



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	北海道噴火湾における有害赤潮形成ラフィド藻Heterosigma akashiwoの季節変動
Author(s)	夏池, 真史; 金森, 誠; 馬場, 勝寿 他
Citation	日本プランクトン学会報, 62(1), 1-7
Issue Date	2015-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60652
Type	journal article
File Information	natsuike-2015.pdf



北海道噴火湾における有害赤潮形成ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の 季節変動

夏池真史^{1), 2)*}・金森 誠^{1), 3)}・馬場勝寿^{3), 4)}・山口 篤¹⁾・今井一郎¹⁾

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学院, 〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1

²⁾ 現在: 舞根森里海研究所, 〒988-0582 宮城県気仙沼市唐桑町東舞根212

³⁾ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構函館水産試験場, 〒040-0051 北海道函館市弁天町20-5

⁴⁾ 現在: 北海道立総合研究機構水産研究本部, 〒046-8555 北海道余市郡余市町浜中町238

Seasonal distribution of *Heterosigma akashiwo* in Funka Bay, Hokkaido, Japan

MASAFUMI NATSUIKE^{1), 2)*}, MAKOTO KANAMORI^{1), 3)}, KATSUHISA BABA^{3), 4)}, ATSUSHI YAMAGUCHI¹⁾ AND
ICHIRO IMAI¹⁾

¹⁾ Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido, 041-8611 Japan

²⁾ Present address: Moune Institute for Forest-Sato-Sea Studies, 212 Higashi-Moune, Karakuwa-cho, Kesenuma, Miyagi, 988-0582 Japan

³⁾ Hokkaido Research Organization, Hakodate Fisheries Research Institute, 20-5 Benten-cho, Hakodate, Hokkaido, 040-0051 Japan

⁴⁾ Present address: Hokkaido Research Organization, Fisheries Research Institute, 238 Hamanaka-cho, Yoichi, Hokkaido, 046-8555 Japan

* Corresponding author: E-mail: natsuike.masafumi@yahoo.co.jp

Abstract The raphidophyte *Heterosigma akashiwo* is well known to be a fish-killing red tide species, and the distribution of this species in Japan has reported from Otaru (43.2°N), Hokkaido to Okinawa (26.1°N). Occurrences of the red tide of *H. akashiwo* have been mainly reported in the Pacific coastal areas from Honshu to Kyushu, such as Sanriku coast, Tokyo Bay, Seto Inland Sea and Shikoku. However, there is a paucity of information on dynamics of this species in northern Japan. This is the first report to reveal the seasonal distribution of *H. akashiwo* in Funka Bay, Hokkaido, northern Japan. Monthly surveys were conducted at two fixed stations in the inner part of the bay during the period from April 2011 to July 2013, and the cell density of *H. akashiwo* and environmental factors (water temperature, salinity, Chl. *a*, DIN, PO₄-P, and SiO₂-Si) were measured. *H. akashiwo* was detected every summer with the maximum cell density reaching 1.9×10^4 cells L⁻¹ from 0 m depth in August 2012. At the same time, *H. akashiwo* also accounted for 74.4% of the total cell density of phytoplankton. On the other hand, *H. akashiwo* was not detected from every autumn to next spring. *H. akashiwo* cell density and water temperature showed a significantly positive correlation ($r = 0.53$), while salinity or DIN showed significantly negative correlation ($r = -0.33$, -0.25 , respectively). It is concluded that *H. akashiwo* commonly appears in summer with a rise of water temperature and overwinters in cyst form. Furthermore, it is suggested that this species sometimes occupies a potential important primary producer in the bay during summer when the primary produce changes relatively at a low level.

Key words: *Heterosigma akashiwo*, Funka Bay, red tide species, seasonal distribution, water temperature

はじめに

Heterosigma akashiwo (Hada) Hada はラフィド藻綱 (Class Raphidophyceae) の1種であり, 2本の亜等長の鞭毛を持

つ細胞長8–25 μm, 幅6–15 μm程度, 楕円形でやや扁平な植物プランクトンである。本種は赤潮を形成して養殖魚類の斃死を引き起こす有害赤潮形成種である。本種赤潮による漁業被害として, 日本では養殖ブリ類 (ハマチ, カンパチ, ヒラマサ), マダイ, シマアジ (本城 1997,

折田 ほか1999, 今井 2013), 外国では亜寒帯に位置するカナダ (Taylor 1990) や温帯に位置するニュージーランドなどで (Chang et al. 1990) で養殖サケ類の斃死が報告されている。

本種はわが国において北海道小樽から沖縄県糸満までの亜寒帯から亜熱帯で出現が確認されており (原 1990), 三陸沿岸から東京湾, 伊勢湾, 瀬戸内海や四国および九州沿岸などの本州以南の太平洋側の沿岸域を中心に赤潮の形成が報告されている (本城 1997, 西谷ほか 2013). 本種の北海道における出現は, 小樽, 函館湾および噴火湾において報告されている程度であり (原 1990, 本城 1997, 夏池ほか 2012), 本種の北海道における生態はほとんど明らかにされていない. そこで, 本研究では亜寒帯に位置する北海道南部の噴火湾内の2定点において2年4ヶ月にわたる定期調査を行い, 北日本では初めて本種の周年に亘る出現状況および本種出現と環境条件との関係を調べたので報告する。

材料および方法

北海道八雲町にある八雲漁港より約2マイル沖の定点 (St. A, 水深17 m; Fig. 1) および3マイル沖の定点 (St. B, 水深32 m; Fig. 1) において, 2011年4月から2013年7月まで月1回の頻度で, 日中 (午前11時から午後3時の間) に観測を行った. St. Aでは水深0, 10 m層, St. Bでは水深0, 10, 20, 30 m層より, 植物プランクトン計数用および栄養塩類とChl. *a*測定用の海水試料をVan-Dorn採水器を用いてそれぞれ1 Lずつ採取した. これらの試料をそれぞれ別のポリビンに入れ, 暗所に冷蔵で実験室に持ち帰った. 採水と同時にCTD (RINKO-Profler ASTD102, JFEアドバンテック株式会社) による水温と塩分の観測を行った.

持ち帰った植物プランクトン計数用の海水試料1 mLを無固定の状態で罫線付スライドガラスに滴下して倒立顕微鏡を用いて検鏡し, 採水日中に*H. akashiwo*およびその他の固定によって細胞が変形するディクティオカ藻綱の*Vicicitus globosus* (Hara & Chihara) Changや無殻渦鞭毛藻などの同定と計数を行った. 検鏡は1試料ごとに3回行い, その平均値を計数結果とした. また, 残りの海水試料1 Lを最終濃度0.37%のホルマリンによって固定した後, 沈殿濃縮法によって約100倍に濃縮した. この固定試料1 mLを同様に罫線付スライドガラスに滴下して倒立顕微鏡を用いて検鏡し, その他の植物プランクトンの同定と計数を行った.

採水日中にChl. *a*と栄養塩類測定用の海水試料をGF/F

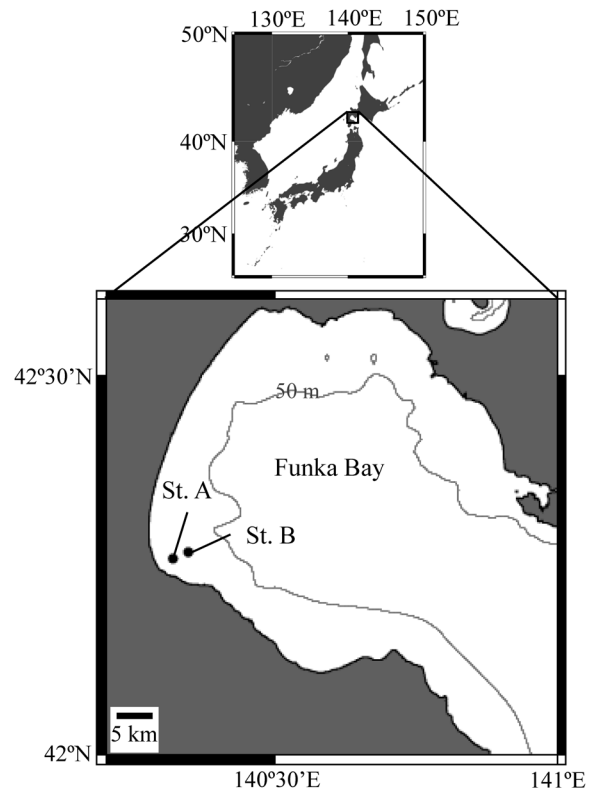


Fig. 1. Location of the sampling stations in Funka Bay, Hokkaido, Japan.

ガラス繊維濾紙で濾過して, フィルターと濾液を分析まで冷凍保存した. GF/FフィルターからChl. *a*を*n,n*-ジメチルホルムアミド (DMF) によって抽出して, 蛍光光度計 (AU10, Tuner Designs社) を用いて濃度を測定した. また, 濾液を無機栄養塩類濃度 ($\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$) の測定に供した. 測定は自動測定機 (AAIIもしくはQuAatro, BLTEC社) を用いて行った.

結 果

*H. akashiwo*細胞密度の季節変動をFig. 2に示す. 本種は2011年には7, 8月, 2012年は6月から10月, 2013年は7月に検出され, 夏季を中心に出現が確認された. 各年の最高細胞密度は2011年7月にSt. Aの0 m層で 5.0×10^3 cells L^{-1} , 2012年8月にSt. Aの0 m層で 1.9×10^4 cells L^{-1} , 2013年7月にSt. Bの0 m層で 6.7×10^2 cells L^{-1} であった. また, 本種は水深0 m層あるいは10 m層 (2012年10月のSt. B) で細胞密度が最大となり, 20, 30 m層では 3.3×10^2 cells L^{-1} 未満とほとんど検出されなかった.

*H. akashiwo*が比較的高密度に検出された2011年7月と2012年8月のSt. Aの0 m層における本種を含む他の植物

プランクトンの種組成を Table 1 に示す。本種出現率は珪藻類が優占 (57.4%) した 2011 年には 6.5% であったが、珪藻類の出現率が 13.7% であった 2012 年には 74.4% と高かった。

St. A と St. B における水温と塩分の季節変動を Fig. 3 に示す。調査期間中の水温の変動範囲は 1.4–25.0°C、塩分では 28.6–34.0 であった。また、*H. akashiwo* の出現時の水温は 6.8–25.0°C、塩分は 30.5–33.0 の範囲であった。Chl. *a* 濃度と DIN 濃度の季節変動を Fig. 4 に示す。調査期間中の Chl. *a* は、0.2–19.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ の範囲で変動し、*H. akashiwo* 出現時は 0.5–0.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ であった。DIN は調査期間中に 0–11.8 μM の範囲で変動し、本種出現時は 0.04–1.32 μM であった。

Fig. 5 に *H. akashiwo* 細胞密度と各環境要因 (水温、塩分、Chl. *a*, DIN, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$) との散布図を示す。本種

の細胞密度と水温は有意な高い相関を示し ($r=0.53$, $p<0.01$)、塩分および DIN については負の相関関係が見られた (塩分については $r=-0.33$, DIN については $r=-0.25$, それぞれ $p<0.01$)。Chl. *a* と $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_2\text{-Si}$ について本種細胞密度との間に相関関係は認められなかった。

考 察

本研究では、北海道噴火湾に出現する *H. akashiwo* の季節的な出現を観察した。これは我々の知る限り北日本の海域において初めての観測記録である。本種は調査期間中、毎年夏季に出現し、特に 7, 8 月に最高密度に達した。本種は、細胞密度が数万 cells mL^{-1} で養殖魚類の斃死が起こるとされている (折田ほか 1999)。本研究における本種最高出現密度は、2012 年 8 月の St. A の 0 m 層の海水試料で確認された 1.9×10^4 cells L^{-1} である。この値は前述の魚類の斃死を起こしうる密度の約 5000 分の 1 以下である。また、本湾において漁港内などでの局所的な本種による赤潮発生等も報告されていない。以上のことから、本種の大量出現による魚類の斃死等の漁業や生態系への悪影響は、噴火湾内において今のところ発生していないと考えられる。

噴火湾において *H. akashiwo* は、赤潮を形成する程に高密度に達することはなかったものの毎年出現が確認されており、本種は噴火湾に普通に生息していることが明らかになった。噴火湾では、対馬暖流の分流である津軽暖流水が夏季から秋季にかけて湾口から流入することが知られており、塩分 33.6 以上の高塩分水塊の存在が暖流水流入の目安となっている (大谷・木戸 1980)。本研究においても、この高塩分な水塊の存在が 2011 年には 9 月以降、2012 年には 10 月以降に認められた (Fig. 3)。しかし、本種はこの暖流水の流入以前に、2011 年では 7 月、2012 年には 6 月から出現していることから、津軽暖流水

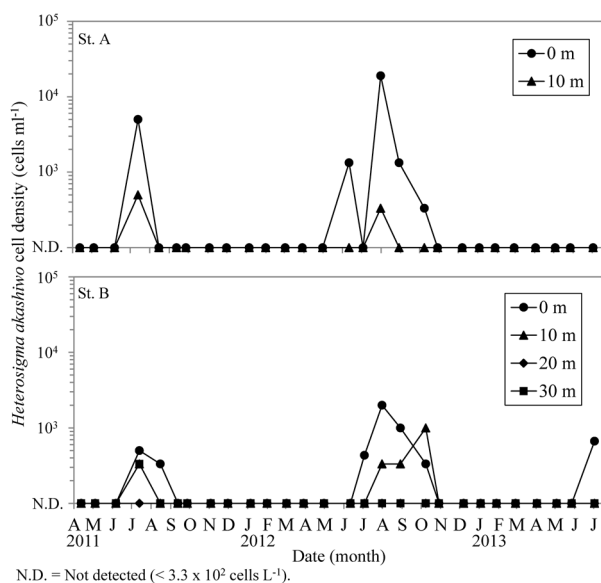


Fig. 2. Seasonal changes in *Heterosigma akashiwo* cell densities at Sts. A and B in Funka Bay from April 2011 to July 2013.

Table 1. Species composition of phytoplankton at St. A from 0 m layer in July 2011 and August 2012, when *Heterosigma akashiwo* was detected at high density during sampling period.

	July 2011		August 2012	
	Cell density (cells mL^{-1})	Percentage (%)	Cell density (cells mL^{-1})	Percentage (%)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	5.0	6.5	19.0	74.4
Centric diatoms	40.1	51.8	2.6	10.2
Pennate diatoms	4.3	5.6	0.9	3.5
Dinoflagellates	5.0	6.4	1.7	6.8
Silicoflagellates (<i>Vicicitus globosus</i>)	23.0	29.7	1.3	5.1
Others	0.0	0.0	0.0	0.0
Summary	77.4	100.0	25.5	100.0

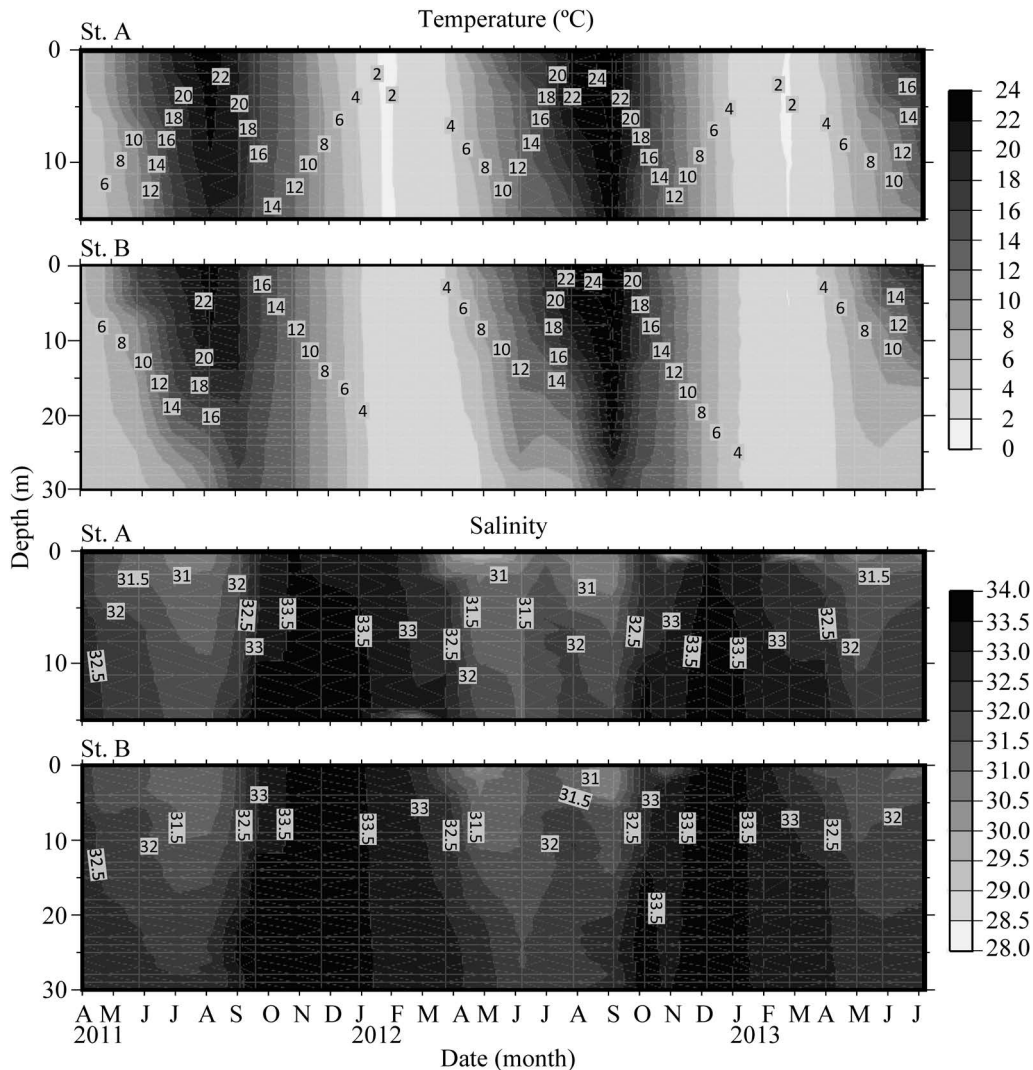


Fig. 3. Seasonal changes in water temperature and salinity at Sts. A and B in Funka Bay from April 2011 to July 2013.

の流入による他の海域からの本種の輸送が噴火湾における本種出現の主要因とは考えにくい。

本種はシストと呼ばれる耐久細胞を形成し、増殖不適期間を海底堆積物中で休眠することが知られている (Imai et al. 1993). Orlova & Morozova (2009) は噴火湾とほぼ同緯度の日本海沿岸の Peter the Great Bay から本種のシストが存在することを報告しており、噴火湾の海底堆積物中においても本種シストが存在する可能性がある。本種シストは水温が 10°C 以上で発芽可能になり、15°C 以上になるとシストからの発芽が活発になることが報告されており (Imai & Itakura 1999), 本湾において本種が比較的高密度に出現した 2011 年 7 月および 2012 年 8 月には、特に沿岸に近い St. A で底層水温が 15°C 近くまで上昇していた (Fig. 3). このように底層水温が上昇することによって、本種シストの発芽量が増加することも本種

の出現量増加に影響するとともに、シストによって秋から翌春にかけての低温期間を越冬することで個体群を維持している可能性がある。一方、2013 年 7 月の St. A では本種が出現しているにも関わらず、底層水温は 10°C を下回っており (Fig. 3), 2013 年度の本種初期発生がシストのみに依存していないことが示唆された。Konovalova (1995) は、カムチャッカ半島沿岸域において水温 1–3°C で本種栄養細胞が出現することを報告しており、この水温は観測期間中の噴火湾における冬季の最低水温と同程度であった (Fig. 3). 本研究では冬季に本種の栄養細胞を検出できなかったものの、検出限界以下の密度 ($< 3.3 \times 10^2$ cells L⁻¹) で本種が栄養細胞によって越冬している可能性も考えられる。すなわち、本湾では越冬した栄養細胞とシストのいずれか、もしくは両者が同時に初期発生と低温期間中の個体群の維持に寄与している可能

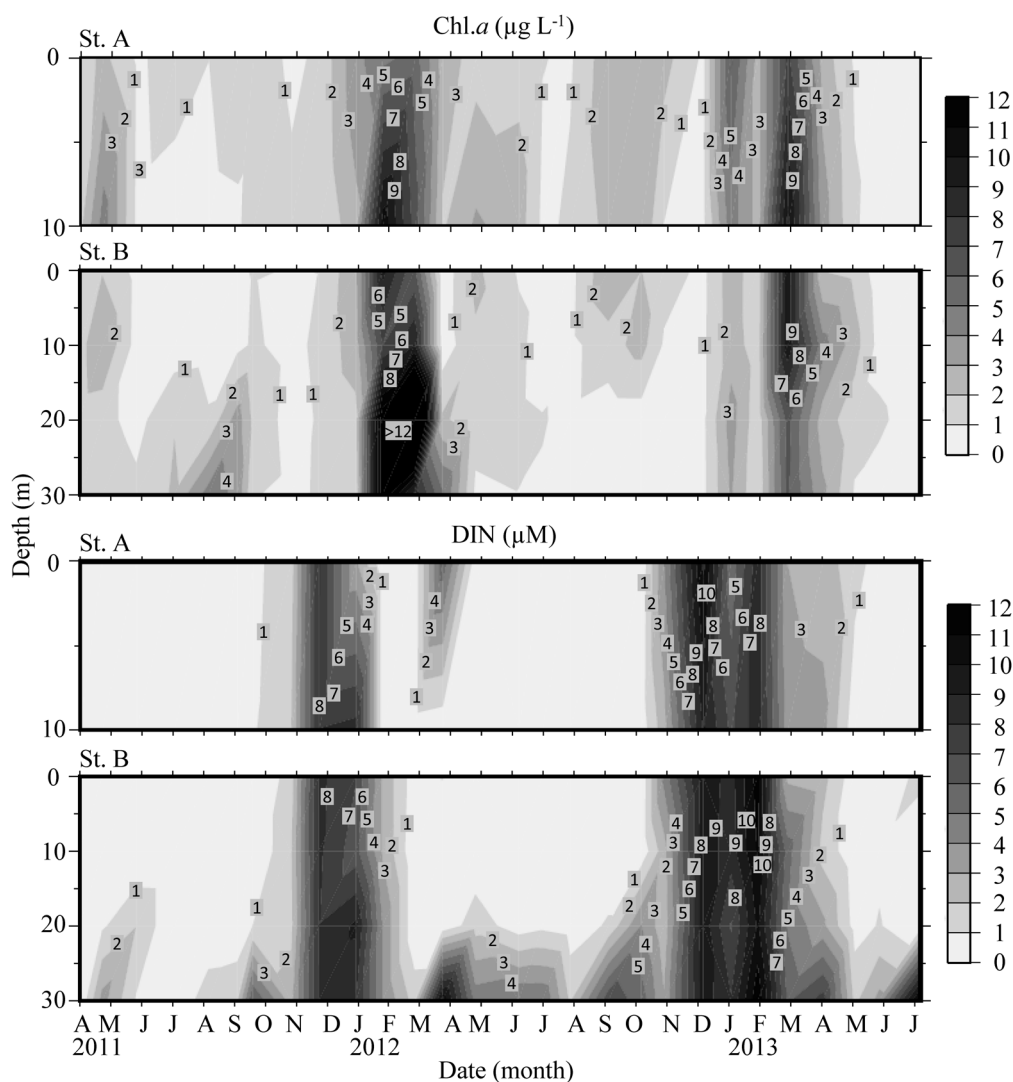


Fig. 4. Seasonal changes in DIN, $\text{PO}_4\text{-P}$, and $\text{SiO}_2\text{-Si}$ at Sts. A and B in Funka Bay from April 2011 to July 2013.

性がある。

噴火湾では植物プランクトンの細胞数の変化について、珪藻類と渦鞭毛藻類に着目して研究が行われており、春季珪藻ブルームの終了後の夏季に渦鞭毛藻類の細胞数が増加することが報告されている（西浜ほか 1976, 嶋田 2000, 宮園・嶋田 2000）。本研究では、*H. akashiwo* や *V. globosus* が夏季の噴火湾の植物プランクトン群集において、渦鞭毛藻や珪藻類の密度を上回る事例が示された（Table 1）。このように、*H. akashiwo* や *V. globosus* のような無殻の赤潮形成鞭毛藻類が、基礎生産量が顕著に減少する夏季の噴火湾において、植物プランクトン群集の重要な要素となり得ることが判明した。今後その生態系への影響について評価することは重要な検討課題であろう。

本研究において、*H. akashiwo* が比較的高密度で出現し

た2011年7月および2012年8月の水温は、表層で約20–23℃あり（Fig. 3）、本種と水温には比較強い正の相関が見られた（Fig. 5）。この水温域は、本邦の他の海域における本種大量出現時の水温環境、および本邦産本種単離株を用いた増殖試験に基づく増殖至適水温域（20–25℃）と概ね一致する（矢持 1984, 山砥ほか 2006, 村田ほか 2010）。また、噴火湾における夏季の最高水温は25℃以下であり、本種の増殖至適域近くであった。このように、本湾では夏季の水温が本種の増殖に好適な範囲内（20–25℃）で推移するため、本種が夏季に増殖できると考えられた。

H. akashiwo の増殖至適塩分は25前後であることが報告されている（Haque & Onoue 2002, 山砥ほか 2006, 村田ほか 2010）。噴火湾では、夏季に河川水からの出水の影響によって低塩分の夏季表層水と呼ばれる水塊が形成さ

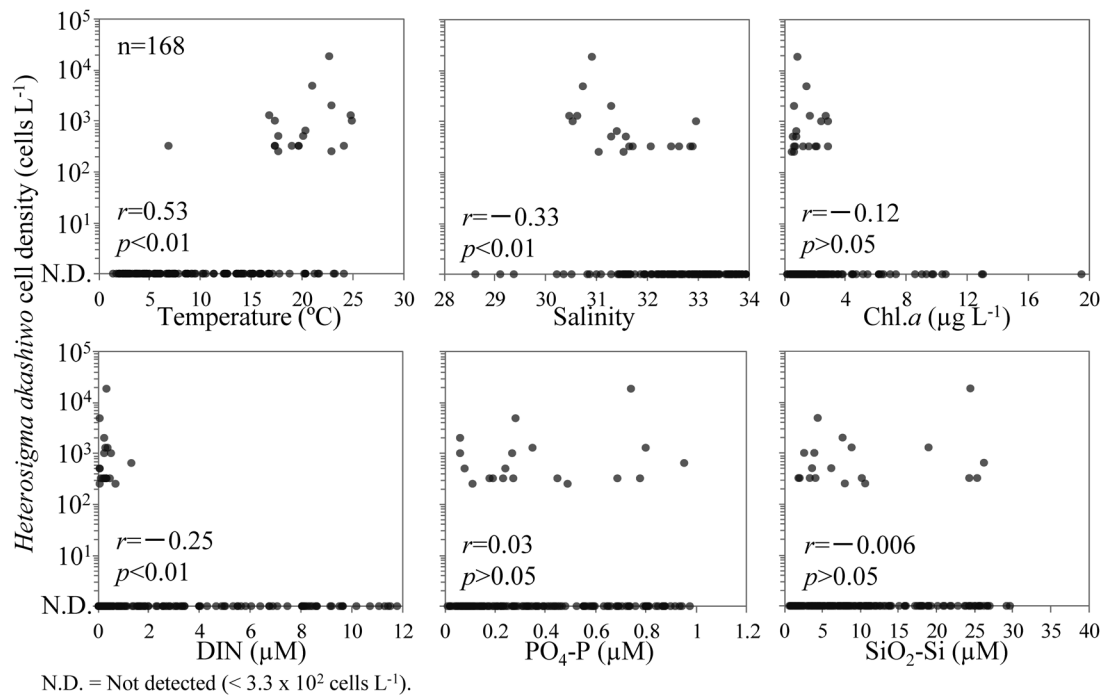


Fig. 5. Relationships between cell densities of *Heterosigma akashiwo* and water temperature, salinity, Chl. *a*, DIN, PO₄-P, or SiO₂-Si.

れ、密度躍層が発達する（大谷・木戸 1980）。本種が高密度に出現した時期にはこの夏季表層水が存在しており、表層は比較的低塩分であった。本種と塩分との間に負の相関が見られたこと、本種の出現量はより沿岸に近い St. A で比較的多かったことから、夏季に塩分が低下し成層化することも本種の増殖にとって好適な要因であったと考えられる。また、この夏季表層水の発達とともに DIN が顕著に枯渇し、それに従って植物プランクトンの構成種も珪藻類から渦鞭毛藻類へと遷移することが報告されている（西浜ほか 1976, 宮園・嶋田 2000）。本種は顕著な日周鉛直移動能を有し、夜間に深層に移動して表層で不足する栄養塩類を取り込み、日中表層に移動して光合成を行うことで栄養塩類が枯渇した環境においても良好にブルームの形成と維持がなされることが指摘されている（Yamochi & Abe 1984）。噴火湾においても本種と DIN の間にも負の相関が見られたことから、DIN の枯渇は珪藻類との競合において本種にとって有利であった可能性がある。

本研究によって、本邦では主に関東以西で大量発生することが知られていた *H. akashiwo* が噴火湾では表層水温が 15℃ を超えると出現し、20℃ を超えると比較的高密度に達することが明らかになった。噴火湾において本種は赤潮を形成するほど高密度に出現しなかったが、貧栄養条件下で植物プランクトンの総出現量が顕著に低下する夏季に優占種となる可能性が示唆された。また、宮

城県気仙沼湾で本種赤潮（西谷ほか 2013）が、カナダでは養殖サケ科魚類の斃死を伴う本種ブルームが報告されている（Tayler 1990）。これら亜寒帯に属する比較的寒冷な海域においても本種の高密度ブルームが発生していることから、北海道においても本種は増殖に好適な環境が整えば赤潮を形成するポテンシャルを有すると言える。さらに、近年、噴火湾では夏季表層で極端な高水温が報告されており（金森・馬場 2014）今後、北海道においても夏季の高水温時に、本種大量出現によって生態系や漁業へ悪影響を及ぼす可能性も否定できない。これまで北海道では、本種のような有害赤潮形成種については、その動向の監視はほとんど行われてこなかったが、噴火湾のように重要な漁業生産海域では、これらのプランクトンの出現動向を把握する体制の整備を検討するべきであろう。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり貴重な試料採集の機会を賜った八雲町漁業協同組合所属第 33 大安丸船長の阿チ谷大輔氏に厚く御礼申し上げます。北海道大学大学院水産科学研究院の久万健志教授ならびに工藤 勲准教授、および研究室の皆様には栄養塩測定においてご協力賜ったことを感謝申し上げます。稿の改訂に当たり査読者には有益なご意見を賜ったことに感謝の意を表します。稿を

まとめるに当たり多大なるご支援を賜った、北海道大学水産学部プランクトン講座の皆様、舞根森里海研究所の田中 克所長（京都大学名誉教授）、首都大学東京横山勝英准教授、NPO 法人森は海の恋人の畠山 信副理事長ならびに同事務局の皆様深く感謝申し上げます。なお、本研究の一部は函館バイオクラスター UMI プロジェクト研究費によって支援された。

文 献

- Chang, F. H., C. Anderson & N. C. Boustead 1990. First record of a *Heterosigma* (Raphidophyceae) bloom with associated mortality of cage-reared salmon in Big Glory Bay, New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.* **24**: 461–469.
- 原 慶明 1990. V. ラフィド藻 Raphidophyceae. 日本の赤潮生物写真と解説。（福代康夫・高野秀昭・千原光雄・松岡数充編），pp. 346–347. 日本水産資源保護協会，東京。
- Haque, S. M. & Y. Onoue 2005. Effects of salinity on growth and toxin production of a Noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Bot. Mar.* **45**: 356–363.
- 本城凡夫 1997. ヘテロシグマ. 赤潮の科学（第2版，岡市友利編），pp. 255–264. 恒星社厚生閣，東京。
- Imai, I., S. Itakura & K. Itoh 1993. Cysts of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo*, Raphidophyceae, found in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakk.* **59**: 1669–1673.
- Imai, I. & S. Itakura 1999. Importance of cysts in the population dynamics of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Mar. Biol.* **133**: 755–762.
- 今井一郎 2013. 有害有毒赤潮の生物学(28) 有害赤潮ラフィド藻ヘテロシグマ1. 海洋と生物 **35**: 387–394.
- 金森 誠・馬場勝寿 2014. 養殖ホタテガイの成長モニタリング調査. 平成24年度道総研函館水産試験場事業報告書：25–27.
- Kononova, G. V. 1995. The dominant and potentially dangerous species of phytoflagellates in the coastal waters of east Kamchatka, pp. 169–174. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-Le Boat (eds.) Harmful marine algal blooms. Lavoisier, Paris.
- 宮園 章・嶋田 宏 2000. 珪藻ブルーム後に出現する渦鞭毛藻の増殖と環境要因. 沿岸海洋研究 **38**: 29–38.
- 村田圭助・猪狩忠光・和田 実・上野剛司 2010. 鹿児島県海域で発生する *Heterosigma akashiwo* の増殖に及ぼす水温・塩分・照度・シストの影響. 鹿児島水技研報 **1**: 1–5.
- 夏池真史・金森 誠・馬場勝寿・山口 篤・今井一郎 2012. 噴火湾における球形シャットネラ *Chattonella globosa* の初報告. 北海道大学水産学部彙報 **62**: 9–13.
- 西浜雄二・岩崎良教・金子 実・広海十朗 1976. 噴火湾鹿部沖における海洋条件および動植物プランクトンの季節変化. 北水試月報 **33**: 1–22.
- 西谷 豪・山田雄一郎・長坂翔子・横山勝英・夏池真史・吉永郁生 2013. 2013年に気仙沼舞根湾海域で発生した有害有毒プランクトン. 海洋と生物 **209**: 568–574.
- 大谷清隆・木戸和男 1980. 噴火湾の海洋構造. 北海道大学水産学部彙報 **31**: 84–114.
- 折田和三・上野貴治・中村章彦 1999. 1995年4月鹿児島湾部に発生した *Heterosigma akashiwo* 赤潮. 平成9年度鹿児島水試事報生物部編，pp. 119–127.
- Orlova, T. Yu. & T. V. Morozova 2009. Resting stages of microalgae in recent marine sediments of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Rus. J. Mar. Biol.* **35**: 313–322.
- 嶋田 宏 2000. 噴火湾における植物プランクトン組成の季節変化. 沿岸海洋研究 **38**: 15–22.
- Taylor, F. J. R. 1990. Red tides, brown tides and other harmful algal blooms: The view into the 1990's, pp. 527–533. In Graneli, E., B. Sundstroem, L. Edler & D. M. Anderson (eds.) *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York.
- 山砥稔文・坂口昌生・岩滝光儀・松岡数充 2006. 諫早湾に出現する有害赤潮鞭毛藻4種の増殖に及ぼす水温，塩分の影響. 日水誌 **72**: 160–168.
- 矢持 進 1984. 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻6種の増殖に及ぼす水温の影響. 日本プランクトン学会報 **31**: 15–22.
- Yamochi, S. & T. Abe 1984. Mechanisms to initiate a *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay. II. Diel vertical migration. *Mar. Biol.* **83**: 255–261.