

۲-۲-۲ آماده سازی نمونه جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

(زمان مورد نیاز ۲ روز)

از هر گونه یک یا دو نمونه تمیز انتخاب شد و اسکولکس آن را از استروبیلا جدا کرده و استروبیلا به عنوان voucher رنگ آمیزی می شود.

• آبدهی

۱- قرار دادن اسکولکس در ویال حاوی اتانول ۷۰٪

۲- تعویض الکل ۷۰٪ با الکل ۳۵٪ فیلتر شده (۱۵ دقیقه)

۳- تعویض الکل ۳۵٪ با آب مقطر فیلتر شده (۱۵ دقیقه) سه بار

• تترا اکسید اسمیم osmium tetraoxyde

۱- تعویض آب مقطر با تترا اکسید اسمیم ۱٪ تا کل نمونه را بپوشاند (ویال حدودا یک پنجم پر باشد).

۲- قرار دادن نمونه با در بسته در یخچال به مدت یک شب

• شستشو

- تعویض تترا اکسید اسمیم با آب مقطر فیلتر شده (۱۵ دقیقه) : ۲ بار

• آب گیری تا مرحله الکل ۷۰٪

۱- تعویض آب مقطر با الکل ۳۵٪ صاف شده (۱۵ دقیقه)

۲- تعویض الکل ۳۵٪ با الکل ۷۰٪ (۱۵ دقیقه)

۳- تعویض الکل ۷۰٪ با الکل ۹۵٪ (۱۵ دقیقه)

۴- تعویض الکل ۹۵٪ با الکل ۱۰۰٪ صاف شده (۱۵ دقیقه)

• هگزامتیل دزیلازان HMDS

۱- انتقال نمونه به الکل ۱۰۰٪ تازه، در زیر هود

۲- با استفاده از پیپت شیشه ای الکل ۱۰٪ را خارج کرده و بلافاصله HMDS روی نمونه اضافه کرده، به طوری که روی آن را پوشانده و به مدت ۱۰ دقیقه در آن قرار داده شد.

۴- خارج کردن HMDS تا حد ممکن و گذاشتن نمونه زیر هود برای اینکه خشک شود. نمونه قبل از انتقال به مرحله بعد باید کاملاً خشک شود.

۵- برداشتن یک stub آلومینیومی با پنس خاص، چسباندن چسب کربنی دو رو بر سطح آن،

۶- برداشتن نمونه با یک پنس ظریف یا قلم‌مو و گذاشتن در حالت دلخواه روی stub

۷- قرار دادن پوشش طلا (gold coating) روی نمونه به ضخامت ۱۵ نانومتر با دستگاه مدل BALTIC SCD 004

۸- انجام عملیات عکس برداری با SEM

اغلب کرم‌ها با استفاده از روش زیر در دانشکده پزشکی دانشگاه روستوک برای عکسبرداری با SEM مدل ZEISS DSM960A آماده شدند.

۱- قرارداد دادن اسکولکس در اتانول ۷۰٪ (۱۵ دقیقه)

۲- انتقال نمونه به اتانول ۸۰٪ (۱۵ دقیقه)

۳- انتقال نمونه به اتانول ۹۰٪ (۱۵ دقیقه)

۴- گذاشتن نمونه در اتانول ۱۰۰٪ (۱۵ دقیقه): ۲ بار

۵- قرار دادن نمونه در استون ۱۰۰٪ (۱۵ دقیقه)

۶- خشک کردن نمونه ها با Critical Point Dryer (مدل: BALTIC SCD004)

نکته: این مرحله نیازمند دقت زیادی می‌باشد، چون ممکن است نمونه‌ها به علت کوچک بودن گم شوند. برخی گونه‌های بزرگ *Acanthobothrium* با این مشکل روبه‌رو نبوده و در ظرف‌های مخصوص دستگاه CPD در مجاورت CO₂ گم نمی‌شوند. نمونه‌های ریز در محفظه‌های فیلتری که دارای منافذ خیلی ریزی بوده که امکان خروج آنها از طریق منافذ مقدور نباشد، قرار داده شدند. زمان مورد نیاز برای این مرحله حدود ۲ ساعت می‌باشد. بعد از خشک شدن نمونه‌ها، اسکولکس را با قلم‌موی باریک برداشته، و مراحل زیر را انجام داده می‌شود:

۷- گذاشتن نمونه روی stub که دارای چسب کربنی روی آن می‌باشد.

نکته: این مرحله نیازمند دقت خیلی زیاد می‌باشد. چون نمونه به شدت سبک و فرّار بوده و امکان گم شدن آن در هوا زیاد می‌باشد. جهت قرار دادن نمونه در این مرحله بسیار مهم می‌باشد. نمونه باید با مهارت کافی در جهتی قرار داده شود که دو بوتریدی آن رو به سمت بالا باشد و در هنگام عکس برداری قابل رویت باشد.

۸- قرار دادن پوشش طلا روی نمونه ها به ضخامت ۱۵ نانومتر

۹- عکس برداری از نمونه های آماده شده

نکته: برای هر نمونه‌ی *Acanthobothrium* شش عکس از بخش‌های مختلف اسکولکس تهیه می‌شود. بزرگنمایی مورد نیاز برای تهیه عکس به نسبت هر بخش متفاوت بوده که از ۲۰۰ برابر در نمای کلی اسکولکس تا ۱۵ هزار برابر از نمای میکروتیریش‌ها متفاوت می‌باشد. ابتدا یک عکس از نمای کلی اسکولکس تهیه می‌شود. بخش‌های دیگر نمونه برای تهیه عکس عبارتند از قلاب‌ها و صفحه‌ی ماهیچه‌ای راسی، سطح صفحه راسی، سطح نزدیک بوتریدی (proximal bothridial surface)، سطح دور بوتریدی (distal bothridial surface) و سطح cephalic peduncle. مقیاس هر نمونه کنار آن در پایین سمت راست قرار داده می‌شود. در نهایت از عکس‌های گرفته شده برای هر گونه، پلیت تهیه می‌شود.

۲-۳ شناسایی نمونه ها

برای شناسایی نمونه ها از مقالات متعددی که وجود داشت استفاده شد. بیشتر مقالات و منابع از پایگاه داده های سستوهای جهان به نشانی www.tapewormdb.uconn.edu گرفته شد.

۲-۳-۱ صفات جهت توصیف گونه‌ها

یکی از صفاتی که در توصیف گونه های جنس *Acanthobothrium* استفاده می شود، قلاب‌ها می باشد. در مورد واژه شناسی قلاب‌ها از روش Euzet (1959) استفاده شد که توسط Ghoshroy and Caira (2001) تغییر داده شد. شکل ۲-۲ قلاب‌ها و بخشهای مختلفی که اندازه گیری شدند را نشان می دهد. واژه شناسی قلابها با استفاده از روش Ghoshroy & Caira (2001) شامل قلاب‌های کناری و میانی شامل: طول پایه قلاب (A و A')، که فاصله از قدامی‌ترین بخش قلاب تا قدامی‌ترین بخش اتصال شاخهٔ محوری axial prong و شاخهٔ مقابل محوری abaxial prong؛ طول شاخه محوری (B و B')، فاصله از نقطه اتصال دو شاخه تا خلفی‌ترین بخش شاخه محوری، طول شاخه مقابل محوری (C و C')، فاصله از محل اتصال دو شاخه تا خلفی‌ترین بخش شاخه مقابل محوری، طول کل قلاب (D و D') فاصله از قدامی‌ترین بخش پایه قلاب تا خلفی‌ترین بخش شاخه محوری است.