

Cyphotilapia frontosa'da Cinsiyete Bağlı Şekil Farklılıklarının Geometrik Morfometri Yöntemiyle Belirlenmesi

Ayhan ALTUN*, Şehriban ÇEK, Eren ÇEMBERTAŞ

İskenderun Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, 31200, İskenderun, Hatay.

* Sorumlu yazar: Tel: +90 533 540 36 57
E-posta: altun7@yahoo.com

Geliş Tarihi: 10.06.2014
Kabul Tarihi: 04.03.2015

Abstract

Sexual Dimorphism in *Cyphotilapia frontosa* Determined by Geometric Morphometry

Sexual dimorphism in fishes is not always easily observable. There are some exemptions where dimorphism is obvious. Males in some species, especially the ones that the egg development undergoes inside female body, have a specialized structure called gonopodium, which distinguishes the males from the females. The first anal fin-ray has become a probe like organ to channel semen into the female's cloaca during mating. Another example of the clear sexual dimorphism is presence of stripes on the males of *Aphenius*, a cyprinid. These stripes do not exist on the females, at all. Besides these rare occurrences, some sexual morphological differentiation may take place in the adults of some fish during reproduction period. The best example of this situation is the males of trout whose mouth shapes change and elongate to take almost the shape of a beak. Despite such limited examples sexual determination in fish needs a thorough examination of an expert eye and/or an autopsy of the reproductive organs of the specimens which usually means the death of the specimen.

Cyphotilapia frontosa used in this study is a favorable aquarium fish belongs to Tilapia family. A horn-like extension over the head develops in adult males. Investigation of sexual dimorphism in *C. forontosa* was carried out on 27 specimens. They were analyzed using geometric morphometrics methods where landmarks are used to evaluate the shape of the fish which does not necessitate the death of the fish however autopsy was also carried out to ascertain the results. For geometric morphometrics analysis the pictures of fish were taken and they were digitized using landmarks to determine the shape differences statistically. As a result sexual shape variation in *Cyphotilapia frontosa* individuals were determined.

Keywords: *Cyphotilapia frontosa*, sexual dimorphism, geometric morphometry.

Özet

Balıklarda erkek-dişi ayrımını dış görünümünden belirleyebilmek her zaman kolay değildir. Cinsiyet ayrımının belirgin olduğu bazı balık türlerinin erkeklerinde, özellikle de yumurta gelişimi dişi karnında gerçekleşen balıkların erkeklerinde gonopodium adı verilen kolay fark edilebilen morfolojik farklılık bulunmaktadır. Bu tür balıklarda anal yüzgecin ilk ışını dişi karnındaki yumurtaları dölleyecek şekilde dikenleşmiştir. Belirgin eşeysel şekil farklılığına diğer bir örnekte cyprinidlerde dişli sazancık diye bilinen *Aphenius* türünün erkeklerindeki çizgilerin varlığıdır. Bu çizgiler dişilerde asla bulunmamaktadır. Bu nadir örneklerin dışında balıklarda cinsiyet bağlı belirgin şekil farklılıkları üreme dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Üreme döneminde cinsiyete bağlı morfolojik farklılığın en güzel örneklerinden biri de Alabalık erkeklerinde ağız yapısının değişerek uzayıp gaga görünümünü almasıdır. Bu gibi örneklerin dışında balıklarda cinsiyetin belirlenmesi ancak uzman biri tarafından detaylı inceleme sonucunda ya da otopsiyle balıkların üreme organlarına bakılarak belirlenebilir ki bu da çoğu zaman incelenen balığın ölümüyle sonuçlanan bir işlem olmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan *Cyphotilapia frontosa* akvaryum balıkçılığında beğeni kazanmış bir tilapia türüdür ve yetişkin erkeklerde baş daha fazla uzayarak bir çıkıntı oluşturmaktadır. Bu türün 27 bireyi geometrik morfometri yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bunun için balıkların ölmesine gerek kalmadan yapılan fotoğraflamayla elde edilen resimlerden yararlanılmıştır. Bu digital örnekler üzerinde şekil farklılığını istatistiksel olarak ortaya çıkaracak nirengi noktaları belirlenmiş. Nirengi noktalarının analizleri sonucunda *Cyphotilapia frontosa* bireylerinde dişi-erkek şekil farklılıkları ve bu farklılığın konumu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cyphotilapia frontosa*, eşeysel dimorfizm, geometrik morfometri.

Giriş

Balıklarda cinsiyet belirlenmesi her zaman kolay değildir. Birçok balık türünde dişi ve erkek ayırımı nerdeyse olanaksızdır. Ekonomik öneme sahip olan çipura, levrek, lâhos, dil, kalkan mercan balıkları, zebra, çiklit, tetra ve japon gibi akvaryum balıkları ile yağ balıkları, cobitis gibi ekonomik önemi olmayan balık türleri de dâhil olmak üzere pek çok balık türünde morfolojik olarak dişi-erkek ayırımı yapılamamaktadır. Buna rağmen sınırlı da olsa bazı balık türlerinde belirgin cinsiyete bağlı şekil farklılıkları görülmektedir. Örneğin canlı doğuran akvaryum balıklarından, plati, lepiştes, moli, kılıçkuyruk gibi türlerde morfolojik olarak gözlenebilen gonopodiyumlar gelişmiştir. Sularımızda yaygın bulunan kıkırdaklı balıklardan olan kemane vatoz erkekleri morfolojik olarak gözlenebilen klasper adı verilen organı geliştirmiştir. Dişli sazancık (*Aphenius*) erkekleri de dişilerinden şekilsel olarak farklılaşmış ve çizgili bir görünüm almışlardır. Bazen üreme dönemlerinde fenotipik elastiklikten kaynaklanan cinsiyete bağlı farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Bu alabalık erkeklerinde alt çenenin uzaması ve yukarı doğru, gagaya benzer şekilde bükülmesi şeklinde belirgin şekilsel bir farklılık olabildiği gibi dişiyi cezp edecek renk dönüşümleri biçiminde de olabilmektedir. Oysa balık popülasyonları arasında karşılaştırma yapmak (Altun vd., 2007) kadar türlerin ekolojisini, davranışlarını ve yaşam döngülerini anlamak için cinsiyet ayırımı esastır.

Sitotilapyta frontoza (*Cyphotilapia*

frontosa) Cichlidae familyasına ait Tankanyika gölüne endemik bir türdür (Takahashi vd., 2007). Orjini Tanganyika gölüdür (Boulenger, 1906). Ülkemizde ekonomik olarak oldukça büyük öneme sahiptir. Türün taksonomik sınıflandırması Takahashi vd. (2007) tarafından yapılmıştır. Erkek ve dişilerin başlarının üzerinde hörgüç şeklinde yükselti oluşmakla birlikte bu yükselti erkeklerde daha büyük çaplı ve belirgindir (Takahashi vd., 2007). Ayrıca erkekler dişilerden daha iyi büyüme performansı göstermektedir ve dişilere nazaran daha büyük boyludur (Takahashi vd., 2007). İki cinsiyet arasındaki bu farklılıklara rağmen bu özellikler iki cinsiyeti birbirinden ayırt etmek için yeterli değildir. Türün yetiştiriciliğinde erkek dişi stoklama oranı başarı için önemlidir. Bu nedenle çalışma için özellikle seçilmiştir. Ayrıca *C. frontosa* da iki cinsiyet arasında şekilsel farklılıkların bulunması, morfometrik yöntemlerin çalışılması ve geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Yürütülen bu çalışmada *C. frontosa* eşeysel dimorfizme bağlı farklılıkları geometrik morfometrik yöntemlerle çalışmak amacıyla model tür olarak kullanılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada yerel bir akvaryumcudan sağlanan toplam 27 adet *C. frontosa* anacı kullanılarak eşeye bağlı şekil farklılığı ortaya çıkarılmıştır. Popülasyon bireyleri arasındaki gelişime bağlı (ontogenetik) şekil farklılıklarının çalışmayı etkilememesi için araştır-

mada sadece eşeyssel olgunluğa gelmiş 9 erkek ve 18 dişi balık kullanılmıştır. Her bir eşey için örnek sayısının minimum 10 olması önerilmesine rağmen örnek sayısının azlığından dolayı erkek bireylerin sayısı 9 ile sınırlı kalmıştır. Anaçlar bireysel olarak %0,04, 2- phenoxethanol (Sigma Chem. Dorset, UK) ile anestezi maddeye tabii tutulduktan sonra dijital fotoğraf makinesiyle fotoğraflanmıştır. Cinsiyetlerin belirlenmesi öncelikle dıştan morfolojik olarak yapılmış, daha sonra doğrulama amaçlı olarak 5 balıkta gonatların direk incelenmesi de gerçekleştirilmiştir. Cinsiyete bağlı dimorfizmi göstermek amacıyla verilerin oluşturulması için nirengi noktalarından faydalanan geometrik-morfometrik yöntemi kullanılmıştır (Zelditch vd., 2004). Çalışmada kullanılan nirengi noktaları bireyler için eşkökenli olan noktalardır ve evrimde önemli oldukları ileri sürülmüştür (Zelditch vd., 2004; Costa ve Cataudella, 2007). Her bir balık fotoğraflandıktan sonra, balıkların eşeyssel morfolojilerini ayrıntılı bir biçimde ortaya koyabilecek eşkökenli 20 nirengi noktası belirlenmiştir. Bu nirengi noktaları TpsDig ver. 2.10 yazılımı (Rohlf, 2006) kullanılarak sayısallaştırılmıştır. Her bir nirengi noktasının x ve y düzlemlerinde koordinat oluşturan iki noktasal karşılığının olması istatistikî değişkenlerinin sayısını iki katına çıkararak sonuçların güvenilirliğini artıracak niteliktedir. Gruplar-İçi ve gruplar-arası farklılıklar NTSys 2.2 programı kullanılarak Çok Değişkenli Varyans Analizi (MANOVA) ile değerlendirilmiş ve bunun içinde Temel Ögeler Analizi (PCA) de gerçekleştirilmiştir.

Balıkların görüntüleri şekil olan ve olmayan öğeler barındırır (Kassam vd., 2004). Farklı büyüklükteki balıklardan, farklı konumlarda ya döndürülmüş şekilde elde edilen görüntülerden kaynaklanan farklılıklar şekilsel olmayan öğelerdir. Bu öğelerin ortadan

kaldırılması için örtüştürme diye bilinen Genel Procrustes Analizi (GPA) gerçekleştirilerek örnekler şekilsel olmayan farklılıklardan arındırılırlar (Rohlf, 2003). Bu işlem ve Thin-Plate Spline (TPS) diye bilinen örtüştürülme grafikleri Morpheus yazılımı Slice (1998) ile elde edilmiştir. GPA, boyut ve rotasyonel/dönüşümsel farklılıkları ortadan kaldırılarak, bütün şekilsel alanların bütün bireylerde ya da gruplarda hizalanmasında kullanılmaktadır. Bu işlem, öncelikle nokta koordinatlarının genel bir ağırlık merkezine ($X=0, Y=0$) dönüştürülmesi ve sonra her bir balık örneğinin nokta koordinatlarının ağırlık merkezi boyutuna ölçeklenmesi şeklinde gerçekleşmektedir.

Böylelikle şekil olmayan öğelerden arındırılmış bir analiz gerçekleştirilmekte ve örtüştürme sonucu x-y koordinatlarından oluşan bir veri matrisi elde edilmektedir (Bookstein, 1991).

Bulgular

Eşeye bağlı farklılıklarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada 9 erkek ve 18 dişi olmak üzere toplam 27 *C. frontosa* bireyinin dijital fotoğrafları üzerine TPSDig2 (Rohlf, 2006) yazılımı yardımıyla yerleştirilen 20 nirengi noktasının (Şekil 1) analizi, bu türün bireyleri arasında cinsiyete bağlı farklılıkların olduğunu göstermektedir.

Nirengi noktalarının oluşturduğu veri matrisinin Çok Değişkenli Varyans Analizi (MANOVA) ile değerlendirilmesi sonucunda gruplar-İçi Temel Ögeler Analizinin (PCA) bireyler arasındaki şekil farklılığının çoğunu ilk düzlemde belirlediği ve şekil farklılığının % 90'dan fazlasının ilk dört Eigen değeriyle gösterilebildiği ortaya konulmuştur (Tablo 1).

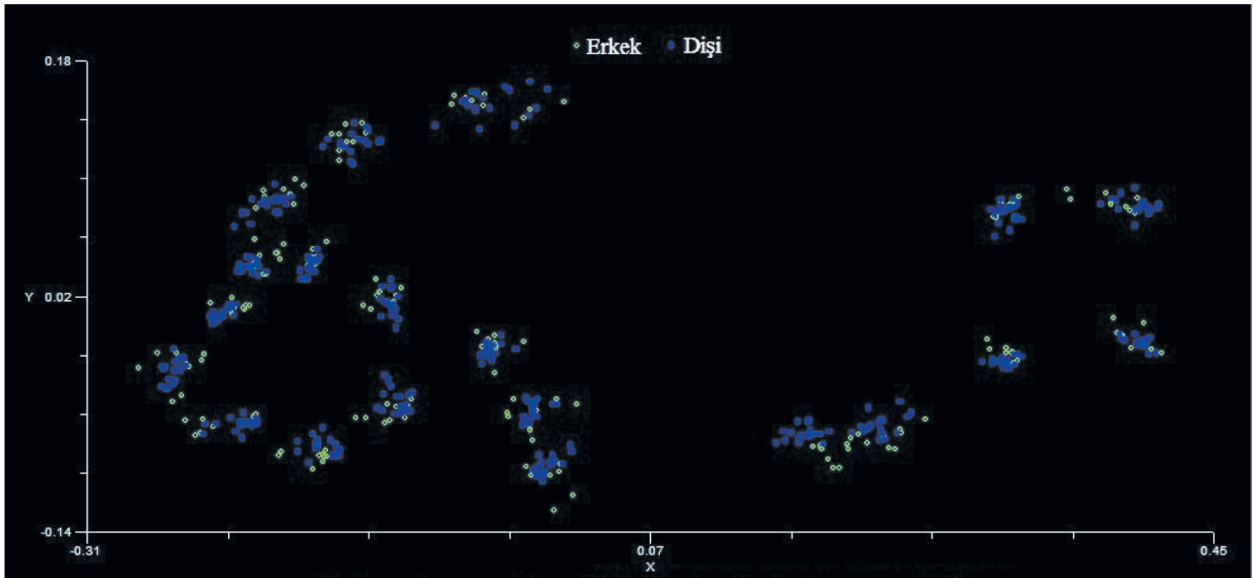
Bireylerin tamamını göz önüne alan bu analiz bireyler arasındaki farklılığı (Şekil 2) belirleyerek bir ortalama şekil oluşturma için kullanılmaktadır.



Şekil 1. *Cyphotilapia frontosa* bireylerinin eşeysel şekil farklılığı için kullanılan nirengi noktaları.

Tablo 1 . Birleştirilmiş Gruplar-içi varyans-covaryans matrisinin PCA'sı

Düzlem (i)	Eigen değeri	%	Toplam
1	2511633.36853312	69.0353	69.0353
2	877824.89786513	24.1281	93.1633
3	209317.78492401	5.7534	98.9167
4	12468.43612968	0.3427	99.2594



Şekil 2. *C. frontosa* bireylerinin nirengi noktalarının genel dağılımı.

Tablo 2. Gruplar-arası varyans-kovaryans matrisinin PCA'sı

D Düzlem (i)	Eigen değeri	%	Toplam
1	7319338856266.99023000	100.0000	> 100%
2	0.07799664	0.0000	> 100%

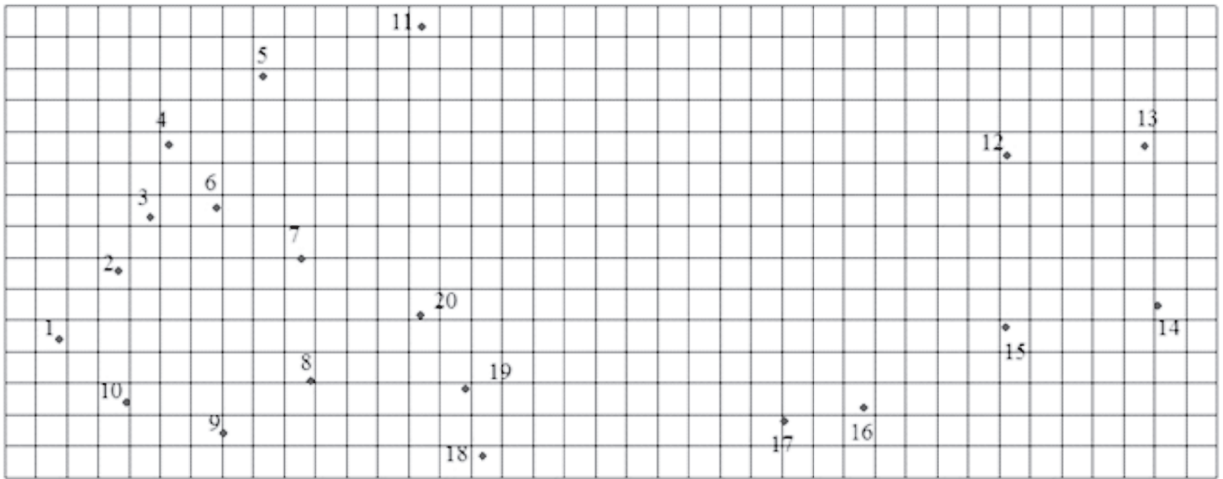
Benzer şekilde gerçekleştirilen Gruplar- arası Temel Ögeler Analizi (PCA) sonuçları dişi ve erkeklerdeki şekil farklılığının % 100'ünün ilk Eigen değeriyle belirlendiğini göstermektedir (Tablo 2). Bu durum eşeyssel olgunluğa erişmiş *C. frontosa* bireylerinin dişi ve erkekleri arasında belirgin şekil farklılığının olduğunu açık bir belirtisidir.

Dişi ve erkekler arasındaki belirgin şekil farklılığını, oluşturulan ortalama şekle (Şekil 3) göre karşılaştırdığımızda, dişi bireylerin sırt yüzgecinin arkasıyla kuyruk yüzgeci arasında kalan kaudal pedinkülünün öne doğru kısaldığı görülmektedir. Yüzgeçler yerlerini korumuş

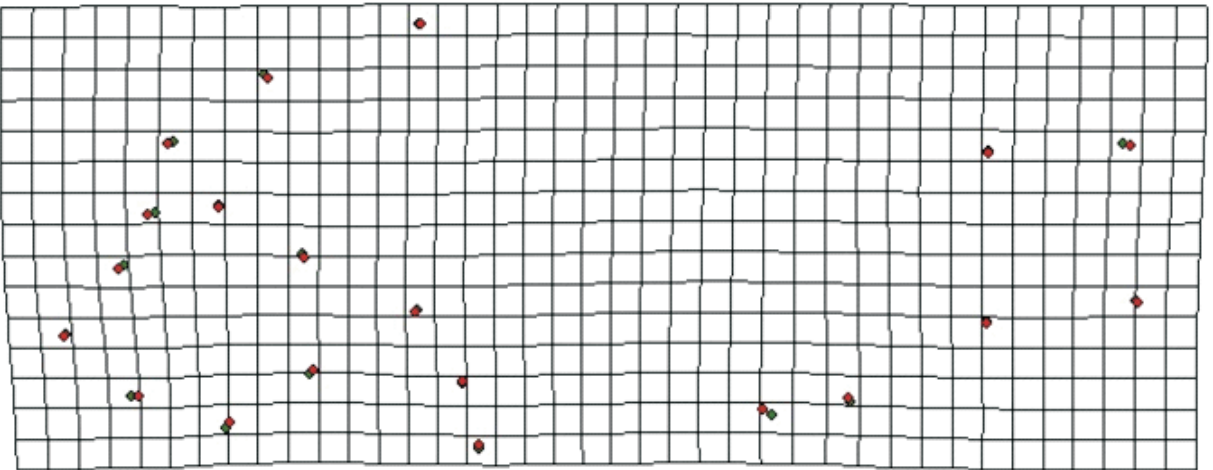
olmalarına karşın 17. nirengi noktasıyla belirtilen anüs bölgesinin ventral yönde genişlediği görülmektedir (Şekil 4). Asıl belirgin farklılık baş bölgesindedir ve burun (2. Nirengi), göz (6. Nirengi) arasında içe doğru değişmiş durumdadır.

Erkek bireylerinin şekil farklılıklarının daha net olduğu Şekil 5.'te görülmektedir.

Buna göre erkeklerde kaudal pedinkül geriye ve aşağıya doğru daha uzunlaşmış olmasına karşın anal yüzgecide içine alan anal bölgenin dorsala doğru giderek karın bölgesinin daha daraldığı görülmektedir.



Şekil 3. Nirengi noktalarıyla ortaya çıkarılmış ortalama *C. frontosa* şekli.



Şekil 4. *C. frontosa* dişilerinin ortalama şekle göre gösterdikleri farklılığın TPS görüntüsü.

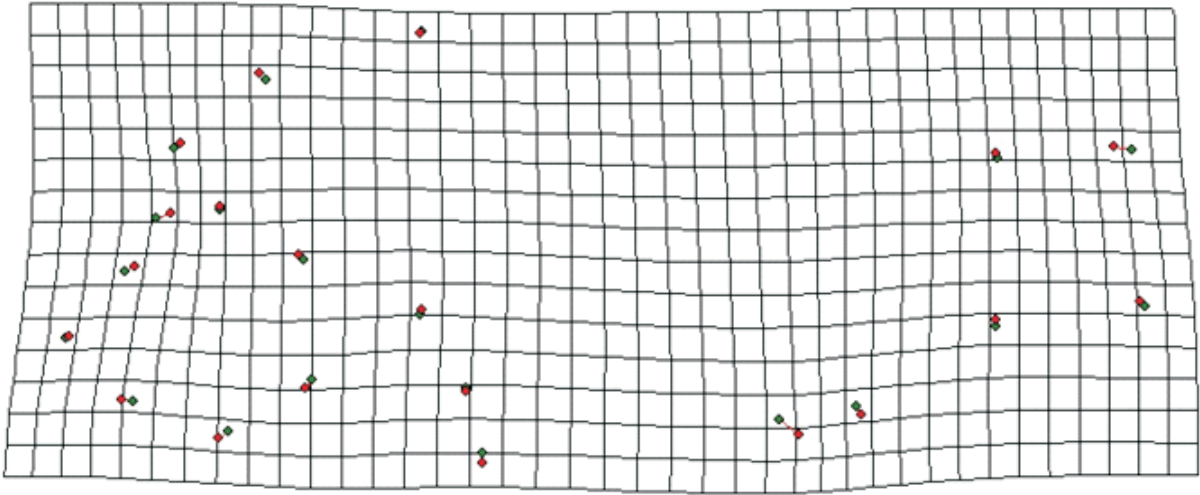
Baş bölgesinde 2, 3 ve 4 numaralı nirengi noktaları öne doğru (anterior olarak), 7, 8 ve 9 numarayla temsil edilen solungaç kapağında arkaya doğru (posterior olarak) yer değiştirerek baş bölgesini dışıye kıyasla daha büyük bir şekle dönüştürmüştür. Nirengi noktalarının 4'üncüsünün antero-ventral ve 5'incisinin postero-ventral farklılaşması erkeklerde hörgüc denilen boynuzumsu bir yapının daha belirgin hale gelmesini sağlamıştır.

Şekil 6, erkeklerdeki baş bölgesi genişlemesini daha açık bir şekilde göstermektedir.

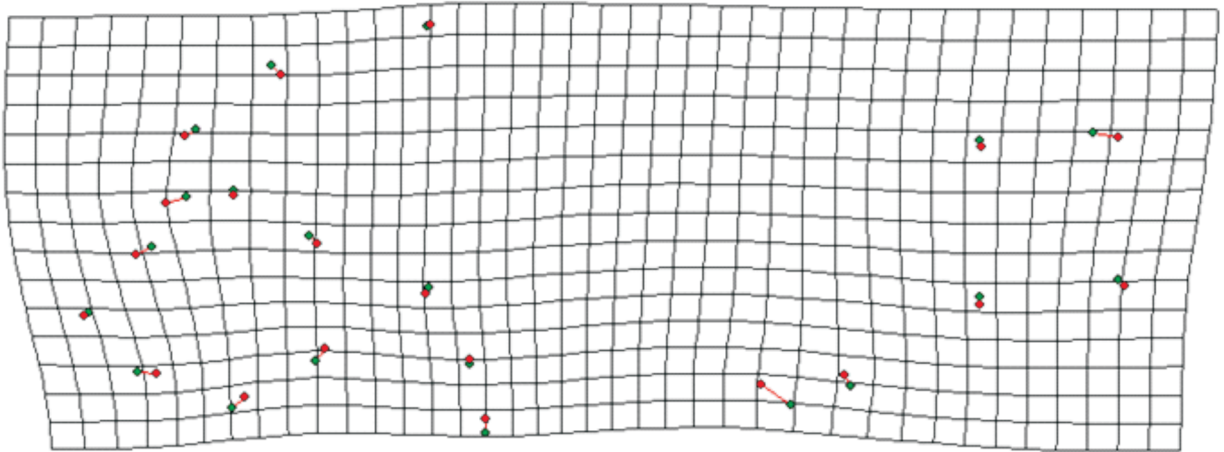
Aynı şekilde erkeklerin vücut geniş-

liğinin karın bölgesinde azalması da oldukça belirgindir. Kuyruk bölgesindeki geriye doğru uzama ise genelde erkeklerin dişilerden daha büyük olduğunun bir göstergesidir.

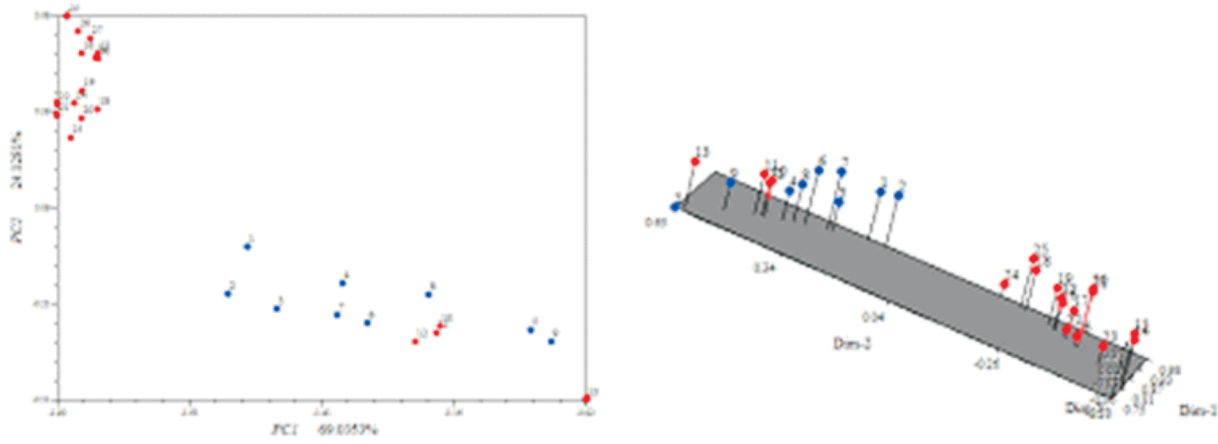
C.frontosa bireyleri arasındaki şekil farklılıklarını, x ve y eksenini boyunca şekil değişimini gözlemleyerek özetlemek mümkündür. Bunu sağlamanın en iyi yolu, X-ekseni ve Y-ekseninde şekilleri gözlemlemektir. Bu bağlamda PC1 (x axis) ve PC2 (y axis) kullanılarak cinsiyetler arası vücut şekli varyasyonları 2 ve 3 boyutlu (Şekil 7) olarak verilmiştir.



Şekil 5. *C. frontosa* dişilerinin ortalama şekle göre gösterdikleri farklılığın TPS görüntüsü.



Şekil 6. *C. frontosa* dişi ve erkeklerinin şekilsel farklılıklarının birbirine göre karşılaştırması.



Şekil 7. PCA sonuçlarına göre *C. frontosa* 'da eşeye bağlı şekil farklılıklarının 2 ve 3 boyutlu gösterimi. Mavi; Erkek, Kırmızı; Dişi.

Ortaya çıkan sonuç, dişilerle erkekler arasında belirgin şekil farklılığının olduğunu göstermekle birlikte dişilerin kendi içindeki şekil farklılığının erkekler içindeki varyasyondan daha düşük olduğunu belirtmektedir. Ayırt edici şekilsel farklılaşma erkeklerde erginlikle belirginleştiğinden dolayı bu durum erkeklerin erginlik düzeyi dolayısıyla yaşları ile bağlantılı olabilir.

Tartışma

Nirengilerden (landmarklardan) yararlanan geometrik morfomeri, şekil farklılıklarından yararlanarak arası ayırımının yapılmasında kullanılan etkin bir sayısal analiz yöntemi haline gelmektedir (Rohlf, 1990; Adams vd., 2002). Sınıflandırmaları şüpheli bazı türlerin bu yöntemle sınıflandırmalarının daha kolay olacağına yönündeki araştırmaların sayıları (Baran vd., 2011) artmaktadır. Park vd. (2013) *Gasterosteus aculeatus* türünün farklı popülasyonları üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda geometrik morfometri yönteminin, balık popülasyonların büyüklük ve şekil değişikliklerini ortaya çıkarmada güçlü bir araç olduğunu belirtmektedir. Vücut şeklinde ortaya çıkan evrimsel değişiklikler kadar cinsiyete bağlı değişiklikleri de belirlemek için bu yöntem

oldukça etkili bir yöntemdir ve farklı balık türlerinde cinsiyete bağlı morfolojik farklılıkların ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır (Kitano vd., 2007; Spoljaric ve Reimchen, 2008; Sherwin vd., 2012; Dorado vd., 2012). *Cyphotilapia frontosa* türünün erkek ve dişileri üzerinde yaptığımız şekil farklılığını ortaya koyan bu çalışma, iki cinsiyet arasındaki şekil farklılığının oldukça açık olduğunu göstermiştir. Bu türün erkeleri dişilerinden daha fazla büyümektedirler. Balıklarda cinsiyetin belirlenmesinin çeşitli avantajlar sağlayabileceği dikkate alınmalıdır. Burada ortaya çıkan sonuç, akvaryum balıkçılığı için dişilerin daha kolay erkeklerden ayırt edilerek daha fazla döl alımında faydalı olabilecek niteliktedir. Benzer çalışmaların ekonomik türler üzerinde yapılması, hangi cinsiyetin daha hızlı geliştiğini belirleme de ve dolayısıyla hızlı gelişen cinsiyetin besiyeye alınarak daha fazla et verimi alınmasını sağlayacak niteliktedir. Özellikle sayısal taksonomide yaygın olarak kullanılan bu yöntemlerin yetiştiriciliğe de uygunluğu açıktır. Tam olarak belirlenemeyen, yetiştiricilikte karşılanılabilecek deformasyon gibi genetik bozuklukların ya da farklı kaynakların sebep olabileceği şekilsel farklılığa neden olan sorunlara maruz kalan bireylerin belirlenmesi,

stokların yenilenmesi gerektiğinin bir göstergesi olabilir ve yetiştiricilerin daha sorunlarla karşılaşmadan önce çözüm oluşturmalarına yardımcı olabilir.

Kaynaklar

- Adams, D. C., Rohlf, F. J., ve Slice, D. E. 2002. Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the Revolution. *Italian Journal of Zoology*. 71: 5-16.
- Altun, A., Kayım, M., ve Kence, A. 2007. Endemik Yağ Balıkları (Pseudophoxinus) Cinsindeki Dört Türün Geometrik Morfometri Yöntemiyle Belirlenen Şekil Farklılıkları. 5.Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-8 Eylül 2007 Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Baran, S., Altun, A., Ayyıldız, N., ve Kence A. 2011. Morphometric analysis of oppiid mites (Acari, Oribatida) collected from Turkey. *Experimental and Applied Acarology*. 54(4): 11.
- Boulenger, G. A. 1906. Fourth contribution to the ichthyology of Lake Tanganyika. Report on the collection of fishes made by Dr. W.A. Cunnington during the third Tanganyika expedition, 1904-1905. *Trans Zoological Society of Lond.* 17:537-619.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge Univ. Press New York. 435pp.
- Costa, C. ve Cataudella, S. 2007. Relationship between Shape and trophic ecology of Selected species of Sparids of the Caprolace coastal Lagoon (Central Tyrrhenian sea). *Environmental Biology of Fishes*. 78: 115-123.
- Dorado, E. L., Torres, M. A. J. ve Demayo, C. G. 2012. Sexual Dimorphism in Body Shape of the spotted barb fish, *Puntius binotatus* of Lake Buluan in Mindanao, Philippines. *AAFL, International Journal of the Bioflux Society*. 5(5): 321-329.
- Kassam, D., Mizoiri, S. ve Yamaoka, K. 2004. Interspecific Variation of Body Shape and Sexual Dimorphism in thee Coexisting Species of the Genus *Petrotilapia* (Teleostei: Cichlidae) from Lake Malawi. *Ichthyological Research*. 51: 195-201.
- Kitano, J., Seiichi, M. ve Peichel, C. L. 2007. Sexual Dimorphism in the External Morphology of the Threespine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Copeia*. 2: 336-349.
- Park, P. J., Aguirre W. E., Spikes, D. A. ve Miyazaki, J. M. 2013. Landmark-Based Geometric Morphometrics: What Fish Shapes Can Tell Us about Fish Evolution Tested Studies for Laboratory Teaching Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education, 34: 361-371
- Rohlf, F. J. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 299-316.
- Rohlf, F. J. 2003. TpsDig Version 1.36 Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, <http://life.bio.sunysb.edu/morp/>.
- Rohlf, F. J. 2006. TpsDig Version 2. 10. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, <http://life.bio.sunysb.edu/morp/>.
- Sherwin, N., Anthony, T. M. ve Demayo, C. G. 2012. Sexual Dimorphism in Body Shape of *Hypseleotris agilis* (Herre, 1927) from Lake Lanao, Philippines. *ISCA Journal of Biological Sciences*. 1(2): 25-31
- Slice, D. E. 1998. Morpho et al.: software for morphometric research. Revision 01-30-98. Stony Brook, New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Spoljaric, M. A. ve Reimchen, T. E. 2008. Habitat-dependent Reduction of Sexual Dimorphism in Geometric Body Shape of Haida Gwaii Threespine Stickleback. *Biological Journal of the Linnean Society*. 95: 505-516.
- Takahashi, T., Ngatunga, B. ve Snoeks, J. 2007. Taxonomic status of the six-band morph of *Cyphotilapia frontosa* (Perciformes: Cichlidae) form Lake Tanganyika, Afrika. *Ichthyological Research*. 54: 55-60.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L. Sheets, H. D. ve Fink, W. L. 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists*. Elsevier. California.