

Место для баллов:

Код:

КАБИНЕТ № 1
ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ
(30 баллов)

Продолжительность выполнения заданий – 1 час 30 минут (90 минут).

ЗАДАНИЕ 1
Фенотипирование растений, культивируемых
в условиях *in vitro* (15 баллов)

Материалы и оборудование: компьютер (ноутбук); компьютерная мышь; экспериментальные цифровые фотографии; специализированное программное обеспечение – ImageJ.

Ход работы:

В современной биологии всё чаще используются методы компьютерной обработки данных. Так существует целый ряд программ, с помощью которых можно проводить измерения самых разнообразных морфологических показателей. Данные программы создаются в первую очередь с целью получения более точных достоверных данных, а также для удобства экспериментатора, поскольку таким образом необходимые измерения можно производить в любое подходящее для исследователя время.

Сегодня Вам предлагается произвести серию измерений на цифровом графическом материале, полученном ранее в научно-исследовательской лаборатории Физиологии и биотехнологии растений Белорусского государственного университета. На рабочем столе предоставленного Вам компьютера расположена папка «Фото», в которой Вы найдёте все необходимые для работы цифровые изображения, а именно папку «Устьица» с фотографиями устьиц берёзы карельской (*Betula pendula* var. *carelica* (Merckl.) Hämet-Ahti) на различных этапах микрклонального размножения и папку «Корни» с изображениями чашек Петри с 10-дневными проростками резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* L.), выращенными по специальной методике, позволяющей анализировать изменения в корневой системе под действием различных факторов.

Для выполнения данного задания перед Вами стоит непростая задача, а именно освоение новой программы – ImageJ. Данная программа расположена на рабочем столе компьютера. Ниже подробно изложен алгоритм действий при работе с программой.

Инструкция по работе с программой ImageJ

После того как вы откроете программу ImageJ перед Вами появится окно. Внешний вид интерфейса программы представлен на рисунке 1.

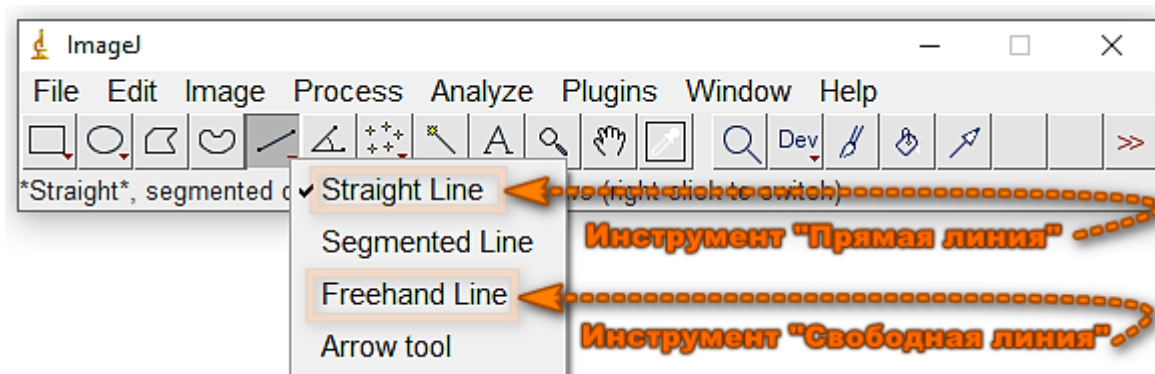





Рисунок 1 – Интерфейс программы ImageJ

1) Для того, чтобы *открыть фотографию* для проведения измерений, необходимо на панели управления выбрать пункт меню «File», затем выбрать строку «Open», далее найти и открыть интересующую вас фотографию в папке «Фото» (располагается на рабочем столе вашего компьютера).

2) Следующий этап – *калибровка*. Для калибровки необходимо выбрать на панели инструментов прямую линию «Straight Line»  и провести линию (выделить) на объекте известной длины. В качестве данного объекта может выступать линейка (50 мкм), отображённая на фото с устьицами, или диаметр чашки Петри равный 9 см. Далее в панели управления необходимо выбрать кнопку «Analyze» и строку «Set Scale». В появившемся окне в графе «Known distance» записать наше значение – 50 или 9, соответственно. Возле параметра «Global» выставить галочку, чтобы калибровка использовалась для всех последующих измерений и перейти на следующий этап нажав кнопку «ОК».

3) Собственно *измерение длины*. Для измерения параметров устьица отлично подходит выбранный ранее инструмент – прямая линия («Straight Line» ) , однако для того чтобы измерить длину корня данную функцию использовать не рекомендуется, поскольку из-за изгибов последнего появляются большие погрешности. Чтобы наши измерения были максимально точными необходимо выбрать на панели инструментов линию, которую можно проводить в произвольном направлении. Для этого правой клавишей мыши нажмите на значок прямой линии и выберите в появившемся окошке строку «Freehand line» (Свободная линия), на панели инструментов появится следующий значок . После этого необходимо максимально точно нарисовать линию поверх корня, от начала до конца. Затем для измерения его длины

выбрать кнопку «Analyze» и строку «Measure» или нажать сочетание клавиш «Ctrl+M». В открывшемся окне приложения в столбце «Length» будет указана длина выделенного объекта. После повторяем измерения для всех корней или устьиц на фото. Для работы со следующим фото в папке можно следовать пункту 1 инструкции либо выбрать на панели управления кнопку «File» и строку «Open Next».

На рисунке 2 представлено изображение рабочего окна программы ImageJ, на котором демонстрируется окно с измеряемым параметром (длина корня), отмеченным на рисунке. В окне «Results» в столбце «Length» показана длина корня *Arabidopsis* в сантиметрах.

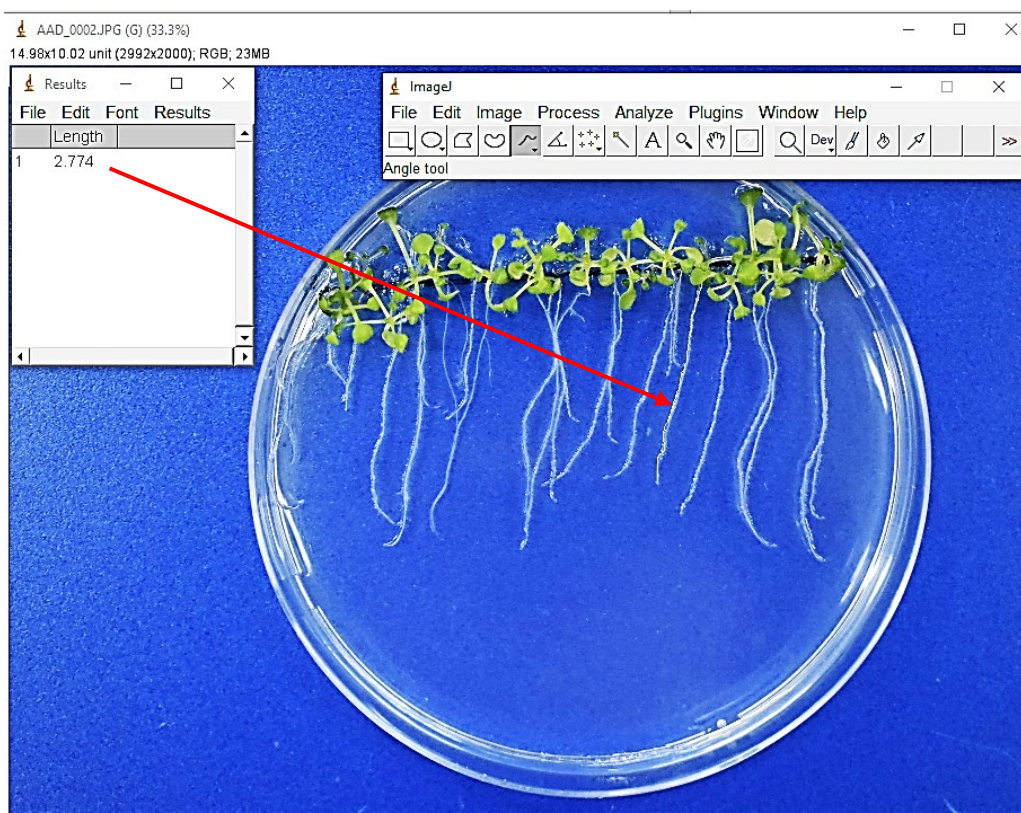


Рисунок 2 – Рабочее окно ImageJ с изображением измерения корней *Arabidopsis thaliana*

Перед началом измерений биологических объектов проверьте себя, для этого в папке «Фото» помимо экспериментальных изображений корней и устьиц расположено ещё одно цифровое изображение под названием «Пробное». На нём отображен отрезок длиной 1 см и 4 фигуры. Используя инструкцию измерьте стороны у квадратов и длину произвольной линии, правильные результаты измерений представлены на рисунке 3. При измерениях допускаются погрешности до 0,1–0,2 см.

После успешного освоения программы приступайте к выполнению задания!

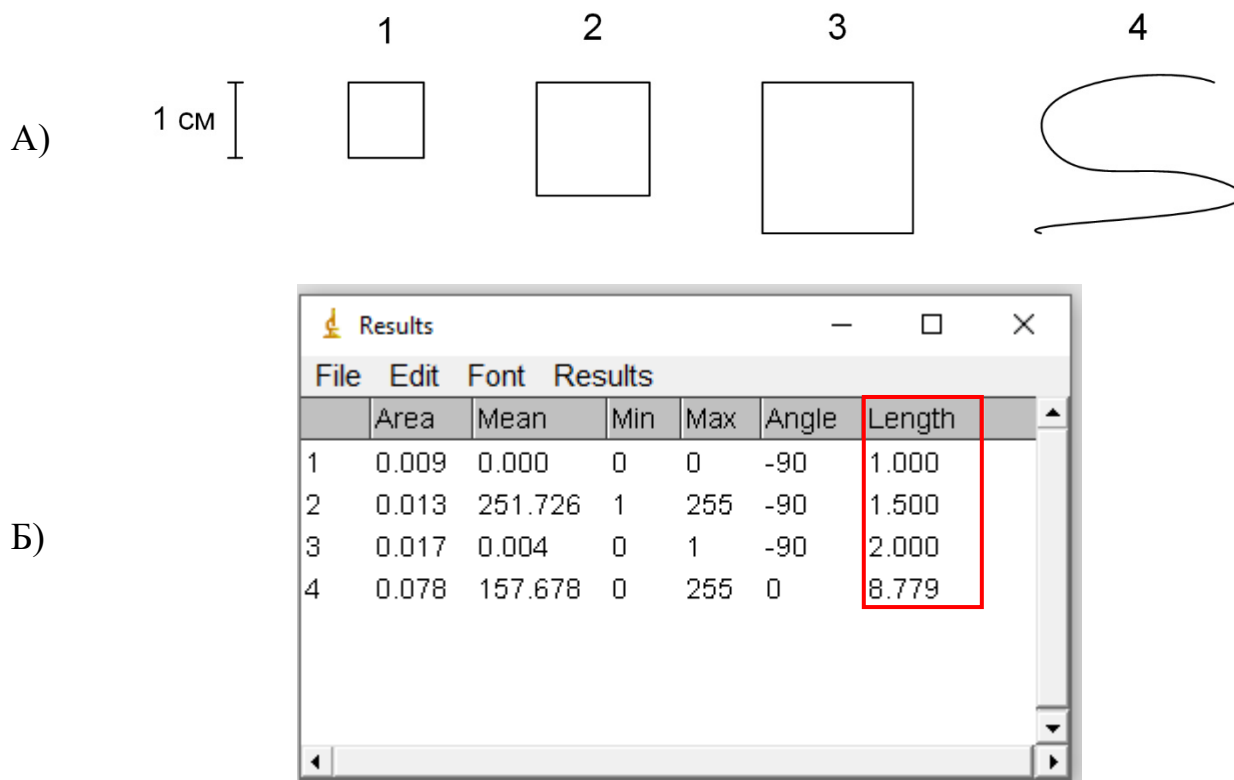


Рисунок 3 – «Пробное» изображение (А) и результаты измерений длины фигур на изображении (Б)

Первой частью задания является анализ модификации морфологических характеристик устьичного аппарата при переводе микроклонально размноженной берёзы карельской (*Betula pendula* var. *carelica*) в условия *ex vitro*. В папке «Устьица» вы найдёте фотографии нижнего эпидермиса листа берёзы на 3 этапах её размножения:

1 этап – собственно микроклональное размножение – листья растений на 30 суток культивирования *in vitro*;

2 этап – адаптация растений к нестерильным условиям *ex vitro* – листья на 30 суток выращивания в нестерильных условиях;

3 этап – завершение периода акклиматизации – *ex vitro* листья на 90 суток пропации.

Для каждого этапа предложено по 2 изображения с 3–5 устьицами на каждом. Необходимо измерить длину устьиц и ширину устьичной щели. Эти показатели помогут Вам заполнить таблицу 1 и ответить на вопросы, представленные ниже.

Н.В. Все фотографии эпидермиса сделаны при одинаковом увеличении микроскопа, в связи с чем достаточно 1 раз сделать калибровку в начале работы! На рисунке 4 отмечены необходимые для измерения параметры, обратите внимание, что в случае явно повреждённых устьиц измерения проводить не нужно.

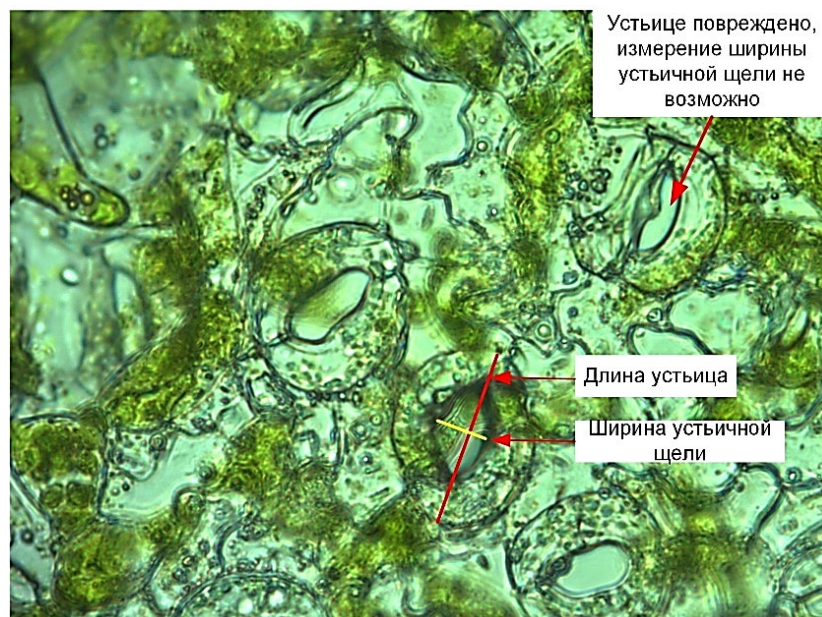


Рисунок 4 – Эпидермис берёзы карельской *in vitro* с указанием параметров для измерения

При заполнении таблицы 1 вносите усреднённые значения длины и ширины (среднее арифметическое) для каждого из этапов с указанием в скобках количества проанализированных устьиц. За полностью правильный ответ будут считаться значения с погрешностью не больше 2 мкм для длины и 0,5 мкм для ширины от полученных экспертами.

Таблица 1 – Морфометрические параметры устьиц берёзы карельской (6 баллов: по 1 баллу за ячейку).

Этап размножения берёзы карельской	Длина устьица, мкм (средняя для этапа)	Ширина устьичной щели, мкм (средняя для этапа)
1	56 ± 2 (6)	$17 \pm 0,5$ (6)
2	47 ± 2 (10)	$6,3 \pm 0,5$ (10)
3	46 ± 2 (6)	$4 \pm 0,5$ (6)

При выполнении данного задания Вами были выявлены следующие закономерности: в ходе выведения микроклонов берёзы карельской в условия *ex vitro* происходит модификация устьичного аппарата, а именно длина устьиц увеличивается / уменьшается / не изменяется (подчеркните правильный вариант (0,25 балла)), а ширина устьичной щели увеличивается / уменьшается / не изменяется (подчеркните правильный вариант (0,25 балла)). Данные модификации связаны с особенностями культивирования *in vitro* растений – внутри культивационных сосудов создаются условия повышенной влажности, что приводит к нарушению работы (не функционированию) (0,5 балла) устьичного аппарата. Также высокая концентрация питательных

веществ в среде культивирования способствует тому, что при развитии корневой системы не развиваются следующие структуры – **корневые волоски** (0,5 балла), которые в норме участвуют в **поглощении воды и минералов из почвы** (0,5 балла).

Вторая часть задания по работе с программой ImageJ включает в себя анализ длины корней модельного растения *Arabidopsis thaliana* L., культивируемого в стандартизированных *in vitro* условиях на средах с различной концентрацией NaCl – одного из основных абиотических стрессоров у растений. Все необходимые для выполнения задания фотографии расположены в папке «Корни», по 1 изображению для каждого из трех вариантов:

- 1 вариант – контроль (среда без добавления NaCl);
- 2 вариант – среда с добавлением 40 ммоль/л NaCl;
- 3 вариант – среда с добавлением 100 ммоль/л NaCl.

На всех фотографиях отображено не менее 15 корней *Arabidopsis*, необходимо измерить их длину и заполнить таблицу 2, указав среднюю длину корней для каждого из вариантов.

Н.В. Обратите внимание, что съёмка данных фотографий была не полностью стандартизирована в связи с чем калибровку (по диаметру чашки Петри) необходимо осуществлять для каждой из фотографий.

Таблица 2 – Длина корней *Arabidopsis thaliana* L. при культивировании на средах с различной концентрацией NaCl (4,5 балла: по 1,5 баллу за ячейку).

Вариант среды культивирования	Длина корня, см
Контроль	3,5 ± 0,3
40 ммоль/л NaCl	3,7 ± 0,3
100 ммоль/л NaCl	2,5 ± 0,3

При добавлении 40 ммоль/л NaCl длина корней *Arabidopsis* **увеличивается** / уменьшается / не изменяется (подчеркните правильный вариант (0,5 балла)), подобное явление в биологии называется: **гормесис (стимуляция – 0,5 балла)** (1 балл). Высокие концентрации хлорида натрия являются токсичными для большинства растений, при этом более 30 % почв в мире подвержены засолению. Согласно Селье (Ганс Селье – создатель теории биологического стресса) стрессовые воздействия, приводящие к гибели организма, называются **дистресс** (0,5 балла). Однако не все стрессовые воздействия приводят к гибели растения, они также могут приводить и к приспособлению (адаптации), такой тип стресса согласно Селье носит название **эустресс** (0,5 балла).

ЗАДАНИЕ 2

Структурно-функциональная организация электрон-транспортной цепи хлоропластов (15 баллов)

Материалы и оборудование: простой карандаш, линейка, ножницы канцелярские, клей-карандаш.

Фотосинтез – единственный на Земле процесс, с помощью которого энергия солнечного света трансформируется в энергию химических связей органических соединений. Этот сложный процесс возможен благодаря слаженной работе электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов. В настоящее время ЭТЦ хлоропластов довольно хорошо изучена и является одной из центральных тем физиологии растений. В приложении А приведены основные компоненты нециклической ЭТЦ хлоропластов. Вам необходимо их расположить в правильном порядке на листе «Нециклическая ЭТЦ хлоропластов» (вырезать и приклеить), а также дополнить схему, ответив на вопросы ниже (7 баллов: по 0,5 балла за каждый правильно расположенный элемент).

2.1 В пустых окошках фотосистем I и II (ФС I и ФС II, соответственно) впишите название пигментов-ловушек реакционных центров этих фотосистем (1 балл: по 0,5 балла за каждый правильный ответ).

2.2 В пустом окошке АТФ-азы напишите число протонов необходимое для синтеза 1 молекулы АТФ (0,5 балла).

2.3 В скобках после слов «строма», «люмен» укажите знаками «+», «-» заряд на каждой стороне мембраны (1 балл: по 0,5 балла за каждый правильный ответ).

2.4 На составленной Вами схеме ЭТЦ с помощью стрелок отметьте нециклический транспорт электронов между компонентами системы (1 балл).

2.5 Назовите первичный донор электронов ЭТЦ хлоропластов:

вода (H₂O) (0,5 балла)

2.6 Назовите конечный акцептор электронов ЭТЦ хлоропластов:

НАДФ (0,5 балла)

2.7 Для работы компонентов ЭТЦ необходимы ионы металлов (кофакторы). Для перечисленных ниже компонентов ЭТЦ хлоропластов напишите ионы каких металлов являются кофакторами (3,5 балла).

Компонент ЭТЦ	Металл
Пластоцианин	<i>Сu (медь)</i>
Ферредоксин	<i>Fe (железо)</i>
Цитохром b ₆	<i>Fe (железо)</i>
Цитохром f	<i>Fe (железо)</i>
Белок Риске	<i>Fe (железо)</i>
Кислород-выделяющий комплекс	<i>Mn (марганец), Ca (кальций)</i>

