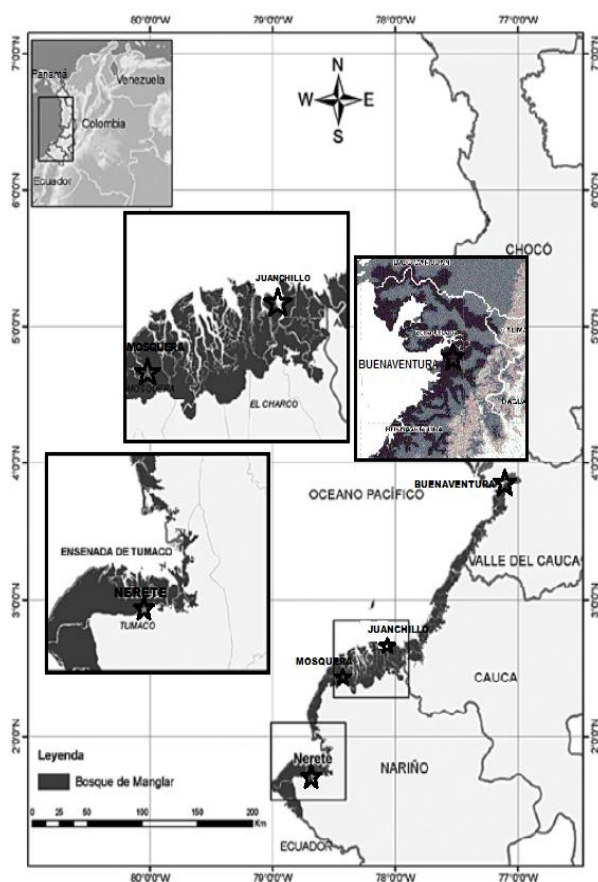
Dada la ausencia actual de datos e investigaciones genéticas relacionadas con la piangua, la creciente explotación y la acción antrópica en la costa pacífica colombiana, resulta de gran pertinencia efectuar estudios sobre la genética de *A. similis* en la costa Pacífica colombiana, como una herramienta que amplíe el conocimiento sobre esta especie para futuros estudios de conectividad y diferenciación genética entre poblaciones. Esta información tendrá un gran valor en posteriores estrategias de recuperación de las poblaciones silvestres que impliquen la preservación del proceso natural de repoblamiento mediado por la dispersión larval y el establecimiento de medidas que garanticen la conservación y uso sostenible de estas especies (Cantera & Lucero 2007).

## MÉTODOS

### 1. Zona de estudio, colecta y almacenamiento.

Las muestras de tejido de *A. similis* para este estudio corresponden al pie del molusco y provienen de individuos colectados durante la investigación titulada “Potencial productivo de las poblaciones naturales de la piangua *A. tuberculosa* y *A. similis* dentro de una perspectiva espacio-temporal en la costa Pacífica colombiana”, realizada por INVEMAR-UNIVALLE-WWF-UEASPNN-

ASCONAR-COLCIENCIAS. La colecta se efectuó entre febrero-julio de 2009 y se empleó el método manual tradicional de “concheo” a lo largo de transectos de 50 m<sup>2</sup> (10x5 m) desde la línea de marea baja, por triplicado, en cuya área se extrajeron todos los individuos encontrados por 2 mujeres “piangueras” en una hora durante la marea baja, haciendo un barrido del área hasta una profundidad de 30 cm.



**Figura 1.** Zona de estudio en Costa Pacífica Colombiana (CPC). De norte a sur: Buenaventura, Juanchillo, Mosquera y Nerete.

Las muestras fueron depositadas en el Banco de Tejidos del Instituto de Investigación de

Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Palmira-Valle, preservadas en etanol 96% y solución tampón de colecta (Tris HCL 0,1M, EDTA 0,1M, NaCl 0,01M, SDS 0,5%) a -20°C. De estas, se escogieron aleatoriamente muestras de individuos pertenecientes a cuatro localidades de la Costa Pacífica Colombiana (Buenaventura, Mosquera, Nerete, Juanchillo) hasta obtener un total de 30 individuos (Fig. 1).

## 2. Extracción y cuantificación del ADN total

Se realizó la extracción de ADN a partir de 25 mg del pie del molusco empleando dos protocolos: CTAB y kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN Inc., California), para establecer cuál ofrecía un mejor rendimiento en términos de calidad, cantidad, tiempo y costos. La concentración de ADN extraído se estimó por medio del espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.) a una longitud de onda de 260 nm (debido a que las bases púricas y pirimidínicas del ADN tienen la propiedad de absorber la luz UV a esta longitud de onda) y comparando con un blanco que fue en este caso agua destilada. El protocolo de extracción finalmente utilizado en este trabajo fue el método de extracción CTAB, con el cual se obtuvieron concentraciones de ADN entre 300 y 800 ng/μL.

## 3. Amplificación por PCR usando microsatélites cruzados.

Se probaron 24 pares de cebadores aislados por Quesada *et al.* (2014), a partir de una

librería genómica de *A. tuberculosis*. Las reacciones de amplificación fueron programadas en un termociclador CFX96 Touch™ (BioRad). Se estandarizó partiendo del protocolo de PCR de Sekino *et al.* (2010). Mediante varios ensayos se buscó optimizar la PCR para cada par de cebadores, variando lo siguiente: (i) concentración final de componentes del premix (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, cebador, Taq polimerasa, ADN), (ii) la temperatura de hibridación o anillamiento de los cebadores. Para el caso (i), se probaron varios volúmenes y concentraciones de los componentes hasta obtener resultados óptimos (Tabla 1).

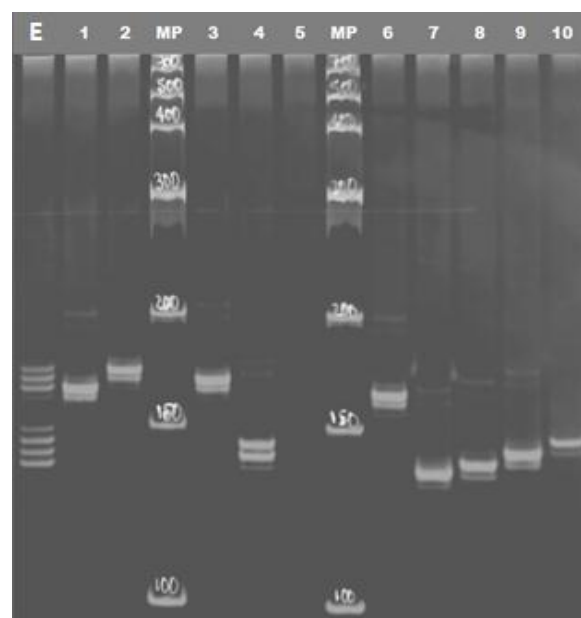
**Tabla 1.** Volúmenes y concentraciones de la solución de amplificación o Premix de reacción óptimas para amplificación de los *loci* microsatélites: STR10, STR13, STR15, STR19, STR24.

Reactivos	Cantidad (μL)	Concentración Final
Agua MiliQ	8,4	--
Buffer Buffer PCR (5X)	3,0	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,9	1,5 mM
Mezcla dNTPs (2,5 mM)	1,2	0,2 mM
Mezcla Cebadores (F+R) (20 μM)	0,3	0,3 μM
Taq Polimerasa (5u/μL)	0,2	0,5 u/μL
ADN	1,0	--
<b>Total</b>	<b>15,0</b>	--

En el caso (ii), se utilizaron diferentes protocolos con gradientes de temperatura y “touchdown” hasta escoger para cada cebador, temperaturas de alineamiento óptimas (Tabla 1.1). Para monitorear posibles problemas por contaminación en las corridas de amplificación se incluyeron controles negativos. El proceso de comprobación de amplificación se realizó

por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6.5% con un marcador de peso de 25 pb (Bioline), a 150 voltios de pre-corrída por 15 minutos y 300 voltios de corrida por 1 hora y 40 minutos. Cada gel se llevó a un volumen final de 7μL (2μL de buffer + 5μL de ADN amplificado). Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y se aplicó una solución reveladora para visualizar los patrones de bandeos.

La amplificación cruzada fue considerada exitosa sólo cuando se generaron fragmentos claros y específicos luego de varias reacciones de PCR independientes, y dentro del intervalo de 100 a 500 pares de bases, que eran los tamaños de los fragmentos esperados a partir del diseño de los iniciadores (Fig. 2).



**Figura 2.** Ejemplo de patrón de bandeos que se obtuvo en las amplificaciones cruzadas exitosas vistas en geles de poliacrilamida al (imagen modificada a blanco y negro). E= escalera alélica, MP= Marcador de peso.

**Tabla 1.1** Condiciones óptimas de Amplificación en PCR para los *loci* microsatélites: STR10, STR13, STR15, STR19, STR24.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	3:00	1
Desnaturalización	94	0:30	
Alineamiento	58	0:30	30
Extensión	72	0:30	
Extensión Final	72	5:00	1

#### 4. Identificación del nivel de polimorfismo

Una vez se estandarizaron las condiciones de PCR y se separaron los *loci* microsatélite que mostraron una amplificación exitosa, se estimó el tamaño de los alelos a partir de las fotografías de los geles utilizando el software UVIPro versión 12.4.

#### 5. Análisis Genéticos

Para realizar los análisis genéticos, se construyó una matriz de datos con las 30 muestras escogidas de las poblaciones de *A. similis* de las Costa Pacífica Colombiana en estudio y los *loci* microsatélites que amplificaron exitosamente. La matriz de datos contenía la información de los patrones de bandas obtenidos a partir del tamaño o longitud del fragmento en pares de bases (pb), asignándose a cada individuo dos valores por *locus*, dependiendo de su genotipo (homocigoto o heterocigoto). Cuando ambos valores por *locus* fueron similares en tamaño, se tomó como

homocigoto y para valores diferentes como heterocigotos. Luego se realizaron los análisis de los datos habilitando los macros de GenAlex 6.2 en Microsoft Excel 2010 y se modificó la matriz original para poder realizar los cálculos como se requiere con el primer programa (Peakall y Smouse, 2006). Se estimó el número de alelos, la frecuencia alélica por locus, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), el número efectivo de la población ( $N_e$ ). Se probó el equilibrio Hardy-Weinberg, y se llevó a cabo una estimación del flujo génico entre poblaciones con el método de alelos privados y alelos comunes (Barton & Slatkin 1986, Slatkin 1994) (Fig. 3).

## RESULTADOS

De los 24 pares de cebadores evaluados, sólo cinco permitieron una amplificación óptima: STR10, STR13, STR15, STR19, STR24. Estos cebadores fueron adecuados para que la ADN polimerasa amplificara regiones polimórficas (i.e. aparición de varios alelos o bandas) en las muestras bajo estudio (Tabla 2). Los 19 cebadores restantes se descartaron porque simplemente no amplificaron en ninguno o en la mayoría de los individuos, otros generaron un patrón de bandas nucleotídicas que no permitió su lectura y no se logró eliminar totalmente las bandas inespecíficas.

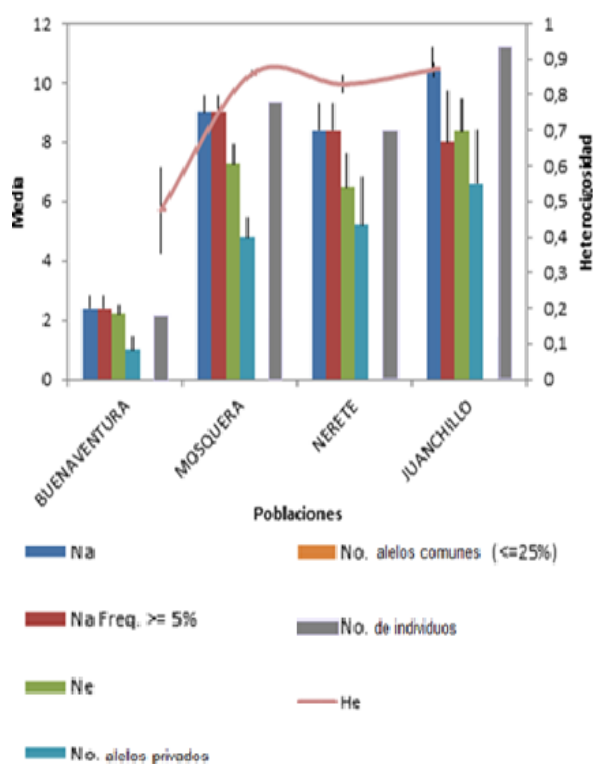
A partir de las corridas electroforéticas de los 30 individuos y luego de determinar cada uno de los genotipos de los 5 microsatélites con el software correspondiente, se obtuvo un rango alélico entre 107-504 pb y un promedio de 22,8 alelos/*locus* (Tabla 3 y 4).

**Tabla 2.** Secuencias de cebadores y motivos repetidos de 24 *loci* microsatélites probados para amplificación cruzada en *A. similis*. En color gris, aparecen señalados los *loci* que amplificaron exitosamente, siendo polimórficos en los individuos analizados.

Loci	Motivo repetido	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Resultado
STR1	ATTT(70)	TTCAGAGCAAAGATCGAAATCC	AAACAGTTAATTGTGATACATCAGTACG	amplificación nula
STR2	ATCT(60)	TCCTAAGTTTATGTGAAAGATGGG	AGAATAAACCAAGGATCGTATGC	amplificación nula
STR3	ATAC(52)	TTTCATAATTAAGACAGGAAACAGG	CTTGAGAAATATTATCCTATTTAAAGCCG	amplificación nula
STR4	AAAT(52)	CCAACGTAACAGAAACAAGCG	AAGATTGAAACCAGACACCG	amplificación nula
STR5	AAGT(52)	TCACGCAGTCACACAACACC	ATACCACTTAATAAGAGCCTTACTTGC	Bandas inespecíficas
STR6	ATCT(52)	TCAGGGATTCATATTAAGTCAAATGG	CTGATAACATCGAGGTCGCC	amplificación nula
STR7	AAAT(48)	TGGGTATTTAGAAGGCAACCG	GTGTACTTGAATCATATCATGAAACCG	amplificación nula
STR8	AAAT(48)	TTAGGATGTTATCAGTCTTATTACAG	AAACTTACCATTTCTGGGTGGC	amplificación nula
STR9	AAAT(48)	GCCACCTAAAGTGATCTAGCCG	AGGATATTTATTGTTTCAGGTGGTCC	amplificación nula
STR10	ATCT(48)	TGTCTGTGAATGGCCAAAGC	CAACAAATATGGCACTAATAAAATCACC	Polimórfico
STR11	ATCT(48)	AAACTCAGGCGTGTGATGG	AAGTAAATATTGTACCTTCGTAAAGAGG	amplificación nula
STR12	AGTG(48)	CGGTTGGTCGGTCAGTCG	GGGCTTTCCTCTGAGCTGC	amplificación nula
STR13	AATC(48)	TTCACTCATCAAACAGTTGGC	AAACTCCAGACTGAAGACCCG	Polimórfico
STR14	ATCT(48)	TCTCGAAATGTCAAATACAGGG	CAATTCTAATATTCTTCATTGAGAAGGG	amplificación nula
STR15	ATCT(48)	TTTCGGAAGGTTAACGACAGG	CGCCATACCGAGAGATAGACG	Polimórfico
STR16	ATCT(48)	AAGTGGTATGACCTTGACTGTAGACC	TTGAAGGCGCTCATACATCC	Bandas inespecíficas
STR17	ATCT(48)	AAACGGTTAACCTTATAGACAGGC	AAGATTCTTCACTTATACCGAGGG	amplificación nula
STR18	ATCT(48)	GGAGTAATGGTGTTTATCGCCG	TCCTACCGTACCATCCCAGG	Bandas inespecíficas
STR19	AAAT(48)	GCAAGCTTAGAAGACCTAAGCCC	AGAAAACACAGAAGAAACCTGC	Polimórfico
STR20	ATCT(44)	GGTTTGGTCTTCCAGTGATCC	GGCAACTAAGAACGGGAAACG	amplificación nula
STR21	ATCT(44)	TTGACGATGGGAGAACATTTGC	GGTTGTTGCCTGTGTGTCCACC	amplificación nula
STR22	ATCT(44)	GGAAGATTCCATAGTGCCCG	CAAGCGTTTGATACCATCCC	amplificación nula
STR23	AAAT(44)	TGTATCTGTGCTCTTACTTCTGATAGGG	TGTCCACCCTTCAAACATGG	Bandas inespecíficas
STR24	ATAC(44)	GCATTAATCCACCATTACATTAACG	GGTACTAATGCCGGACATGC	Polimórfico

**Tabla 3.** Análisis de amplificación cruzada de cinco *loci* microsatélites en *A. similis*. Ta = Temperatura de alineamiento; N = Número de muestras; Na = Número de alelos; Ae= Número efectivo de alelos, Ho= Heterocigosidad observada; He = Heterocigosidad esperada, HWE = Equilibrio Hardy-Weinberg, p: valor de significancia.

Loci	Rango alélico (pb)	Ta (°C)	N		Ae	Ho	He	F	HWE (p < 0.05)
			N	Na					
STR10	129-361	58	26	32	28,167	0,385	0,964	0,601	No
STR13	287-504	58	30	21	8,182	0,800	0,878	0,089	Equilibrio
STR15	107-197	58	25	21	17,123	0,360	0,942	0,618	No
STR19	207-329	58	28	14	6,877	0,536	0,855	0,373	No
STR24	193-268	58	26	26	14,857	0,346	0,933	0,629	No
<b>Total</b>				<b>114</b>					



**Figura 3.** Patrones alélicos y valores promedio entre poblaciones (Na=Número de alelos; Ne=Número efectivo, He=Heterocigosidad esperada).

Los cebadores STR10 y STR24 presentaron un número alto de alelos, además de tener una secuencia repetida perfecta, por lo que pueden ser considerados como buenos marcadores en estudios de genética de poblaciones de esta especie. En todos los *loci* bajo estudio, la Heterocigosidad esperada (He) fue mayor que la observada (Ho), lo que muestra un déficit de heterocigositos en todos los *loci* que se amplificaron exitosamente (Tabla 3). Lo anterior puede ser explicado por la presencia de alelos nulos. Los alelos nulos se presentan cuando existe una mutación en la secuencia nucleotídica adyacente a los microsatélites, impidiendo que los cebadores se unan a la secuencia molde (Chapuis & Estoup 2007). A diferencia del alelo ausente la ocurrencia del alelo nulo no se da al azar, lo que se obtiene es una falta de consistencia en la amplificación. A partir de los *loci* microsatélites, se compararon los análisis genéticos respectivos en todas las poblaciones bajo estudio (Fig. 1).



**Tabla 4.** Número de muestras escogidas aleatoriamente para cada una de las 4 poblaciones en estudio y los respectivos alelos encontrados para cada *loci* microsatélite que amplificaron con éxito. Los valores iguales en cada locus para cada muestra representan los individuos homocigotos para dicho locus, mientras que los valores diferentes representan a los heterocigotos. Total muestras N= 30 (AL= Alelo, STR= *loci*).

Muestra	Población	STR15		STR19		STR24		STR10		STR13	
		AL#1	AL#2	AL#1	AL#2	AL#1	AL#2	AL#1	AL#2	AL#1	AL#2
1	BUENAVENTURA	131	131	0	0	200	244	284	320	356	363
2	BUENAVENTURA	181	181	308	308	260	260	309	309	356	367
3	MOSQUERA	0	0	304	304	260	260	0	0	363	371
4	MOSQUERA	135	148	221	206	212	212	236	236	363	375
5	MOSQUERA	0	0	312	329	255	255	0	0	356	386
6	MOSQUERA	161	161	321	325	212	204	0	0	356	356
7	MOSQUERA	127	127	321	321	208	208	255	255	352	367
8	MOSQUERA	139	153	329	329	0	0	284	284	356	378
9	MOSQUERA	197	197	304	304	223	223	294	294	367	386
10	MOSQUERA	165	194	321	325	208	208	297	361	356	363
11	MOSQUERA	162	158	227	214	248	256	182	248	371	405
12	NERETE	131	139	321	321	206	206	190	272	352	390
13	NERETE	0	0	227	210	208	208	229	229	300	363
14	NERETE	107	107	308	321	0	0	129	129	287	308
15	NERETE	157	157	308	321	197	251	233	340	363	367
16	NERETE	127	127	304	325	208	208	166	240	363	367
17	NERETE	173	173	325	325	251	256	247	247	363	370
18	NERETE	144	140	0	0	268	268	225	240	367	367
19	NERETE	144	144	317	317	202	208	186	212	367	367
20	JUANCHILLO	169	169	321	321	201	198	256	256	374	393
21	JUANCHILLO	139	139	304	325	0	0	194	267	374	374
22	JUANCHILLO	165	165	321	325	216	245	202	202	363	382
23	JUANCHILLO	153	153	325	325	235	235	238	238	356	356
24	JUANCHILLO	148	148	231	231	0	0	0	0	363	375
25	JUANCHILLO	0	0	304	321	239	239	198	198	356	401
26	JUANCHILLO	0	0	308	317	236	236	194	162	356	360
27	JUANCHILLO	115	115	239	239	260	260	190	190	349	367
28	JUANCHILLO	144	144	321	321	227	227	196	196	356	356
29	JUANCHILLO	148	189	304	329	193	193	193	193	363	386
30	JUANCHILLO	135	135	321	325	243	259	252	252	374	504

## DISCUSIÓN

En este estudio de *A. similis* se consideró exitosa la amplificación cruzada de cinco *loci*. Con relación al resto de los *loci*, en algunos no se logró amplificación y otros no se alcanzó la estandarización. Una de las explicaciones de que no se haya logrado la amplificación de algunos microsatélites en estudio (Tabla 4), se debió quizás, a que el diseño de los cebadores no fue el mejor, o coincidió con una región de tasa de mutación elevada en uno de los cebadores diseñados en el organismo usado como fuente de ADN (*A. tuberculosa*). Por otra parte, la aparición de bandas inespecíficas que no lograron limpiarse en algunas de las amplificaciones, puede deberse a que los cebadores no se diseñaron específicamente para la especie y es probable que en ocasiones se hibridicen en regiones del ADN de *A. similis* diferentes a la región flanqueante del microsatélite (Vissuet *et al.* 2008). Los 5 *loci* microsatélites analizados en las 30 muestras fueron polimórficos y el número de alelos por *locus* varió de 14 en STR19 hasta 32 alelos en STR10. Cabe aclarar que varios *loci* microsatélite amplificaron, pero no con patrones de bandas estables que permitieran su medición, por lo que se dejaron fuera de la estandarización. No obstante, Hamill *et al.* (2007) mencionan que es posible continuar variando la temperatura de anillamiento y las concentraciones del cloruro de magnesio, junto con otros parámetros de la PCR para conseguir amplificaciones exitosas.

Aunque este estudio no es un trabajo poblacional (debido al N muestral) sino más bien un trabajo de investigación exploratorio que buscaba marcadores para ser utilizados

en posteriores estudios poblacionales en *A. similis*, se realizaron algunas estimaciones a partir de este tamaño de muestra con el fin de comparar con otros estudios, obteniéndose diversidades genéticas ( $H_e$ ) similares para las diferentes poblaciones analizadas, entre 0,85 y 0,96. Pero al comparar esta diversidad con la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), se encontró deficiencia de heterocigotos en todos los *loci* bajo estudio (Tabla 3). No obstante, el déficit de heterocigotos es una característica comúnmente observada en moluscos marinos (*Crassostrea gigas* y *Buccinum undatum*) (Hedgecock *et al.*, 2004, Weetman *et al.*, 2005) y otros moluscos bivalvos (*Crassostrea virginica*, *Venerupis pullastra* y *Macoma balthica*) (Reece *et al.* 2004, Becquet *et al.* 2009, Pereira *et al.* 2009). En estudios poblacionales este déficit de heterocigotos, suele deberse al efecto Wahlund, el cual se refiere a la reducción de heterocigosidad en una población causada por una estructura subpoblacional o mezcla de poblaciones (Tripp-Valdéz *et al.* 2010). Mientras tanto, al comparar otros estudios donde se presenta sobreexplotación de especies, el déficit de heterocigotos se basa en dicha sobre explotación que directamente aumenta la deriva génica (Benzie & Williams 1998). Cabe señalar que los efectos de explotación no solo afectan los sitios donde se realiza sino que también podrían causar un efecto a largo plazo sobre los patrones de reclutamiento larvario en sitios de explotación lejanos (Zamora *et al.* 2011).

Este déficit de heterocigotos sigue siendo un aspecto importante a considerar, ya que ninguno de los *loci* analizados (excepto el STR13) se encontró en equilibrio de Hardy-

Weinberg (HWE) (Tabla 3), fundamento básico en el análisis de la estructura genética poblacional. Estas desviaciones del equilibrio HWE, pueden ser atribuidas a factores como la endogamia a consecuencia de la sobre explotación pesquera. Además, los valores de heterocigosidad observados, se corresponden con el índice de fijación (F), cuyos valores fueron relativamente altos en casi todos los *loci* analizados, lo cual indica que se pueden estar fijando alelos en la población de estudio.

Otro aspecto importante y frecuente que también se debe considerar durante la caracterización de microsatélites, son los errores durante la amplificación de los *loci* en los individuos, ocasionando falsos homocigotos (alelos nulos) (Li & Kijima 2005). Los alelos nulos en los marcadores tipo microsatélite, se dan por mutaciones puntuales en las regiones flanqueantes, que es donde se alinean los cebadores, lo cual disminuye la capacidad de reconocimiento de estos últimos durante la amplificación del fragmento por PCR (Callen *et al.* 1993, Reece *et al.* 2004). La presencia de alelos nulos en los estudios de genética de poblaciones trae consigo la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg debido a un déficit de heterocigotos (Callen *et al.* 1993, Li *et al.* 2003) y múltiples alelos nulos hacen confusos los análisis de estructura poblacional (Reece *et al.* 2004, Li *et al.* 2009).

Se debe tener en cuenta además, que organismos que producen gran número de gametos, como algunos moluscos marinos, tienen un mayor número de ciclos celulares, por lo tanto se incrementa la posibilidad de

mutaciones a nivel de la replicación del ADN (Foltz 1986, Beckenbach 1994), y se ha observado que las especies con espermatozoides planctónicos muestran alelos nulos y desviaciones al HWE, en comparación con especies de menor frecuencia copulatoria, y menor producción de espermatozoides como los decápodos en el cual la presencia de alelos nulos es rara (Jensen & Bentzen 2004).

Se debe tener en cuenta, que aunque esta técnica denominada amplificación cruzada, ha demostrado alta eficiencia para varias especies de peces (Rico *et al.* 1996, Takagi *et al.* 1997), su eficiencia en bivalvos es bastante pobre, incluso para los EST-SSR, los cuales deberían estar aún más conservados ya que provienen de regiones codificantes (Zhan *et al.*, 2005). Sin embargo, al comparar con otros estudios en bivalvos (Ibarra *et al.* 2006, Petersen *et al.* 2009) la amplificación cruzada de microsatélites reportados para la almeja *Nodipecten subnodosus* mostró baja eficiencia cuando se realizó en especies de diferente género, pero presentó un mayor porcentaje de loci amplificados cuando se probó en una especie del mismo género. Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados de esta investigación, se hace oportuno reevaluar la cercanía filogenética de las especies fuente y objetivo (*A. tuberculosa* y *A. similis*, respectivamente) y el uso de esta técnica de amplificación cruzada en el caso de las especies en estudio, siendo necesario realizar una librería genómica de *A. similis* para identificar marcadores microsatélites propios de la especie.

## CONCLUSIONES

1. La estrategia de amplificación cruzada fue considerada exitosa y reproducible en cinco de los marcadores microsatélites probados.
2. Aunque 5 de los 24 *loci* microsatélites fueron informativos, se considera una proporción baja con respecto a estudios de amplificación cruzada realizados en otras especies (Schlötterer *et al.* 1991, Kijas *et al.* 1995, Kayser *et al.* 1996, González 2003, Strecker 2006, Chan 2007, Chang *et al.* 2008, Küpper *et al.* 2008, Lin *et al.* 2008).
3. Los resultados no mostraron un patrón claro sobre el éxito de la amplificación cruzada y la relación filogenética entre las especies origen y objetivo en este estudio.

## SUGERENCIAS

1. Seguir variando las condiciones de PCR y la metodología de estandarización, sobre todo para aquellos *loci* que aunque amplificaron en las diferentes muestras, no se lograron limpiar de la presencia de bandas inespecíficas al final de este estudio.
2. Para estudios futuros, se recomienda hacer una librería genómica para *A. similis* y posteriormente identificar marcadores moleculares tipo microsatélite, para aumentar el número de *loci* útiles y mejorar así los estudios poblacionales de dicha especie. Adicionalmente, utilizar otros tipos de marcadores moleculares.

3. Aumentar el número de la muestra en las diferentes localidades así como el número de *loci*, para robustecer la información y poder iniciar análisis poblacionales, que en un futuro puedan llevar a la búsqueda de *loci* de caracteres cuantitativos y planes de conservación en esta especie.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se encuentra enmarcado en el proyecto “*Conectividad genética de poblaciones naturales de la piangua (A. tuberculosa y A. similis) en la costa Pacífica colombiana a partir de marcadores moleculares*”, desarrollado por el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) y contó con la cofinanciación de la Universidad del Valle.

Agradezco al Banco de Tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH) por el suministro de los tejidos utilizados en este estudio. También agradezco el apoyo de la Universidad del Valle (sede Cali) por el préstamo de laboratorios y equipos. Agradecimientos al profesor y director Jaime Cantera, al profesor Heiber Cárdenas y la bióloga Fanny Gonzáles por su contribución en la fase experimental y tutoría. También al biólogo Ronny Fernando Orobio, por sus valiosas sugerencias para solucionar situaciones durante este trabajo, así como al evaluador que contribuyó con sus comentarios a mejorar este documento. Finalmente, a mi familia y amigos por todo su apoyo durante mi carrera.

## LITERATURA CITADA

- Ardila, N.E., Navas, G.R. and Reyes, J.O. (2002), *Libro Rojo de invertebrados marinos de Colombia*. INVEMAR y Ministerio del Medio Ambiente. Editorial Panamericana. Bogotá.
- Astorga, M.P. (2008), “Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura”, in A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (Eds.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, No. 12, Roma, pp. 277-287.
- Barton, N.H. and Slatkin, M. (1986), “A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population”. *Heredity*. Vol. 56, pp. 409–415.
- Beckenbach, A.T. (1994), “Mitochondrial haplotype frequencies in oysters: neutral alternatives to selection models”, in B. Golding (Ed.). *Non-neutral evolution: theories and molecular data*. Chapman and Hall, Nueva York, EEUU, pp. 188-198.
- Becquet, V., I. Lanneluc, B.S. Bouhet and García, P. (2009), “Microsatellite markers for the Baltic clam, *Macoma balthica* (Linné 1758), a key species concerned by changing southern limit, in exploited littoral ecosystems.”. *Conservation Genetics Resources*. Vol. 1, pp. 265-267.
- Benzie, J.A.H. and Williams, S.T. (1998), “Phylogenetic relationships among giant clam species (Mollusca: Tridacnidae) determined by protein electrophoresis”. *Marine Biology*. Vol. 132, pp. 123-133.
- Betancourth, J. and Cantera, J.R. (1978), “*Estudio Ecológico y Económico de la piangua Anadara tuberculosa (Bivalvia: Arcidae) en la costa del Pacífico colombiano*”. *Memorias I Seminario sobre el Océano Pacífico Sudamericano*. Universidad del Valle. Cali.
- Borda, C. A. and Cruz, R. (2004), “Pesca Artesanal de Bivalvos (*Anadara tuberculosa* y *A. similis*) y su Relación con Eventos Ambientales. Pacífico Colombiano”. *Revista de Investigaciones Marinas*. Vol. 25, No. 3, pp. 197-208.
- Borrero, F.J. (1982), *Observaciones sobre la recolección de juveniles de piangua Anadara spp. y las condiciones oceanográficas en el área de Punta Soldado, Bahía de Buenaventura*. Tesis Biología. Universidad del Valle, Cali. 110 p.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y. Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. and Sutherland, G.R. (1993), “Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers”. *The American Journal of Human Genetics*. Vol. 52, pp. 922-927.

- Cantera, J.R. and Contreras, R. (1978), “Informe preliminar sobre el potencial malacológico aprovechable en el Pacífico colombiano”. *Memorias I Seminario sobre el Océano Pacífico Sudamericano*. Universidad del Valle. Cali.
- Cantera, J.R. and Lucero, C. (2007), *Aportes de las bases científicas para el acompañamiento de procesos de conservación de la piangua en Bahía Málaga, Pacífico colombiano*. Informe Técnico. Universidad del Valle. Cali.
- Chan, L. M. (2007), “Characterization of microsatellite markers for Couch’s spadefoot toad (*Scaphiopus couchii*) and cross-amplification in other species of the family Scaphiopodidae”. *Molecular Ecology Notes*. Vol. 7, pp. 318-320.
- Chang, Y.M., Kuang, Y.Y., Liang, L.Q., Lu, C.Y., He, J.G. and Su, X.W. (2008), “Searching for protein-coding genes using microsatellites in common carp by comparing to zebrafish EST database”. *Zoological Research*. Vol. 29, No. 4, pp. 373-378.
- Chapuis, M. P. and Estoup, A.(2007), “Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation”, *Molecular Biology and Evolution*, 24 (3): 621-631.
- Dupont, S., Wilson, K., Obst, M., Skold, H., Nakamo, H. and Thorndyke, M.C. (2007), “Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology”. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 332, pp. 257-273.
- Fisher, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E. and Niem, V. H. (1995), “Pacífico Centro-Oriental: Plantas e invertebrados”, *Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca*. Vol. 1, 646 p.
- Foltz, D.W. (1986), “Segregation and linkage studies of allozyme loci in pair crosses of the oyster *Crassostrea virginica*”. *Biochemical Genetics*. Vol.24, pp. 941-956.
- Fusejima, I. (1991), *Informe final CORPONARIÑO-JICA*. Tumaco. 201 p.
- Gallo, C.C. and E. Vargas (1987), *Determinación del aporte de materia orgánica del manglar en la Ensenada de Tumaco*. Centro Control de Contaminación del Pacífico –CCCP. Tumaco. 13 p.
- González, E.G. (2003). “Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad”. *Graellsia*. Vol. 59, No. 2-3, pp. 377-388.
- Hamill, R.M., Webb, S.A., Macias, C., Graves, J.A., Magurran A.E. and Ritchie, M.G. (2007), “Comparison of genetic diversity at microsatellite loci inner-extinct and non-endangered species of Mexican goodeine fishes and prediction of cross-amplification within the family”, *Journal of Fish Biology*. Vol. 70, (Supplement A), pp. 16-32.

- Hedgecock, D., Li, G., Hubert, S., Bucklin, K. and Ribes, V. (2004), "Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA *loci* cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*". *Journal of Shellfish Research*. Vol. 23, pp. 379-385.
- Herrán, Y. (1983), *Observaciones sobre el desarrollo gonadal de la piangua Anadara tuberculosa (Sowerby 1833) y Anadara similis (Adams 1852) en Punta Soldado, Bahía de Buenaventura*. Trabajo de grado. Universidad del Valle, Cali. 112 p.
- Ibarra, A.M., Petersen, J.L., Famula, T.R. and May, B. 2006. "Characterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family", *Molecular Ecology*. Vol. 6, pp. 153-156.
- Jensen, P.C. and Bentzen, P. (2004), "Isolation and inheritance of microsatellite *loci* in the *Dungeness crab* (Brachyura: Cancridae: Cancer magister)". *Genome*. Vol. 47, pp. 325-331.
- Kayser, M, Ritter H, Bercovitch F, Mrug M, Roewer L, Nurnberg P. 1996. "Identification of highly polymorphic microsatellites in the rhesus macaque *Macacamulatta* by cross-species amplification". *Molecular Ecology*. Vol. 5, No.1, pp. 157-159.
- Keen, M. (1971), *Sea Shells of the Tropical America: Mollusks from Lower California to Perú*. Stanford University Press., California, 1064 pp.
- Kijas, J.M., Fowler, J.C. and Thomas, M.R. (1995), "An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species". *Genome*. Vol. 38 (2), pp. 349-355.
- Küpper, C., Burke, T., Székely, T. and Dawson, D.A. (2008), "Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds". *BMC Genomics*. Vol. 9, pp. 502.
- Li, Q. and Kijima, A. (2005), "Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)". *Marine Biotechnology*. Vol. 7, pp. 669-676.
- Li, Q., Nie, H. and Kong, L. (2009), "Microsatellite-centromere mapping in zhikong scallop (*Chamys farreri*) through half-tetrad analysis in D-shaped larvae of gynogenetic diploid families". *Aquaculture*. Vol. 293, pp. 29-34.
- Liu, Z.J. and Cordes, J.F. (2004), "DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics". *Aquaculture*. Vol. 238, pp. 2-37.
- Lin, G., Chang, A., Yap, W., Yue, G.H. (2008), "Characterization and cross-species amplification of microsatellites from the endangered Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricate*)". *Conservation Genetics*. Vol. 9, pp. 1071-1073.

- López-Vinyallonga, S., López-Alvarado, J., Constantinidis, T.H., Susanna de la Serna, A. and García, N. (2011), “Amplificación cruzada de microsatélites en el género *Centaurea* (Compositae)”. *Collectanea Botanica*. Vol. 30, pp. 17-27.
- Lucero, C. (2007), *Aportes de las bases científicas para el acompañamiento de procesos de conservación de la piangua en Bahía Málaga, Pacífico colombiano*. Universidad del Valle. Cali.
- Mackenzie, L. Jr. (2001), “The fisheries for Mangrove Cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Perú, With Descriptions of Their Habitats and Biology, The Fishermen’s Lives, and the Effects of Shrimp Farming”. *Marine Fisheries Review*. Vol. 63, pp. 1-39.
- Mora, S.E. (1990), *Catálogo de bivalvos marinos del Ecuador*, Instituto Nacional de Pesca, Boletín Científico y Técnico, Guayaquil, Ecuador.
- Pereira, S.M., Arias, A., Méndez, J., Insua, A. and Freire, R. (2009), “Isolation of twelve microsatellite markers in the pullet carpet shell *Venerupis pullastra* (Bivalvia: Veneridae)”. *Conservation Genetics Resources*. Vol. 2, pp. 201-203.
- Petersen, J.L., Ibarra, A.M. and May, B. (2009), “Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids”, *Conservation Genetic Resource*.
- Prahl, H. von, J. Cantera y R. Contreras. (1990), *Manglares y hombres del Pacífico colombiano*, Editorial Presencia, Cali, Colombia.
- Quesada, S.M., Cantera, J.R. and Cárdenas, H. (2014), Evaluación del polimorfismo de microsatélites aislados de novo en *Anadara tuberculosa* (Mollusca: Arcidae). Tesis de grado, Universidad del Valle, Cali.
- Reece, K.S., Ribeiro, W.L., Gaffney, P.M. Carnegie, R.B. and Allen, K. Jr. (2004), “Microsatellite marker development and analysis in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios”. *Heredity*. Vol. 95, pp. 346-352.
- Rico, C., Rico, I. y Hewitt, G. (1996), “470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species”, *Biol. Sci*. Vol. 263, pp. 549-557.
- Rodríguez, F. (1985), Proyecto Maricultura Colombia -Componente Pacífico- Subproyecto Piangua (*Anadara* spp): Taxonomía, crecimiento y mercadeo de la Piangua *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* en el Pacífico Colombiano. Informe final. Universidad del Valle, Cali.
- Saavedra, C. and Bachere, E. (2006), “Review bivalve genomics”. *Aquaculture*. Vol. 256, pp. 1-14.



- Schlötterer, C., Amos, B. and Tautz, D. (1991), "Conservation of polymorphic simple sequences in cetacean species". *Nature*. Vol. 354, pp. 63-65.
- Sekino, M., Kurokawa, T. and Sasaki, K. (2010), "Multiplex PCR panels of novel microsatellites for the ark shell *Scapharca broughtonii* (Pteriomorpha: Arcoida)". *Conservation Genetics Resources*. Vol. 2, pp. 39-42.
- Silva, A.M. and Carrillo, N.N. (2004), "El manglar de Purruja, Golfito, Costa Rica: un modelo para su manejo". *Revista Biología Tropical*, Vol. 52, No. 2, pp. 195-201.
- Squires, M., Estevéz, M., Barona, O. and Mora, O. (1975), "Mangrove cockles, *Anadara* spp. (Mollusca: Bivalvia) of the Pacific coast of Colombia", *The Veliger*, Vol. 18, pp. 57-68.
- Strecker, U. (2006), "Characterization and cross-species amplification of microsatellite *loci* in a Cyprinodon species flock", *Molecular Ecology Notes*, Vol. 6, pp. 843-846.
- Takagi, M., Taniguchi, N., Cook, D. and Doyle, R.W. (1997), "Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species", *Fisheries Science*. Vol. 63, No 2, pp. 199-204.
- Tripp-Valdéz, M., García de León, F.J., Ortega-García, S., Lluch-Cota, D., López-Martínez, J. and Cruz, P. (2010), "Population genetic structure of dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Gulf of California, using microsatellite *loci*." *Fisheries Research*, Vol. 105, pp. 172-177.
- Vissuet, I., Faride, E., García de León, F.J., Galván, F. and McCoy, M. (2008), "Amplificación cruzada de diez *locimicrosatelitales* en el tiburón martillo (*Sphyrnalewini*)", *III Simposium Nacional de Tiburones y Rayas*. Facultad de Ciencias UNAM. México.
- Wilson, K., Thorndyke, M., Nilsen, F., Rogers, A. and Martinez, P. (2005), "Marine systems: moving into the genomics era", *Marine Ecology*, Vol. 26, pp. 3-16.
- Weetman, D., Hauser, L., Shaw, P.W. and Bayes, M. (2005), "Microsatellite markers for the whelk *Buccinum undatum*", *Molecular Ecology Notes*, Vol. 5, pp. 361-362.
- Yue, G.H., Kovacs, B. and Orban, L. (2003), "Microsatellites from *Clariasbatrachus* and their polymorphism in seven additional catfish species", *Molecular Ecology Notes*, Vol. 3, pp. 465-468.
- Zamora, R., Rodríguez, R., García de León, F.J. and Tello, J. (2011), "Diversidad genética de dos poblaciones del caracol *Strombus gigas* (Gastropoda: Strombidae) en Yucatán, México, con microsatélite", *Revista Biología Tropical*, Vol. 59, No. 3, pp. 1127-1134.

Zhan, A.B., Bao, Z.M., Wang, X.L. y Hu, J.J. (2005), "Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags", *Fisheries Science*, 2005, Vol. 71, pp. 1341-1346.