



Latin American Journal of Aquatic Research

E-ISSN: 0718-560X

lajar@ucv.cl

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
Chile

Fuentealba, Carmen; Figueroa, Ricardo

Nueva especie de Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora) en la Patagonia chilena: Biomphalaria  
cristiani sp. nov.

Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 40, núm. 4, noviembre, 2012, pp. 929-935

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
Valparaíso, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=175025197023>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

**Research Article**

## **Nueva especie de Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora) en la Patagonia chilena: *Biomphalaria cristiani* sp. nov.**

**Carmen Fuentealba<sup>1</sup> & Ricardo Figueroa<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile

<sup>2</sup>Unidad de Sistemas Acuáticos, Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile  
Universidad de Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile

<sup>3</sup>Centro de Estudios Patagónicos, CIEP, Ignacio Serrano 509, Coyhaique, Chile

**RESUMEN.** En Chile la familia Planorbidae está representada por el género *Biomphalaria* Preston, 1910, compuesta por siete especies distribuidas desde Isluga hasta el río Puelo. De estas especies, solo *B. peregrina*, ampliamente distribuida en el neotrópico, y *Biomphalaria aymara* de Isluga, han sido reconocidas sobre la base de la morfología del sistema reproductor y la rádula, caracteres que fueron utilizados en el presente estudio para diferenciar a *Biomphalaria cristiani* como nueva especie del grupo y primer registro de la familia en la Patagonia chilena, ampliando su actual rango de distribución. Los caracteres que permiten la diagnosis de *B. cristiani* son el saco vaginal vestigial truncado, ausencia del desarrollo de los músculos suspensores del pene, vaina del pene corta en relación al prepucio, oviducto largo en relación al espermioducto y vaso deferente más delgado y largo que la vaina del pene, de tamaño similar al prepucio. La localidad tipo de *Biomphalaria cristiani* sp. nov. es Laguna Cisnes (47°7'10.02"S, 72°27'40.65"W), región de Aysén.

**Palabras clave:** *Biomphalaria cristiani*, nueva especie, Planorbidae, sistema reproductor, distribución, Laguna Cisnes, Chile.

## **First record of Planorbidae (Mollusca: Basommatophora) in Chilean Patagonia: *Biomphalaria cristiani* sp. nov.**

**ABSTRACT.** The family Planorbidae in Chile is represented by the genus *Biomphalaria* Preston, 1910, consisting of seven species distributed from Isluga to Puelo River. Of these species, only *Biomphalaria peregrina* widely distributed in the neotropical and *Biomphalaria aymara* from Isluga are recognized based on the morphology of the reproductive system and radula, characters that were used in the following study to differentiate *Biomphalaria cristiani* as a new species of this group and first record of the family in Chilean Patagonia, extending its current distribution range. The characters for the diagnosis of *B. cristiani* are: truncated vestigial vaginal pouch, lack of development of the penis retractor muscles, penis sheath shorter than the prepuce, oviduct longer than the spermiduct and vas deferens thinner and longer than the penis sheath, similar size to the prepuce. The type locality of *B. cristiani* nov. sp. is Laguna Cisnes (47°7'10.02"S; 72°27'40.65"W), Aysén region.

**Keywords:** *Biomphalaria cristiani*, new species, Planorbidae, reproductive system, distribution, Laguna Cisnes, Chile.

---

Corresponding author: Carmen Fuentealba (cfuentea@udec.cl)

### **INTRODUCCION**

La distribución de moluscos de agua dulce en Chile ha sido considerada discontinua y relacionada a las características orográficas particulares del sistema

hidrográfico nacional (Fuentealba *et al.*, 2010), además de representar un alto grado de endemismo (Valdovinos, 2006). Los primeros estudios biogeográficos efectuados en la Patagonia chilena (Subregión Subantártica) también revelaron un alto grado de

endemismo en la mayoría de las familias de gasterópodos dulceacuícolas y una baja riqueza específica, lo que podría deberse a la limitada cantidad de estudios faunísticos realizados en el área (Fuentealba *et al.*, 2010).

Actualmente, la familia Planorbidae en Chile se encuentra representada por el género *Biomphalaria* Preston, 1910 y se han reconocido, tentativamente, un total de siete especies. De estas, cinco fueron descritas por Biese (1951): *Biomphalaria atacamensis* (Biese, 1951), *B. schmiererianus* (Biese, 1951), *B. costata* (Biese, 1951), *B. montana* (Biese, 1951) y *B. thermalis* (Biese, 1951), mientras Antón (1839) describió a *B. chilensis* y Valdovinos & Stuardo (1991) a *B. aymara*. La mayoría de estas especies fueron sinonimizadas por Paraense (1966) con *B. peregrina* (D'Orbigny, 1835), un taxón ampliamente distribuido en la Región Neotropical.

De las especies señaladas, sólo *B. costata* con localidad tipo Salar San Martín (21°12'S, 68°15'W) y *B. thermalis* con localidad tipo Ojos de Ascotán (21°41'S, 68°12'W), han sido descritas en la región Altoandina sobre los 3.600 m de altura (Biese, 1951) y no fueron sinonimizadas a *B. peregrina*. Por otro lado, respecto a la distribución, *B. atacamensis* fue descrita para el río Copiapo en la Región de Atacama (27°20'S, 70°52'W), mientras *B. schmiererianus* desde el río Choapa (31°38'S, 71°34'W) hasta el río Illapel (31°37'S, 71°09'W) y *B. montana* en el río Hurtado, Región de Coquimbo (30°35'S, 71°11'W). El resto de las poblaciones se distribuyen desde Valparaíso (33°37'S, 71°39'W) hasta la desembocadura del río Manso (41°44'S, 72°06'W) y pertenecerían a la especie *B. chilensis* (Antón, 1839). Respecto a latitudes australes, según Biese (1951) en su revisión de los moluscos, terrestres y de agua dulce de Chile, señaló que las investigaciones y prospecciones destinadas a la búsqueda de estos ejemplares realizadas en Aysén y Magallanes, fueron infructuosas.

La última especie descrita en Chile corresponde a *B. aymara*, colectada en los bofedales de Isluga (19°15'S, 68°40'W), altiplano chileno (Valdovinos & Stuardo, 1991). Sobre este taxón, se realizaron las primeras descripciones en detalle de la anatomía interna, incluyendo la rádula y la concha. Los estudios filogenéticos, son bastante recientes limitándose a algunas especies de la zona norte, sin embargo han permitido aportar valiosa información sobre eventos vicariantes y las relaciones específicas de *Biomphalaria* durante el Pleistoceno (Collado *et al.*, 2011).

Como se ha señalado, la mayoría de las descripciones de planorbídos se ha realizado para la zona norte de Chile, asociadas a ambientes salobres (Biese, 1951; Valdovinos & Stuardo, 1991). En un

listado reciente del rango de distribución del género *Biomphalaria* en el país, las especies fueron registradas desde Isluga (19°15'S, 68°40'W) hasta el río Puelo (41°39'S, 72°17'W), Región de Los Lagos (Valdovinos, 2006). El objetivo de este trabajo, de acuerdo al material malacológico colectado en Aysén, es describir una nueva especie de *Biomphalaria* en Chile, ampliando la distribución de la familia a la Patagonia chilena.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares fueron recolectados en Laguna Cisnes, Región Aysén (47°7'10.02"S, 72°27'40.65"W) (Fig. 1). Se recolectó un total de 40 ejemplares, de los cuales 25 conservaban sus partes blandas en su interior. De éstos, cinco fueron depositados en el Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (MZUC). Los ejemplares restantes fueron tratados previamente con pastillas de mentol, para relajar la musculatura antes de la fijación en alcohol (70%). Posteriormente, se lavaron con detergente y agua tibia, luego se procedió a remover el periostraco con hipoclorito de sodio para observar la microestriación y la protoconcha. La rádula fue removida del saco bucal con una solución de hidróxido de potasio al 10% a temperatura ambiente por 24 h, observando cada media hora los tejidos en solución, para evitar cualquier daño en la dentición radular. Para la medición de las conchas y la disección de los animales se utilizó un estereomicroscopio provisto de un ocular graduado. El estudio de la concha y la rádula se realizó bajo microscopía electrónica de barrido mediante la técnica publicada por Solem (1970, 1972), usada por Valdovinos & Stuardo (1991) para la descripción de *B. aymara*. Previamente las muestras fueron tratadas con ultrasonido leve, utilizando un equipo Bransoordes nic 20, y luego se metalizaron con un sistema S 150 Sputter Coater. Para la observación y obtención de fotografías de la rádula se utilizó un microscopio electrónico de barrido Autoscan U-1 Siemen ETEC, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción.

## RESULTADOS

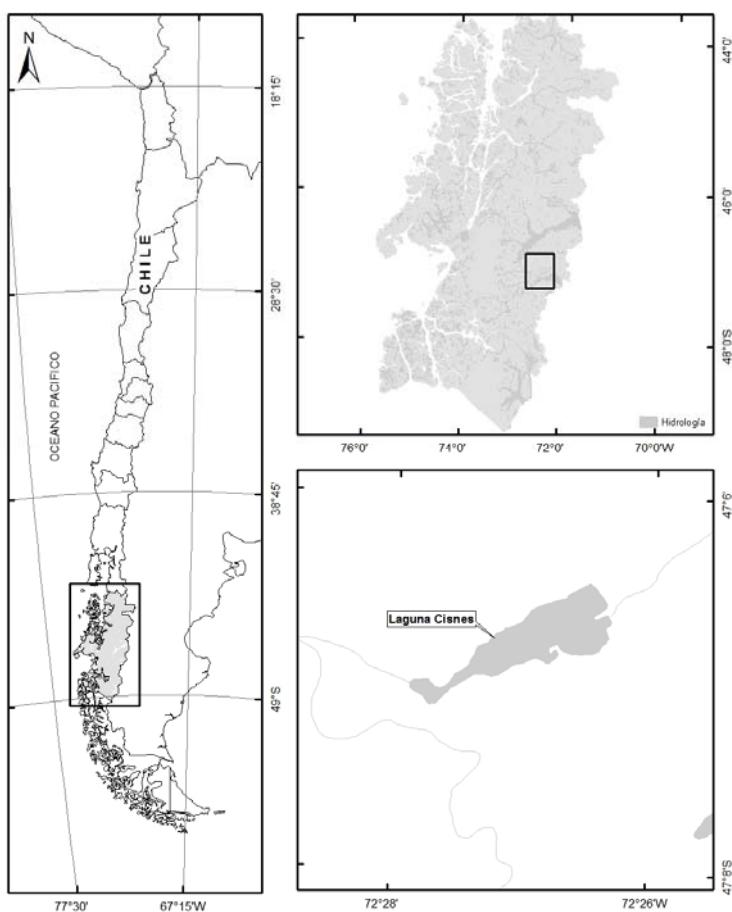
### Sistemática

Familia Planorbidae H. & A. Adams, 1855

Género *Biomphalaria* Preston, 1910

Especie tipo: *Biomphalaria smithii* Preston, 1910.

*Biomphalaria cristiani* nueva especie



**Figura 1.** Sitio de colecta de *B. cristiani* spec. nov.

**Figure 1.** Sampling site of *B. cristiani* spec. nov.

Holotipo: MZUC 035386, ejemplar adulto de *Biomphalaria* colectado por el autor y Dr. Brian Reid en marzo 2008.

Localidad tipo: Laguna Cisnes situada en la región de Aysén (47°7'10.02"S, 72°27'40.65"W).

Paratipos: un total de cinco individuos adultos completos.

Etimología: dedicado a Cristian Franco, quien aportó con sus valiosos comentarios durante el proceso de elaboración de este manuscrito.

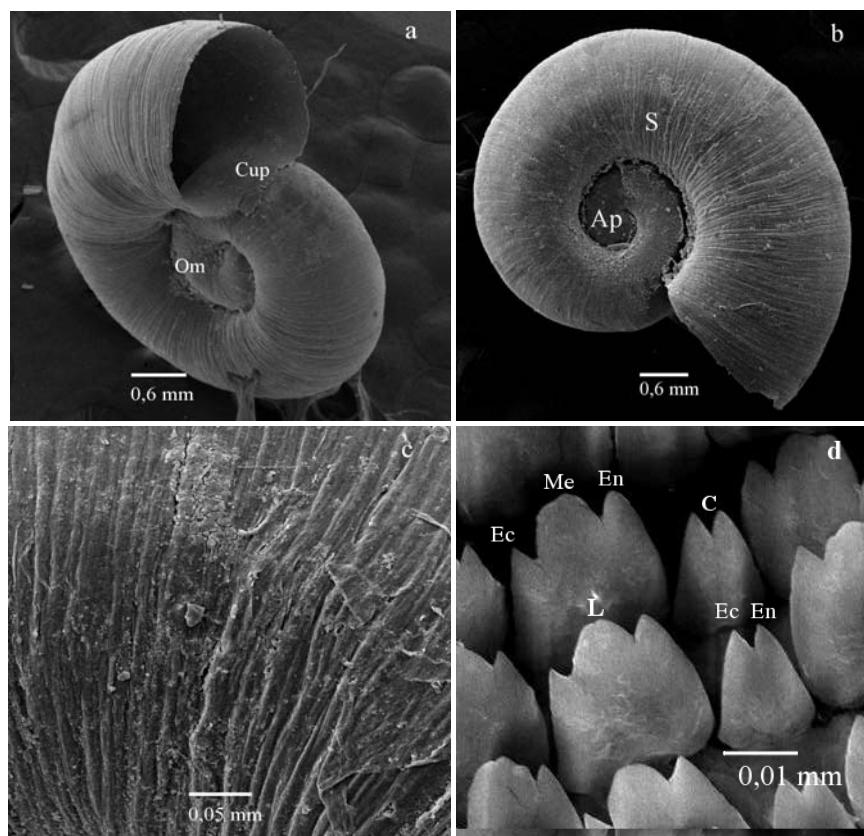
#### Diagnosis

Concha: concha planiespiral, con 2 a 2,5 vueltas, levógiara, color córneo a café claro translúcido. Abertura oval-redondeada casi no desviada del plano de la espira y sutilmente más ancha que alta, bordes de la abertura cortante. Cada vuelta se va ensanchando a partir de la primera vuelta desde el ápice, espira no proyectada, básicamente plana. Último anfracto ensanchado hacia la abertura. La ornamentación de la

superficie se encuentra representada por estrías de crecimiento finas, notorias, irregulares y densas, no se observan líneas longitudinales. Detalle de la sutura profunda (Figs. 2a, 2b y 2c). Las medidas promedio se indican en la Tabla 1.

Rádula: diente raquídeo o central bicúspide más pequeño que los dientes laterales, margen liso; no es posible distinguir mesocono. Ambas cúspides elongadas, puntiagudas y simétricas de base ancha. Dientes laterales tricúspides, mesocono espatulado, margen redondeado, superficie irregular y notablemente más ancho que el ectocono y endocono. El ectocono es 1/3 más largo que el endocono, el ángulo entre éste y el mesocono es menor que el ángulo del endocono y el mesocono, por tal razón se observa levemente dirigido hacia afuera (Fig. 2d). Fórmula radular 21+R+21.

Anatomía interna: ovotestis con numerosos divertículos medianos en doble fila. Canal colector corto, simple, delgado y levemente plegado. Vesícula semi-



**Figura 2.** Detalle de la concha y rádula de *B. cristiani* spec. nov. a) Vista apertural, Om: ombligo, Cup: callo parietal, b) vista apical, AP: ápice, S: detalle de la sutura, c) detalle de la superficie de la conchilla destacando estrías de crecimiento, d) detalles del diente raquideo o central (C) y diente lateral (L), Me: mesocono, En: endocono, Ec: ectocono.

**Figure 2.** Detail of the shell and radula from *B. cristiani* spec. nov. a) Apertural view, Om: umbilicus, Cup: parietal callus, b) apical view, S: detail of the suture, AP: apex, c) detail of the surface shell showing growth striae, d) detail of the rachidian or central (C) and lateral (L), Me: mesocone, En: endocone, Ec: ectocone.

**Tabla 1.** Medidas de la concha (mm) de la serie tipo *Biomphalaria cristiani* sp. nov. AiA: altura máxima de la abertura, AIC: altura máxima de la concha, AnA: ancho máximo de la abertura, Dmax: diámetro máximo de la concha, Dmin: diámetro mínimo de la concha, MZUC: Museo Zoológico de la Universidad de Concepción.

**Table 1.** Shell measurements (mm), from the serie type *Biomphalaria cristiani* sp. nov. AiA: opening maximum height; AIC: shell maximum height, AnA: opening maximum width, Dmax; shell maximum diameter, Dmin: shell minimum diameter, MZUC: Museo de Zoología de la Universidad de Concepción.

Nº MZUC	Dmax	Dmin	AIC	AnA	AiA
Holotipo					
035386	4.45	3.43	2.25	3.90	3.26
Paratipo					
035387	5.67	4.56	3.45	4.02	3.46
035388	6.72	6.02	4.09	3.29	4.28
035389	3.42	3.01	2.49	3.59	3.00
035390	5.66	5.04	3.08	3.80	4.01
Promedio	5.18	4.41	3.07	3.72	3.60
Desviación estándar	1.27	1.21	0.74	0.28	0.53

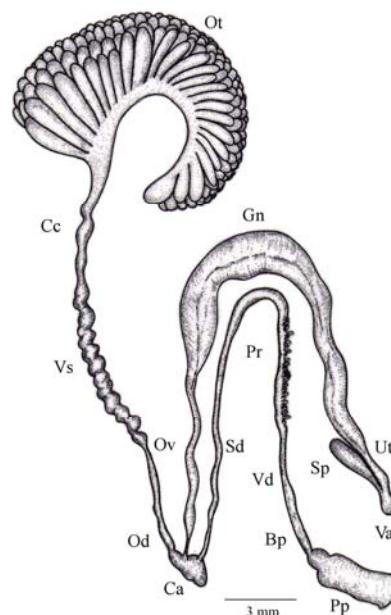
nal de mayor longitud que el canal conductor, no se distinguen divertículos digitiformes sino más bien levemente esbozados casi como pequeñas prominencias, distribuidos regularmente. Glándula nidamentaria muy desarrollada con forma de cinta plegada, vagina con un leve esbozo de una bolsa vaginal casi vestigial. Esta suele ser confundida con una bolsa en otras especies, sin embargo, en esta especie es una proyección de la pared vaginal. Útero delgado, alargado y sin contorneación en sus márgenes. Ducto espermático alargado, liso y delgado. Próstata bien desarrollada con divertículos pequeños, abundantes y delgados, no se distinguen ramificaciones de estos. Pene alargado y ancho en la base. Vaso deferente delgado y largo en comparación a la bolsa del pene cuyo tamaño es similar al prepucio. Músculos suspensores escasamente distinguibles. Espermateca con cuerpo ovoide, redondeada o piriforme más largo que el conducto espermático, apenas distinguible (Fig. 3). Comparación con otras especies: al realizar la comparación morfológica de *B. cristiani* sp. nov., con las dos especies *B. peregrina* y *B. aymara*, sobre las cuales existe información disponible en Chile de la anatomía interna (Tabla 2), es posible establecer diferencias mediante la diagnosis del saco vaginal vestigial, que a diferencia de las dos especies nombradas es truncado, falta de desarrollo de los músculos suspensores del pene, la vaina del pene más corta en relación al prepucio, oviducto largo en relación al espermiducto y vaso deferente delgado y largo en comparación a la vaina del pene, siendo similar en tamaño al prepucio. Respecto a la rádula, dada las características observadas del mesocono, no permiten por si solo diferenciarla de *B. peregrina*, aunque en *B. cristiani* la superficie del mesocono es irregular.

## DISCUSIÓN

La estructura utilizada inicialmente para la caracterización de la mayoría de los géneros y especies de *Biomphalaria*, incluyendo sus relaciones filogenéticas, fue la concha (Hubendick, 1948, 1955). Esto llevó al reconocimiento preliminar de un mayor número de especies en Chile (Paraense, 1966). No obstante, estudios posteriores reconocieron que tales caracteres son fuertemente influenciados por las condiciones locales del ambiente (Rummi, 1991), llevando al uso de la morfología del sistema reproductor y completamente la estructura radular (Valdovinos & Stuardo, 1991), como caracteres confiables. Estos caracteres han permitido, a la fecha, reconocer a lo menos dos especies en la zona norte: *B. aymara* y *B. peregrina*. Según los autores, existen diferencias

reconocibles en las estructuras del sistema reproductor como: la ramificación de los divertículos de la ovotestis y prostáticos, presencia del saco vaginal, superficie de la espermateca y el tamaño del ducto espermático.

Respecto a la especie *B. costata*, estudiada por (Paraense, 1966), no ha sido sinonimizada por presentar diferencias con *B. peregrina*. Sin embargo, su descripción de los órganos reproductores es limitada, y la información disponible para establecer una comparación con *B. cristiani*, es parcial. Algunos de los caracteres disponibles del trabajo de Biese (1951) para *B. costata* son: divertículos de la ovotestis escasos, no ramificados, bifurcados o trifurcados, divertículos prostáticos escasos, no ramificados, presencia de saco vaginal, vaina del pene mas corta que el prepucio, oviducto y espermiducto retorcido. Respecto a la rádula, el autor no hace mención de esta estructura en su publicación. En relación a *B. thermalis*



**Figura 3.** Detalles del sistema reproductivo de *B. cristiani* spec. nov. Ot: ovotestis, Cc: canal colector, Vc: vesícula seminal, Od: ovispermiducto, Ca: carrefour (órgano de divergencia), Ov: oviducto, Sd: espermiducto, Gn: glándula nidamentaria, Pr: próstata, Vd: vaso deferente, Bp: bolsa del pene, Pp: prepucio, Sp: espermateca, Ut: útero, Va: vagina.

**Figure 3.** Detail reproductive system of *B. cristiani* spec. nov. Ot: ovotestis, Cc: collector duct, Vc: seminal vesicle, Od: ovispermioduct, Ca: carrefour, Ov: oviduct, Sd: spermiduct, Gn: nidamental gland, Pr: prostate, Vd: vas deferens, Bp: Bursa penis, Pp: prepuce, Sp: spermatheca, Ut: uterus, Va: vagina.

**Tabla 2.** Comparación del sistema reproductor y la rádula de las tres especies de *Biomphalaria*.**Table 2.** Comparison of reproductive system and radule from three species of *Biomphalaria*.

Carácter diagnóstico	<i>B. peregrina</i>	<i>B. aymara</i>	<i>B. cristiani</i> sp. nov.
Divertículos prostáticos	numerosos	escasos	numerosos
Divertículos de la ovotestis	numerosos y algunos ramificados	numerosos no ramificados	numerosos no ramificados
Ducto espermático	corto	alargado	corto
Superficie de la espermateca	lisa	irregular	lisa
Saco vaginal	presente	ausente	vestigial, truncado
Mesocono dientes laterales	truncado no ondeado	truncado ondeado	truncado no ondeado, convexo
Mesocono diente central	no distingible diente central bicúspide	escasamente desarrollado tricúspide	no distingible diente central bicúspide
Desarrollo de los músculos suspensores del pene	muy desarrollados	muy desarrollados	no desarrollados
Vaina del pene	largo similar al prepucio	largo similar al prepucio	corto en relación al prepucio
Oviducto	corto en relación al espermioducto	corto en relación al espermioducto	largo en relación espermioducto
Vaso deferente	ancho distalmente más angosto que la vaina del pene	más angosto que la vaina del pene	delgado y largo en comparación a la vaina del pene cuyo tamaño es similar al prepucio

no existe información disponible sobre el sistema reproductor, solo se ha considerado como especie distinta a *B. peregrina* por presentar la superficie lisa de la concha y ser más pequeña que *B. costata*. Sin embargo, para su validez taxonómica, se ha recomendado el estudio del sistema reproductor y la rádula (Valdovinos & Stuardo, 1991).

En este sentido, se ha sugerido que los órganos copuladores masculinos en los planoríbidos son considerados los más relevantes en estudios taxonómicos y filogenéticos. En general, el aparato copulador masculino presenta variaciones que determinan tipos morfológicos a nivel específico (Rummi, 1991). Este autor, también afirma que para la discriminación específica de estructuras como la ovotestis, vesícula seminal y otras glándulas anexas, sólo deben utilizarse como caracteres complementarios dado que pueden variar en morfología de acuerdo a su etapa reproductiva. Para la discriminación específica, el autor recomienda considerar el conducto deferente, oviducto, vagina, pene, cuerpo y conducto de la espermateca; destacando que la próstata es aconsejable para discriminar, preferentemente a nivel de género y familia, muy ocasionalmente entre especies. En relación con la morfología radular, recomienda utilizarla para la diferenciación de géneros o grupos de mayor rango taxonómico. Sin

embargo, los caracteres radulares de las especies estudiadas en esta latitud, no parecen ser conservativos para grupos taxonómicos de mayor rango.

En Chile, las estructuras radulares se utilizan de forma complementaria en la descripción y comparación de las especies. *B. peregrina* y *B. aymara*, diferenciadas por el mesocono de los dientes laterales. A pesar que en ambas es básicamente truncado, en la primera, el mesocono es del tipo ondeado, mientras que la segunda presenta un mesocono liso (Valdovinos & Stuardo, 1991). Al comparar las especies *B. aymara* y *B. cristiani*, la primera presenta un mesocono que la diferencia claramente de la segunda. *B. cristiani* tiene mesocono del diente lateral convexo irregular, que la diferencia tanto de *aymara* como de *peregrina*. Las estructuras del sistema reproductor consideradas relevantes y que permiten el reconocimiento de *B. cristiani* como una nueva especie son: saco vaginal vestigial truncado, ausencia del desarrollo de los músculos suspensores del pene, vaina del pene corta en relación al prepucio, oviducto largo en relación al espermioducto y vaso deferente delgado y largo en comparación a la vaina del pene, cuyo tamaño es similar al prepucio.

Siguiendo estas recomendaciones y basados en la comparación morfológica de las dos especies hasta

ahora reconocidas para Chile, se propone a *Biomphalaria cristiani* como nueva especie, sobre la base de las características del aparato reproductor, las cuales permiten diferenciar de manera confiable a esta nueva especie de *B. peregrina* y *B. aymara*.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción, quienes procesaron las muestras para su observación y al Dr. Brian Reid por su ayuda en la recolección del material biológico. Se agradece especialmente a la Dra. Stella Maris Martín de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de la Plata, por sus valiosas sugerencias en la estructura radular y anatomía blanda de los ejemplares. Se reconoce también al Sr. Pedro Arias, por su ayuda en la confección de diagramas. Este estudio fue financiado por el proyecto DIUC N° 210.310.0581-SP de la Universidad de Concepción.

### REFERENCIAS

Antón, H.E. 1839. Verzeichniss der Conchylien, welche sich in der Sammlung von Hermann Eduard Anton befinden, Halle, 110 pp.

Biese, W.A. 1951. Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte VII, Familia Planorbidae. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat., 25: 121-230.

Collado, G., I. Vila. & M. Méndez. 2011. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. Zool. Scripta, 40: 613-622.

Fuentealba, C., R. Figueroa & J.J. Morrone. 2010. Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat., 83: 289-298.

Hubendick, B. 1948. Studies on *Bulinus*. Ark. Zool., 40(16): 1-63.

Hubendick, B. 1955. Phylogeny in the Planorbidae. Trans. Zool. Soc. London, 28(6): 453-542.

Paraense, W.L. 1966. The synonymy and distribution of *Biomphalaria peregrina* in the Neotropical region. Rev. Bras. Biol., 26: 269-296.

Rummi, A. 1991. La familia *Planorbidae* Rafinische, 1815 en la Republica Argentina. Fauna de agua dulce de la Republica Argentina, 15: 5-51.

Solem, A. 1970. Malacological applications of scanning electron microscopy. I. Introduction and shell surface features. Veliger, 12(4): 394-400.

Solem, A. 1972. Malacological applications of scanning electron microscopy. II. Radular structure and functionning. Veliger, 14(4): 327-336.

Valdovinos, C. & J. Stuardo. 1991. Planorbidos altoandinos del norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca Basommatophora). Stud. Neo. Fau. Environ., 26(4): 213-224.

Valdovinos, C. 2006. Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. Gayana, 70: 88-95.

Received: 2 January 2012; Accepted: 10 October 2012