

Some methods to stain cartilage and bone of vertebrates and application on small fish in museum of oceanography

Nguyen Thi My Ngan^{*}, Bui Quang Nghi, Nguyen Kha Phu, Hoang Xuan Ben

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*E-mail: myngan.ion@gmail.com

Received: 30 July 2019; Accepted: 6 October 2019

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

In a natural scientific museum as Museum of Oceanography, a specimen should be not only awesome but also scientific in order to attract visitors and introduce knowledge to them. One of the methods satisfying those requirements is “Method of staining cartilages and bones for small vertebrates”. This method was applied to handle small fish: Anchovies (*Encrasicholina devisi* (Whitley, 1940)), amphiprions (*Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830)) and ponyfish (*Leiognathus* sp.), which is highly efficient, not only used in studying fish bones and cartilages but also attractive to visitors. This paper also gives details on experiences during handling process of this method.

Keywords: Staining of cartilage and bone, *Amphiprion ocellaris*, vertebrates.

Một số phương pháp nhuộm màu động vật có xương sống và kết quả thực nghiệm trên một số loài cá kích thước nhỏ

Nguyễn Thị Mỹ Ngân*, Bùi Quang Nghị, Nguyễn Khả Phú, Hoàng Xuân Bền

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*E-mail: myngan.ion@gmail.com

Nhận bài: 30-7-2019; Chấp nhận đăng: 6-10-2019

Tóm tắt

Đối với một bảo tàng khoa học tự nhiên, hình thức trưng bày mẫu vật ngoài tính chất thẩm mỹ thu hút sự chú ý, thì tính khoa học cũng luôn được lưu tâm nhằm giúp người xem có thể tiếp cận kiến thức khoa học. Một trong những phương pháp đáp ứng được nhu cầu trên đó là “Nhuộm màu xương và sụn mẫu sinh vật có xương sống”. Phương pháp trên được ứng dụng trên 3 loài cá có kích thước nhỏ (cá lằm tròn nhẵn - *Spratelloides gracilis* (Temminck & Schlegel, 1846), cá khoang cô - *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830) và cá liệt - *Leiognathus* sp.) đã cho hiệu quả cao, vừa có thể được dùng trong nghiên cứu xương, sụn các loài cá đồng thời đạt tính thẩm mỹ, thu hút người xem. Bài báo cũng đề cập đến một số kinh nghiệm trong quá trình xử lý mẫu theo phương pháp này.

Từ khóa: Nhuộm màu sụn và xương, cá khoang cô Nemo, động vật có xương sống.

GIỚI THIỆU

Đối với một bảo tàng khoa học tự nhiên, việc tìm hiểu, ứng dụng và làm chủ những phương pháp chế tác mẫu mang tính khoa học đồng thời đủ tính thẩm mỹ để có thể thu hút công chúng là việc làm cần thiết. Vì vậy, bảo tàng luôn không ngừng tìm hiểu những phương pháp mới, áp dụng vào việc chế tác mẫu vật nhằm tạo ra những sản phẩm khoa học độc đáo, thỏa mãn nhu cầu ngày càng cao của du khách tham quan. Một trong những phương pháp đáp ứng được cả hai yêu cầu trên là chế tác mẫu bằng cách làm trong và nhuộm màu hai lần áp dụng cho động vật có xương sống.

TỔNG QUAN CÁC PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MÀU SỤN VÀ XƯƠNG ĐỘNG VẬT CÓ XƯƠNG SỐNG

Mặc dù được sử dụng lần đầu tiên trong thí nghiệm nhuộm xương bằng chất được chiết xuất từ cây thiên thảo từ thế kỷ 18 [1], phương

pháp nhuộm màu xương, sụn và làm trong cơ và các mô khác được biết đến trong nghiên cứu của Taylor (1967) [2] - thực hiện trên động vật có xương sống kích thước nhỏ. Sau đó, phương pháp nhuộm màu và làm trong xương và sụn được phát triển bởi Dingerkus & Uhler, 1977 [3]; Potthoff (1984) [4]; Kawamura & Hosoya (1991) [5], phương pháp này được sử dụng khá phổ biến trong các nghiên cứu về động vật có xương sống, góp phần làm sáng tỏ cây phả hệ các loài cá [6], cũng như nghiên cứu cấu trúc, sự hình thành xương và sụn trong các giai đoạn phát triển của ấu trùng cá [7–11]; hoặc áp dụng cho mẫu lưu trữ bảo tàng đối với bào thai hoặc những động vật có xương sống cỡ nhỏ [12]. Phương pháp được phát triển khi nhuộm enzym đôi với các dây thần kinh (phương pháp nhuộm 3 lần) [13]) nhờ đó, những nghiên cứu có thể thực hiện trên cả xương, sụn và hệ thần kinh của cá.

Tùy vào nhu cầu và mục đích nghiên cứu, phương pháp nhuộm màu và làm trong 2–3 lần sẽ được áp dụng. Đối với mẫu vật ở bảo tàng, phương pháp nhuộm màu hai lần có lẽ là phương pháp thích hợp vì đáp ứng yêu cầu thẩm mỹ bên cạnh mục đích nghiên cứu. Phương pháp này được tổng hợp bởi Taylor & Dyke (1985) [14], các tác giả đã khảo sát những qui trình nhuộm màu và làm trong tại thời điểm đó, áp dụng trên nhiều loài cá kích thước từ 10–175 mm, thậm chí cả trên lưỡng cư, thú và xương chim. Tác giả đã đề xuất qui trình nhuộm 2 lần gồm 12 bước dành cho ấu trùng cá. Căn cứ trên qui trình này, Potthoff (1984) [4] đưa ra qui trình 7 bước sau khi kinh nghiệm từ thực tế xử lý nhiều mẫu cá kích thước từ 3 mm đến hơn 500 mm. Qui trình tiếp tục được hoàn thiện gồm 9 bước bởi Helland (1988) [15] và 10 bước bởi Ambruster (1989) [1]. Cho đến nay, các qui trình này vẫn được sử dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu xương ấu trùng cá.

Dù được cải tiến, bổ sung bởi nhiều tác giả nhưng về chi tiết các bước thực hiện, qui trình nhuộm màu và làm trong xương 2 lần vẫn giữ nguyên tắc như sau: Mẫu khi cố định sẽ được nhuộm sụn bằng Alcian blue ($C_{56}H_{68}Cl_4CuN_{16}S_4$), sau đó “làm trong” các mô cơ bằng trypsin, tiếp tục nhuộm xương bằng thuốc nhuộm Alizarin red S ($C_{14}H_7NaO_7S$), tẩy thuốc nhuộm bằng dung dịch borax và trypsin trong nước cất hoặc dùng kali hydroxit 1%, cuối cùng bảo quản mẫu trong glycerin. Qui trình này có thể áp dụng cả mẫu cá, lưỡng cư, hoặc các động vật có xương sống nhỏ. Đối với cá, kích thước mẫu có thể lên đến 500 mm, áp dụng được cho cả mẫu tươi và mẫu đã lưu trữ hàng chục năm trước [14], vì vậy thích hợp với mẫu lưu trữ tại bảo tàng. Thực tế, qui trình đã được thực hiện trên mẫu vật cá, bào thai trong các bảo tàng [12, 14].

Trong nghiên cứu ấu trùng cá, phương pháp trên tuy được áp dụng phổ biến nhưng cũng thể hiện nhược điểm: Môi trường axit trong quá trình nhuộm sụn lại gây khử khoáng xương trong bước nhuộm xương tiếp theo. Để khắc phục điều này, Walker & Kimmel (2006) [14] đã phát triển phương pháp dùng clorua magie ($MgCl_2$) thay cho axit, nhờ đó, không gây tổn hại đến xương ấu trùng, phương pháp này còn

có ưu điểm mẫu sau khi nhuộm vẫn có thể dùng trong các nghiên cứu kiểu gen bằng phương pháp PCR.

Như đã nêu trên, phương pháp nhuộm màu 2 lần phù hợp với nhu cầu đa dạng hóa mẫu vật trưng bày đồng thời phục vụ mục đích nghiên cứu ở Bảo tàng Hải dương học. Tuy nhiên, để đáp ứng thị hiếu của công chúng, mẫu vật cần được chú trọng chọn lựa nhằm đạt tính thẩm mỹ cao sau khi chế tác. Trong khi đó, phương pháp nhuộm màu hai lần liên quan đến cấu tạo xương và sụn của động vật, đặc điểm này khác biệt ở từng nhóm cá, có nhóm cá xương và các tia vây cứng, thân dẹp như cá liệt, cá giò, có nhóm cá mình tròn, các tia vây ngắn như cá com. Ngoài ra, các nhóm cá còn khác nhau ở sự hiện diện của lớp vây bên ngoài. Tất cả những đặc điểm cấu tạo trên có thể ảnh hưởng đến chất lượng và cảm quan thẩm mỹ về mẫu vật. Điều này chưa được đề cập trong các nghiên cứu đã có, cũng có thể vì nhu cầu trưng bày không được chú trọng ở các thí nghiệm khoa học trước đây. Bài báo được thực hiện dựa trên những kết quả thực nghiệm đối với một số loài cá kích thước nhỏ, trình bày quy trình nhuộm và những điều cần lưu ý trong quá trình tiến hành nhằm đạt được những mẫu vật vừa có tính thẩm mỹ vừa đạt được tính khoa học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu vật

Ngày 7/6/2018, tiến hành thu mẫu: Cá làm tròn nhẵn - *Spratelloides gracilis* (Temminck & Schlegel, 1846), cá khoang cổ - *Amphiprion ocellaris* (Cuvier 1830), cá liệt *Leiognathus* sp.,... Cá chọn làm mẫu đều tươi hoặc còn sống, chiều dài toàn thân không quá 8 cm:

Cá liệt: Đại diện cho nhóm cá không có vây, thân mỏng đẹp, các tia vây cứng, có thể tạo hình đẹp; số lượng 3 mẫu, chiều dài từ 5,5–6,5 cm.

Cá làm tròn nhẵn: Đại diện cho nhóm cá thân tròn, dài, vây mỏng, các tia vây nhỏ; số lượng 5 mẫu, chiều dài từ 6–6,7 cm.

Cá khoang cổ Nemo: Đại diện cho nhóm cá nhiều vây; số lượng 3 mẫu, chiều dài từ 4–4,4 cm.

Hóa chất

Formalin (H₂CO), cồn ethanol (C₂H₅OH), a xít acetic (CH₃COOH), thuốc nhuộm sụn Alcian Blue 8X, thuốc nhuộm xương Alizarin Red S, sodium borate, oxy già (H₂O₂), kali hidroxit (KOH), nước cất, men trypsin.

Dụng cụ

Lọ thủy tinh 25 đến 500 ml, cốc đong 50 ml và 500 ml, bình thủy tinh pha hóa chất, thìa khuấy, ống nghiệm và lọ thủy tinh đựng mẫu, giấy nhôm, lọ thủy tinh đựng mẫu.

Nhuộm màu mẫu vật

Tiến hành xử lý mẫu theo qui trình 9 bước của Helland (1988) [15]:

B1. Làm chết cá: Đối với cá khoang cổ, cho vào nước một ít formol, tăng dần nồng độ cho đến khi cá chết hoàn toàn, định hình mẫu, căng vây.

B2. Cố định mẫu trong Formalin 4% có dung dịch đệm Phosphat: Tỷ lệ formalin/cá: 10/1; Thời gian cố định mẫu: 2 ngày.

B3. Nhuộm sụn: Vớt mẫu từ dung dịch cố định, rửa kỹ bằng nước ngọt, ngâm vào dung dịch ethanol 50% trong 4 ngày, tiếp tục ngâm trong ethanol 95% trong 2 ngày, sau đó tiến hành nhuộm sụn bằng thuốc nhuộm Alcian blue 8X. Dung dịch nhuộm gồm 35 ml Ethanol 95% +15 ml axit axetic +10 mg Alcian Blue 8X. Nhuộm sụn trong 22 h.

B4. Trung hòa mẫu đã nhuộm bằng Sodium borate bão hòa trong 2 ngày.

B5. Tẩy trắng 15 ml 3% oxy già và 85 ml 1% kali hidroxit. Thời gian tẩy 6 h.

B6. Làm trong bằng dung dịch pha theo tỉ lệ 35 ml Sodium borax bão hòa + 65 ml nước cất + bột trypsin. Sau 5 ngày, mẫu đạt độ trong khoảng 70%.

B7. Nhuộm xương bằng Alizarin Red S pha trong Kali hidroxit 1% theo tỉ lệ 100 ml kali hidroxit và 1 mg Alizarin Red S. Thời gian nhuộm trong vòng 1 ngày.

B8. Tẩy chất nhuộm dung dịch pha theo tỉ lệ 35 ml sodium borax bão hòa +65 ml nước cất. Thời gian tẩy: 2 ngày.

B9. Bảo quản trong dung dịch glycerin và kali hidroxit lần lượt theo tỉ lệ 30% glycerin + 70% kali hidroxit 1% trong 10 ngày, tiếp tục với dung dịch 2 theo tỉ lệ 60% glycerin + 40% kali hidroxit 1% trong 10 ngày, cuối cùng giữ mẫu lâu dài trong 100% glycerin.

Đánh giá hiệu quả việc ứng dụng phương pháp nhuộm màu và làm trong




Đánh giá hiệu quả của việc ứng dụng kỹ thuật nhuộm màu và làm trong sinh vật trong việc chế tác mẫu bằng cách phát phiếu khảo sát ý kiến nhận xét về các mẫu đã thực hiện.

KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM TRÊN MỘT SỐ LOÀI CÁ KÍCH THƯỚC NHỎ

Nhuộm màu mẫu vật

Kết quả quá trình nhuộm màu và làm trong mẫu vật theo qui trình của Helland (1988) [6] cho ra sản phẩm với các bước cụ thể như sau:

Bảng 1. Các bước thực hiện phương pháp nhuộm màu và làm trong mẫu vật

Nội dung	Cá liệt	Cá làm tròn nhẵn	Cá khoang cổ
Mẫu cá	Cá tươi	Cá tươi	Cá còn sống, làm chết cá từ từ trong formol
Xử lý mẫu ban đầu			
	Hình 1. Mẫu cá liệt cố định, thước 1 cm	Hình 2. Mẫu cá làm tròn nhẵn cố định, thước 1 cm	Hình 3. Mẫu cá khoang cổ cố định, thước 1 cm
Cá được cố định hoàn toàn, đuôi và các vây xòe ra, cứng cứng			

Nhuộm sụn



Hình 4. Mẫu cá liệt nhuộm sụn



Hình 5. Mẫu cá làm tròn nhẵn nhuộm sụn



Hình 6. Mẫu cá khoang cổ nhuộm sụn

Bất màu xanh thấy rõ nhất ở vùng viền mắt và các đầu vây

Trung hòa và tẩy trắng



Hình 7. Các mẫu đang được trung hòa và tẩy trắng

Trước và sau khi tẩy trắng, màu xanh trên mẫu cá thay đổi không đáng kể, nhưng phần cơ đã khá trong, có thể thấy xương sống ở cá liệt

Làm trong	Sau 6 ngày, phần cơ khá trong, riêng ruột cá vẫn giữ màu đục	Sau 6 ngày, cá trong hoàn toàn kể cả phần ruột	Sau 7 ngày, cá khá trong
Nhuộm xương	Sau 1 ngày ngâm trong dung dịch nhuộm, cá bắt màu hồng đậm ở các tia vây, đuôi và xương sống, toàn thân cá đã trong suốt		Xương, tia vây và cả vây đều bắt màu tím hồng, mắt cá vàng, cá chưa trong
Tẩy chất nhuộm	Không tẩy		Giữ trong dung dịch kali hydroxit trong 2 ngày trước khi tiến hành bảo quản
Bảo quản	Dung dịch 1: <i>Bảo quản bằng kali hydroxit 1% và glycerin theo tỉ lệ 70/30</i> Cá khá trong, xương cá bắt màu tím hồng rõ nét, tất cả mẫu đều có bọt khí trong bụng, màu xanh của sụn còn lại rất ít, chỉ còn lại viền mảnh quanh mắt	Cá trong suốt, xương và tia vây có màu tím hồng, màu xanh sụn còn ở viền mắt, gốc vây hậu môn, gốc vây ngực	Cá chưa trong hoàn toàn, không còn màu xanh sụn, Xương, tia vây và vây màu hồng nhạt
	Dung dịch 2: <i>Bảo quản bằng kali hydroxit 1% và glycerin theo tỉ lệ 60/40</i> Cá trong suốt, xương hồng tím, màu xanh của sụn có thể thấy ở viền mắt và các gốc mang		Cá tương đối trong, xương và vây còn lại màu hồng tím, gốc mang màu xanh



Hình 8. Mẫu cá liệt đã xử lý xong



Hình 9. Mẫu cá làm tròn nhẵn đã xử lý xong



Hình 10. Mẫu cá khoang cổ đã xử lý xong

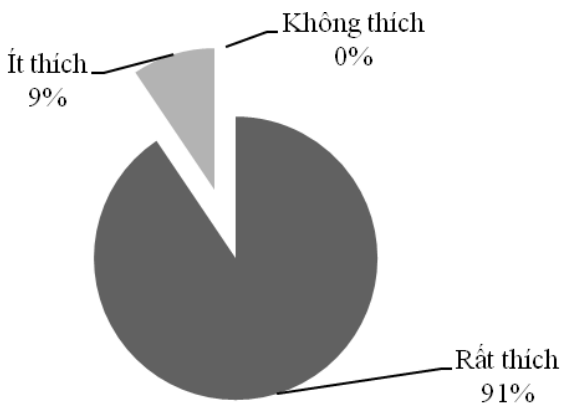
Dung dịch 3: Bảo quản trong glycerin

Mẫu vật hoàn thiện

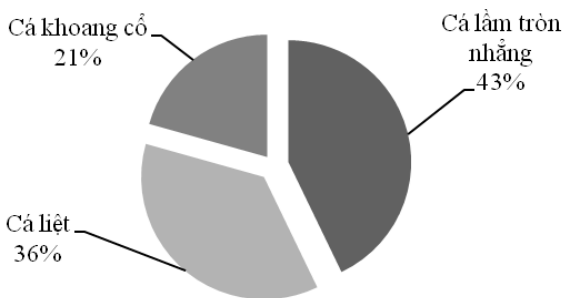


Hình 11. Mẫu vật hoàn thiện

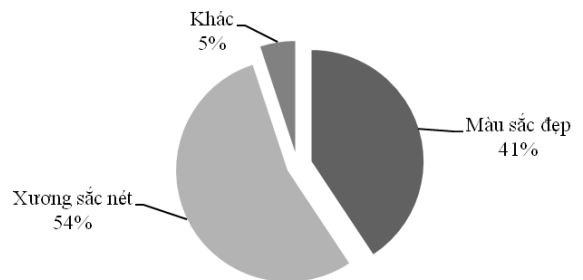
Đánh giá hiệu quả việc ứng dụng kỹ thuật nhuộm màu trong xử lý và chế tác mẫu



Hình 12. Biểu đồ về kết quả khảo sát mức độ ưa thích mẫu vật



Hình 13. Biểu đồ về kết quả khảo sát mức độ ưa thích đối với từng mẫu vật



Hình 14. Biểu đồ về kết quả khảo sát lý do ưa thích mẫu vật

Kết quả khảo sát ý kiến của 53 khách tham quan (25 nam và 28 nữ) ở độ tuổi từ 18 đến 58 thể hiện trong hình 12–14.

THẢO LUẬN

Về qui trình xử lý mẫu vật

Đối với mẫu động vật có xương sống, qui trình thực hiện theo Helland (1988) [15] có thể xem là hướng dẫn chi tiết nhất, áp dụng cho 3 kích thước mẫu 10–80 mm, 80–200 mm và lớn hơn 200 mm. Đây là chỉ dẫn rất quan trọng liên quan đến thời gian xử lý mẫu bởi với các chất tẩy mạnh như kali hydroxit hoặc oxy già, thời gian xử lý chỉ cần thay đổi vài giờ cũng có thể dẫn đến tình trạng mẫu bị phân rã hoặc không chứa đủ độ mềm của cơ. Mặc dù vậy, hướng dẫn trong qui trình cũng có một số nội dung được định lượng một cách tương đối như

“không được tẩy quá lâu” hoặc “ngâm mẫu có đến khi độ trong đạt 60%”. Đối với những người lần đầu tiên áp dụng, rất khó có thể chắc chắn mẫu đã đủ độ tẩy trắng và độ trong hay chưa, do vậy, qui trình cần được thực hiện nhiều lần để rút ra kinh nghiệm cụ thể cho những lần xử lý mẫu sau.

Sự khác biệt giữa các nhóm mẫu trong quá trình xử lý

Cá thí nghiệm được chọn thuộc 3 nhóm có những đặc điểm khác biệt như: Cá lìm tròn nhẵn thân tròn, dài, không có vây; cá liệt thân dẹp, mỏng, da trơn láng; cá khoang cổ thân dẹp, mỏng, có vây, viền các vây tròn và rõ nét. Thực tế trong quá trình thực hiện hầu như không có khác biệt lớn giữa các nhóm mẫu. Ở cá khoang cổ, thời gian xử lý một số giai đoạn hơi dài hơn so với 2 mẫu còn lại như: Mẫu bắt màu chậm hơn khi nhuộm sụn, quá trình làm trong mẫu cũng lâu hơn và kết quả cảm quan cũng cho thấy cá ít trong hơn. Có thể cấu tạo xương và thịt của cá khoang cổ cứng, chắc hơn hai nhóm còn lại nên thời gian đáp ứng với các loại hóa chất chậm hơn, điều này để kết luận, cần được kiểm chứng. Tuy nhiên, có một điều chắc chắn là mỗi loại mẫu sẽ cần thời gian xử lý khác nhau. Vì vậy, dù đã có qui trình hướng dẫn cụ thể, các bước thực hiện cũng cần được theo dõi một cách thận trọng, đảm bảo chất lượng mẫu qua từng giai đoạn xử lý.

Một số lưu ý khi xử lý mẫu vật

Ở giai đoạn xử lý ban đầu, đối với những mẫu có cơ dày, nên lạng bớt ở bên phần thân trái để hóa chất thấm nhanh và quá trình làm trong cũng được rút ngắn lại, điều này đã được đề cập trong chỉ dẫn của Helland (1988) [15] và kiểm chứng qua quá trình thực hiện.

Ở giai đoạn tẩy trắng bằng oxy già và kali hydroxit, cần theo dõi sát sao vì hóa chất sử dụng có tác dụng tẩy rất mạnh, nếu để quá thời gian, có thể làm hỏng mẫu như nở mắt thậm chí rã toàn bộ thân cá. Quá trình này nếu thực hiện tốt thì sau khi hoàn tất, một số mẫu nhỏ đã đạt đủ độ trong, có thể bỏ qua bước xử lý tiếp theo.

Ở giai đoạn làm trong, đối với những mẫu nhỏ, men trypsin có thể không cần dùng đến, nhưng với mẫu lớn, nhất thiết phải bổ sung vào nhằm thúc đẩy quá trình phân giải chất đạm, làm cho mẫu nhanh trong.

Đối với những mẫu trung bày, sau khi hoàn tất qui trình, mẫu vật chưa hoàn toàn trong hẳn mà nhờ hiệu ứng thị giác khi đặt mẫu trong glycerin sẽ cho hình ảnh trong suốt hơn mẫu thực, chính vì vậy, chất lượng glycerin và lọ thủy tinh đóng góp vai trò quan trọng đối với tính thẩm mỹ của mẫu.

Mẫu vật trải qua hai lần nhuộm sụn màu xanh và nhuộm xương màu hồng tím nhưng trong thực tế đối với cả 3 loại cá, màu xanh hầu như không đáng kể, có thể do 3 nhóm đều là cá xương, phần sụn không còn nhiều trong cơ thể đủ để tạo ra ấn tượng về màu xanh. Từ thực tế trên, khi tiến hành xử lý mẫu nên cần nhắc có hay không thực hiện bước nhuộm sụn đối với các nhóm cá xương, bởi nếu bỏ qua giai đoạn này sẽ giảm được thời gian và cả chi phí hóa chất.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Hải dương học đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài này, xin cảm ơn các đồng nghiệp đã có những đóng góp ý kiến rất chân thành trong quá trình thực hiện đề tài cũng như hoàn thiện bài báo trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Pramod, K. L., and Vaswani, V. R., 2011. Museum preservation of skeleton of fetus & small vertebrates. *Recent Research in Science and Technology*, 3(2), 54–58.
- [2] Armbruster, J. W. 1989. Clearing and staining method. (<http://www.aquamedia.org/FileLibrary/27/Diagnostics%20-%20Staining.pdf>).
- [3] Dingerkus, G., and Uhler, L. D., 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology*, 52(4), 229–232.
- [4] Bensimon-Brito, A., Cardeira, J., Dionísio, G., Huysseune, A., Cancela, M. L., and Witten, P. E., 2016. Revisiting in vivo staining with alizarin red S—a valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Developmental Biology*, 16(1), 1–10.

- [5] Lewis, L. M., Lall, S. P., and Witten, P. E., 2004. Morphological descriptions of the early stages of spine and vertebral development in hatchery-reared larval and juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 241(1–4), 47–59. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.08.018.
- [6] Gavaia, P. J., Sarasquete, C., and 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. *Biotechnic & Histochemistry*, 75(2), 79–84.
- [7] Taylor, W. R., 1967. Outline of a method of clearing tissues with pancreatic enzymes and staining bones of small vertebrates. *Turtox News*, 45, 308–309.
- [8] Potthoff, T., 1984. Clearing and staining techniques. In: Moser, H. G. (Ed.), *Ontogeny and Systematics of Fishes. Special Publication-American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, Vol. 1. Allen Press, Lawrence, KS, USA, pp. 35–37.
- [9] Kawamura, K., and Hosoya, K., 1991. A modified double staining technique for making a transparent fish-skeletal specimen. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture (Japan)*, 20, 11–18.
- [10] Fjellidal, P. G., Totland, G. K., Hansen, T., Kryvi, H., Wang, X., Søndergaard, J. L., and Grotmol, S., 2013. Regional changes in vertebra morphology during ontogeny reflect the life history of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Anatomy*, 222(6), 615–624.
- [11] Song, J., and Parenti, L. R., 1995. Clearing and staining whole fish specimens for simultaneous demonstration of bone, cartilage, and nerves. *Copeia*, 114–118.
- [12] Rosa-Molinar, E., Proskocil, B. J., Ettl, M., and Fritzsche, B., 1999. Whole-mount procedures for simultaneous visualization of nerves, neurons, cartilage and bone. *Brain Research Protocols*, 4(2), 115–123.
- [13] Taylor, W. R., 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9, 107–119.
- [14] Walker, M. B., and Kimmel, C. B., 2007. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotechnic & Histochemistry*, 82(1), 23–28.
- [15] Helland, I. S., 1988. On the structure of partial least squares regression. *Communications in statistics -Simulation and Computation*, 17(2), 581–607.
- [16] Johnson, G. D., and Anderson Jr, W. D., 1993. Proceedings of the Symposium on Phylogeny of Percomorpha, June 15-17, 1990, held in Charleston, South Carolina at the 70th Annual Meeting of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- [17] Summer, A., 2013. On the clarity of animals: the art and science of clearing and staining. <http://www.southernfried-science.com/on-the-clarity-of-animals-the-art-and-science-of-clearing-and-staining>. Truy cập ngày 12/9/2018.