

مطالعه تغییرات شکل بدن و توسعه خصوصیات ریختی ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*) در طی مراحل اولیه تکوین

فاطمه مشیدی^۱، سهیل ایگدری^۱، سید حامد موسوی ثابت^{۲*}

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی تغییرات شکل بدن و توسعه خصوصیات ریختی ماهی زینتی آنجل (*Pterophyllum scalare*) در مراحل اولیه تکوین از زمان تخم‌گشایی تا ۵۱ روز پس از آن با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی به اجرا درآمد. برای این منظور تعداد ۱۰۸ نمونه لارو در طی مراحل اولیه تکوین بعد از تخم‌گشایی نمونه‌برداری شدند. برای استخراج داده‌های شکل بدن، از سمت چپ نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال تصاویر دوبعدی تهیه گردید. سپس تعداد ۹ لندمارک هم‌ساخت تعریف و با استفاده از نرم‌افزار tpsDig2 بر روی نمونه‌ها رقومی شدند. داده‌های لندمارک پس از روی هم‌گذاری براساس آنالیز پروکراست با استفاده از تحلیل *Relative warp* مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز خوشه‌ای برای گروه‌بندی نمونه‌ها از نظر سن و اندازه یا به عبارت دیگر تقسیم‌بندی مراحل لاروی انجام شد. نتایج نشان داد که تغییرات شکل بدن این گونه در طی مراحل اولیه تکوین در دو فاز شامل (۱) افزایش عمق بدن و طول و عمق سر و (۲) افزایش عمق بدن، طول ساقه دم و جابجایی خلفی موقعیت چشم به وقوع می‌پیوندد که جهت رفع نیازهای زیستی شامل تغذیه، تنفس و شنا براساس اولویت‌های حیاتی این گونه در طی مراحل اولیه تکوین می‌باشد. با توجه به آنالیز ریخت‌سنجی هندسی شکل بدن، مراحل اولیه رشد این گونه به پنج مرحله (۱) *Eleuthero-embryo*، (۲) *Propterygio larval*، (۳) *Pterygiolarval*، (۴) *Younger juvenile* و (۵) *Juvenile* تقسیم گردید که مطابق با توسعه ویژگی‌های ریختی ظاهری بود.

کلید واژه: ماهی آنجل، ماهی زینتی، شکل بدن، ریخت‌سنجی هندسی.

- ۱- گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران mousavi_sabet@guilan.ac.ir

۱- مقدمه

ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*)، از ماهیان زینتی زیبا و مردم‌پسند می‌باشد که تکثیر و پرورش آن در صنعت ماهیان زینتی بسیار مورد اهمیت می‌باشد. لارو این گونه همانند سایر ماهیان استخوانی در طی مراحل اولیه تکوین دستخوش تغییرات سریع ریختی می‌شود (Osse and van den Boogaart, 1999; Gisbert, 1999). این تغییرات ریختی در ماهیان استخوانی در یک دوره زمانی کوتاه به‌وقوع می‌پیوندد (Osse et al., 1997) تا توانایی‌های لازم برای انجام فعالیت‌های حیاتی از قبیل متابولیسم، شنا، تنفس و تغذیه را در کوتاه‌مدت به‌دست آورد (Peña and Dumas, 2009). از این‌رو شناخت روند این تغییرات اهمیت بالایی در مدیریت تکثیر و پرورش آنها دارد.

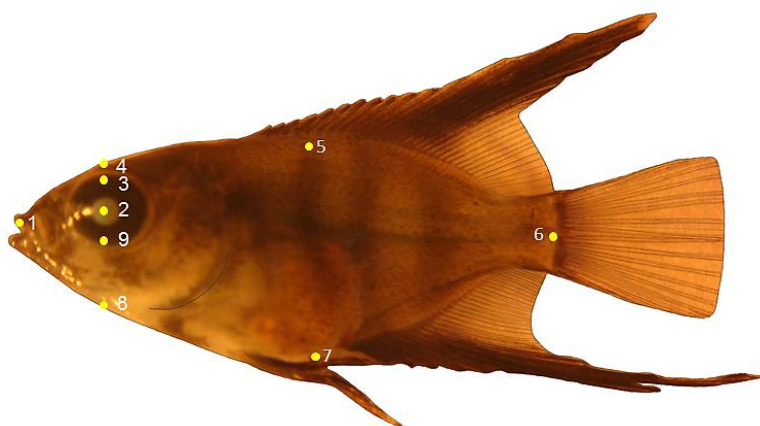
روش ریخت‌سنجی هندسی لندمارک-پایه از جمله روش‌های جدید می‌باشد که کاربرد آن اخیراً در رشته‌های مختلف علوم توسعه یافته است (Bookstein, 1991; Rohlf, 1998; Zedditch et al., 2004). این روش ابزار مناسبی برای بررسی تغییرات ریختی در مراحل اولیه تکوین می‌باشد، چراکه علاوه بر استخراج داده‌های مربوط به شکل بدن به صورت دقیق، تجزیه و تحلیل آنها را با استفاده از آزمون‌های آماری چندمتغیره و مصورسازی تغییرات ریختی را امکان‌پذیر می‌سازد (Zelditch et al., 2004). از این‌رو این تحقیق، با هدف بررسی تغییرات شکل بدن ماهی آنجل در مراحل اولیه تکوین با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی و توسعه خصوصیات ریختی آن به اجرا درآمد.

۲- مواد و روش‌ها

روش نمونه‌برداری: به‌منظور تکثیر ماهی آنجل، دو جفت مولد پرورشی به ۲ آکواریوم ۶۰ لیتری معرفی شدند. تخم‌گذاری مولدین در اوایل شب رخ داد و تخم‌گشایی تخم‌ها پس از سه روز به‌وقوع پیوست. در طول دوره پرورش دما، اکسیژن محلول و pH به ترتیب $26 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ، $7.8 \pm 0.5 \text{ mg l}^{-1}$ و ≥ 6.5 بودند. لاروها از روز اول تا چهارم بعد از تخم‌گشایی با استفاده از ناپلی آرتیمیا و از روز چهارم تا انتهای دوره پرورش دو بار در روز و با ترکیبی از ناپلی آرتیمیا و پلت غذای (بیومار، دانمارک، ۵۸٪ پروتئین و ۱۵٪ چربی) تغذیه شدند. نمونه‌برداری از لاروها در روزهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ بعد از تخم-گشایی (DPH = Day Post Hatching) به‌صورت روزانه و سپس به صورت یک روز در میان تا روز ۵۱ پس از تخم‌گشایی به‌صورت کاملاً تصادفی انجام شد. در مجموع تعداد ۱۰۸ نمونه با میانگین ۴ نمونه

در هر نمونه برداری جمع آوری گردید. لاروها و بچه ماهیان بلافاصله پس از نمونه برداری در عصاره گل میخک بیهوش و از نیمرخ چپ آنها با استفاده از استریومیکروسکوپ مجهز به دوربین دیجیتال (Cannon) با قدرت تفکیک ۵ مگاپیکسل عکسبرداری گردیدند و همچنین مهمترین تغییرات ریختی آنها در طی فرآیند تکوین توسط استریومیکروسکوپ (Leica) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تغییرات شکل بدن: به منظور استخراج داده‌های شکل بدن با استفاده از روش ریخت‌سنجی هندسی لندمارک-پایه، تعداد ۹ لندمارک هم‌ساخت تعریف و سپس با استفاده از نرم‌افزار (Rohlf, 2004) (tpsUtil) از تصاویر دیجیتالی، فایل tps تهیه و توسط نرم‌افزار tpsDig2 (Rohlf, 2005) رقومی شدند (شکل ۱). برای حذف عوامل غیرشکل شامل اندازه، جهت و موقعیت از آنالیز پروکراست استفاده شد و سپس داده‌های حاصل از شکل بدن با استفاده از آنالیز Relative warp به منظور بررسی روند تغییرات شکل بدن مورد تحلیل قرار گرفتند (Rohlf, 1993). در این آنالیز امتیازات RW (RW1 و RW2) به‌عنوان شاخص توصیف کننده تغییرات شکل بدن استفاده شدند (Bookstein, 1996). همچنین برای ترسیم نمودارهای Relative warp از مجموع نمونه‌های هر مرحله‌ی، شکل اجماع (میانگین) آنها با استفاده از نرم‌افزار tpsSmall استخراج گردید. همبستگی بین شاخص‌های توصیف کننده شکل بدن یعنی RW1 و RW2 و طول کل با استفاده از آنالیز رگرسیون با ارزش P حاصل از Permutation test با ۱۰۰۰ تکرار در نرم‌افزار tpsReg مورد تحلیل قرار گرفت. نقطه عطف (Inflexion points) تغییرات شکل بدن براساس روش van Snik و همکاران (۱۹۹۷) تعیین شد. در نهایت، آنالیز خوشه‌ای بر اساس ۹ لندمارک و مجذور فاصله اقلیدسی با استفاده از الگوریتم Ward برای گروه‌بندی نمونه‌ها از نظر سن و شکل بدن انجام شد (Legendre and Legendre, 1998).

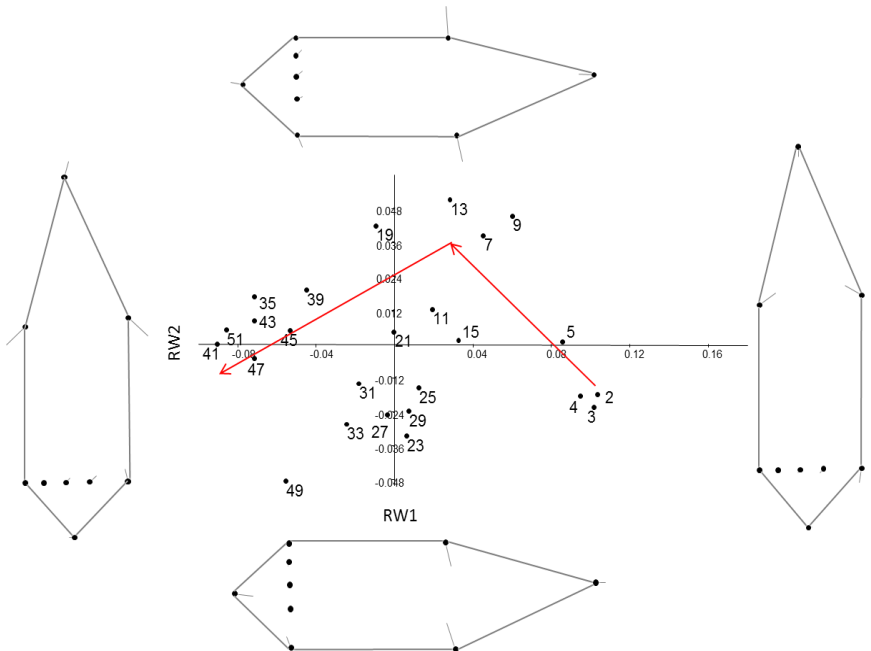


شکل ۱- لندمارک‌های تعریف شده بر روی گونه *P. scalare* بر اساس شکل بدن؛ (۱) ابتدایی‌ترین بخش فک بالا، (۲) مرکز چشم، (۳) لبه بالایی چشم، (۴) نقطه عمود از مرکز چشم بر لبه بالایی سر، (۵) نقطه عمود بر منفذ مخرج، (۶) انتهای قاعده باله دم، (۷) منفذ مخرج، (۸) نقطه عمود از مرکز چشم بر لبه پایینی سر و (۹) لبه پایینی چشم.

۳- نتایج

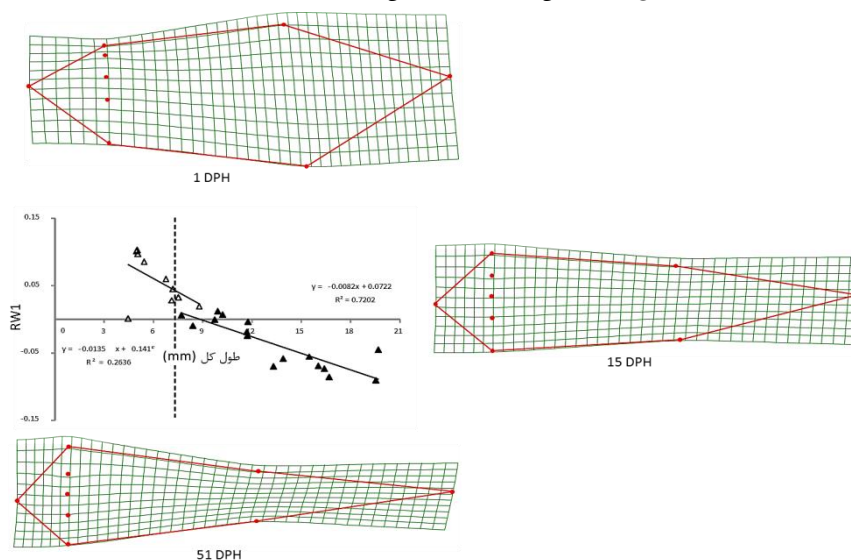
ریخت سنجی هندسی: میانگین طول کل لارو ماهی آنجل از روز اول تا ۵۱ بعد از تخم‌گذاری از $4/45 \pm 0/005$ به $16/6 \pm 2/5$ میلی‌متر افزایش یافت. در آنالیز $Relative\ warp$ چهار RW اول با مجموع $96/22$ درصد واریانس مربوط به تغییرات شکل بدن را شامل می‌شدند ($RW1 = 72/49\%$ ، بیشترین درصد بار عاملی را به خود اختصاص دادند. شکل ۲ نمودار پراکنش نمونه‌های لاروی را بر اساس روند تغییرات شکل در امتداد محورهای $RW1$ و $RW2$ نشان می‌دهد. اعداد بیان شده از کوچک به بزرگ بیانگر روند تغییرات سن نمونه‌ها را نشان می‌دهند. بر اساس نتایج آنالیز $Relative\ warp$ تغییرات شکل بدن در طول محور $RW1$ بر اساس سن نمونه‌ها از $-RW1$ به $+RW1$ شامل (۱) افزایش عمق بدن، (۲) طویل شدن طول و عرض سر و (۳) جابجایی خلفی موقعیت چشم بود. نتایج همچنین نشان داد که از روز اول تا روز ۱۵ پس از تخم‌گذاری پراکنش نمونه‌ها بیشتر در امتداد محور $RW1$ بود. از روز ۱۵ تا ۵۱ روز بعد از تخم‌گذاری روند تغییرات شکل بدن بیشتر در طول محور $RW2$ (از $+RW2$ تا $-RW2$) بود. بر اساس تغییر طول کل نمونه‌ها، تغییرات در طول این محور مربوط به (۱) افزایش عمق

بدن، (۲) جابجایی خلفی موقعیت چشم و (۳) طول شدن ساقه دمی می‌باشد. مدل رگرسیون تغییرات شکل بدن با استفاده از نرم‌افزار tpsReg و آزمون Goodal F با مقدار ۱/۷۱ و $P=0/046$ رابطه مناسبی بین متغیرهای شکل بدن و طول کل در مراحل اولیه رشد را نشان داد. به‌علاوه نتایج نشان داد که رابطه بین شاخص توصیف‌کننده شکل بدن RW1 و طول کل شامل دو مرحله با یک نقطه عطف در روز ۱۵ بعد از تخم‌گذاری بود که مرحله اول قبل از نقطه عطف ($7/5 \text{ mm}$) با همبستگی اندک ($R^2=0/263$) و بعد از نقطه عطف با همبستگی بالا ($R^2=0/772$) بود (شکل ۳). آنالیز خوشه‌ای داده‌های شکل بدن براساس شکل اجماع هر مرحله نمونه‌برداری، مراحل اولیه تکوینی را در پنج گروه دسته‌بندی نمود (شکل ۴). براساس نتایج آنالیز خوشه‌ای و با توجه به روند تغییر شکل بدن و توسعه مهمترین ویژگی‌های ریختی مراحل اولیه تکوین به پنج مرحله؛ (۱) eleuthero-juvenile، (۲) embryo، (۳) pterygiolarval، (۴) younger juvenile و (۵) juvenile قابل تقسیم بود.

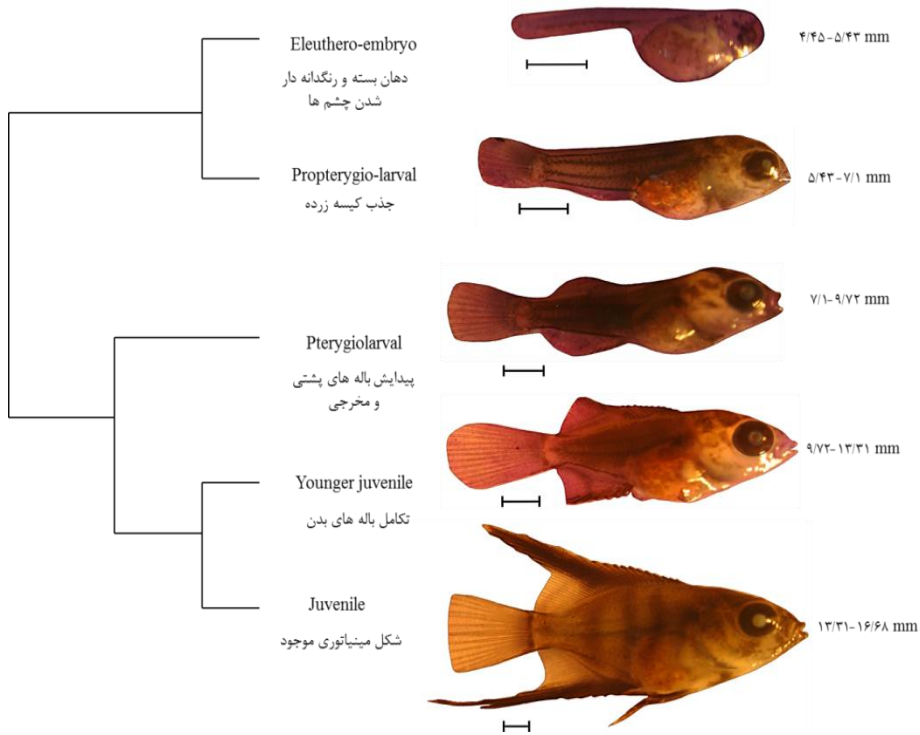


شکل ۲- نمودار پراکندگی داده‌های مربوط به آنالیز Relative warp نمونه‌های *P. scalare* از روز اول بعد از تخم-گذاری تا ۵۱ روز بعد از آن در طول محور RW1 و RW2 (نمونه‌های کم سن تر از شماره ۱ و نمونه‌های با سن بیشتر با اعداد بزرگتر علامت‌گذاری شده‌اند).

تغییرات ریختی: بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی خارجی گونه *P. scalare* در طول دوره Eleuthero-embryo، وجود کیسه زرده در بخش شکمی بدن لاروها می‌باشد. به‌علاوه در این دوره رنگدانه‌دار شدن چشم‌ها به‌عنوان یک ویژگی مهم بین روزهای اول و دوم بعد از تخم‌گشایی بود. در این دوره همچنین چین‌خوردگی‌های باله (Primordial fin-fold) به‌ویژه در محل باله دمی و تنه لاروها قابل مشاهده بود. مهمترین ویژگی‌های مرحله دوم لاروی (Propterygio larval) جذب کیسه‌زرده و باز شدن منافذ دهانی و مخرج بود. ظهور رنگدانه‌های بدن به‌ویژه در بخش‌های شکمی و پشتی سر و تنه از دیگر ویژگی‌های این دوره می‌باشد. همزمان با شروع مرحله سوم لاروی (Pterygio-larval)، پیدایش باله‌ها به‌عنوان بارزترین ویژگی ریختی این دوره بود. جدا شدن باله‌های مخرجی و پشتی از چین خوردگی باله‌ها سریع‌تر از جدا شدن باله‌های سینه‌ای به‌وقوع پیوست. در مرحله Younger juvenile، توسعه و تمایز بیشتر باله‌ها به‌عنوان یکی از بارزترین خصوصیات ریختی این دوره مشاهده شد. در آخرین مرحله لاروی (Juvenile)، ماهیان شبیه به شکل مینیاتوری ماهیان بالغ بودند و اغلب ساختارهای عملکردی و ریختی آنها کامل شده بود (شکل ۴).



شکل ۳- روند رشد و تغییر شکل بدن *P. scalare* از روز اول پس از تخم‌گشایی تا ۵۱ روز بعد از آن براساس داده‌های مربوط به RWI نسبت به طول کل (خط‌چین نشان‌دهنده نقطه عطف است).



شکل ۴- آنالیز خوشه‌ای روند تغییرات شکل بدن براساس ۹ لندمارک تعریف شده در *P. scalare* از روز اول پس از تخم‌گذاری تا ۵۱ روز بعد از آن (مقیاس نشان‌دهنده ۱ میلی‌متر است).

۴- بحث

در زمان تخم‌گذاری اکثر سیستم‌های عملکردی ماهی آنجل شامل تغذیه، تنفس و شنا هنوز بطور کامل تمایز پیدا نکرده بودند. از این رو لارو این ماهی همانند سایر ماهیان استخوانی (Teleost) در مواجهه با عوامل متنوع محیطی نیازمند تغییرات سریع و به موقع در سیستم‌های عملکردی آنها برای تعامل با محیط می‌باشند (Gisbert, 1999).

اساساً این تغییرات در راستای نیازهای زیستی این گونه براساس اولویت‌های زیستی آنها می‌باشد. استخراج چنین اولویت‌هایی می‌تواند به درک و شناخت مراحل مختلف لاروی یک گونه کمک نماید. تغییرات سیستم‌های عملکردی براساس توسعه شکل بدن به وقوع می‌پیوندد و در واقع مراحل اولیه تکوین شکل بدن ارتباط نزدیکی با تغییرات عملکردی و در نتیجه تغییر شرایط محیطی و منابع مورد استفاده دارد (Russo et al., 2007). در روش‌های معمول، طبقه‌بندی مراحل لاروی ماهیان عمدتاً

براساس ویژگی‌های ریختی ظاهری و الگوی رشد ماهیان در طی مراحل اولیه تکوین ماهیان می‌باشد. اما در تحقیق حاضر طبقه‌بندی مراحل لاروی ماهیان با تکیه بر تغییرات شکل بدن مستخرج از روش ریخت‌سنجی هندسی و با استفاده از آنالیز خوشه‌ای به دست آمد. براساس نتایج، تحقیق حاضر به خوبی توانست براساس تغییرات شکل بدن مراحل لاروی این گونه از زمان تخم‌گذاری تا ۵۱ روز بعد از آن را به پنج مرحله شامل؛ (۱) *Eleuthero-embryo*، (۲) *Propterygio larval*، (۳) *Pterygiolarval*، (۴) *Younger juvenile* و (۵) *Juvenile* تقسیم کند که مطابق با توسعه ویژگی‌های ریختی ظاهری بود.

در مرحله اول لاروی (*Eleuthero-embryo*) شکل بدن به صورت کشیده به همراه کیسه زرده متصل به بخش شکمی لاروها بود. کیسه زرده به عنوان منبع غذایی داخلی و تأمین‌کننده انرژی لازم برای دوره لاروی می‌باشد (Koumounddoulos et al., 1999; Russo et al., 2007). به علاوه در این مرحله به علت کامل نشدن ساختارهای مربوط به تغذیه از قبیل باز شدن دهان و مخرج و کامل نبودن ساختارهای عملکردی شنا، وجود این منبع غذایی داخلی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (van Snik et al., 1997). عملکردی شدن چشم‌ها در مراحل اولیه تکوین همگام با توسعه ناحیه سر می‌تواند با توانایی لاروها در یافتن غذا مرتبط باشد (Arnold, 1974).

در مرحله *Propterygio larval*، عمده تغییرات شکل بدن مربوط به طویل شدن طول و عرض سر و همچنین افزایش عمق بدن بود. همزمان با جذب کیسه زرده بسیاری از ساختارهای مربوط به تغذیه از قبیل باز شدن دهان و مخرج به وقوع پیوست. به علاوه توسعه ناحیه سر به عنوان یک ویژگی معمول در تکوین اولیه ماهیان استخوانی (Van Snik et al., 1997) می‌تواند با تکامل مغز، اندام‌های حسی، تغذیه ای و تنفسی مرتبط باشد (Fuiman, 1983; Osse and van der Boogart, 1995; van Snik et al., 1997; Osse et al., 1997; Gisbert, 1999; Loy et al., 1998; Gisbert and Doroshov, 2006). از جمله ویژگی‌های ریختی مهم مرحله *Pterygio-larval*، پیدایش باله‌ها و افزایش طول و عمق دم بود. این توسعه احتمالاً با توانایی شنا در لاروها به منظور فرار از شکارچی ضروری می‌باشد (Osse and Vanden Boogaart, 1995 and 1999).

به علاوه به نظر می‌رسد که عملکردی شدن این بخش در مقایسه با سایر ساختارهای حیاتی مانند تنفس و تغذیه در اولویت‌های بعدی برای موجود می‌باشد (Osse and van den Boogaart, 2004). در مراحل بعدی تکوین، تغییرات شکل بدن ماهی آنجل چشم قرمز عمدتاً بر افزایش عمق بدن متمرکز بود و این تغییر با پیدایش کامل باله‌ها همراه بود. پیدایش باله‌ها به ویژه باله‌های سینه‌ای می‌تواند

نقش مهمی در رفتارهای مربوط به تغذیه و هدف‌گیری طعمه داشته باشد (Osse and van den Boogart, 1995). افزایش عمق بدن در ماهیان می‌تواند مربوط به افزایش قابلیت مانورپذیری موجود باشد (Ontario, 2011) که با توجه به زیست این گونه در آب‌های با سرعت جریان کم و وجود گیاهان دریایی (Lamber, 2001) به نظر می‌رسد که قابلیت مانورپذیری بالا در روند شکل‌گیری یک موجود بالغ و تغییر جایگاه زندگی و تغذیه از منابع مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است. در نهایت نتایج این تحقیق نشان داد که شکل بدن گونه *P. scalare* همگام با اولویت‌های زیستی موجود و اهمیت رشد بخش‌های مختلف در هر مرحله تکوین توسعه می‌یابد. از این‌رو شناخت این تغییرات مهم که با نیازهای موجود در ارتباط است ما را در درک بهتر نیازهای موجود و پرورش لارو این گونه کمک می‌کند.

فهرست منابع

1. **Arnold, G.P., (1974).** Rheotropism in fishes. *Biological Reviews*, 49: 515-576.
2. **Bookstein, F.L., (1991).** Morphometric tools for landmark data. *Geometry and biology*. Cambridge, Cambridge University Press.
3. **Bookstein, F.L. (1996).** Combining the tools of geometric morphometry. In: Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. (Eds). *Advances in Morphometry*. pp. 131–152. New York: Plenum Press.
4. **Fuiman, L.A., (1983).** Growth gradients in fish larvae. *Journal of Fish Biology*, 23: 117-123.
5. **Gisbert, E., (1999).** Early development and allometric growth patterns in Siberian sturgeon and their ecological significance. *Journal of Fish Biology*, 54: 852-862
6. **Gisbert, E., Doroshov S.I. (2006).** Allometric growth in green sturgeon larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 202-207.
7. **Koumoudouros, G., Anezaki, L., kentouri, M., (1999).** Ontogeny and allometric plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology*, 139: 817-830.
8. **Lambert, D., 2001.** A practical guide to breeding your fresh water fish. In: Barron's, Canada, pp. 80-82.
9. **Legendre, P., Legendre L. 1(998).** *Numerical Ecology*, 2nd edn. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
10. **Loy A., Mariani, L., Bertelletti M., Tunesi L. (1998).** Visualizing allometry: geometric morphometrics in the study of shape changes in the early stages of the two-banded sea bream, *Diplodus vulgaris* (Perciformes, Sparidae). *Journal of Morphology*, 237: 137-146.
11. **Ontario B. (2011).** Fish morphology. Retrieved from <http://www.eoearth.org>.
12. **Osse J.W.M., Van den Boogart J.G.M. (1995).** Fish larvae, development

- allometric growth, and the aquatic environment. Paper presented at the ICES Marine Science Symposium, 201: 21-34.
13. **Osse ,J., Van Den Boogaart, J., Van Snik, G., Van Der Sluys L. (1997).** Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture*, 155: 249-258.
 14. **Osse J.W.M., Van den Boogaart, J.G.M., (1999).** Dynamic morphology of fish larvae, structural implications of friction forces in swimming, feeding and ventilation. *Journal of Fish Biology*, 55(Suppl A): 156-174.
 15. **Osse J.W.M., Van den Boogaart J.G.M., (2004).** Allometric growth in fish larvae: timing and function. Fisheries Society, symposium 40, Bethesda, MD 167-194.
 16. **Peña R., Dumas, S. (2009).** Development and allometric growth patterns during early larval stages of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). *Scientia Marina*, 73: 183-189.
 17. **Rohlf, F. J. (1993).** Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: Marcus L.F., Bello E., Garcia-Valedcasas A. (Eds.). *Contributions to Morphometrics*. Museo Nacional de Ciencias Naturales.
 18. **Rohlf, F.J. (1998).** On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Systematic Biology*, 47 (1): 147-158.
 19. **Rohlf, F.J. (2004).** tpsUtil, file utility program. Version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
 20. **Rohlf, F.J. 2005.** tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
 21. **Russo, T., Costa, C., Cataudella, S. (2007).** Correspondence between shape and feeding habit changes throughout ontogeny of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. *Journal of Fish Biology*, 71: 629-656.
 22. **Van Snik, G.M.J., Van den Boogaart J.G.M., Osse J.W.M. (1997).** Larval growth patterns in *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus* with attention to finfold. *Journal Fish Biology*, 50: 1339-1352.
 23. **Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., Fink, W.L. (2004).** *Geometric Morphometrics for biologists: A primer*. Elsevier (USA).