

Asentamiento en estadios postlarvales de la langosta *Panulirus argus* (Decapoda: Palinuridae), en Limón, Costa Rica

Ronald Umaña Leitón y Didiher Chacón Chaverri*

* Asociación ANAI, Apdo. 170-2070, Sabanilla, Montes de Oca, San José, Costa Rica.

(Rec. 27-VII-1993. Acep. 14-IV-1994)

Abstract: The Gandoca-Manzanillo National Wildlife Refuge is located on the Caribbean coast at the southeast corner of Costa Rica, near the Panamanian border. Postlarvae of the lobster *Panulirus argus* were collected in eight stations using floating plastic fiber collectors. Three pigmentation stages were found (n=1057). The monthly settlement index showed a maximum peak, (1.635 postlarvae/hour/collector) in July. The larvae were more abundant during dark moon and in sand substrate habitats, suggesting the importance of the nearshore environments as postlarval nursery areas. Length did not vary significantly between postlarval stages and was 1.350-1.900 cm. Control of fishing gear and techniques, and the protection and reforestation of the coastal and riverine forest, are recommended.

Key words: Puerulo, spiny lobster, Caribbean, coral reef, collector, growth, ecology.

Los arrecifes, uno de los ecosistemas más diversos y productivos del mundo (Odum 1983), tienen importancia pesquera como criadero de peces, moluscos y crustáceos, incluyendo a la langosta espinosa (*Panulirus argus*, Latreille 1804). En el Refugio de Vida Silvestre Gandoca-Manzanillo, la zona de Manzanillo constituye un área importante para la pesca de la langosta espinosa, y produce beneficios económicos para la comunidad.

Esta langosta está en el Océano Atlántico y el mar Caribe desde Carolina del Norte, Estados Unidos, hasta Río de Janeiro, Brasil, distribuyéndose en las provincias zoogeográficas Antillana y Caribeña (Williams 1965 y Fischer 1978).

Los adultos y juveniles suelen encontrarse en grietas o cavernas en zonas de arrecife, mientras que los primeros estadios larvales migran mar adentro como parte del plancton (Warner y Combs 1977).

La primera etapa de desarrollo larval o filosoma (Lewis 1951, Buesa 1965, Briones y Lo-

zano 1992) se caracteriza por ser comprimida dorsoventralmente y de cuerpo transparente; pasa en mar abierto formando parte del plancton. Luego de varios estadios de filosoma aparece la etapa denominada puerulo (Lyon 1980), con características similares al adulto pero de cuerpo transparente. A diferencia de la filosoma, el puerulo se distribuye en áreas cerca de la costa y pasa por varias etapas hasta la de juvenil. A pesar de las muchas investigaciones sobre el desarrollo de *P. argus*, no existe unificación de criterios acerca de si el puerulo es una etapa larval o postlarval. Según Lewis (1951), Lewis *et al.* (1952), Little (1977), Little y Milano (1980), Marx y Herrnkind (1986) y Monterrosa (1986), el término "larva" es usado para los estadios de filosoma y "postlarva" para las etapas posteriores a la metamorfosis, independientemente del grado de pigmentación, y la primera etapa es el "puerulo". Sin embargo, Baisre (1979) considera al puerulo una etapa larval debido a su similitud con la megalopa de los braquiuros y a otras fases de crustáceos de-

cápodos similares. Cruz (1980) afirma que a pesar de que el puerulo posee características de larva como alta transparencia corporal y cuerpo aplanado, también posee otras de postlarva como periópodos y pleópodos (que le dan habilidad para nadar eficientemente), por lo que define al puerulo como una fase transicional pelágica.

A raíz de la posible disminución en Limón de la pesca de esta langosta, surgió la necesidad de estudiar postlarvas y juveniles. Aquí se describe la evolución mensual de la cifra que indica la cantidad de postlarvas asentadas y sus relaciones ecológicas.

MATERIAL Y METODOS

Area de estudio: El refugio se encuentra en el cantón de Talamanca, provincia de Limón,

cerca de las estribaciones caribeñas de la Cordillera de Talamanca. Hay una gran zona de arrecife coralino, desde la desembocadura de río Cocles hasta Punta Mona (Fig. 1).

Metodología: La recolección se hizo por nueve meses (marzo a noviembre 1989) en ocho estaciones, usando puntos de referencia terrestres en la línea de costa, para establecer los transeptos de recolectores, cuya posición fue perpendicular a la costa.

En cada estación se colocó parejas de recolectores después de los primeros 100 m a partir de la línea de marea baja y cada 100 m hasta completar el número de diez en cinco subestaciones; cada subestación tuvo dos recolectores colocados a diferente profundidad (profundidad media y sobre el piso marino), esto con la finalidad de abarcar varias profundidades y diversificar la posibilidad de asentamiento de las postlarvas.

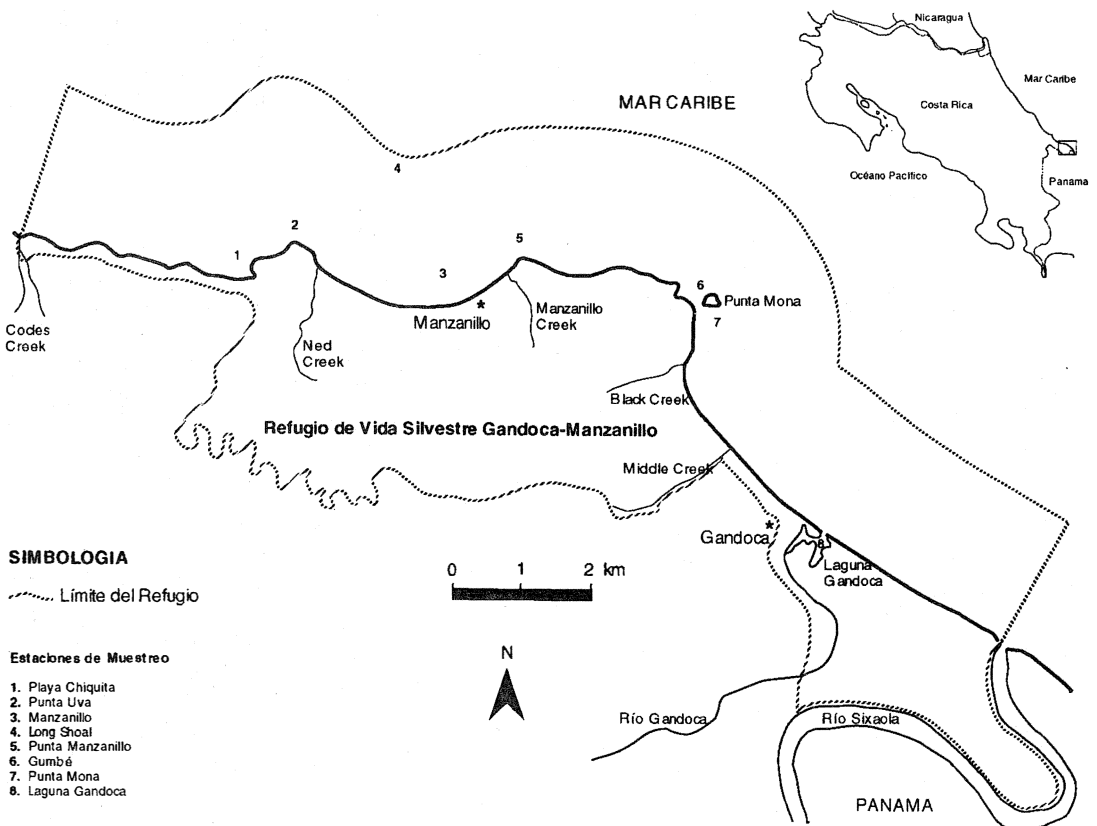


Fig.1. Estaciones de muestreo, dentro de los límites del refugio de Vida Silvestre Gandoca-Manzanillo.

CUADRO 1

Valores promedio, ámbito y desviación estándar para los factores físico-químicos muestreados por estación

Estación	I	III	IV	V	VI	VIII
T(°C)	27.5	28.2	28.2	29.0	28.4	28.3
ámbito	27-28	26-30	28-29	28-30	27-30	25-29
D.E.	0.58	1.2	0.45	0.76	1.34	1.08
S(ppm)	39	35	35	35	37	35
ámbito	38-40	30-40	34-35	34-35	35-40	33-40
D.E.	1.15	1.93	0.45	0.36	2.18	1.89
Z. Disco Secchi(m)	6.6	3.9	7.4	6.4	3.08	4.9
ámbito	3.5-8.7	0.0-5.9	7.0-7.5	0.0-6.5	0.0-8.25	0.0-6.5
D.E.	2.48	1.7	0.22	0.18	4.48	0.99
Z(m)	8.05	4.8	9.6	7.34	3.75	6.12
ámbito	4.5-14	1.5-10	9.5-10	6.0-8.0	2-7.25	3-10
D.E.	2.48	1.97	0.22	0.69	2.32	1.81
N.O.R.	15	12	2	4	2	2
ámbito	1-34	1-126	1-6	1-10	1-3	1-8
D.E.	14.86	20.16	2.23	3.01	1.1	1.84
Puerulos totales	60	884	10	54	9	40

T (°C): temperatura en grados centígrados, S(ppm): salinidad en partes por mil, Z. Disco Secchi(m): Profundidad del disco Secchi en metros, Z(m): profundidad del mar en metros para la estación, N.O.R.: Número de organismos por recolector, D.E.: Desviación Estándar.

Los recolectores, contruídos y colocados según Little y Milano (1980), permanecieron sumergidos 72 hr una vez por semana, de tal modo que cada mes se muestrearon ocho estaciones con repetición.

Las estaciones se eligieron por su exposición a las corrientes, que transportan las postlarvas (Opresco *et al.* 1973).

El registro de los factores físico-químicos se hizo en el lugar de colocación de los recolectores, antes y después del muestreo y en forma directa (Spotte 1979).

Las postlarvas y el resto de material atrapado fueron fijados según Omori y Fleminger (1976), la proporción biomasa de muestra: volumen de solución fijadora fue 1:4. Se identificó con las claves de Lewis (1951), Lewis *et al.* (1952), Fischer (1978) y Kaplan (1982). Se utilizó el término "puerulo" o "postlarva" para (1) etapas posteriores al estadio N° 11 de la filoso- ma, con cuerpo transparente y ojos amarillo brillante y (2) otras etapas que van adquiriendo pigmentación leve (semipigmentados) o completa (pigmentados). Organismos con dos bandas café o rojizas a los lados y una central "beige" o blanca, numerosas espinas en los períopodos, anténulas y antenas y razgos similares al adulto fueron denominados "juveniles tempranos".

Se consideró la relación entre presencia de postlarvas y períodos lunares según lo establecido por Little y Milano (1980), Monterrosa (1986), Bannerot *et al.* (1987) y Heatwole *et al.* (1987).

Se fijaron 614 postlarvas de las 1057 recolectadas; el resto fue liberado en áreas cercanas a la estación de muestreo. Las 614 fueron medidas con un "vernier" (incertidumbre 0.05 cm), anotando las longitudes total, cefalotoráxica y antenal; de éstas se escogieron aleatoriamente 126 (de cada fase) para realizar un análisis biométrico.

RESULTADOS Y DISCUSION

El 45% de los 1057 postlarvas fueron puerulos transparentes, 36% semipigmentados y 18% pigmentados, según la clasificación establecida por Monterrosa (1986), la mayor cantidad arri- vó al arrecife coralino en julio; en coincidencia con Monterrosa (1986), (Fig. 2) quien para Puerto Rico mencionó el periodo julio-setiembre. En cambio, Lewis *et al.* (1952) y Witham *et al.* (1964), hallaron en Florida dos máximos de asentamiento (enero-mayo y octubre-no- viembre), algo diferente de Little (1977), quien estableció para la misma área máximos en fe-

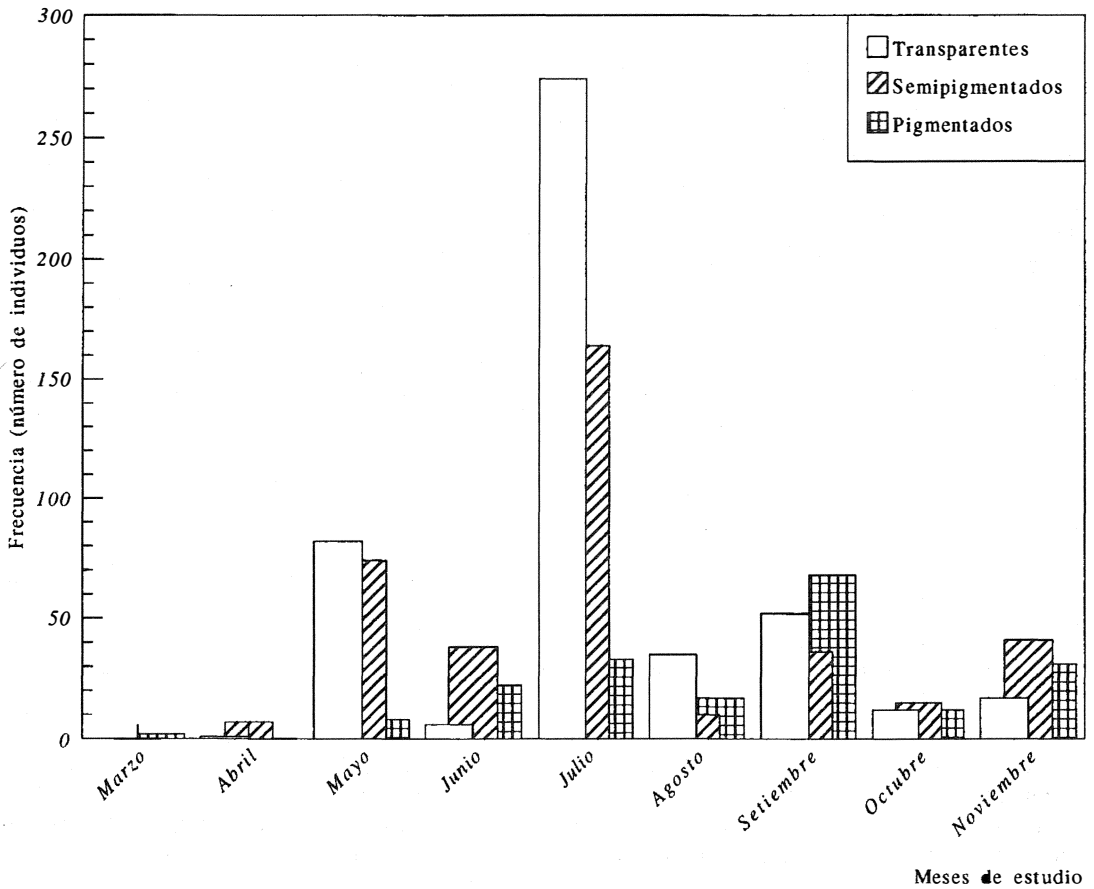


Fig. 2. Número total de postlarvas de *P. argus*, por mes y por fase de coloración.

brero-junio y setiembre-diciembre. Para Cuba (Baisre 1979) informó el periodo noviembre-febrero, y Briones y Lozano (1992), identificaron un máximo de setiembre a diciembre en Bahía de Ascensión, México. Estas diferencias están ligadas principalmente a la variación anual y espacial de factores abióticos y bióticos. Para Little y Milano (1980), los puerulos transparentes y semipigmentados son las dos fases que constituyen en su totalidad la migración nocturna de aguas profundas hacia la costa. Calinski y Lyons (1983) establecen que la postlarva de *P. argus* migra en el plancton sólo de noche. El comportamiento natatorio se ve influido por períodos lunares de baja luminosidad, siendo la luna nueva y el cuarto creciente los períodos de mayor arribo y asentamiento de postlarvas (CPUE: 0.144 y 0.530 respectivamente, cuadro 2).

La mayor cantidad de puerulos asentados sobre los recolectores se presentó en la luna nueva (Fig. 3), excepto en agosto y setiembre, cuando la mayor cantidad de puerulos se recolectaron en el cuarto creciente. Esta observación fueron coincidentes con lo establecido por Little (1977), Little y Milano (1980), Calinski y Lyons (1983), Herrnkind y Butler IV (1986), Monterrosa (1986), Bannerot *et al.* (1987), Heatwole *et al.* (1987) y Briones y Lozano (1992): en luna nueva y cuarto creciente se presentan los máximos asentamientos. El período de luna llena no presentó cantidades significativas de puerulos asentados (t-student, $p < .05$) teniendo solamente un máximo de seis individuos para agosto, a pesar de que en este período lunar se presentan las mareas más altas y el acarreo mayor de agua hacia costa por escorrentía.

CUADRO 2

Valores del asentamiento por unidad de esfuerzo (CPUE) según mes, estación y fase lunar

MES	M	A	M	J	J	A	S	O	N
CPUE	.007	.028	.569	.235	1.635	.215	.542	.135	.310
ESTACION	I	III	IV	V	VI	VIII			
CPUE	.023	.341	.003	.021	.003	.015			
FASE LUNAR	LN	CC	LLI	CM					
CPUE	.144	.053	.002	-					

CPUE: Número de postlarvas/Número de horas recolector colocado.
 LN: Luna Nueva, CC: Cuarto Creciente, LLI: Luna Llena, CM: Cuarto Menguante.

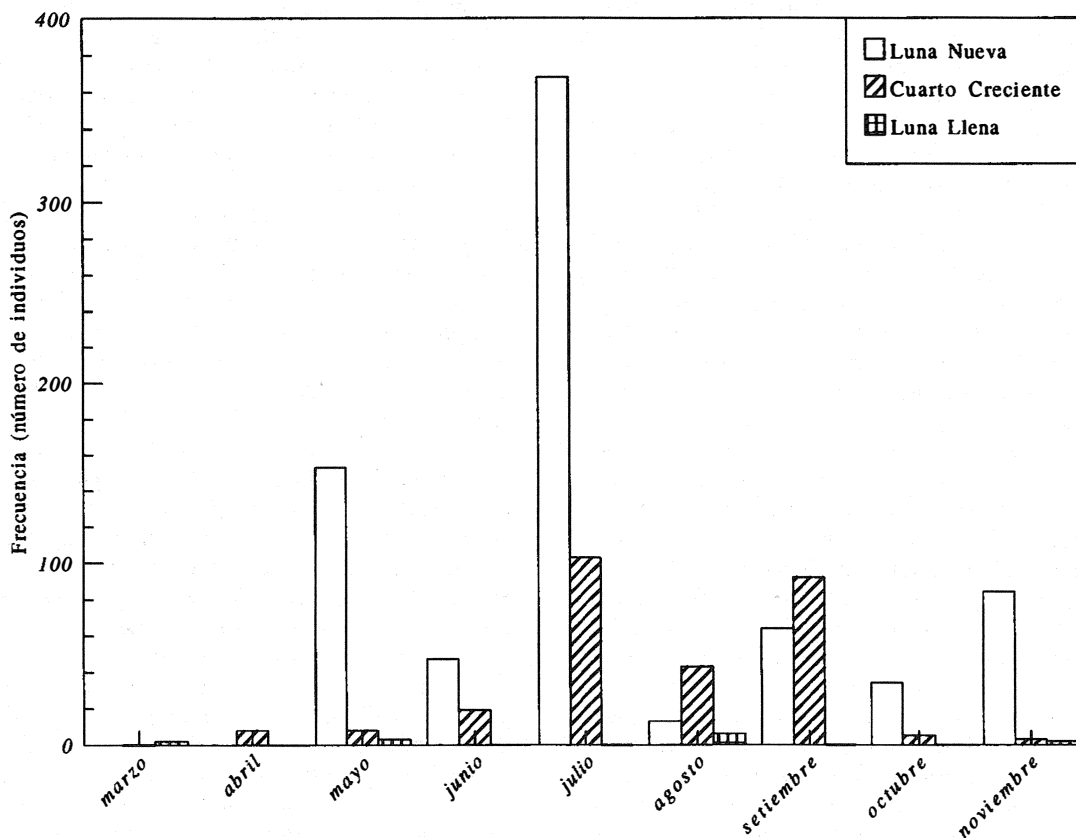


Fig. 3. Número de puerulos de langosta espinosa por fase lunar.

Los puerulos pigmentados son individuos que ya han superado el proceso de inmigración costera y la metamorfosis, por lo tanto su vida es totalmente bentónica y su presencia sobre los recolectores fue producto de la necesidad de un refugio como lo establecieron Briones y Lozano (1992). Además, por su distribución en la columna de agua los recolectores captan organismos planctónicos y bentónicos.

La migración postlarval de langosta espinosa está relacionada principalmente con fenómenos físicos como la circulación de aguas (corrientes marinas y marea); este efecto puede observarse de la comparación entre los balances hídricos (Instituto Meteorológico Nacional 1990) y el número de postlarvas recolectadas por mes. En julio se presentó la precipitación media mensual más alta como reflejo indirecto del mal clima; en un oceano tormentoso las corrientes acentúan su acarreo de materiales a la costa, provocando que el plancton sea llevado hacia las comunidades coralinas. Little (1977), Herrnkind y Butler (1986) y Marx (1986) mencionan que el arribo de postlarvas depende de los ritmos de desove y las condiciones ambientales.

La influencia de factores abióticos como temperatura y salinidad sobre los procesos migratorios de postlarvas de langosta espinosa son denotados por Little y Milano (1980) y Monterrosa (1986); ellos las establecieron como variables determinantes de la duración del estadio postlarval. Sin embargo, en el período de estudio no se encontraron variaciones significativas (Fig. 4), (t-prueba, $p < .05$) que afectarán el comportamiento de la postlarva. Solamente es notable que para julio (máximo asentamiento), los valores promedio de temperatura y salinidad son los más bajos; esto posiblemente se presentó porque la precipitación media mensual fue la más alta. Los valores de temperatura y salinidad se ubicaron en los ámbitos normales en que la especie sobrevive.

El mayor número de postlarvas se recolectó en áreas de arena y arena-roca (Fig. 5), debido principalmente a la abundancia allí de las comunidades algales, que son preferidos por los puerulos para asentarse en forma natural (Marx y Herrnkind 1986). Herrnkind y Butler IV (1986) y Briones y Lozano (1992), establecieron que las postlarvas evitan asentarse en zonas de arena debido a su vulnerabilidad a la depredación, pero el recolector artificial les brindó el refugio necesario. Es normal el hecho que las

recolectas menores se dieran sobre los pastos marinos, debido a su competencia con el recolector como sustrato de asentamiento.

No se pudo comparar las estaciones con respecto a su potencial en el asentamiento, por las condiciones climáticas en algunos meses no pudieron ser visitadas varias estaciones (II, VII). Con clima tormentoso la estación en que siempre fueron colocados los recolectores fue la N° 3 (Manzanillo), debido a la facilidad de recuperación y vigilancia. Sin embargo, la mayor frecuencia de muestreo allí no fue el único factor que determinó el alto asentamiento, pues allí abundaron pastos marinos y algas especialmente de (*Thalassia testudinum* y *Laurencia* sp.), sectores rocosos, y sectores coralinos de formas columnares y costrosas. Esto es similar a lo informado por Herrnkind y Butler IV (1986) y Marx y Herrnkind (1986) los puerulos se asientan en ecosistemas de alta complejidad estructural. Tales comunidades sin embargo, se ven sometidas a la destrucción por la acumulación de sedimentos, entre otros factores, (Cortés y Kandler 1990). Los sedimentos son producto de malas prácticas agrícolas, deforestación desenfundada, y erosión de los suelos por la lluvia. Así la tierra es acarreada por los ríos al mar, donde, las corrientes y la marea la distribuyen en la costa. Los sedimentos se acumulan en capas, impidiendo la fotosíntesis en las algas y provocando la muerte de corales, además de disminuir por cobertura la complejidad estructural de las áreas rocosas (Risk 1983 y Kühlmann 1985). El resultado es la eliminación de hoyos y cavernas que servirían como refugio a los estadios tempranos de la langosta espinosa (Marx 1986, Marx y Herrnkind 1986). Estos últimos autores y Herrnkind *et al.* (1988) mencionan que los sedimentos, al decantarse sobre las setas de la larvas y postlarvas, provocan un peso que en algunos casos causa la muerte por agotamiento. Quirós (1989) estableció, para la estación Blood die (E2), Manzanillo, que existe mayor sedimentación ($25 \text{ mg/cm}^2/\text{día}$ de sedimento), en los meses en que aquí se observó mayor asentamiento; además, el disco Secchi perdió su visibilidad (estación 3, julio), al 6.7% de la profundidad, lo que induce a pensar que el medio y las postlarvas están sometidas a destrucción y fatiga por la sedimentación, especialmente en los períodos de mal clima cuando se acentúa la inmigración de postlarvas a la costa.

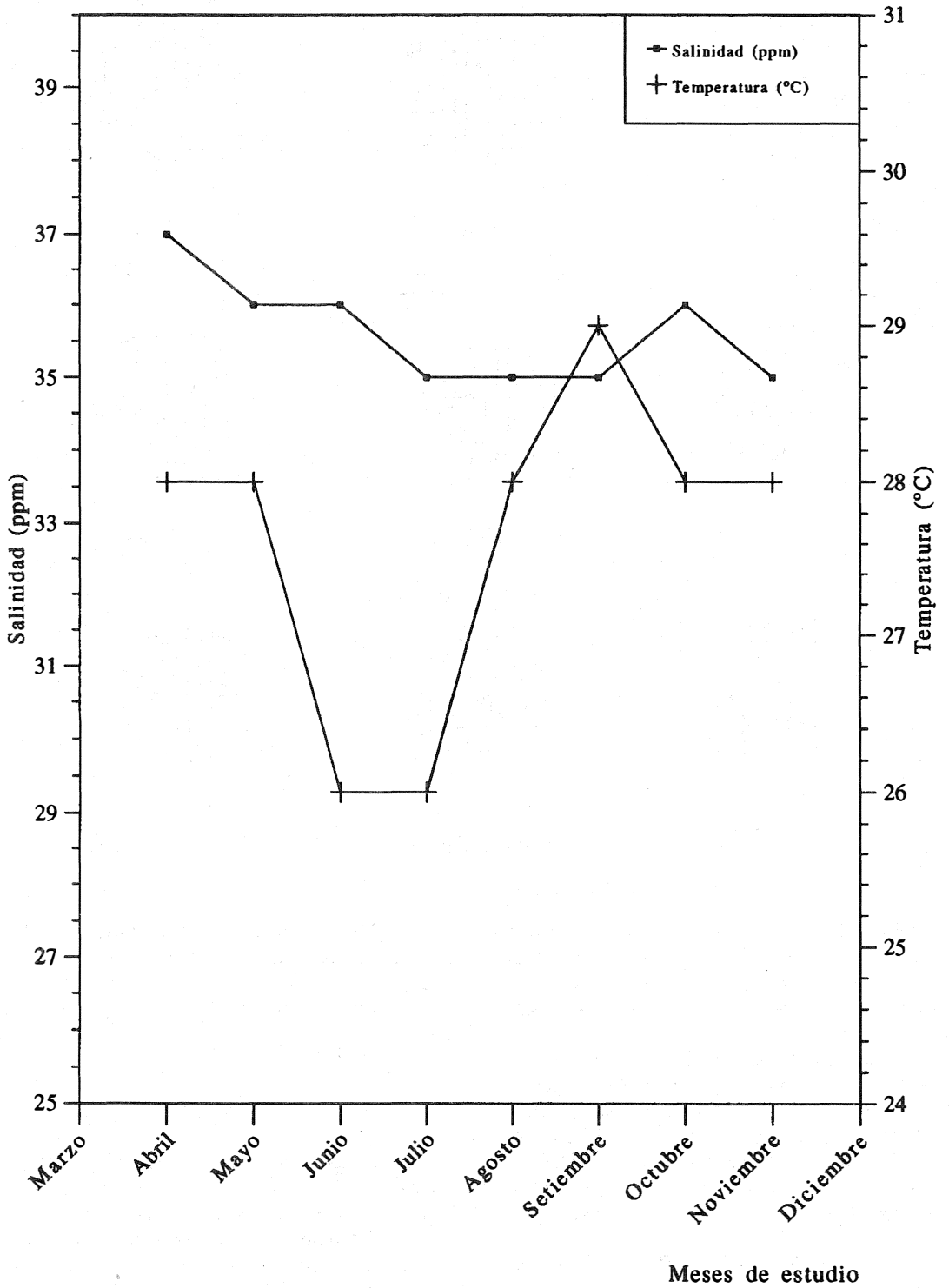


Fig. 4. Temperatura y salinidad promedio para todas las estaciones.

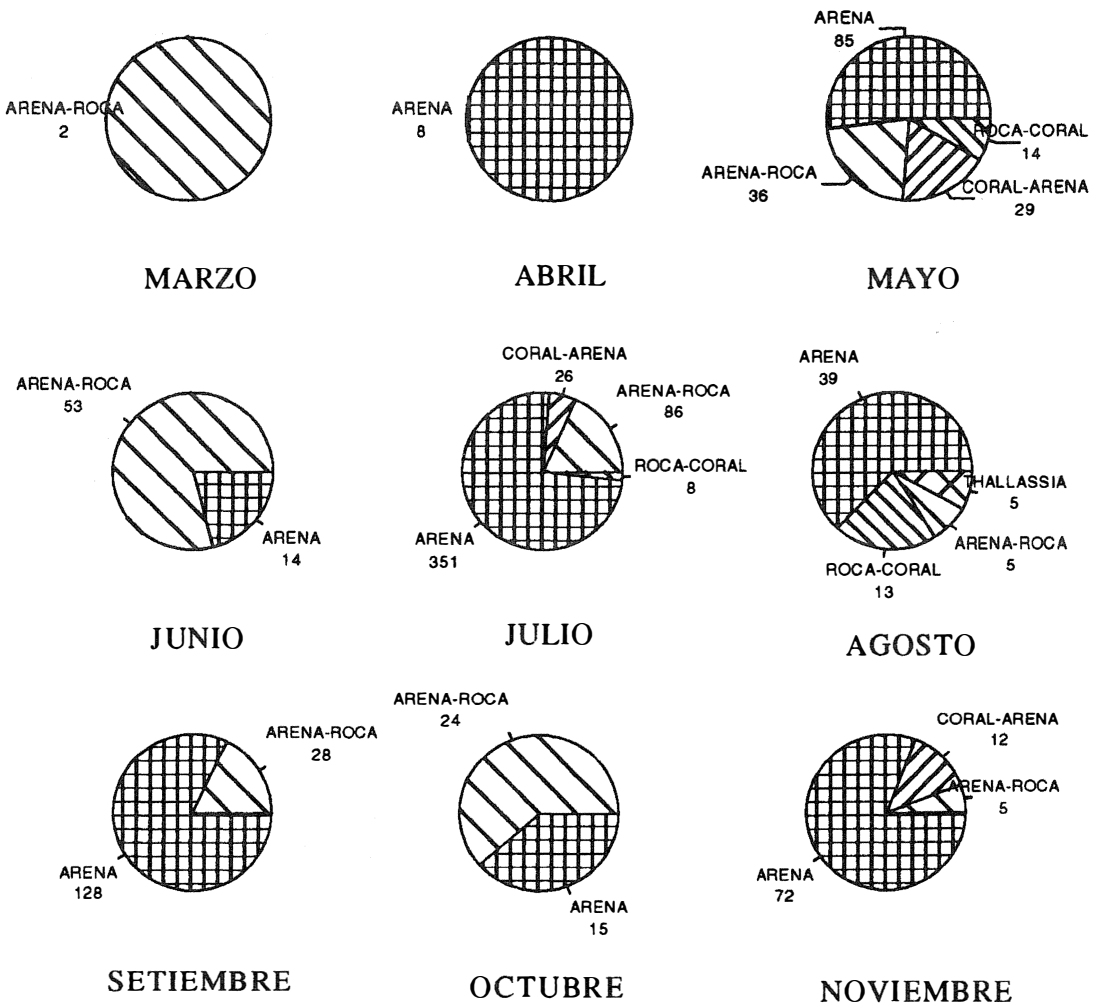


Fig. 5. Número de postlarvas totales según el tipo de sustrato.

El análisis de longitudes totales en las tres fases de coloración (Fig.6) no indicó diferencias (t-prueba, $p < .005$), en coincidencia con Witham *et al.* (1964), y debido al traslape de longitudes totales.

El arrecife coralino del Refugio es importante como corredor biológico marino entre Nicaragua, Costa Rica y Panamá, debido a la influencia de las corrientes marinas, pero es prioritario eliminar los disturbios que causan (Cortés 1992) el turismo masivo y la agricultura, así como proteger y reforestar las zonas costeras y ribereñas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias al convenio Fondo de Desarrollo Forestal-Asocia-

ción ANAI. Agradecemos a Patricia Briones de la Universidad Nacional Autónoma de México sus aportes y consejos, al pueblo de Manzanillo y al personal administrativo de la Asociación ANAI.

RESUMEN

El Refugio de Vida Silvestre Gandoca-Manzanillo está localizado en el extremo sureste de la costa Caribe de Costa Rica, cerca de la frontera con Panamá. Las postlarvas de la langosta (*Panulirus argus*) fueron recolectadas en ocho estaciones haciendo uso de recolectores plásticos flotantes. Se halló tres estadios de pigmentación (n=1057). El índice mensual de asenta-

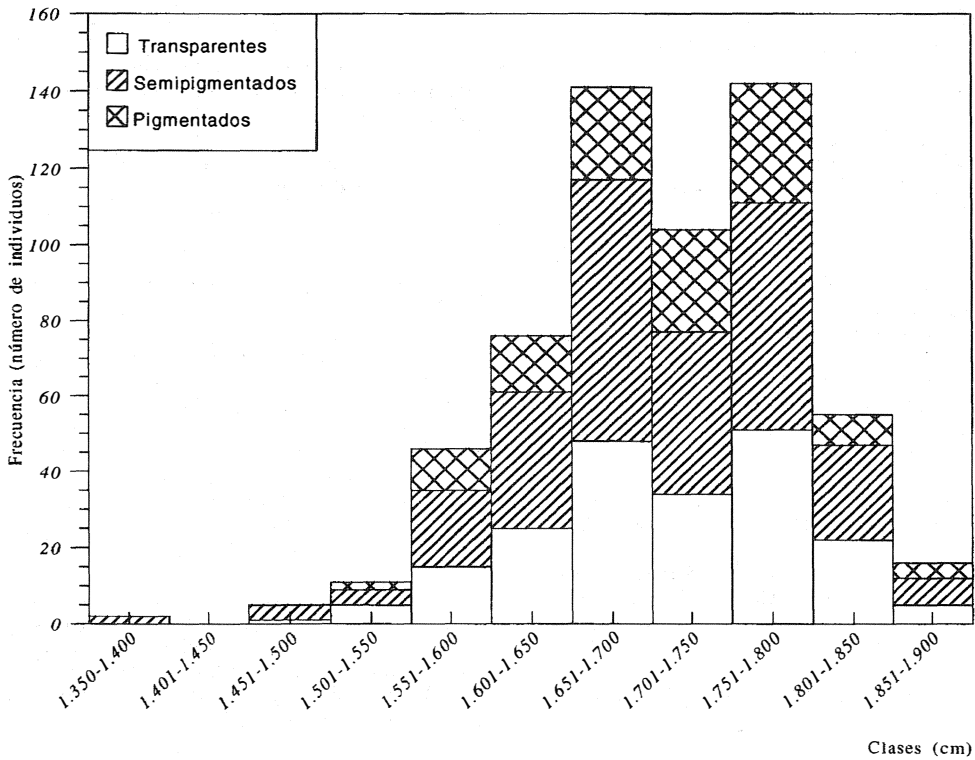


Fig. 6. Frecuencia de puerulos de *P. argus* para las clases de longitud total, según las fases de pigmentación.

miento mostró su valor máximo (1.635 postlarvas/ hora recolector colocado), en julio y con una estrecha relación a fases lunares oscuras y hábitats arenosos, lo que demuestra su importancia como zonas de crianza para estadios juveniles. Las medidas de longitud no indicaron diferencias estadísticas entre cada estadios postlarval, presentado un ámbito de longitud de 1.350-1.900 cm. Se recomienda controlar los artes y técnicas de pesca, así como la protección y reforestación de los bosques costeros y ribereños.

REFERENCIAS

Baisre, J. 1979. Reclutamiento de puerulos de la langosta comercial (*Panulirus argus* Latreille) en la plataforma suroriental de Cuba. MIP/CIP; III Foro Científico. Academia de Ciencias de Cuba, La Habana, Cuba. 36 p.

Bannerot, S., J. Ryther & S. Griffith. 1987. An informal Report on Preliminary Collections of Postlarval Spiny Lobsters for an Extensive Mariculture Experiment in Antigua, West Indies. The Spiny Lobster Recruitment Workshop, Ann. Meet. of the Gulf and Caribb. Fish., Curaçao. 14 p.

Briones, P. & E. Lozano. 1992. La Langosta en la Bahía de Ascensión. Serie Cuadernos Sian Ka'an Quintana Roo 3:1-17.

Buesa, R.J. 1965. Biología de la langosta *Panulirus argus* (Latreille, 1804), (Crustacea: Decapoda: Raptantia). Instituto Nacional Pesca, La Habana, Cuba. 230 p.

Calinski, M. & W. Lyons. 1983. Swimming behavior of the puerulus of the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804)(Crustacea: Palinuridae). J. Crust. Biol. 3: 329-335.

Cortés, J. & M. Kandler. 1990. Los corales como indicadores de problemas de sedimentación en arrecifes coralinos. Bull. Inter. Marinelifa Alliance Sea Wind 4:20-25

Cortés, J. 1992. Los arrecifes coralinos del Refugio Nacional de Vida Silvestre Gandoca-Manzanillo, Limón, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 40:325-333.

Cruz, I.R. 1980. Los recursos langosteros en el Archipiélago Cubano. Gulf Caribb. Fish. Inst. San José, Costa Rica. 24 p.

Fisher, W. 1978. Species identification sheets for fishery purposes. Fishery Resources and Environment Division. FAO. Fisheries Department. Vol II. FAO, Roma. 260 p.

- Heatwole, D., J. Hunt & B. Blonder. 1987. Offshore Recruitment of Postlarval Spiny Lobster, *Panulirus argus*, at Looe Key Reef, Florida. 40th Ann. Meet. of Gulf and Caribb. Fish. Inst., Curaçao. 8 p.
- Herrkind, W. & M. Buttler IV. 1986. Factors regulating postlarval settlement and juvenile microhabitat use by spiny lobster *Panulirus argus*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 34:23-30.
- Herrkind, W., M. Butler IV & R. Tankersley. 1988. The effects of siltacion on recruitment of spiny lobsters, *Panulirus argus*. Fish. Bull. 86:331-338.
- Instituto Metereológico Nacional. 1990. Catastro de las series de precipitaciones medidas en Costa Rica. Ministerio de Recursos Naturales Energía y Minas. San José, Costa Rica. 370 p.
- Kaplan, E. 1982. A Field Guide to Coral Reefs of the Caribbean and Florida. Houghton Mifflin, Boston. 289 p.
- Kühlmann, D. 1985. The protection role of coastal forests on coral reefs. Proc. 5th Int. Coral Reef Cong., Tahiti 6:503-508.
- Lewis, J.B. 1951. The Phyllosoma larvae of the spiny lobster, *Panulirus argus*. Bull. Mar. Sci. Gulf. Caribb. 1:89-103.
- Lewis, J. B., H. Moore & W. Babis. 1952. The postlarval stages of the spiny lobster, *Panulirus argus*. Bull. Mar. Sci. Gulf. Caribb. 2: 324-337
- Little, E. 1977. Observations on recruitment of postlarval spiny lobster, *Panulirus argus*, to the Florida Keys. Fla. Mar. Res. Publ. 37:1-16
- Little, E. & G. Milano. 1980. Technique to monitor recruitment of postlarval spiny lobster, *Panulirus argus*, to the Florida Keys. Fla. Mar. Res. Publ. 37:1-16
- Lyon, W.G. 1980. Possible sources of Florida's spiny lobsters populations. Proc. Gulf. Caribb. Fish. Inst. 33: 253-266.
- Lyon, W.G., P. Barber, S. Foster, F. Kennedy & G. Milano. 1981. The spiny lobster, *Panulirus argus*, in the middle and upper Florida Keys: population structure, seasonal dynamics and reproduction. Fla. Mar. Res. Publ. 38: 38 p.
- Marx, J.M. 1986. Recruitment and settlement of spiny lobster pueruli in south Florida. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43:2221-2227.
- Marx, J. & W. Herrkind. 1986. Species Profiles: Life Histories and Enviromental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (South Florida). Spiny Lobster. Fish and Wildlife Service. U.S. Depart. of the Interior Biological Report 82 (1161). 21 p.
- Monterrosa, O. 1986. Postlarval Recruitment of the Spiny Lobster, *Panulirus argus*, (Latreille), in Southwestern Puerto Rico. 40th Ann. Meet. of the Gulf and Caribb. Fish. Inst. 24 p.
- Odum, E. 1983. Ecología. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 639 p.
- Omori, M. & A. Flemminger. 1976. Zooplankton fixation and preservation. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. París. 350 p.
- Opresco, L., D. Opresco, R. Thomas & G. Voss. 1973. Guide to the lobster-like animals of the Gulf of Mexico and the Caribbean Region. University of Miami. Sea Grant Program. NOAA, Sea Grant Report N° 04-3-158-27. Miami, Florida. 44 p.
- Quirós, L. 1989. Caracterización de la comunidad arrecifal y el impacto de los sedimentos, Refugio Nacional de vida Silvestre Gandoca/Manzanillo, Talamanca, Limón, Costa Rica. Investigación por tutoría para optar al grado de Bachiller en Biología Marina, Universidad Nacional. Heredia. 59 p.
- Risk, M. 1983. The effect of deforestation on coral reefs. Mc Master Institute for Energy Study Energy Newsletters 4:62-70.
- Simmons, C.D. 1980. Review of the Florida spiny lobster resource. Fisheries 5: 37-43
- Spotte, S. 1979. Fish and invertebrate culture (water management in closed systems). Wiley, Nueva York, p. 135-144.
- Sutcliffe, W. H. 1953. Some observations of breeding and migration of the Bermuda spiny lobster *P. argus*. Ecology. 28:526-529.
- Warner, R. & C. Combs. 1977. Biological studies of the spiny lobster, *Panulirus argus* (Decapoda: Palinuridae), in South Florida. Gulf. Caribb. Fish. Inst. 29: 166-183.
- Williams, A. 1965. Marine decapod Crustaceans of the Carolinas. Fish. Bull. U.S. 65: 289 p.
- Witham, R., R. Ingle & H. Sims. 1964. Notes on the postlarvae of *Panulirus argus*. Q. J. Florida Acad. Sci. 27:289-297.