



مجله علمی تخصصی انگل‌شناسی و بیولوژی ناقلین بیماری

بهره‌برداری و پرورش آبزبان
جلد پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۵
<http://japu.gau.ac.ir>

بررسی ساختار بافتی و هیستوشیمی لبه روپوش دوکفه‌ای (*Chlamys ruschenbergerii*)

فاطمه پرویزی^۱، ملیحه‌الزمان منصفی^۲، امیر قادرمرزی^۳ و *محمدشریف رنجبر^۴

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست دریا، دانشگاه هرمزگان، آستاد گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشجوی دکتری

شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲استادیار، دانشکده زیست دریا، دانشگاه هرمزگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۱

چکیده

کلسیم در شکل‌گیری پوسته صدف‌ها مشارکت دارد. تولید پوسته توسط بافت روپوش صدف صورت می‌گیرد. علی‌رغم اهمیت غیر قابل انکار بافت روپوش و کلسیم در شکل‌گیری پوسته، هیچ‌گونه مطالعه‌ای در زمینه بافت‌شناسی روپوش دوکفه‌ای‌ها و شناسایی کلسیم در این بافت، در کشور صورت نگرفته است. مطالعه حاضر جهت بررسی ساختار بافتی لبه روپوش در گونه ارزشمند *Chlamys ruschenbergerii* خلیج‌فارس و شناسایی کلسیم در این بافت می‌باشد. قسمت قدامی، خلفی و مرکز لبه روپوش هر کفه جدا گردید و رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی توسط روش هماتوکسیلین-ئوزین هریس صورت گرفت. جهت تشخیص کلسیم از دو روش آلیزارین‌رد اس و وونکوسا استفاده شد. نتایج نشان داد که لبه روپوش این‌گونه، از سه چین خارجی، میانی و داخلی تشکیل شده است که چین داخلی از سایر چین‌ها بزرگتر بود. هر یک از سه چین شکل و اندازه متفاوتی داشتند. سلول‌های موجود در این‌گونه شامل سلول‌های موکوسی، گرانول‌های قهوه‌ای، هموسیت و تارهای ماهیچه‌ای بوده و از لحاظ نوع پراکنش در سطح هر یک از چین‌ها با یکدیگر متفاوت می‌باشند. تفاوت در ساختار، ارتفاع و نوع اپی‌تلیوم، در مناطق مختلف لبه روپوش مشاهده شد. کلسیم با استفاده از دو روش ذکر شده رنگ‌نگرفته و تشخیص داده نشد.

واژه‌های کلیدی: بافت‌شناسی، لبه روپوش، دوکفه‌ای، خلیج‌فارس

*مسئول مکاتبه: sharif_ranjbar@yahoo.com

مقدمه

دوکفه‌ای‌ها نرم‌تنانی با صدف دوپاره‌ای هستند و بدن این نرم‌تنان به‌طور کامل درون دو کفه صدف جای دارد. بدن دوکفه‌ای‌ها پهن بوده و به‌وسیله بافت مهمی به‌نام روپوش پوشیده شده است. روپوش در دوکفه‌ای‌ها خارجی‌ترین اندام می‌باشد و سطح داخلی کفه‌های صدف را می‌پوشاند (فاگروس و همکاران، ۲۰۰۸ و هیکمن و همکاران، ۲۰۰۳). لبه روپوش بخش آزاد و قدامی روپوش است که یک حلقه پیرامون دهانه پوسته تشکیل می‌دهد و پس از لبه روپوش، منطقه پالیال قرار گرفته است (فاگروس و همکاران، ۲۰۰۸). مناطق مختلف لبه روپوش دارای ترشحات و وظایف مختلفی می‌باشند (اون و همکاران، ۱۹۵۸ و فاگروس و همکاران، ۲۰۰۸). از مهم‌ترین وظایف روپوش، ترشح پوسته می‌باشد.

پوسته صدف‌های مرواریدساز شامل حدود ۹۵ درصد کلسیم‌کربنات به شکل کلسیت و آراگونیت است. پوسته از سه لایه موازی تشکیل شده است (تیلور و استراک، ۲۰۰۸). تمام اجزای سازنده در هر سه لایه پوسته، توسط سلول‌های مختلف اپی‌تلیومی روپوش ترشح می‌شود (وانگ و همکاران، ۲۰۰۲). لایه داخلی پوسته که نقیر نام دارد، در مجاورت کل سطح بیرونی روپوش می‌باشد و به‌طور مداوم توسط این سطح ترشح می‌شود (هیکمن، ۲۰۰۳).

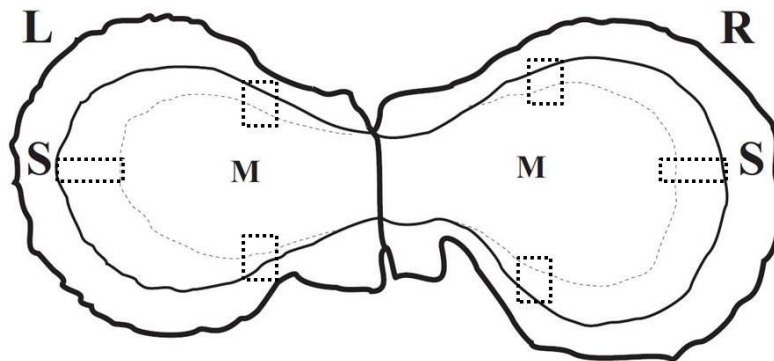
با توجه به این‌که روپوش نقش اساسی در شکل‌گیری پوسته ایفا می‌نماید و کلسیم در پوسته وجود دارد، پس انتظار می‌رود که کلسیم در بافت روپوش وجود داشته باشد. قابل ذکر است که تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در خصوص بافت‌شناسی روپوش و شناسایی کلسیم در این بافت در کشور صورت نگرفته است. لذا در تحقیق حاضر به بررسی ساختار بافتی لبه روپوش و شناسایی کلسیم در این بافت می‌پردازیم.

مواد و روش

در آبان ماه ۱۳۹۴ تعدادی موردنیاز صدف از گونه (*Chlamys ruschenbergarii* (80-90 mm)) به‌وسیله غواصی اسکوبا از جزیره قشم (E 56°16'53.55" N 26°55'34.81") استحصال گردید. پس از زیست‌سنجی اولیه و بیهوش کردن صدف‌ها با استفاده از پودر میحک، لبه بافت روپوش جداسازی گردید و در محلول بوئن (Gabe, 1968) به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس، برش‌های عرضی از قسمت کناره‌ها و مرکز لبه روپوش از هر کفه تهیه گردید (شکل ۱) و جهت انجام پاساژ

بافت در دستگاه اتوتکنیکون (DS 2080/H, Iran) قرار گرفتند. پس از قالب‌گیری و تهیه برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون از مقاطع بافتی، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین هریس انجام گردید (هاوارد و اسمیت، ۲۰۰۳).

جهت تشخیص کلسیم موجود در بافت روپوش گونه موردنظر، از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد اس (Alizarin red s) و وون کوسا (Von Kossa) استفاده شد. نمک‌های کلسیمی موجود در بافت، در روش رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد اس به صورت قرمز مایل به نارنجی در زمینه سبز روشن دیده می‌شود و در روش وون کوسا، کلسیم به رنگ سیاه، هسته سلول‌ها به رنگ قرمز و سیتوپلاسم آن‌ها به رنگ صورتی مایل به قرمز نمایان می‌شود (هاوارد و اسمیت، ۲۰۰۳).



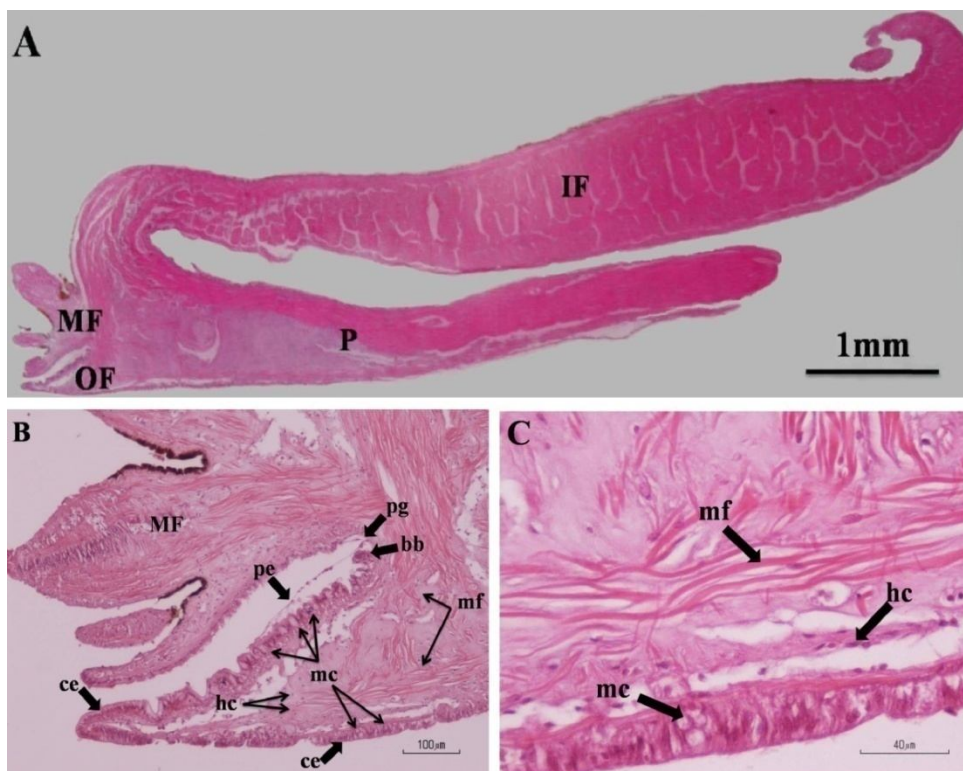
شکل ۱- برش‌های تهیه شده از لبه روپوش. L: کفه چپ، R: کفه راست، S: پوسته، M: روپوش

نتایج

بافت‌شناسی: پس از مقایسه قسمت‌های مختلف لبه روپوش، مشخص شد که برش‌های مختلف در یک کفه و همچنین، در کفه راست و چپ دارای ساختار بافتی مشابهی می‌باشند و از نظر اندازه، تفاوت‌های ظاهری بسیار جزئی در بعضی مناطق دیده شد. لبه روپوش دارای سه چین خارجی، میانی و داخلی می‌باشد که در ادامه، نتایج هر کدام از این چین‌ها تشریح شده است.

چین خارجی: چین خارجی نسبت به سایر چین‌ها کوچکتر می‌باشد (شکل ۲A). در منطقه زیرین اپی‌تلیوم این چین، تارهای ماهیچه‌ای و هموسیت دیده می‌شود (شکل ۲B, C). در پایه چین خارجی، دسته تارهای عضلانی بیشتری نسبت به نوک چین وجود دارد (شکل ۲A, B). در سمت داخلی چین خارجی سلول‌های موکوسی به‌طور متراکم اپی‌تلیوم را می‌پوشانند و در این منطقه تراکم بیشتری از

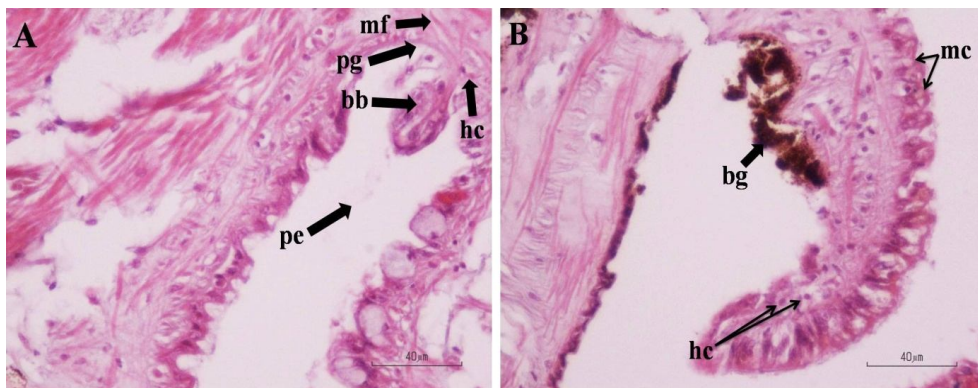
سلول‌های موکوسی نسبت به سمت بیرونی این چین مشاهده شد (شکل ۲B, C). به نظر می‌رسد سلول موکوسی در چین خارجی نسبت به سایر چین‌ها بیشتر می‌باشد (شکل ۲A, B).



شکل ۲- چین خارجی لبه روپوش *C. ruschenbergerii* (H&E). A: سه چین لبه روپوش. OF: چین خارجی، MF: چین میانی، IF: چین داخلی، P: منطقه پالیال، B: چین خارجی. ce: اپی‌تلیوم ستونی، hc: هموسیت، mc: سلول موکوسی، mf: تارهای عضلانی، pg: شیار پریوستراکال، pe: پریوستراکوم، bb: بیسال بالب، MF: چین میانی، C: سمت بیرونی چین خارجی. mc: سلول موکوسی، hc: هموسیت، mf: تارهای عضلانی.

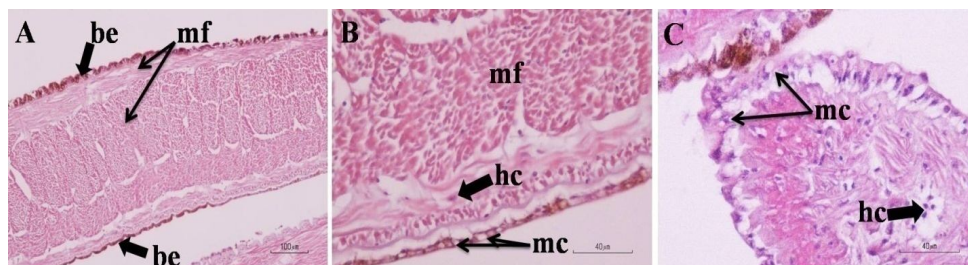
شیار پریوستراکال: بین چین خارجی و میانی شیار پریوستراکال قرار گرفته است که دسته تارهای عضلانی و هموسیت، منطقه زیرین اپی‌تلیوم این قسمت را پوشانده است. در شیار این‌گونه یک برجستگی دایره‌ای شکل مشاهده شد. ارتفاع اپی‌تلیوم پوشاننده شیار از سمت چین خارجی به سمت چین میانی کاهش می‌یابد (شکل ۲B و ۳A).

چین میانی: چین میانی در این گونه بسیار متفاوت تر از دو چین دیگر می باشد. چین میانی از چندین انشعاب با اندازه های مختلف تشکیل شده است. دسته تارهای عضلانی در بعضی نقاط به صورت مترکم قرار گرفته است و در بعضی مناطق به صورت پراکنده دیده می شود. در بعضی از مناطق اپی تلیوم چین میانی، پوشش قهوه ای رنگ وجود دارد، اما در سمت بیرونی این چین، این گرانول های قهوه ای رنگ مشاهده نشد (شکل ۲A, B). در چین میانی سلول موکوسی و هموسیت نیز دیده شد (شکل ۳B).



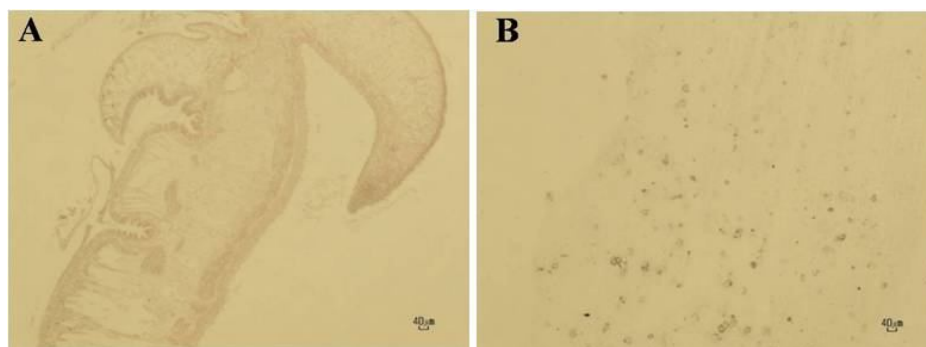
شکل ۳- A: شیار پروستراکال لبه روپوش *C. ruschenbergerii* (H&E). pg: شیار پروستراکال، pe: پروستراکوم، bb: بیسال بالب، mf: تارهای عضلانی، hc: هموسیت، B: چین میانی لبه روپوش *C. ruschenbergerii*. mc: سلول موکوسی، bg: گرانول های قهوه ای، hc: هموسیت.

چین داخلی: این چین نسبت به سایر چین ها بسیار بزرگتر و بلندتر می باشد و به سمت بخش داخلی و پشتی کفه متمایل شده است (شکل ۲A). قسمت عمده این چین را دسته تارهای عضلانی طولی و عرضی می پوشاند (شکل ۲A و ۴A). چین داخلی نسبت به دو چین دیگر دارای دسته تارهای عضلانی بیشتری می باشد (شکل ۲A). اپی تلیوم در هر دو سمت بیرونی و داخلی چین داخلی دارای پوشش قهوه ای رنگ می باشد (شکل ۲A و ۴A). در بعضی مناطق از چین داخلی سلول موکوسی مشاهده شد و هموسیت نیز در چین داخلی وجود دارد (شکل ۴B, C).



شکل ۴- چین داخلی لبه روپوش *C. ruschenbergerii* (H&E). A: دو سمت چین داخلی. mf: تارهای عضلانی، be: اپی‌تلیوم قهوه‌ای، B: سمت بیرونی چین داخلی. mc: سلول موکوسی، hc: هموسیت، mf: تارهای عضلانی، C: نوک چین داخلی. mc: سلول موکوسی، hc: هموسیت.

هیستوشیمی: با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی مورد استفاده در این مطالعه، کلسیم در بافت روپوش گونه مورد نظر رنگ نگرفته و شناسایی نشد.



شکل ۵- نتایج حاصل از دو روش رنگ‌آمیزی تخصصی کلسیم در بافت روپوش. A: رنگ‌آمیزی آلیزارین رد اس، B: رنگ‌آمیزی وون کوسا.

بحث

هر یک از سه چین لبه روپوش گونه دارای شکل و اندازه متفاوتی می‌باشند. چین داخلی بزرگترین چین و چین خارجی کوچکترین چین را تشکیل می‌دهد. چین میانی دارای ساختاری منشعب و شاخه‌ای می‌باشد. سلول‌های موجود در این‌گونه شامل سلول‌های موکوسی، گرانول‌های قهوه‌ای، هموسیت و تارهای ماهیچه‌ای بوده و از لحاظ نوع پراکنش در سطح هر یک از چین‌ها با یکدیگر

متفاوت می‌باشند. تفاوت در ساختار، ارتفاع و نوع اپی‌تلیوم، در مناطق مختلف لبه روپوش مشاهده شد. با توجه به مطالعه حاضر و مطالعات قبلی انجام‌شده (مک ایلوین و همکاران، ۲۰۱۴)، لبه روپوش در هر گونه مختلف دارای ساختار ریخت‌شناسی متفاوتی می‌باشد.

جبار ذهاب و همکاران (۱۹۹۲) بیان کردند که در گونه *Pinctada margaritifera* سمت داخلی و بیرونی چین خارجی دارای اپی‌تلیوم ستونی بوده و در نوک چین اپی‌تلیوم مکعبی وجود دارد (جبار ذهاب و همکاران، ۱۹۹۲). در مطالعه حاضر، اپی‌تلیوم مکعبی در نوک چین خارجی وجود نداشت.

در گونه *Cerastoderma edule* یک چین اضافی در سمت بیرونی چین خارجی مشاهده شده است (ریچاردسون و همکاران، ۱۹۸۱) که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد.

در گونه *C. ruschenbergerii* چین داخلی از دو چین دیگر بلندتر بوده، اما در گونه خوراکی صخره‌ای *Saccostrea cucullata* چین خارجی بلندتر از دو چین دیگر می‌باشد. در گونه *S. cucullata* لکه‌هایی به رنگ قهوه‌ای روشن در منطقه زیرین اپی‌تلیوم هر سه چین مشاهده شد که در گونه *C. ruschenbergerii* مشاهده نشد. اپی‌تلیوم قهوه‌ای‌رنگ موجود در سمت داخلی چین خارجی گونه *Pinctada radiata* و *S. cucullata* در گونه *C. ruschenbergerii* مشاهده نشد.

طبق مطالعه McElwain و Bullard (۲۰۱۴)، در گونه *Villosa nebulosa*، *Strophitus connasauagaensis* و *Fusconaia cerina* بخشی از چین میانی را اپی‌تلیوم سنگفرشی احاطه کرده است (مک ایلوین و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه حاضر، اپی‌تلیوم سنگفرشی مشاهده نشد. همچنین، بیان کردند که در سه گونه مذکور، در شیار پریوستراکال یک برجستگی مثلثی‌شکل به نام بیسال‌بالب وجود دارد، که در گونه *C. ruschenbergerii* مشاهده شد. اما این برجستگی، دایره‌ای‌شکل بود.

هیلمن و شوستر (۱۹۶۰) بیان کردند در گونه *Mercenaria mercenaria* در سمت داخلی چین داخلی یک چین اضافی که دارای لبه ضخیم‌تری نسبت به سایر چین‌ها می‌باشد، قرار دارد. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد. چین اضافی در چین داخلی گونه مورد مطالعه در این تحقیق مشاهده نشد.

تارهای ماهیچه‌ای در نقاط مختلف چین‌ها گسترش می‌یابند. انقباض ماهیچه‌ای ممکن است در شکل‌گیری پریوستراکوم تأثیر داشته باشد (چیکا، ۲۰۰۲). با توجه به این‌که تراکم و تمایل دسته تارهای عضلانی در چین خارجی و میانی در سمت بیرونی چین بیشتر می‌باشد، ممکن است انقباض و

انبساط ماهیچه‌های شیار پریوستراکال و سمت بیرونی چین میانی در شکل‌گیری پریوستراکوم خارجی تأثیر بیشتری داشته و همچنین، ماهیچه‌های سمت بیرونی چین خارجی در شکل‌گیری پریوستراکوم داخلی نقش مؤثرتری داشته باشد.

یکی از مهم‌ترین عملکردهای روپوش ترشح کلسیم می‌باشد (Bubel, 1973). یون‌های کلسیم در سلول‌های اپی‌تلیالی روپوش متمرکز هستند (میاموتو، ۲۰۰۵ و اوجیما، ۱۹۵۲) بیان کرد که در گونه *Pinctada martensii* گرانول‌های کلسیم در نزدیکی سطح داخلی و بیرونی اپی‌تلیوم و همچنین در بافت پیوندی روپوش قرار گرفته‌اند. طبق مطالعات وی، چهار نوع سلول در روپوش وجود دارد که از بین آن‌ها فقط سلول موکوسی دارای کلسیم می‌باشد. اما این نشان‌دهنده این نیست که سلول‌های موکوسی سلول‌های انحصاری و مخصوص ترشح کلسیم باشند (اوجیما، ۱۹۵۲).

نتایج مطالعه حاضر با مطالعات (اوجیما، ۱۹۵۲ و دیکس، ۱۹۷۳) مطابقت دارد. ریچاردسون و همکاران (۱۹۸۱) چهار روش رنگ‌آمیزی کلسیم از جمله آلزارین‌رد اس، وون‌کوسا، روش کلسیم قرمز و سدیم رودی‌زونات بر روی لبه روپوش و غده گوارشی سه گونه دوکفه‌ای دریایی شامل *C. edule*، *Mytilus edulis* و *Chlamys opercularis* و غده گوارشی یک شکم‌پای جزرومدی به نام *Helix aspersa* استفاده نمودند. در لبه روپوش و غده گوارشی گونه‌های دوکفه‌ای، در هیچ یک از روش‌های رنگ‌آمیزی مورد استفاده، کلسیم رنگ نگرفته و تشخیص داده نشد. اما در غده گوارشی شکم‌پای *H. aspersa* با استفاده از سه روش آلزارین‌رد اس، روش کلسیم قرمز و سدیم رودی‌زونات، کلسیم تشخیص داده شد و روش رنگ‌آمیزی وون‌کوسا موفقیت‌آمیز نبود.

(اوجیما، ۱۹۵۲) هیستوشیمی کلسیم در روپوش را، جهت شناسایی فرآیندهای شکل‌گیری مروارید و پوسته در صدف مرواریدساز *P. martensii*، مورد مطالعه قرار داد. وی از روش رنگ‌آمیزی آلزارین‌رد اس و وون‌کوسا استفاده کرد و کلسیم به‌وسیله این دو روش تشخیص داده نشد.

(دیکس، ۱۹۷۳) از روش وون‌کوسا جهت شناسایی کلسیم در چهار منطقه روپوش شامل لبه روپوش، منطقه پالیال، منطقه مرکزی و انتهایی روپوش در گونه *Pinctada maxima* استفاده کرد. وی بیان کرد در یک نوع سلول ترشحی موجود در منطقه مرکزی روپوش نمک کلسیم شناسایی شد اما در سایر مناطق رسوبات سیاه‌رنگ کلسیم وجود نداشت. در مطالعه حاضر نیز با روش وون‌کوسا کلسیمی در لبه روپوش شناسایی نشد.

ذخیره کلسیم در پا و لبه روپوش شکم پای آب شیرین *Helisoma duryi eudiscus* تشخیص داده شد (کاپور و گیپسون، ۱۹۸۲). طبق مطالعه هیچ کلسیمی داخل سلول‌های اپی‌تلیال لبه روپوش نمی‌توان تشخیص داد. احتمالاً اگر کلسیم در عرض این سلول‌ها به مایع اکستراپالیاال انتقال داده می‌شود ممکن است به شکل یونی محلول باشد و از طریق هیستوشیمی قابل تشخیص نیست. همچنین، بیان کردند که روش‌های رنگ‌آمیزی کلسیم که در نرم‌تنان دریایی موفقیت‌آمیز نبوده است، در شکم‌پایان آب شیرین موفقیت‌آمیز بوده و کلسیم شناسایی شده است. بنابراین، شکم‌پای آب شیرین دارای مکانیسمی است که توسط آن کلسیم را جذب و ذخیره می‌کند، اما نرم‌تنان دریایی ممکن است کلسیم را به شکل اجسام کروی بزرگ و متعدد ذخیره نکنند (کاپور و گیپسون، ۱۹۸۲) و همچنین (بولاندر، ۱۹۵۲) بیان کرد که نرم‌تنان، کلسیم را به شکل یونی در تولید اجزای معدنی پوسه استفاده می‌کنند (بولاندر، ۱۹۵۲). اگرچه مطالعاتی در ارتباط با هیستوشیمی کلسیم در نرم‌تنان انجام شده است، اما همچنان نیازمند مطالعات و شفاف‌سازی بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه حاضر، لبه روپوش در گونه *Chlamys ruschenbergerii* دارای سه چین می‌باشد که چین میانی دارای چندین انشعاب می‌باشد. تفاوت در ساختار و ارتفاع و نوع اپی‌تلیوم مناطق مختلف لبه روپوش نشان می‌دهد که سمت بیرونی و داخلی هر چین ممکن است دارای نقش و ترشحات اپی‌تلیومی مختلفی باشند. با توجه به این که دو روش هیستوشیمی موردنظر جهت تشخیص کلسیم موفقیت‌آمیز نبود، ممکن است کلسیم در لبه روپوش به صورت یون باشد که با این دو روش قابل تشخیص نمی‌باشد.

سپاسگزاری

مراتب تشکر و قدردانی خود را از جناب آقای دکتر محمد جواد شکرخوار و جناب آقای دکتر حمیدرضا اسماعیلی که در انجام بخش عملی این تحقیق، ما را یاری نمودند اعلام می‌نمائیم. همچنین، از *Dr. Masahiko Awaji*، به دلیل راهنمایی‌های ارزنده‌اش جهت افزایش کیفیت مقاله، کمال تشکر را داریم و از همکاری‌های صمیمانه پرسنل محترم بیمارستان خلیج فارس استان هرمزگان تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Parvizi, F., Nori, A., and Ranjbar, M.Sh. 2015. Compression of histochemical structure in *Pinctada radiata* and *Saccostrea cucullata*, *Physiological and Biologicals.*, Guilan.
2. Jelipor, M. 1984. Clams Pearl Persian Gulf Construction, Institute for Cultura Research., 197p.
3. Almeida, M.J., Moura, G., Pinheiro, T., Machado, J., and Coimbra, J. 1998. Modifications in *Crassostrea gigas* shell composition exposed to high concentrations of lead, *Aquatic Toxicology*, 40: 323–334.
4. Beedham, G.E. 1958. Observation on the mantle of the Lamellibranchia, *Microscopic Science*, 99: 181–197.
5. Bevelander, G. 1952. Calcification in molluscs. III. Intake and deposition of Ca 45 and P 32 in relation to shell formation, *Biological Bulletin*, 102(1): 9–15.
6. Bevelander, G., and Benzer, P. 1948. Calcification in marine mollusks, *Biological Bulletin*, 94(3): 176–183.
7. Bubel, A. 1973. An electron-microscope investigation of the cells lining the outer surface of the mantle in some marine mollusks, *Marine Biology*, 21(3): 245–255.
8. Checa, A.G. 2002. Fabricational morphology of oblique ribs in bivalves, *Journal of Morphology*, 254: 195–209.
9. Dix, T.G. 1973. Histochemistry of mantle and pearl sac secretory cells in *Pinctada maxima* (Lamellibranchia), *Australian Journal of Zoology*, 20(4), 359–368.
10. Fougereuse, A., Rousseau, M., and Lucas, J.S. 2008. Soft tissue anatomy, shell structure and biomineralization, In: P.C. Southgate and J.S. Lucas, Ed. The pearl oyster, Oxford Elsevier, Pp: 77–102.
11. Gervis, M., and Sims, N.A. 1992. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: pteriidae), Manila, Philippines, volume. 21, 49p.
12. Hickman, C.P., Roberts, L.S., and Larson, A. 2003. Animal Diversity, McGraw-Hill, New York, 447p.
13. Hillman, R.E., and Shuster, J.C.N. 1960. Observations on the mantle of the northern quahog, *Mercenaria mercenaria* L., *Proceedings of the National Shellfisheries Association*.
14. Howard, D.W., and Smith, C.S. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks, 102p.
15. Jabbour-Zahab, R., Chagot, D., Blanc, F., and Grizel, H. 1992. Mantle histology, histochemistry and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.), *Aquatic Living Resources*, 5(4): 287–298.
16. Kapur, S.P., and Gibson, M.A. 1968. A histochemical study of the development of the mantle-edge and shell in the freshwater gastropod, *Helisoma duryi eudiscus* (Pilsbry), *Canadian Journal of Zoology*, 46(3): 481–491.

- 17.Kapur, S.P., and Gibson, M.A. 1968b. A histochemical study of calcium storage in the foot of the freshwater gastropod, *Helisoma duryi eudiscus* (Pilsbry), *Canadian Journal of Zoology*, 46(5): 987–990.
- 18.McElwain, A., and Bullard, S.A. 2014. Histological Atlas of Freshwater Mussels (Bivalvia, Unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini), *Malacologia*, 57(1): 99–239.
- 19.Miyamoto, H., Miyoshi, F., and Kohno, J. 2005. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*, *Zoological science*, 22(3): 311–315.
- 20.Nakahara, H., and Bevelander, G. 1971. The formation and growth of the prismatic layer of *Pinctada radiata*. *Calcified tissue research*, 7(1): 31–45.
- 21.Ojima, Y. 1952. Histological studies of the mantle of pearl oyster (*Pinctada martensii*, Dunker), *Cytologia*, 17: 134–143.
- 22.Owen, G., Trueman, E.R., and Yonge, C.M. 1953. The ligament in the Lamellibranchia. *Nature*, 171(4341): 73–75.
- 23.Richardson, C.A., Runham, N.W., and Crisp, D.J. 1981. A histological and ultrastructural study of the cells of the mantle edge of a marine bivalve, *Cerastoderma edule*. *Tissue and Cell*, 13(4): 715–730.
- 24.Taylor, J., and Strack, E. 2008. Pearl production, In: P.C. Southgate and J.S. Lucas, Ed. The pearl oyster, Oxford Elsevier, 273–302.
- 25.Wang, A., Yan, B., Su, Q., and Ye, L. 2001. Electron microscopic observations on the cells from cultured mantle of the pearl oyster, *Pinctada martensii* D. *Marine Sciences*, 26(10): 4–9.

