

## NOTA CIENTÍFICA

Presentado: 12/02/2019  
Aceptado: 23/07/2019  
Publicado online: 25/05/2020  
Editor:

### Autores

#### Wendy Acuña\*

w.acunarodriguez@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-3131-1197>

#### Claudia Yalta

clayama29@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-4469-4695>

#### Eudósio Veli

eudósio.veli77@gmail.com, sdb@inia.gob.pe

### Correspondencia

#### \*Corresponding author

Instituto Nacional de Innovación Agraria, Subdirección de Biotecnología, Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Lima 12, Perú.

### Citación

Acuña W., C. Yalta y E. Veli. 2020. Transferibilidad de marcadores microsatélites de *Anas platyrhynchos* al pato criollo peruano *Cairina moschata domestica*. Revista peruana de biología 27(2): 255- 260 (Mayo 2020). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i2.15015>

## Transferibilidad de marcadores microsatélites de *Anas platyrhynchos* al pato criollo peruano *Cairina moschata domestica*

### Cross species transferability of microsatellite markers from *Anas platyrhynchos* to Peruvian Muscovy Duck *Cairina moschata domestica*

#### Resumen

El pato criollo peruano (*Cairina moschata domestica*) es una de las especies de mayor importancia económica en la alimentación humana. Las especies de patos forman grupos genéticos complejos y difíciles de reconocer, por lo que el uso marcadores microsatélites (SSR) identificados en una especie relacionada como *Anas platyrhynchos*, representa una opción atractiva, de menor costo y útil para resolver temas relacionados con la conservación de la diversidad genómica, flujo génico e hibridación entre poblaciones. El objetivo de la investigación fue evaluar la transferibilidad de 24 SSR identificados para *A. platyrhynchos* a las poblaciones peruanas de *C. moschata domestica* y determinar el grado de polimorfismo (PIC) de los marcadores transferibles. Para ello, se obtuvo ADN a partir de plumas alares usando el método cloroformo-alcohol isoamílico. Los SSR se construyeron con una secuencia adicional de 19 pb (cola M13) y se utilizaron fluoróforos 6-FAM, VIC, NED y PET para su etiquetado. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa 2% y separados por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3130XL. Los resultados mostraron 7 SSRs con un valor PIC alto (PIC>0.5) y que el marcador CMO211 se expresaba con un tamaño molecular menor del de la referencia. En conclusión, el presente trabajo demostró que el 75% de los SSR diseñados para *A. platyrhynchos* son transferibles a *C. moschata domestica*; y que sólo 7 fueron altamente informativos. Demostrando así que los SSRs son útiles en la detección de polimorfismos en especies relacionadas y pueden ser usados para mejorar las poblaciones peruanas de patos criollos.

#### Abstract

Peruvian Muscovy duck (*Cairina moschata domestica*) is one of the most economically important species in human nutrition. Duck species form complex genetic groups which are difficult to recognize, thus the use microsatellite markers (SSRs) identified already in *Anas platyrhynchos* (related species), represents a very attractive option for its cheapness and usefulness for solving issues related to conservation of genomic diversity, gene flow and hybridization between population. The main goal of this work was to evaluate the degree of polymorphism (PIC) and the transferability of 24 SSRs identified for *A. platyrhynchos* to *C. moschata domestica*. In this study, DNA collected from wing feathers was extracted using the chloroform-isoamyl alcohol method. SSRs were constructed with an additional 19 bp sequence (M13 tail) and 6-FAM, VIC, NED and PET fluorophores were used for their labeling. The amplified fragments were visualized on 2% agarose gels and separated by capillary electrophoresis in an automatic ABI 3130XL sequencer. Results showed 7 SSR with high PIC value (PIC> 0.5) and the CMO211 marker expressed in a smaller molecular size that the one used as reference. In conclusion, we showed that 75% of the SSR designed for *A. platyrhynchos* were transferable to *C. moschata domestica* as well as we found only 7 SSR highly informative, thus we proved that SSR are highly useful for detecting polymorphisms in related species and improved the Peruvian populations of Muscovy ducks.

#### Palabras clave:

*Cairina moschata domestica*; transferibilidad; PIC; cola M13; electroforesis capilar; SSR.

#### Keywords:

*Cairina moschata domestica*; Marker Transferability; PIC; M13 tail; capillary electrophoresis; SSR.

## Introducción

El pato Pekín (*Anas platyrhynchos*) y el pato criollo (*Cairina moschata domestica*) son consideradas aves domésticas de interés económico (Kear 2005, Avilez & Camiruaga 2011). En particular en el pato Pekín se han realizado la caracterización molecular y el estudio genético de sus poblaciones (Maak et al. 2000, Wang et al. 2004, El-Gendy et al. 2005, He et al. 2008, Hsiao et al. 2008, Fei et al. 2009, Shi-Yi et al. 2009, Su & Chen 2009).

En estudios de genética de poblaciones, la transferibilidad de marcadores moleculares puede resultar una herramienta muy útil para aprovechar la información generada en especies ampliamente estudiadas y aplicarla en parientes cercanos. Esta herramienta puede aplicarse a distintos niveles taxonómicos, desde microorganismos hasta especies vegetales y animales (Weng et al. 2007, Cristancho & Escobar 2008, Feng et al. 2009).

Así mismo, los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología (Avice 1994, Hillis & Wiens 2000). Los diferentes tipos de marcadores empleados en estudios poblacionales o estudios evolutivos se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples. Como, por ejemplo, los marcadores de tipo microsatélite (SSR), que son de tipo co-dominante (Simpson 1997), se repiten muchas veces en un locus particular y están distribuidos de manera relativamente uniforme en muchos loci genómicos diferentes (Tautz & Renz 1984, Wiesenbach & Dib 1992, Weber & Wong 1993, Golstein et al. 1996, Provan et al. 1999, Yan et al. 2008).

La transferibilidad de marcadores se hace posible debido a que las regiones flanqueantes al microsatélite se mantienen homólogas permitiendo la afinidad de cebadores entre especies cruzadas. Adicionalmente, la transferibilidad también proporciona mayor eficiencia de trabajo, reduciendo costos de insumos y tiempo, lo cual significa mayor oportunidad de investigación en especies nuevas.

En este estudio, presentamos los resultados del estudio de la transferibilidad de marcadores SSR del pato doméstico Pekín *A. platyrhynchos* al pato criollo peruano *C. moschata domestica*.

## Material y métodos

Se utilizó muestras de ADN genómico obtenido a partir de plumas de patos criollos *Cairina moschata domestica* originarios de los departamentos de Lambayeque y San Martín, Perú. Se probaron 24 marcadores microsatélites, los cuales fueron escogidos por su exitosa amplificación y en función a su alto Contenido de Información Polimórfica (PIC) en *Anas platyrhynchos* pato pekín (Tabla 1). Los cebadores directos fueron construidos con una extensión de 19 pb, la cual es complementaria a los fluoróforos 6- FAM (azul), VIC (verde), NED (negro) y PET (rojo).

Las reacciones de PCR se estandarizaron con el kit KAPA Taq PCR, Kapa Biosystems; realizando variaciones a nivel de concentración de  $MgCl_2$ , concentración de cebadores y temperatura de hibridación del cebador y de la cola M13.

Finalmente, en un volumen de 10  $\mu$ L, se contuvo 1X buffer de PCR, dNTPs 0.2 mM,  $MgCl_2$  1.5 – 3.0 mM, cebador 0.03 – 0.4  $\mu$ M, 0.1 U de Taq Polimerasa y 2  $\mu$ L de ADN (30 ng/ $\mu$ L).

Los programas de amplificación se realizaron en un termociclador de gradiente y consistieron en una fase de desnaturalización inicial 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de fase de desnaturalización a 95 °C por 45 s, luego una etapa de hibridación del cebador que fue de 50 °C – 65 °C por 1 min; la fase de extensión del ADN a 72 °C por 60 s. La fase de extensión final a 72 °C por 10 min y se detiene a 4 °C por tiempo indefinido (Innis & Gelfand 1990, Kainz 2000). Adicionalmente, algunos cebadores requirieron 10 ciclos adicionales a 53 °C por 45 s para una mejor hibridación de la cola M13 (Schuelke 2000). Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 2% y posteriormente separados en un analizador genético ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster, CA. USA) mediante electroforesis capilar. La primera verificación de los productos amplificados se hizo mediante el revelado de los geles de agarosa 2%, y posteriormente se corroboró estos resultados con la revisión de electroferogramas, utilizando el software GeneMapper® Software v.4.0. Finalmente, la prueba de Contenido de Información Polimórfica (PIC), se realizó con el software Cervus v3.0.7.

## Resultados

De los 24 marcadores SSR evaluados, 18 mostraron una amplificación exitosa evidenciándose tanto en los geles de agarosa como en electroferogramas obtenidos por el ABI 3130XL: APH01, APH07, APH09, APH13, APH15, APH18, APL02, APL11, APT004, APT021, APT025, APT029, AY295, CAUD001, CAUD004, CAUD022, CAUD026 y CMO211. Los 6 marcadores restantes, no mostraron amplificación para *C. moschata domestica* a pesar de haber realizado múltiples pruebas con variaciones en las concentraciones del cebador,  $MgCl_2$ , y la temperatura de hibridación.

La prueba de Contenido de Información Polimórfica (PIC) se realizó con los 18 marcadores exitosamente transferidos a *C. moschata domestica*. Sólo 7 marcadores mostraron ser altamente informativos, 4 mostraron ser medianamente informativos y 7 poco informativos (Tabla 1). De este último grupo de marcadores, 3 de ellos (APL02, APH15 y CAUD004) resultaron ser de tipo monomórfico. Así mismo, se encontró que el marcador CMO211 mostraba un rango de peso molecular diferente a lo publicado para *A. platyrhynchos* (221-283 pb) (Su et al. 2007).

## Discusión

La alta tasa de transferibilidad de los SSR evaluados, refleja el alto grado de conservación entre las especies estudiadas. En general, a mayor distancia filogenética menor es el éxito de transferibilidad de los marcadores (Peakall et al. 1998). Sin embargo, esta conservación de las regiones flanqueantes al SSR, hace posible considerar al pato pekín como una especie modelo para la transferencia y aplicabilidad de tecnologías en las poblaciones de patos criollos.

**Tabla 1.** Evaluación de transferibilidad de 24 SSR en *Cairina moschata domestica*: tamaño del microsatélite, éxito de transferibilidad, temperatura de hibridación y fluoróforo.

LOCUS	Referencia	Tamaño (pb)	Transferibilidad			Temperatura de hibridación (°C)	Fluoróforo
			*Visibilidad de amplificado	PIC	Grado de informatividad		
APH01	Maak et al. 2000, Baratti et al. 2008; Wu et al. 2008.	182-232	si	0.06	bajo	53	NED
APH02	Maak et al. 2003; Baratti et al. 2008.	-	no	-	-	-	-
APH03	Maak et al. 2000; Wu et al. 2008.	-	no	-	-	-	-
APH07	Maak et al. 2000; Baratti et al. 2008; Wu et al. 2008; Khan Ahmadi et al. 2007.	225-295	si	0.614	alto	57	PET
APH09	Maak et al. 2000; Baratti et al. 2008; Wu et al. 2008; Khan Ahmadi et al. 2007	75-150	si	0.397	medio	57	PET
APH11	Maak et al. 2000; Wu et al. 2008; Khan Ahmadi et al. 2007	-	no	-	-	-	-
APH13	Maak et al. 2003; Wu et al. 2008.	173-220	si	0.616	alto	57	VIC
APH15	Maak et al. 2003; Baratti et al. 2008; Wu et al. 2008.	168.2-198	si	0	no informativo	59	6-FAM
APH16	Maak et al. 2003; Baratti et al. 2008; Wu et al. 2008.	-	no	-	-	-	-
APH18	Maak et al. 2003; Wu et al. 2008.	225-300	si	0.006	bajo	57	VIC
APL02	Denk et al. 2004	90-138	si	0	no informativo	59	6-FAM
APL11	Denk et al. 2005	70-127	si	0.011	bajo	53	NED
APT004	Hsiao et al. 2008	292-352	si	0.313	medio	53	NED
APT005	Hsiao et al. 2008	-	no	-	-	-	-
APT21	Hsiao et al. 2008	154-186.5	si	0.624	alto	57	PET
APT25	Hsiao et al. 2008	131-171	si	0.779	alto	57	VIC
APT29	Hsiao et al. 2008	186.5-224.4	si	0.602	alto	57	PET
AY295	Ying Su et al. 2007	245-403	si	0.823	alto	59	6-FAM
CAUD001	Huang et al. 2005	300-360	si	0.28	medio	57	PET
CAUD004	Huang et al. 2005	199-240	si	0	no informativo	59	6-FAM
CAUD022	Huang et al. 2005	128-181	si	0.6	alto	53	NED
CAUD024	Huang et al. 2006	-	no	-	-	-	-
CAUD026	Huang et al. 2006	138.5-168.7	si	0.144	bajo	59	6-FAM
CMO211	Su et al. 2007	90-130	si	0.451	medio	57	VIC

\*Visibilidad de amplificados en geles de agarosa 2% y electroferogramas.

PIC: Contenido de Información Polimórfica

Grado de informatividad: alto&gt;0.5; 0.25&gt;medio&gt;0.5; bajo&lt;0.25

Es importante resaltar que, al tratarse de especies y poblaciones diferentes, el valor PIC mostró valores totalmente divergentes a las reportadas para *A. platyrhynchos* (Su et al. 2007, Cristancho & Escobar 2008, Wu et al. 2008, Baratti et al. 2009); incluso a nivel de peso molecular del microsatélite CMO211, se encontró diferencias a lo reportado anteriormente (Su et al. 2007). El secuenciamiento del SSR ofrecería nuevas directrices para conocer mejor las razones de tal exorbitante cambio entre las dos especies, posiblemente ayudaría a conocer y entender mejor los mecanismos evolutivos y/o de domesticación en estas especies (Aranguren-Méndez et al. 2005). Así mismo, de los SSR evaluados, siete resultaron

ser altamente informativos, por lo que se recomiendan para estudios posteriores de caracterización de las poblaciones de patos criollos.

En resumen, los SSR exitosamente transferibles y estandarizados en eficientes protocolos de PCR que se muestran en nuestro trabajo permitirán estudiar las poblaciones de patos criollos evaluando factores como su diversidad genética, estructura genética poblacional, flujo génico, evolución, tasa de endogamia, entre otros aspectos de importancia para la conservación de la especie, así como para los programas de mejoramiento genético de la misma (Shafer et al. 2012, Orozco-Terwengel 2013, Marín et al. 2014).

Finalmente, recomendamos tomar en consideración los marcadores medianamente informativos ya que, aunque en menor medida, también reflejan la variabilidad genética de población y pueden aportar información valiosa para el análisis. Los marcadores monomórficos, por otro lado, a pesar de ser informativos para las poblaciones de pato pekín, no resultaron útiles para las poblaciones de pato criollo, por lo que no es recomendable su uso.

## Literatura citada

- Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13(11):30-42. <http://hdl.handle.net/1807/7085>
- Avilez JP, Camiruaga MF. 2011. *Manual de Crianza de Patos*. Chile: Editorial UC TEMUCO.
- Avise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2381-9>
- Baratti M, Cordaro M, Dessì-Fulgheri F, et al. 2009. Molecular and ecological characterization of urban populations of the mallard (*Anas platyrhynchos* L.) in Italy. *Italian Journal of Zoology* 76(3): 330-339. <https://doi.org/10.1080/11250000802566624>
- Cristancho M, Escobar C. 2008. Transferability of SSR markers from related Uredinales species to the coffee rust *Hemileia vastatrix*. *Genetics and Molecular Research* 7(4):1186-1192. <https://doi.org/10.4238/vol7-4gmr493>
- El-Gendy E, Helal M, Goher N, et al. 2005. Molecular characterization of genetic biodiversity in ducks, using RAPD-PCR analysis. *Arab Journal of Biotechnology* 8(2): 253-264.
- Fei W, Huang T, Ying M, et al. 2009. Evaluation of genetic diversity and relationship within and between two breeds of duck based on microsatellite markers. *Progress in Natural Science* 19: 1581-1586. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2009.06.008>
- Feng SP, Li WG, Huang HS, et al. 2009. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Molecular breeding* 23:85-97. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9216-0>
- Golstein D, Zhivotovsky L, Nayar K, et al. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1213-1218. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025686>
- He DQ, Du J, Liu YP, et al. 2008. Analysis on partial mitochondrial DNA D-loop sequences of Muscovy duck (*Cairina moschata*). *Acta Agriculturae Shanghai* 24(4): 1-4 (en Chino).
- Hillis DM, Wiens JJ. 2000. *Molecules versus morphology in systematics. Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington
- Hsiao MC, Liu HC, Hsu YC, et al. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in Tsaiya duck. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21(5): 624-627. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70366>
- Innis MA, Gelfand DH. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press
- Kainz P. 2000. The PCR plateau phase- towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1494: 23-27. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00200-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00200-1)
- Kear J. 2005. *Ducks, geese and swans*. Oxford: Oxford University Press.
- Maak S, Neumann K, Vonlengerken G, et al. 2000. First seven microsatellites developed for the Pekín duck. *Animal Genetics* 31: 233.
- Marín JC, Romero K, Vásquez JP, Varas V. 2014. Cross-amplification of nonspecific microsatellites markers: a useful tool to study endangered/vulnerable species of southern Andes deer. *Genetics and Molecular Research* 13(2):3193-200. <https://doi.org/10.4238/2014.April.25.4>
- Orozco-Terwengel P, Andreone F, Louis E, Vences M. 2013. Mitochondrial introgressive hybridization following a demographic expansion in the tomato frogs of Madagascar, genus *Dyscophus*. *Molecular Ecology* 22(24):6074-90. <https://doi.org/10.1111/mec.12558>
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, et al. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1275-1287. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025856>
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, et al. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943-947
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 73-76
- Shafer ABA, Corti P, Coltman DW, et al. 2012. Development of eight microsatellite loci from the endangered huemul (*Hippocamelus bisulcus*) and cross-species amplification in six other ungulate species. *Conservation Genetics Resources* 4(3):571-3. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9594-1>
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18(2): 233-234. <https://doi.org/10.1038/72708>
- Shi-Yi C, Da-Qian H, Yi-Ping L. 2009. Low genetic variability of domestic Muscovy duck (*Cairina moschata*) in china revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Biochemical Genetics* 47: 734-738. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9272-0>
- Su Y, Long R, Chen G, et al. 2007. Genetic analysis of six endangered local duck populations in china based on microsatellite markers. *Journal of Genetics and Genomics* 34(11): 1010-1018. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60114-3](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60114-3)
- Su Y, Chen G. 2009. DNA microsatellite analysis of genetic diversity among chinese indigenous laying-type ducks (*Anas platyrhynchos*). *Czech Journal of Animal Science* 54(3): 128-135. <https://doi.org/10.17221/1675-CJAS>
- Tautz D, Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>

- Wang J, Chu M, Wang A, et al. 2004. Genetic relationships among seven sheep populations using four microsatellite markers. *Hereditas* 26(5): 637-643.
- Weber L, Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.8.1123>
- Weng Y, Azhaguvel P, Michels Jr GJ, Rudd JC. 2007. Cross-species transferability of microsatellite markers from six aphid (Hemiptera: Aphididae) species and their use for evaluating biotypic diversity in two cereal aphids. *Insect Molecular Biology* 16(5), 613-622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00757.x>
- Wiessenbach J, Dib G. 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801. <https://doi.org/10.1038/359794a0>
- Wu Y, Liu X, Hou S, Huang W. 2008. Study on Genetic Diversity of Six Duck Populations with Microsatellite DNA. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21(6):776-83. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70367>
- Yan W, Xiao-Lin L, Shui-Sheng H, et al. 2008. Study on genetic diversity of six duck populations with microsatellite DNA. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 21(6): 776 - 783. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70367>

**Agradecimientos / Acknowledgments:**

Los autores agradecen al Ing. Benjamín Depaz, de la Estación Experimental Agraria (EEA) El Porvenir, y la Ing. Gladys Gastelo, de la EEA Vista Florida, por su valioso apoyo durante la colecta de muestras. También quisiéramos dar un especial agradecimiento a todos los criadores de patos criollos de los departamentos de San Martín y Lambayeque ya que sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible. Finalmente, agradecer a la Dra. Evelyn Farfán por su apoyo en la revisión y corrección del presente artículo.

**Conflicto de intereses / Competing interests:**

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

**Rol de los autores / Authors Roles:**

EV realizó el diseño de la investigación y WA realizó las pruebas de laboratorio. WA, CY y EV realizaron el análisis de electroferogramas y de resultados. WA elaboró el presente artículo. Todos los autores revisaron y aprobaron el manuscrito.

**Fuentes de financiamiento / Funding:**

Instituto Nacional de Innovación Agraria, a través del Proyecto "Uso de Herramientas Moleculares para la Caracterización de Recursos Genéticos Animales".

**Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:**

El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) del Ministerio de Agricultura y Riego, como autoridad nacional competente; manifiesta mediante el MEMORANDO N°129-2019-MINAGRI-INIA-DGIA/SDRIA y el INFORME N°082-2019-MINAGRI-INIA/DGIA-SDRIA-ARAPOV, que la especie de estudio no presenta ninguna restricción técnica-legal en el procedimiento de colecta.

---

**Página en banco**

**Blank page**