فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۰، دوره ۱۵، شماره ۴، پاییز۱۴۰۱، صفحه ۱۳ تا ۲۲
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

مقایسه دو روش رنگ آمیزی غضروف و استخوان بر اساس کاربرد و عدم کاربرد اسید برای مطالعه تکوین اولیه سیم معمولی (*Abramis brama*)

محمدرضا صحرائیان[۱]، **سهیل ایگدری**[۲]،غلامرضا رفیعی[۳]، آرش زیبایی[۴]، محمدمرادی قرخلو[۵]

۱- دانش آموخته دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. نویسنده مسئول: soheil.eagderi@ut.ac.ir

۳- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۵- استادگروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۶/۲۳ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۱**

چکیده

زمینه و اهداف: روش مرسوم برای رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان در مهره‌داران استفاده از آلسیان بلو و آلیزارین رد می‌باشد. در پایه ترکیبات محلول آلسیان بلو از اسید استفاده می‌شود که امکان تمایز هرچه بیشتر بافت‌های رنگ شده را فراهم می‌کند. ولی مشکل اینجاست که در صورت استفاده از اسید، بخشی از یون‌های استخوانی حذف شده و نتایج را با خطا مواجه می‌سازد. بنابراین پژوهش حاضر به مقایسه دو دستورالعمل کاربرد و عدم کاربرد اسید برای رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان در بچه ماهی درحال تکوین سیم معمولی برای ارایه راهکار در مطالعاتی آتی پرداخت.

مواد و روش‌ها: برای رنگ آمیزی از دو روش پایه اسیدی (اسید استیک) و غیر اسیدی بر اساس محلول های آلسیان بلو و آلیزارین رد طی مراحل آبدهی ، رنگ آمیزی غضروف و استخوان ، خنسی سازی ، آب دهی ، هضم پروتئین، رنگبری، شستشوی نهاییو آبگیری و شفاف سازی استفاده شد.

نتایج و جمع‌بندی: براساس نتایج می‌توان بیان داشت که در مطالعات تکوین اولیه ماهیان استخوانی استفاده از روش رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان بر پایه عدم استفاده از اسید مناسب‌تر از روش بر پایه استفاده از اسید می‌باشد چرا که این روش در دوره اولیه تکاملی که بخش‌های مختلف لارو ماهیان در حال شکل‌گیری به درک تسلسل و الگوی تغییرات با دقت بیشتری کمک می‌نماید.

کلمات کلیدی: استخوان‌شناسی ،توسعه لارو، آلسیان بلو، آلیزارین رد، ماهی سیم معمولی.

مقدمه

مطالعه اسکلت ماهی‌ها برای درک عملکردهای اصلی ماهی‌ها از جمله حرکت، تغذیه و تنفس از ضرورت‌های تحقیقاتی در آبزی‌پروری است. همچنین ساختارهای استخوانی به‌عنوان یکی از پایدارترین بخش بدن مهره‌داران در مباحث دیرینه‌شناسی و باستان‌شناسی کاربرد دارد (۱). به علاوه در مباحث ماهی‌شناسی، ویژگی‌های شمارشی و اندازشی اسکلت در مطالعات آرایه‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در آبزی‌پروری نیز بررسی بدشکلی‌های اسکلتی در ماهی‌ها اهمیت زیادی دارد چرا که بدشکلی‌ها ایجاد شده در ماهی‌ها از این جهت که روی ارزش محصول نهایی اثرگذار است، بسیار حائز اهمیت است (۲، ۳).

سابقه مطالعات استخوان‌شناسی در مهره‌داران بسیار طولانی بوده و در مورد ماهیان، یکی از قدیمی‌ترین دستورالعمل ارائه شده، استفاده از روش شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی استخوان و غضروف برای نمونه‌های بزرگ مربوط به Dingerkus و Uhler (۱۹۷۷) می‌باشد که حتی در سال‌های اخیر به‌عنوان یکی از منابع اصلی در چنین مطالعاتی مورد استفاده قرار گرفته است (۴). همچنین در سال‌های اخیر دستورالعمل‌های متعددی برای بالا بردن کیفیت روش شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی در گروه‌های مختلف ماهیان توسط محققین مختلف ارایه شده است (۱۱-۵). روش مرسوم برای رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان در مهره داران استفاده از آلسیان بلو و آلیزارین است. در پایه محلول آلسیان بلو از اسید استفاده می‌گردد که امکان تمایز هرچه بیشتر بافت‌های رنگ شده را فراهم کند. ولی در صورت استفاده از اسید، بخشی از یون‌های استخوانی حذف شده و نتایج را با خطا مواجه می‌سازد. در جریان مطالعه تحقیقاتی برروی تکوین اسکلتی ماهی سیم معمولی (*Abramis brama*)، جهت استانداردسازی روش شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی، روش‌های مختلفی با هدف بهینه‌سازی این روش مورد آزمون و خطا قرار گرفت که در این تحقیق نتایج این آزمون‌ها براساس مقایسه دو دستورالعمل کاربرد و عدم کاربرد اسید برای مطالعات بعدی محققان ارایه خواهد شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بچه ماهی و انگشت‌قد ماهی سیم این مطالعه، از مجتمع تکثیر و پرورش شهید انصاری واقع در شهرستان رشت تامین گردید. تعداد ۲۰ نمونه ماهیان ۳۵ روزه که در شرایط کاملاً یکسان مورد پرورش قرار گرفته بودند، بعد از بیهوشی در محلول گل میخک، در فرمالین ۴ درصد بافر فسفات (pH = ۷ با M = ۰/۱) تثبیت و به آزمایشگاه تکوین و بیوسیتماتیک گروه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند. سپس ماهیان به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم و بعد از زیست‌سنجی برای شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی استخوان و غضروف براساس روش بهینه شده زیر که ترکیبی از روش‌های مختلف می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های هر دو گروه دارای وزن و طول یکسان بودند.

شستشو و آبدهی: قبل از شروع رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها آب‌دهی شدند. برای این منظور بچه ماهیان درون ظرف

حاوی آب مقطر تا زمان غرق شدن به کف ظرف انکوباسیون شدند و سپس مجدداً به مدت ۵ دقیقه در ظرف آب مقطر شستشو داده شدند.

رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان بر پایه‌ی اسید: جهت رنگ آمیزی غضروف‌های بچه ماهیان، از محلول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم آلسیان بلو، ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک استفاده شد. جهت رنگ‌آمیزی استخوان‌ها نیز از ۵۰ درصد آلیزارین رد ۵ گرم در لیتر و ۵۰ درصد محلول KOH یک درصد استفاده شد (۲).

رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان بدون پایه‌ی اسید: در این روش از محلول دوگانه شامل ۱ میلی‌لیتر محلول (الف) + ۱۰ میکرولیتر محلول (ب) استفاده شد (**محلول الف**: ۵ میلی‌لیتر آلسیان بلو (۴ گرم در لیتر الکل ۷۰ درصد) + ۷۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد + ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه ۲/۳ گرم کلرید منگنز و **محلول ب**: ۵ گرم در لیتر آلیزارین) (۹).

خنثی‌سازی: جهت حذف اسید باقی مانده در بافت نمونه‌ها و جلوگیری از هضم غضروف و استخوان از اتانول ۱۰۰ درصد به همراه محلول KOH یک درصد استفاده شد.

آب‌دهی دوباره: برای این که مجدداً بافت آبگیری گردد، نمونه‌ها در سری الکلی ۹۵، ۷۰، ۴۰ و ۱۵ درصد هر کدام به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس نمونه‌ها در آب مقطر غوطه‌ور شدند تا زمانی که در ته ظرف ته‌نشین شوند.

فرآیند هضم پروتئین: برای هضم پروتئین‌های بدن به منظور مشاهده دقیق ساختارهای اسکلتی از محلول آنزیمی شامل ۷ حجم آب مقطر، ۳ حجم سدیم بورات (بوراکس) اشباع و ۲ گرم تریپسین استفاده شد.

رنگ‌بری: برای حذف رنگ‌های اضافی از بافت‌های نمونه، از محلول رنگ‌بری شامل یک حجم آب اکسیژنه (H_2O_2) ۳ درصد و نه حجم محلول KOH یک درصد استفاده گردید.

شستشوی نهایی: در این مرحله تمامی بچه ماهیان ابتدا به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر و سپس در محلول KOH ۱ درصد تا از بین رفتن تمامی رنگ‌های اضافی و شفاف شدن بدن قرار گرفتند.

آب‌گیری و شفاف سازی: در این مرحله آب اضافی نمونه‌ها برای جلوگیری از آسیب آن‌ها در طی زمان ذخیره‌سازی بلند مدت، گرفته و نمونه‌ها شفاف‌سازی شدند. این عمل با استفاده از سری گلیسرول – KOH ۱ درصد انجام شد، به این صورت که نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در محلول گلیسرول ۴۰ درصد + ۶۰ درصد KOH ۱ درصد و سپس به مدت ۲۰ ساعت در محلول گلیسرول ۷۰ درصد و ۳۰ درصد KOH ۱ درصد قرار داده شدند و در نهایت به گلسیرین خاص ۱۰۰ درصد حاوی یک قطعه ریز (اندازه یک دانه ارزن) تیمول به منظور جلوگیری از قارچ‌زدگی منتقل شدند.

تصویربرداری: جهت تصویربرداری از نمونه‌ها شفاف و رنگ‌آمیزی شده از اسکنر Epson V600 استفاده شد. در این روش نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده در حمام گلیسرول که برروی صفحه شیشه‌ای اسکنر ایجاد شده بود به صورت انفرادی مستقر و با بالاترین دقت اسکن شدند.

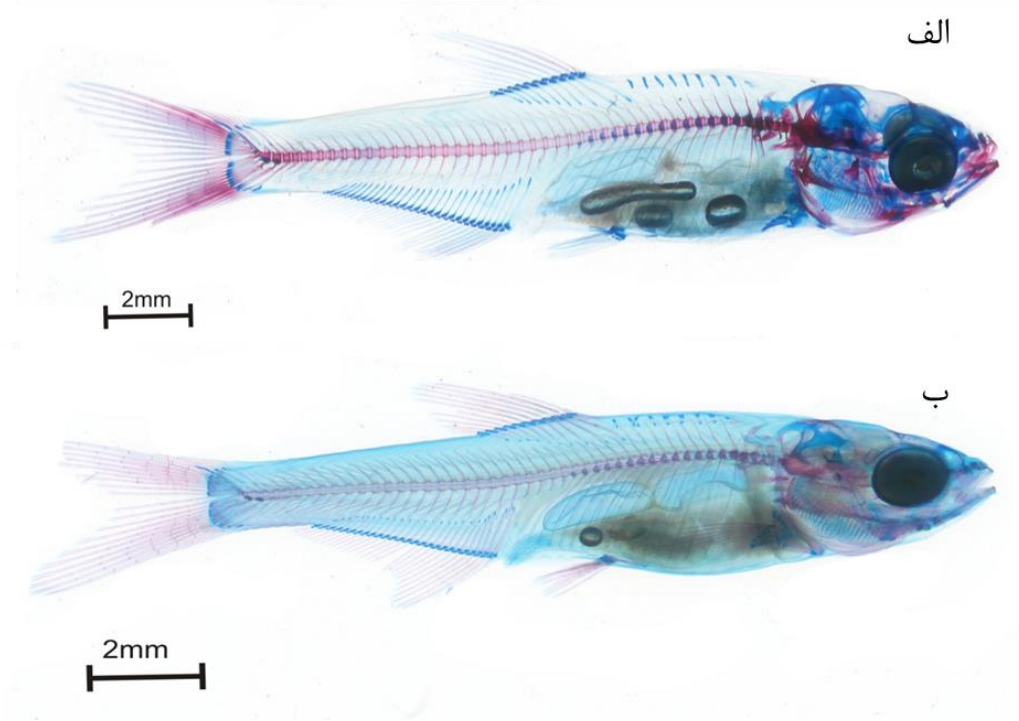
جدول ۱ - تفاوت‌های روش رنگ آمیزی در دو روش کاربرد اسید و عدم کاربرد اسید.

مراحل انجام کار	گروه ۱	گروه ۲
شستشو و آبدهی	۲۰ دقیقه	۲۰ دقیقه
رنگ آمیزی غضروف	۲۴ ساعت	–
خنثی‌سازی	۳ الی ۵ دقیقه	–
آب دهی دوباره	۳۰ دقیقه	–
رنگ آمیزی همزمان غضروف و استخوان	–	۱۰ الی ۱۵ ساعت
شفاف‌سازی	۱۰ الی ۲۰ ساعت	۱۰ الی ۲۰ ساعت
رنگ آمیزی استخوان	۵ الی ۱۰ ساعت	–
رنگ بری	۳۰ دقیقه	۳۰ دقیقه
شستشوی نهایی	۱۰ دقیقه	۱۰ دقیقه
آب گیری	۲٤ ساعت	۲٤ ساعت

نتایج

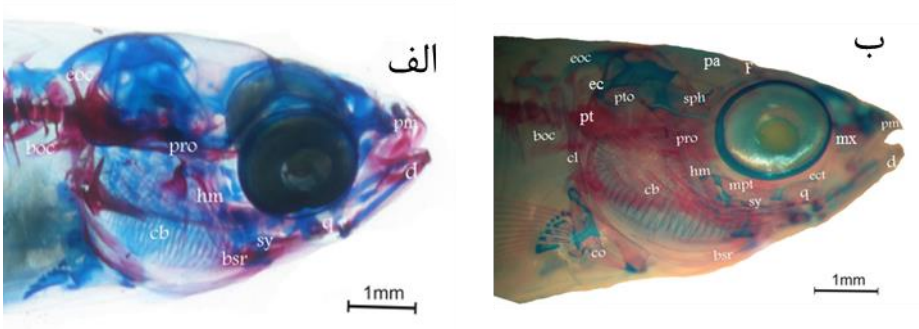
نتایج نشان داد که استفاده از هر دو دستورالعمل منجر به شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی مناسب غضروف و استخوان بچه ماهی سیم معمولی می‌گردد (شکل ۱). در روش اول (دستورالعمل رنگ آمیزی بدون پایه اسید) ماهی شفاف شده از وضوح بیشتری برای بررسی غضروف و استخوان‌ها برخوردار بود ولی با تسلسل الگوی استخوانی شدن بخش‌های غضروفی تطابق داشت (شکل ۱ الف). مقایسه دو روش رنگ‌آمیزی نشان داد که در بچه ماهی سیم رنگ‌آمیزی شده تفاوت‌هایی در میزان و نحوی استخوانی شدن در بخش باله‌ها وجود دارد. براساس دستورالعمل رنگ‌آمیزی بدون پایه اسید، بخش‌های مختلفی از استخوان‌های کمربند باله سینه‌ای شامل غرابی (Cleithrum)، ترقوه (Caracoid)، شانه‌ای (Scapula) و شعاع‌ها استخوانی شده‌اند. در باله‌های پشتی و مخرجی، شعاع‌ها و بخش اعظمی از پرتوپایه‌ها (Pterygiophores) استخوانی بودند. هم‌چنین مشاهده شد که تمام بخش‌های باله دمی مانند هیپورال (Hypural)، ایپورال (Epural)، یورستیل (Urostyle) و شعاع‌های آن استخوانی شده‌اند. در بخش باله شکمی نیز استخوان پایه رجلی (Basipterygium) و شعاع‌های متصل به آن روند استخوانی شدن را طی کرده بودند. در مقابل در دستورالعمل رنگ‌آمیز به روش مجزا بر پایه اسیدی، بخش بیشتری از باله دمی و شعاع‌های باله سینه‌ای استخوانی شده و سایر بخش‌ها همچنان غضروفی به نظر می‌رسیدند.

در بخش ستون مهره، تنها تفاوت بین دو روش رنگ‌آمیزی در میزان استخوانی شدن مهره‌ها و بخش‌های از استخوان‌های دنده بود که این میزان در استخوانی شدن در روش بر پایه اسیدی کمتر نمود داشت در حالی که در روش بر پایه غیر اسیدی کامل بود (شکل ۱).



شکل ۱- شکل کامل بچه ماهی ۳۵ روزه: (الف) رنگ آمیزی برپایه اسیدی و (ب) رنگ آمیزی بر پایه غیر اسیدی.

در بخش سر، تفاوت عمده‌ای در میزان استخوانی شدن در ناحیه اسکلت سر بین دو تیمار مشاهده گردید. بررسی میکروسکوپی نشان داد که در نمونه‌های روش رنگ آمیزی همزمان بر پایه بدون اسید تعداد بخش‌های استخوانی شده بیشتری نمایان بودند که از آن جمله می‌توان به استخوان‌های پیش فکی (Premaxillary)، دندانی (Dentary)، مربعی (Quadrate)، رجلی داخلی (Ectopterygoid)، رجلی میانی (Metapterygoid)، ساده (Symplectic) ، فکی-لامی (Hyomandibular)، غضروفی آبششی (Ceratobranchial)، شعاع‌های آبششی (Branchiostegals) از ناحیه جمجمه احشایی و استخوان‌های پیش گوشی (Prootics) و بالی گوشی (Ptrootic)، پروانه‌ای (Sphenotic)، برون پس سری (Exooccipital) و پایه پس‌سری (Basioccipital)، پیشانی (Frontals) و آهیانه (Parietal) از ناحیه جمجمه عصبی اشاره کرد (شکل ۲). استخوان‌های قابل تشخیص در نمونه‌های روش رنگ آمیزی مجزا بر پایه اسیدی شامل استخوان های پیش فکی، دندانی، مربعی، ساده، فکی-لامی، غضروفی-آبششی، شعاع‌های آبششی در منطقه جمجمه احشایی و استخوان‌های بالی گوشی، برون پس‌سری و پایه پس‌سری از بخش جمجمه عصبی بودند (شکل ۲). بیشتر استخوان‌های در روش رنگ آمیزی با پایه اسیدی به نسبت روش بدون پایه اسیدی از شدت استخوانی شدن کمتری برخوردار که می‌توان به استخوان‌های شعاع‌های آبششی، مربعی و ساده اشاره کرد (شکل ۲).



شکل ۲- شکل بخش سر بچه ماهی ۳۵ روزه: (الف) رنگ آمیزی برپایه اسیدی، و (ب) رنگ آمیزی بر پایه غیر اسیدی. سیر تکوین ساختار استخوان های در لارو ماهی سیم معمولی . : boc: پایه پس سری- bsr: شعاع آبششی- cl: ترقوه- cb: غضروفی آبششی- co: غرابی -d: دندانی- ect: برون بالی- eoc: برون پس سری- eo: رو گوشی یا رو پس سری- F: پیشانی -hm: هیوماندیبولار (لامی فکی) - mx: فکی- mpt: میان بالی- pa: آهیانه -pm: پیش فکی- pt: پس گیچگاهی- pro: پیش گوشی pto-: بالی گوشی - q: مربعی- sym: ساده و sph: پروانه ای

بحث

در لاروها و بچه ماهیان در مراحل اولیه تکوین بخش‌های مختلف اسکلت شامل غضروف و استخوان در حال شکل‌گیری است. این مسئله از آن جهت اهمیت پیدا می‌کند که نمونه ما در این مرحله علاوه بر استخوانی با تراکم کلسیم بالا دارای بخش‌هایی نیز می‌باشد که در حال استخوانی شدن هستند. بنابراین این ویژگی کمک می‌کند که کوچکترین تفاوت در نتیجه استفاده ار پروتکل تعریف شده به خصوص در مورد استخوان های در حال تشکیل قابل تشخیص باشد. در مطالعات تکوین ماهیان درک تسلسل و الگوی تغییرات از جمله استخوانی شدن از نتایج اصلی چنین مطالعاتی می‌باشد، چرا که شناخت روند ریخت‌زایی و تغییرات ساختاری آن‌ها در مدیریت پرورش لارو ماهیان برای شناخت نیازهای زیستی و تغذیه ای آن‌ها بر اساس این تغییرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. از این رو روشی که بتواند چنین تسلسل تغییرات ریختی را با وضوح بیشتری را آشکار سازد، اهمیت بیشتری خواهد داشت. هرچند که دستورالعمل رنگ‌آمیزی بدون پایه اسید وضوح بیشتری را در تفکیک ساختارهای استخوانی و غضروفی نشان داد، ولی روش بدون پایه اسید این تسلسل تغییرات ریختی را به خوبی آشکار نمود.

روش رنگ‌آمیزی آلیسان بلو و آلیزارین رد بر پایه اسیدی از روش‌های قدیمی برای رنگ آمیزی غضروف و استخوان در مهره‌داران می‌باشد (۴، ۵، ۱۲) که در مطالعات متعددی برای رنگ آمیزی استخوان و غضروف ماهیان (۱۶-۱۳)، بررسی بدشکلی در گونه‌های پرورشی (۲، ۳، ۸، ۱۷-۲۳) و هم چنین برای بررسی تاثیر غذا بر روی اسکلت ماهیان استفاده شده (۲، ۲۰، ۲۱) و در طی این مطالعات و براساس تجارب، اصلاحات متعددی برای افزایش کارایی آن‌ها ارائه شده است. برای مثال Gavaia و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشته‌اند که آبدهی نمونه‌ها قبل از رنگ‌آمیزی غضروف در کیفیت رنگ‌آمیزی نسبت به زمانی که نمونه‌ها مورد آب‌گیری قرار نگیرند و مستقیم از مرحله تثبیت نمونه‌ها با فرمالین به محلول رنگ‌آمیزی غضروف منتقل شوند، اثرات بسیار مثبتی دارد (۱۶). براساس Gavaia و همکاران (۲۰۰۰) محلول الکل و KOH جهت خنثی‌سازی اسید باقی مانده

در محلول رنگ‌آمیزی غضروف و جلوگیری از آسیب به ساختار های استخوانی- غضروفی مورد توصیه گردید چراکه استفاده از pH بالا می‌تواند جهت جلوگیری از دست رفتن کلسیم و بافت‌های استخوان و در نتیجه دستیابی به کیفیت بالاتر رنگ آلیزارین رد مورد استفاده قرار گیرد (۱۶). ولی روش‌های استفاده از رنگ‌آمیزی بدون پایه اسیدی در مطالعات کمی مورد بررسی قرار گرفته است (۹، ۲۶-۲۴).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان بدون پایه اسیدی می‌تواند امکان تشخیص برخی از ساختارهای استخوانی را آسان‌تر نماید به‌خصوص استخوان‌هایی که دارای رسوب کمی از مواد معدنی در یک زمان خاص از تکوین مثلاً ۳۵ روزگی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به استخوان‌های برون و میان بالی، پروانه‌ای و پیشانی در بخش اسکلت سر و یا شعاع های و پرتوپایه‌ها در باله پشتی و مخرجی و همچنین استخوان‌های غرابی و شانه‌ای در باله سینه‌ای اشاره کرد. در مطالعه Walker و Kimmel (۲۰۰۷) بر روی ماهی زبرا (*Danio rerio*)، مشاهده کردند که در بخش اسکلت سر نمونه‌های که از رنگ‌آمیزی بدون پایه اسیدی استفاده شده بودند، استخوان هایی مانند پرا پروانه‌ای (Parasphenoid)، استخوان‌های پس سری، نوتوکرد، سرپوش آبششی، پایه آبششی‌ها و برون بالی قابل تشخیص بودند در حالی که در نمونه‌هایی که با رنگ آمیزی پایه اسیدی انجام شده بو،د تنها بخش استخوانی قابل تشخیص نوتوکرد بود (۹).

تشخیص به موقع زمان استخوانی شدن اندام‌های مختلف و هم چنین بدشکلی‌های استخوانی در آبزیان و ماهی پرورشی در جهت تشخیص نیاز گونه‌ای اهمیت بالایی در جهت صحیح پرورشی آن‌ها دارد. به‌عنوان مثال، بررسی روند تغییرات ساختاری قطعات دهانی ماهیان و حضور و یا عدم حضور بخش‌هایی در اسکلت این بخش می‌تواند اطلاعات با ارزشی از استراتژی‌ها و رفتارهای تغذیه‌ای در مراحل اولیه تکوین فراهم می‌آورد. همچنین استخوانی شدن بخش فک‌ها در لاروها و بچه ماهیان می‌تواند بیانگر نیازهای جدید و/ یا تغییر در رفتار تغذیه‌ای گونه و رژیم غذایی لارو و بچه ماهیان باشد. در این حالت ممکن لارو یا بچه ماهیان از نحوی تغذیه به روش مکش غذا به سمت گاز زدن و یا بلع یک باره غذا یا بالعکس تغییر فاز دهند. همچنین ایجاد سرپوش و شعاع‌های آبششی در لارو و بچه ماهیان نمودی در افزایش ظرفیت تنفسی و تغییر فاز از تنفسی پوستی به تنفس آبششی که کارایی بالاتری دارد می‌باشد (۲۷) که پاسخی در جهت فزایش میزان متابولیسم موجود در لارو ماهیان است. استخوانی شدن بخش‌های مختلف باله مانند شعاع‌ها می‌تواند یک نقطه عطفی در تغییرالگوی شنای به حساب آید. بنابران مجموعه اطلاعات تکوین ساختار اسکلتی ماهیان می‌تواند ما را در رسیدن به بیوتکنیک پرورش ماهیان تجاری و دست یابی به حداکثر محصول با کیفیت مناسب و بازار پسندی بالا کمک نماید.

نتیجه گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان داشت که در مطالعات تکوین اولیه ماهیان استخوانی استفاده از روش رنگ‌آمیزی غضروف و استخوان بر پایه عدم استفاده از اسید مناسب‌تر از روش بر پایه استفاده از اسید می‌باشد چراکه این روش در دوره اولیه تکاملی که بخش‌های

مختلف لارو ماهیان در حال شکل‌گیری به درک تسلسل و الگوی تغییرات با دقت بیشتری کمک می‌نماید و امکان تشخیص سریع‌تر را در پرورش لارو ماهیان فراهم آورد.

فهرست منابع

۱. نصری، م.، کیوانی، ی.، ایگدری، س. (۱۳۹۴). ماهی و باستان‌شناسی: مطالعاتی در استخوان‌سنجی، مردارشناسی، تغییرات فصلی و روش‌های صیادی. تحقیقات آموزش کشاورزی، تهران، ۱۶۶ ص.

2. Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Glynatsi, N., Christodoulopoulou, S., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. (2010). Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrachus labrax*, Linnaeus, 1758). Aquaculture, 298; 300-307.

3. Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P., Kentouri, M. (2002). Kyphosis in reared European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. Aquaculture, 209; 49-58.

4. Dingerkus, G, Uhler, L.D. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Technology, 52; 229-232.

5. Taylor, W.R., Van Dyke, G.C. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. Journal of Cybium, 9; 107-119.

6. Adrianes, D., Verraes, W. (1998). Ontogeny of the Osteocranium in the African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822) (Siluriformes: Clariidae): Ossification Sequence as a Response to Functional Demands. Journal of Morphology, 235; 183-237

7. Gisbert, E. (1999). Early development and allometric growth patterns in Siberian sturgeon and their ecological significance. Journal of Fish Biology, 54; 852-862.

8. Gavaia, P.J., Dinis, M.T., Cancela, M.L. (2002). Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (Solea senegalensis). Aquaculture, 211; 305-323.

9. Fraser, M. R.; Anderson, T. A.; de Nys, R. (2004). Ontogenic development of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcarifer*) culture. Aquaculture, 242, 697–711.

10. Walker, M.B., Kimmel, C.B. (2007). A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. Journal of Biotechnic and Histochemistry, 82; 23-28.

11. Hilton, E.J., Grande, L., Bemis, W.E. (2011). Skeletal Anatomy of the Shortnose Sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesueur, 1818, and the Systematics of Sturgeons (Acipenseriformes, Acipenseridae). Journal of Fieldiana Life and Earth Sciences, 3; 1-168.

12. Potthoff, T. (1984). Clearing and staining techniques. In: Ontogeny and sytematics of fishes. In: Moser H.G., Richards W.J., Cohen D.M., Fahay M.P., Kendall A.W., Richardson S.L. (Eds). The American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Spec. Publishers. 1; 35-37.

13. Faustino, M., Power, D.M. (1998). Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. Journal of Fish Biology, 52; 11-22.

14. Faustino, M., Power, D.M. (1999). Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. Journal of Fish Biology, 54; 1094-1110.

15. Faustino, M., Power, D.M. (2001). Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. Journal of Fish Biology, 58; 537-572.

16. Gavaia, P.J., Sarasquete, C., Cancela, M.L. (2000). Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. Journal of Biotechnic and Histochemistry, 75ک 79-84.

17. Marino G., Boglione C., Bertolini B., Cataudella S. (1993). Observations on development and anomalies in the appendicular skeleton of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, larvae and juveniles. Journal of Aquaculture Fish Management, 24 445-456.

18. Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M. (1997a). Normal and abnormal osteological development of caudal fin in Sparus aurata L. fry. Aquaculture, 149; 215-226.

23. (2008). Dietary vitamin mix levels influence the ossification process in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 294; 520-527.

24. Mazurais, D., Glynatsi, G., Darias, M.J., Christodoulopoulou, S., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Koumoundouros, G. (2009). Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. Aquaculture, 294; 262-270.

25. Kindblom, L.G., Angervall, L. (1975). Histochemical characterization of mucosubstances in bone and soft tissuetumors. Cancer, 36; 985-994.

26. Schofield, B.H., Williams, B.R., Doty, S.B., (1975). Alcian blue staining of

19. Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S., Kentouri, M. (1997b). The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Aquaculture, 156; 165-177.

20. Ferna´ndez, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Este´vez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E. (2008). Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture, 283; 102-115.

21. Ferna´ndez, I., Pimentel, M., Ortiz-Delgado, J.B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Este´vez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. Aquaculture, 295; 250-265.

22. Mazurais, D., Darias, M.J., Gouillou-Coustans, M.F., Le Gall, M.M., Huelvan, C., Desbruye`res, E., Quazuguel, P., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L.

cartilage for electron microscopy. Application of the critical electrolyte concentration principle. Histochemistry Journal, 7; 139-149.

27. van Eeden, F.J., Granato, M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., Warga, R.M., Allende, M.L., Weinberg E.S., Nusslein-Volhard C. (1996). Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. Development, 123; 153-164.

28. Kamler, E., Keckeis H., Bauer-Nemeschkal, E. (1998). Temperature-induced changes of survival, development and yolk partitioning in *Chondrostoma nasus*. Journal of Fish Biology, 53; 658-682.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 15, Issue 4, Number 60, Pages 13-22
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

Comparison of cartilage and bone staining methods based on using acid and acid-free protocols for study of ontogeny in common Bream (*Abramis brama*)

Mohammad Reza Sahraein[1], **Soheil Eagderi[2],** Gholamreza Rafiee[3], Arash Zibaee[4]

1.PhD graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Associate professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
Corresponding author: soheil.eagderi@ut.ac.ir
3.Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
4.Associate professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
5.Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received:2022.09.14 **Accepted: 2022.11.02**

Abstract

Introduction & Objective: The traditional method for staining cartilage and bone in vertebrates is to use Alcian blue and Alizarin red. Acid is used in the base of the ingredients of Alcian Blue solution, which led to clear distinguishing of the stained skeletal structures as much as possible. But the problem is that if acid is used, some of the bone ions are removed leading to errors in the results. Therefore, the present study aimed to compare two using acid and acid-free protocols for staining cartilage and bone during the early development of Common bream (*Abramis brama*) to provide a solution in future studies.
Material and Methods: For staining, we applied acid-based (acetic acid) and acid-free protocols using Alican blue and Alizarin red during the processing stages of watering, staining of cartilage and bone, neutralization, watering, protein digestion, color removal, and washing and clearing.
Results and Discussion: Based on the results, it can be stated that in studies of the early development of bony fishes, the use of cartilage and bone staining method based on the acid-free protocol is more suitable than using acid because this method helps to better understand the sequence and pattern of skeletal ontogeny more accurately during theearly development period.

Keywords: Osteology, larval development, Alcian blue, Alizarin red, Common bream.