View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

ساختار ژنتیکی ماهی شوورت در سواحل هرمزگان با بکارگیری نشانگر ریزماهواره

احمد شادی[۱] ، حسین ذوالقرنین* [۲]، محمدعلی سالاری علی آبادی[۲] ، محمدباقر نبوی[۲] ، محمدتقی رونق[۲]

۱ . دانشجوی دکترای زیست شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲ .گروه زیست شناسی دریا ،دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

چکیده :

ماهی شوورت وابسته به سوف ماهی شکلان (*Perciforms*) و دارای پراکنش وسیعی در آبهای کرانه ای مناطق اقیانوس هند و آرام غربی است ،که شباهت زیادی از دیدگاه ریخت شناختی میان گونه های مختلف این ماهی ها وجود دارد . در این بررسی ۵ جایگاه ریزماهواره ای در میان دو جمعیت بندر لنگه و میناب در سواحل استان هرمزگان بر روی ۶۸ نمونه مورد پژوهش قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از روش اصلاح شده CTAB انجام شد. تعداد آللهای دیده شده در جایگاههای بررسی شده ۱۷- ۵ آلل بود . مقادیر هتروزیگوسیتی دیده شده (۰/۱۱۵ <Ho<۰/۷۹۲)و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۵۹۸ <He <۰/۹۰۲) براورد شد. فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی بر پایه Nei به ترتیب ۰/۵۲۰ و ۰/۵۹۵ بدست آمد . در بیشتر جایگاه ها انحراف معنی داری($p<۰/۰۰۱$) از تراز هاردی- واینبرگ دیده شد . تمایز ژنتیکی بر پایه نمایه Fst نشان دهنده تمایز با درجه متوسط میان دو منطقه است(۰/۰۶۰) .

کلمات کلیدی : ماهی شوورت ، فاصله ژنتیکی ، تعادل هاردی –واینبرگ ، خلیج فارس

۱. مقدمه :

خانواده شوورت ماهیان (*Sillaginidae* Richardson,1846) وابسته به راسته سوف ماهی شکلان(Perciform) از زیر رده Percoidei (Kaga,2013;Nelson ,2006)است .

شوورت ماهیان در بیشتر کرانه های آبهای دریایی، مصبها و گاهی در آبهای شیرین منطقه اقیانوس هند و آرام غربی زندگی میکنند (McKay, 1992،Nelson, 2006) . از این خانواده گونه های بسیاری اهمیت فراوانی در ماهیگیری کرانه ای و ماهیگیری ورزشی و سرگرمی دارند . روش تورهای ساحلی و قلاب برای گرفتن آنها بکار میرود . شوورت ماهیان اندازه کوچک تا متوسطی دارند و گوشت آنها سفیدرنگ و ترد و خوشمزه است و در مناطق پراکنش این ماهی یکی از ماهیان محبوب محلی بشمار میرود . به دلیل چربی بسیارکم و هضم آسان غذای مناسبی بویژه برای بیماران و کودکان میباشد .

زیست شناسی بسیاری از گونه های شوورت هنوز بخوبی بررسی نشده و به طور کلی پژوهشهای فراوانی روی شورت ماهیان انجام نگرفته است. این خانواده یک نامزد بسیار مناسب برای آبزی پروری در مناطق مصبی و کم عمق بشمار میرود(Mckay , 1992 .).

با اینکه Springer و Orrell (۲۰۰۴) با روشهای تبار شناسی بر پایه اسکلت و ماهیچه کمان آبششی وابستگی نزدیک این خانواده را با Rhyacichthyidae و Percidae نشان دادند ولی جایگاه سازگانی خانواده شوورت ماهیان هنوز قطعی نیست و طبقه بندیهای گوناگونی از پژوهشگران ارائه شده است (Gill 1861,1862; McKay, 1985, 1992; . Fowler ,1933; Nelson, 2006) .

بنا بر بررسیهای(2006) Nelson ، Gao و همکاران (۲۰۱۱) این خانواده در بردارنده سه جنس و حدود ۳۳ گونه است . خانواده شوورت ماهیان با ویژگیهای زیر شناسایی میشوند: بدن کشیده ، دهان کوچک ، دو باله پشتی با فاصله کم و یا چسبیده ، نخستین باله پشتی دارای ۱۳-۱۰ شعاع و دومین باله پشتی با یک شعاع سخت و ۲۷-۱۶ شعاع نرم است . باله مخرجی دارای دو خار کوچک و ۲۶-۱۴ شعاع نرم است . کیسه هوا وجود ندارد و یا تحلیل رفته و یا به شکل پیچیده با چند بیرون زدگی است . تعداد ستون مهره ها ۴۴-۳۲ میباشد (Nelson, 2006) . شناسایی و جداسازی گونه های شوورت ماهیان بسیار مبهم و سخت است. دلیل اصلی آن شباهت بسیار زیاد در شکل و رنگ بندی در بین گونه هاست . بسیاری از گونه ها دارای رنگ مشابه و ریخت شناسی خارجی یکسان هستند(Mc kay,1992). بنا براین کاربرد نشانگرهای ملکولی برای نشان دادن تمایز جمعیتهای این خانواده از اهمیت زیادی برخوردار است.

در دهه های گذشته روشهای ژنتیکی بدلیل کارامدی مناسب در پاسخ دادن به پرسشهای بوم شناختی، بسیار گسترده شده است .از نشانگرهای ملکولی مانند آلوزایم ها، ریزماهواره ها و توالی یابی ژنوم هسته ای و میتوکندریایی می توان برای براورد آماره ها و پارامترهای بوم شناسی سود برد . ریز ماهواره ها یکی از پسندیده ترین گزینه ها در میان این پژوهشها هستند، زیرا میتوانند نشان دهنده اختلاف در اطلاعات زنتیکی بین افراد و جمعیتها و تخمین کلی از مهاجرت باشد . این نشانگرها همبارزند و تنوع بالای آللی را نشان میدهند.

با توجه به اهمیت شناخت تنوع زنتیکی وضرورت حفاظت از گوناگونی زیستی بوم سازگانهای دریایی این پژوهش برای رسیدن به آگاهی از وضعیت ژنتیکی این ماهی در سواحل استان هرمزگان که از مناطق مهم پراکنش آن در کشور می باشد با بکارگیری نشانگرهای ریز ماهواره طرح ریزی و اجرا شد .

۲. مواد و روشها:

در تابستان ۱۳۹۱تعداد ۶۸ قطعه ماهی شوورت از سواحل شرقی و غربی استان هرمزگان (بندر لنگه و بندر میناب) جمع آوری گردید. برای استخراج DNA بخشی از باله دمی جداسازی شد و در ظروف نمونه گیری دارای الکل مطلق در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر نگهداری شد . استخراج DNA با روش بهینه شده CTAB(Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide) انجام گرفت . ۷۰تا ۱۰۰ میلی گرم از نمونه با بکارگیری ۶۳۰ میکرولیتر بافر CTAB ۱٪ و ۷۰ میکرولیتر محلول SDS(سدیم دودسیل سولفات) ۱۰٪ و ۷-۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد هضم شد. خالص سازی DNA با بکارگیری ۲۴۰ میکرولیتر محلول NACL ۵ مولار به همراه ۲ میکرولیتر بتامرکاپتانول و ۲۵۰ میکرولیتر

کلروفرم و ته نشینی آن با ایزوپروپانول سرد انجام شد و پس از شستشوی DNA با اتانول ۷۰٪ نمونه در آب دوبار تقطیر حل شد . چگونگی و چندی DNA بدست آمده با ژل اگاروز ۱٪ و طیف نورسنجی ارزیابی گردید .

به منظور بررسی ژنتیکی از روش ریزماهواره ۱۴ جفت از آغازگرهای طراحی شده برای گونه *Sillago sihama* بکار برده شد (Guo et al . 2012) . از آغازگرهای بررسی شده فقط تکثیر با استفاده از ۷ جفت از آغازگرها موفقیت آمیز بود و از این میان ۵ جفت برای بررسی مناسب تشخیص داده شدند. برای بررسی ۵ لوکوس میکروستلایت (جدول ۱) واکنشهای زنجیره ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۲ میکرولیتر دارای ۵۰ -۳۰ نانوگرم DNA ژنومی ،۰/۵ میکرومولار از هریک از پرایمرها، ۱/۲ میکرولیتر از بافر PCR ×۱۰، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP و یک واحد آنزیم تک پلیمراز انجام گرفت. چرخه های PCR با واسرشته سازی نخستین در ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه ،و در پی آن ۳۰ چرخه حرارتی در بر دارنده ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای پیوستن و ۴۵ ثانیه دمای گسترش ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد و در پایان ۷ دقیقه گسترش پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بکار رفت .

جدول ۱.ویژگیهای آغازگرهای بکار رفته در هر جایگاه

نام آغازگر	توالی آغازگر	یکای تکراری	دمای پیوستن (درجه سانتیگراد)	منبع
Ssi25	F: AAGCCTGCACTTATTGTTC R: CTCCCTCCTTCATCCATT	(ca)9N5(ac)9	۵۳	Guo et al . 2012
Ssi37	F: CATTCAGATTTTCCTCTTGC R: GACACTCTGGAGCCTAGCAG	(tg)9N(gt)8N(tg)5	۵۲	Guo et al . 2012
Ssi62	F: ACTGACCTGCTCAATGACT R: CTTGGCACTGGCACTTCT	(ac)10	۵۳	Guo et al . 2012
Ssi60	F: TACTTCTCATTAGAGCCACG R: TGCGAGCTTGTGATTGTA	(ga)9N12(ac)29N2(ag)6	۵۲	Guo et al . 2012
Ssi23	F: GAGATTCAGTCAGCGGGATT R: TGTCAGGTGGCGGGTTTA	(ca)15N8(ca)7	۵۸	Guo et al . 2012

برونداد واکنشهای زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل پلی اکریلامید ۸٪ در کنار نشانگر DNA (Ladder 50bp) جداسازی و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد . برای سنجش وزن ملکولی قطعات تکثیر شده از نرم افزار Labimage v 3.3.3 و به منظور ارزیابی شاخصهای فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی ،تمایز ژنتیکی و تراز هاردی – واینبرگ (HWE) ، نرم افزار Peakall GenAlex) (and Smouse,2009 و نرم افزار Microchecker 2.2.1 برای آگاهی از وجود آللهای نول (Van Oosterhout *et al*., 2004) بکار رفت .

۳. نتایج:

۵ لوکوس مورد ارزیابی در این بررسی دارای چندریختی بودند . بیشترین فراوانی آللی در بخش میناب (۰/۵۵) در آلل ۳ در جایگاه Ssi37 و در بخش لنگه(۰/۳۷) در آلل ۶ در جایگاه Ssi23 دیده شد . نتایج بدست آمده از بررسی با نرم افزار Microchecker نشان دهنده وجود اللهای نول در همه جایگاهها بود.

فراوانی آللی جایگاه های مورد ارزیابی در جدول ۲ آمده است . بیشترین تعداد آللها در جایگاه Ssi62 (۱۴ آلل) در بخش میناب و کمترین تعداد آللها در جایگاه Ssi37 در بخش میناب(۴آلل) بدست آمد .

جدول ۲. تعداد آللهای واقعی و موثر و آللهای دیده شده در ۵ جایگاه بررسی شده

جایگاه آلل	جمعیت بندر لنگه N=37		جمعیت میناب N=31		میانگین		آلل دیده شده
	آلل واقعی	آلل موثر	آلل واقعی	آلل موثر	آلل واقعی	آلل موثر	
Ssi25	۱۰	۷/۲۰	۸	۴/۵۹	۹	۵/۸۹	۱۳
Ssi37	۴	۳/۴۴	۵	۲/۴۸	۴/۵	۲/۹۶	۵
Ssi62	۱۲	۴/۸۰	۱۴	۱۰/۱۹	۱۳	۷/۴۹	۱۷
Ssi60	۱۰	۵/۸۲	۷	۳/۱۵	۸/۵	۴/۴۸	۱۰
Ssi23	۷	۳/۸۹	۴	۳/۱۳	۵/۵	۳/۵۱	۷

انحراف از تراز هاردی - واینبرگ برای همه جایگاه ها براورد گردید (جدول۳) . برای براورد میزان تمایز در سطح ساختار ژنتیکی عامل Fst در نظر گرفته شد . مقدار Fst بدست آمده میان دو منطقه بررسی شده برابر ۰/۰۶۰ بدست آمد . میزان فاصله ژنتیکی میان دو منطقه ۰/۵۲۰ و شباهت ژنتیکی ۰/۵۹۵ براورد گردید(جدول۴) . آنالیز واریانس ساختار ژنتیکی نمونه های دو منطقه(AMOVA) نشان داد که ۶٪ اختلاف دیده شده میان دوجمعیت وجود دارد ، و بین افراد درون جمعیتها ۹۴٪ اختلاف وجود دارد .

جدول ۳. مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار(H_e) ،نشانگر شانون و بررسی تراز هاردی – واینبرگ

جایگاه آلل	بندر لنگه				میناب			
	H_o	H_e	نمایه شانون	HWE P	H_o	H_e	نمایه شانون	HWE P
Ssi25	۰/۲۶۵	۰/۸۶۱	۲/۰۹۷	۰.۰۰۰***	۰/۱۳۳	۰/۷۸۲	۱/۶۵۵	۰.۰۰۰***
Ssi37	۰/۴۰۰	۰/۷۰۹	۱/۲۹۵	۰.۰۰۱***	۰/۳۲۳	۰/۵۹۸	۱/۱۲۶	۰.۰۰۰***
Ssi62	۰/۷۷۴	۰/۷۹۲	۱/۹۵۸	۰.۸۱۱ns	۰/۶۵۵	۰/۹۰۲	۲/۴۶۵	۰.۰۰۰***
Ssi60	۰/۱۱۵	۰/۸۲۸	۱/۹۵۲	۰.۰۰۰***	۰/۲۴۱	۰/۶۸۳	۱/۳۹۵	۰.۰۰۰***
Ssi23	۰/۴۵۷	۰/۷۴۳	۱/۵۶۵	۰.۰۰۰***	۰/۵۰۰	۰/۶۸۱	۱/۲۲۷	۰.۰۰۲**

*** اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۰/۰۰۱ در صد از تراز هاردی –واینبرگ معنی دار است .

** اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۰/۰۱ در صد از تراز هاردی –واینبرگ معنی دار است .

Ns اختلاف با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد بر پایه تراز هاردی – واینبرگ غیر معنی دار است.

جدول ۴. ماتریس فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی((Nei,1972) - عدد درون پرانتز ( ) شباهت و عدد بیرون از پرانتز فاصله ژنتیکی میباشد).

منطقه	بندرلنگه	میناب
بندر لنگه	۰ (۱)	۰/۵۲۰ (۰/۵۹۵)
میناب	۰/۵۲۰ (۰/۵۹۵)	۰ (۱)

۴. بحث و نتیجه گیری:

با توجه به شباهت ریخت شناختی بسیار زیاد میان گونه های شوورت ماهیان، نتایج بدست آمده از بررسی ژنتیکی میتواند دارای اهمیت زیادی در بررسی جوامع این ماهی برای زیست شناسان و مدیران شیلاتی باشد.

با اینکه کاربرد آغازگرهای ریزماهواره ای در گونه های با خویشاوندی نزدیک معمولا با موفقیت همراه است ، ولی با افزایش فاصله فیلوژنتیکی احتمال موفقیت آمیز بدون تکثیر ریزماهواره ها کاهش می یابد که یکی از علتهای آن جانشینی های بازی در مناطق پهلوی ریزماهواره هاست که موجب نچسبیدن آغازگرها میگردد (Cui *et al*., 2005) . با توجه به اینکه بیشتر آغازگرهای ریزماهواره ای طراحی شده برای گونه *Sillago sihama* در این بررسی با موفقیت تکثیر نشدند ،احتمال اختلاف ژنتیکی زیاد در حد گونه وجود دارد . همچنین وجود اللهای نول در هر ۵ جایگاه بررسی شده نیز میتواند گواهی دیگر بر این گفته باشد . بنابراین نتایج بدست آمده از این بررسی میتواند بعنوان نخستین نشانه از تمایز ژنتیکی ماهی شوورت در منطقه خلیج فارس باشد .

هتروزیگوسیتی یکی از معیارهای سنجش گوناگونی ژنتیکی جمعیتها در میان بوم شناسان و آبزی پروران است (Xu *et al*.,2001) . نتایج بدست آمده از بررسی حاضر بوسیله نرم افزار Microchecker خطای دسته بندی آللها را در هیچ یک از جایگاه ها نشان نداد ولی در همه جایگاهها افزایش هموزایگوسیتی و وجود آللهای تکثیر نشده (نول) را نشان داد .

در این بررسی در همه جایگاه ها مقدار هتروزایگوسیتی مورد انتظار از مقدار هتروزایگوستی دیده شده بیشتر میباشد که میتواند دلایل متفاوت و مختلفی داشته باشد . با وجود اینکه برخی بررسی ها کاهش هتروزیگوسیتی را بیشتر مرتبط با آللهای پوچ دانسته اند گوناگونی ژنتیکی در ماهیان با عوامل چندگانه ای درگیر است . هتروزیگوسیتی در ماهیان میتواند پیرو ویژگیهای زیستی و بازتابی از زیستگاه آنها باشد . معمولا گونه های دریایی دارای سطوح تنوع ژنتیکی بالاتری (میانگین He =۰/۷۹) نسبت به گونه های آب شیرین (میانگین He =۰/۴۶) و گونه های رودکوچ (میانگین He =۰/۶۸) میباشند (DeWoody and Avise,2000) . بنابر این میزان هتروزیگوسیتی براورد شده در بررسی حاضر ۰/۹۰۲> He> ۰/۵۹۸ نامعمول نیست . ولی پایین بودن هتروزیگوسیتی دیده شده ۰/۷۹۲>Ho>۰/۱۱۵ میتواند در اثر عواملی مانند کاهش شدید جمعیت در اثر صید بی رویه یا عوامل زیستی مانند درون آمیزی یا انتخاب طبیعی باشد (Hauser et al., 2002;Zheng et al., 2009) . ولی به طور کلی و جدای از دلایل زیستی ریزماهواره ها بدلیل بروز پدیده آللهای نول مستعد چنین پدیده ای هستند (Dakin and Avise, 2004) . در بررسی Guo و همکاران(۲۰۱۲) روی گونه *S.sihama* آللهای مشابه نشان دهنده هتروزیگوسیتی بالاتری نسبت به بررسی حاضر است .

بیشتر جایگاههای ژنی مورد بررسی تعادل معنی داری از تراز هاردی-واینبرگ داشتند (جدول ۳) وجود آللهای نول میتواند بعنوان یکی از عوامل کاهش هتروزایگوسیتی در ارتباط با انحراف از تراز هاردی- ئاینبرگ در نظر گرفته شود. در بررسی Guo و همکاران (۲۰۱۲) نیز در رابطه با فاصله از تراز هاردی – واینبرگ و کاهش هتروزایگوسیتی کم بودن تعداد نمونه (۲۵) و یا وجود آللهای تکثیر نشده پیشنهاد شده است .

یکی از نمایه های همسنجی میان جمعیتها در ترازهای مختلف ژنتیکی Fst میباشد. میزان این نمایه میان دو منطقه در بررسی حاضر ۰/۰۶۰ بدست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی میانه در بین دو منطقه است .

تشکر و قدردانی:

از همکاری کارکنان محترم مرکز مطالعات و تحقیقات خلیج فارس و کارکنان محترم بخش آزمایشگاه دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر سپاسگزاری میگردد ..

منابع :

Balloux, F. and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimate of population diffrention with microsatellite markers. Mol. Ecol. 11: 155-165.

Cui, J. Z. Shen, X. Y. Yang, G. P. Gong, Q. L. and Gu, Q. Q. 2005. Characterization of microsatellite DNAs in Takifugu rubripes genome and their utilization in the genetic diversity analysis of T. rubripes and T. pseudommus . Aquaculture. 250: 129– 137.

Dakin EE, Avise JC .2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93: 504–509.

Dewoody,J.A. and J.C.Avise. 2000. Microsatellite variation in marine , freshwater and anadromous fishes compared with other animals. J. Fish Biol. 56:461-473

Fowler H. W. 1933. The fishes of the families Banjosidae, Lethrinidae, Sparidae, Girellidae, Kyphosidae, Oplegnathidae, Gerridae, Mullidae, Emmelichthyidae, Sciaenidae, Sillaginidae, Arripidae, and Enoplosidae collected by the United States Bureau of fisheries steamer "Albatross," chiefly in Philippine seas and adjacent waters . U. S. Govt. print. off. Washington . 465 pp

Gill, T. N. 1861 . Notes on some genera of fishes of the western coast of North America. Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 13: 164–168.

Gill, T. N. 1862. Notice of a collection of the fishes of California presented to the Smithsonian Institution by Mr. Samuel Hubbard. Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 14: 274–282

Guo YS, Wang ZD, Yan CZ, Zhang YL, Zheng JN, Xu YM, Du T, Liu CW ;2012. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from Sillago sihama. J. Genet. . 91(1):e32-6]

Houser, L., Adcock, G.J., Smith, P.J., Ramirez,J.H.B., Carvalho, G.R., 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper(Pagrus auratus). Proc. Acad. Nat. Sci. 99:11742-11747

Kaga,T.2013,Phylogenetic systematics of the family Sillaginidae (Percomorpha: order Perciformes),Zootaxa 3642 (1): 001–105

McKay, R.J. Sillaginid fishes of the world. (Family Sillaginidae). An Annotated and Illustrated catalogue of the Sillago, Smelt or Indo-Pacific Whiting Species Known to Date. FAO Fish. Synop. No. 125, Vol. 14. 1992. 87 p.,

Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4th edition. 601 pp

Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6.3: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6: 288-295.

Springer, V. G., and T. M. Orrell. 2004. Appendix: phylogenetic analysis of 147 families of acanthomorph fishes based primarily on dorsal gill-arch muscles and skeleton; pp. 236–260 in V. G. Springer and G.D. Johnson. Study of the dorsal gill-arch musculature of teleostome fishes, with special reference to the Actinopterygii. Biol. Soc. Wash. Bull. 11:1–260.

van Oosterhout, C.; W. Hutchinson, D. Wills & P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes 4(3): 535–538

Xu,Z., Primavera, J.H., de la Pena,L.D., Pettit, P., Belak, J., Alcivar-Warren,A., 2001 Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp(Penaeus monodon) in the Philipines using microsatellites. Aquaculture. 199:13-40

Zheng, X., Ilkeda, M., Kong, L., Lin,X., Li,Q., Taniguchi,N.,2009. Genetic diversity and population structure of golden cuttlefish, Sepia esculenta (Cephalopoda:Sepiidae) indicated by microsatellite DNA variations. Mar. Ecol. 30:448-454