

Место для баллов:

Код:

КАБИНЕТ № 1
ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ
(30 баллов)

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

ЗАДАНИЕ 1
Дыхание. Оксидативное фосфорилирование
(14 баллов)

Клеточное дыхание представляет собой процесс разрушения органических веществ при участии кислорода воздуха, в результате данного процесса выделяется энергия и образуются высоко-окисленные вещества CO_2 и H_2O .

Энергия, которая освобождается при разрушении дыхательного субстрата, запасается частично в виде АТФ, а частично в виде восстановленных коферментов (заполните пропуски!) – НАДН и ФАДН₂ (0,2 балла). Коферменты, в свою очередь, далее окисляются в ходе оксидативного (окислительного) фосфорилирования в электрон-транспортной цепи дыхания. Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) расположена на внутренней мембране (кристах) митохондрий (0,2 балла) и служит для создания разности электрохимических потенциалов протонов (H^+) (0,2 балла) на мембране.

Большинство ее компонентов белки, которые объединены в сложные белковые комплексы, переносящие электроны. Эти белковые переносчики электронов изменяют свое окисленное и восстановленное состояние – выступают в роли доноров и акцепторов (0,2 балла) электронов. Свободная энергия электронов уменьшается / увеличивается / не изменяется (подчеркните правильный вариант (0,1 балл)) на их пути по ЭТЦ. Цепь заканчивается восстановлением молекулы кислорода (O_2) (0,1 балл), что приводит к формированию H_2O .

1.1 Подробнее рассмотрим электрон-транспортную цепь дыхания. Внимательно изучите предложенное на рисунке 1 схематическое изображение данной цепи и ответьте на задания под рисунком.

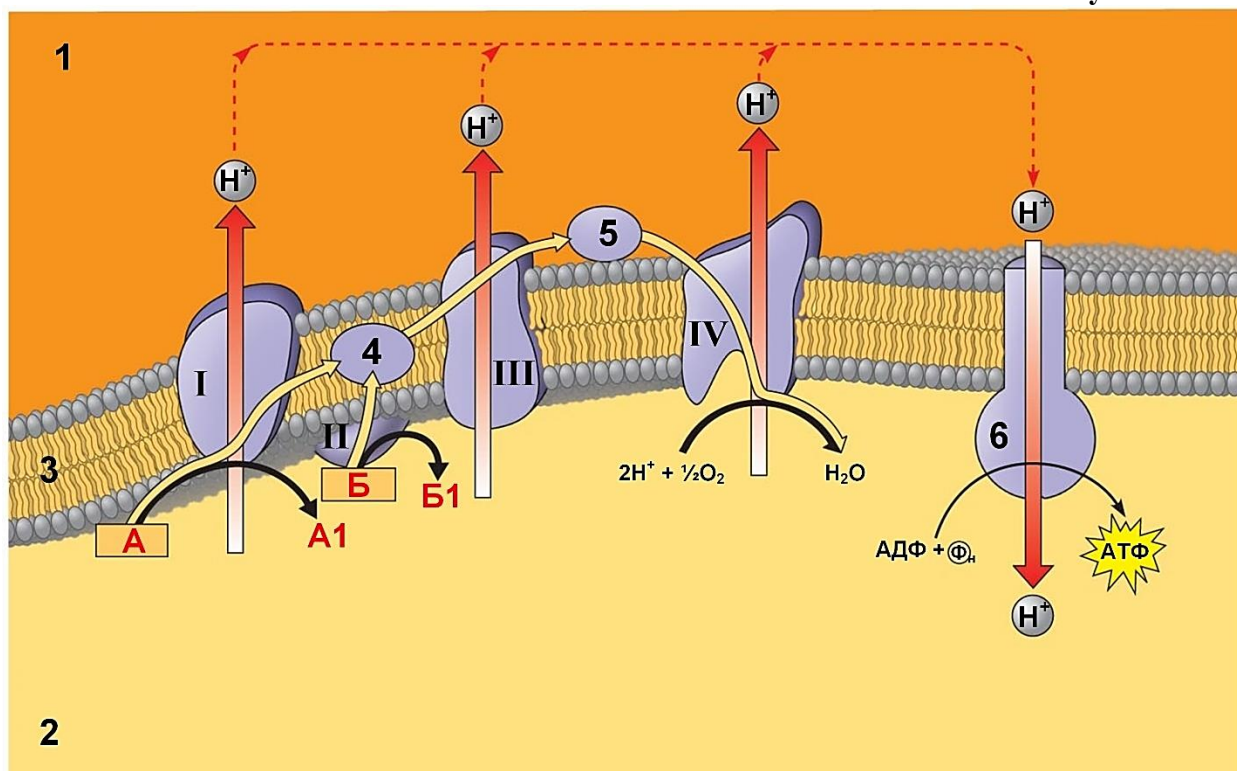


Рисунок 1 – Схематическое изображение электрон-транспортной цепи дыхания

Напишите какие объекты изображены на рисунке 1 под соответствующими номерами (5 баллов: по 0,5 балла за правильно отмеченный элемент):

1 – **Межмембранное пространство**

2 – **Матрикс**

3 – **Внутренняя мембрана митохондрий / мембрана крист**

4 – **Убихинон**

5 – **Цитохром с**

6 – **АТФ-синтаза**

I – **НАД(Ф)Н – убихинон-оксидоредуктаза / НАДН-дегидрогеназа**

II – **Сукцинат – убихинон-оксидоредуктаза / сукцинатдегидрогеназа**

III – **Убихинол – цитохром с-оксидоредуктаза / цитохром bc₁**

IV – **Цитохром с – кислород-оксидоредуктаза / цитохромоксидаза**

Какие коферменты скрыты под красными буквами А и Б на рисунке 1? В какие соединения они превращаются (А1, Б1) в ходе указанной реакции? (1 балл)

А: **НАДН → НАДН⁺ / НАД восстановленный → НАД окисленный**

Б: **ФАДН₂ → ФАД / ФАД восстановленный → ФАД окисленный**

В работе ЭТЦ дыхания также принимает участие и ряд металлов. Напишите какие ионы металлов входят в состав перечисленных ниже комплексов ЭТЦ (2 балла).

Комплексы ЭТЦ	Ионы металлов
Комплекс I	<i>Fe (железо)</i>
Комплекс II	<i>Fe (железо)</i>
Комплекс III	<i>Fe (железо)</i>
Комплекс IV	<i>Fe (железо); Cu (медь)</i>

1.2 АТФ-синтаза.

Напишите функциональные названия F_1 - и F_0 -комплексов АТФ-синтазы и укажите из каких субъединиц и какого количества они состоят? (2 балла)

F_1 -комплекс: *Каталитический; 3 α ; 3 β ; 1 γ ; 1 δ ; 1 ϵ*

F_0 -комплекс: *Интегральный мембранный / трансмембранный; 1a; 2b; 10c*

Нарисуйте АТФ-синтазу (Рисунок 2), правильно расположив все субъединицы друг относительно друга. Помните, что качество визуализации является неотъемлемой составляющей любого научного труда, предварительно потренируйтесь на черновике! Для лучшей визуализации данной структуры используйте цветные карандаши!

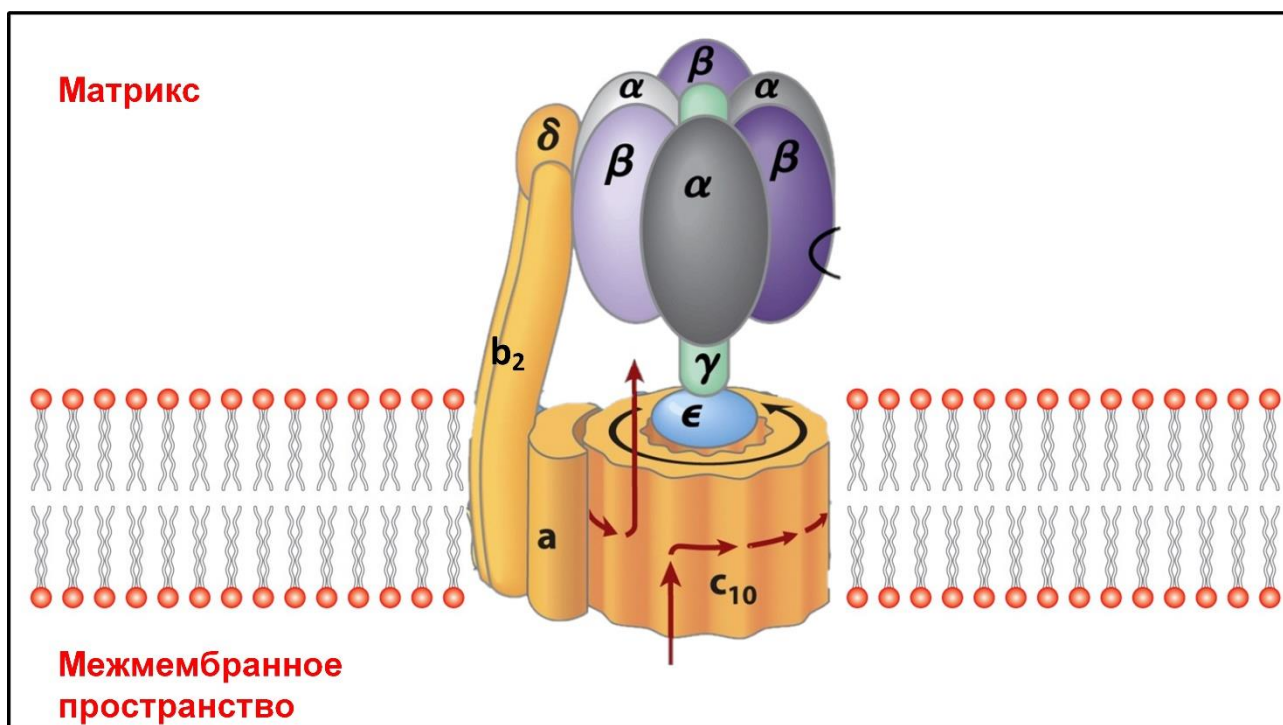


Рисунок 2 – Схематическое строение АТФ-синтазы (3 балла)

ЗАДАНИЕ 2

Анализ влияния антиоксидантов природного и синтетического происхождения на морфометрические параметры высших растений (16 баллов)

Материалы и оборудование: компьютер (ноутбук); компьютерная мышь; экспериментальные цифровые фотографии; специализированное программное обеспечение – ImageJ; программа Microsoft Office Excel; линейка; карандаш.

Современную биологию невозможно представить без использования методов компьютерной обработки данных. Все чаще появляются специализированные программы, с помощью которых можно проводить измерения самых разнообразных морфометрических показателей. Данные программы позволяют получать более точные и достоверные результаты, приводя к минимуму погрешности, возникающие при ручной обработке данных. Также применение компьютерных программ зачастую позволяет производить необходимые измерения в любое подходящее для исследователя время.

Сегодня Вам предлагается проанализировать влияния антиоксидантов природного и синтетического происхождения на морфометрический параметр, такой как длина корней, высших растений, выращенных в условиях окислительного стресса. С этой целью необходимо произвести серию измерений на графическом материале, полученном ранее в научно-исследовательской лаборатории.

На рабочем столе предложенного Вам компьютера расположена **папка «Фото»**, в которой Вы найдете все необходимые для работы изображения, а именно **папку «Triticum»** с фотографиями проростков пшеницы мягкой на 10 сутки культивирования на средах со стрессором и добавлением антиоксидантов различного происхождения и **папку «Arabidopsis»** с изображениями чашек Петри с 10-дневными проростками *Arabidopsis thaliana* L., также выращенными в присутствии стресс-фактора на средах с добавлением антиоксидантов, однако уже в условиях *in vitro* по специальной методике, позволяющей анализировать изменения в корневой системе под действием различных факторов.

Для выполнения данного задания перед Вами поставлена следующая задача – освоение **программы ImageJ**. Данная программа также 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 3.

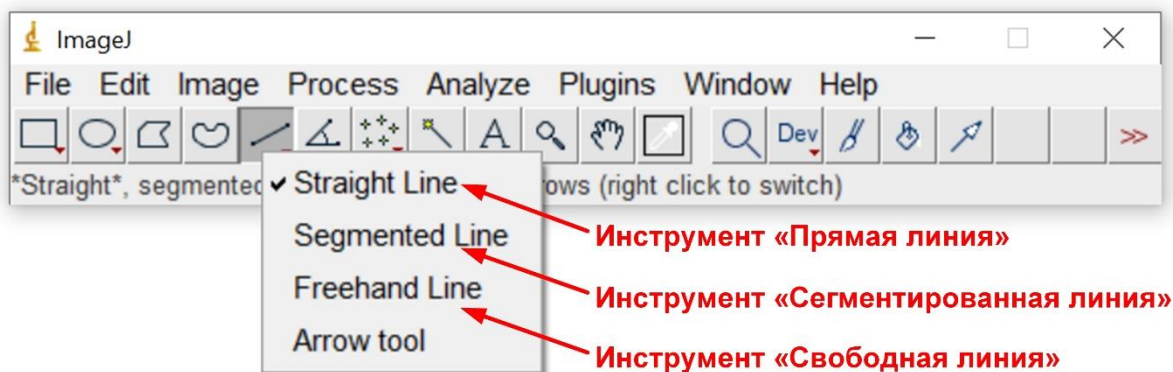


Рисунок 3 – Интерфейс программы ImageJ

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, расположенная рядом с проростками, 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 значение выделенного объекта известной длины – например, 9 для чашки Петри. Возле параметра «**Global**» поставить галочку, чтобы калибровка использовалась для всех последующих измерений на данном фото и перейти на следующий этап нажав кнопку «**OK**».

3) Собственно *измерение длины*. Для того чтобы измерить длину корня выбранный ранее инструмент («**Straight Line**» ) не подходит, поскольку из-за изгибов корней появляются большие погрешности. Чтобы наши измерения были 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 «**Segmented line**» («Сегментированная линия»), на панели инструментов появится следующий значок , после чего вы сможете, нажимая левой клавишей мыши выделять много сегментов (для завершения выделения щелчок правой клавишей мыши). Также вы можете выбрать и инструмент «**Freehand line**» («Свободная линия»), на панели инструментов появится значок .

После выбора инструмента необходимо максимально точно нарисовать линию поверх корня, от начала до конца. 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 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 4 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.

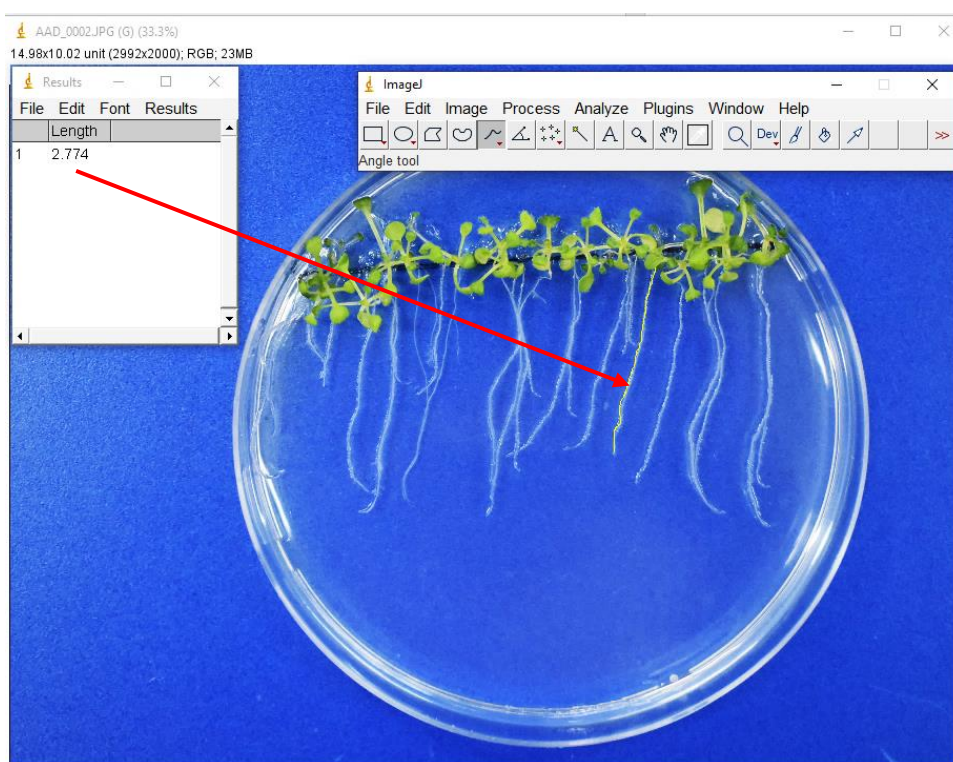


Рисунок 4 – Рабочее окно ImageJ с изображением измерения корней *Arabidopsis thaliana*

Перед началом измерений биологических объектов вы можете проверить усвоили ли вы алгоритм работы с программой, для этого в папке «Фото» помимо экспериментальных изображений корней пшеницы и арабидопсиса расположено еще одно цифровое изображение под названием «**Тестовое**». На нем отображен отрезок длиной 1 см и 4 фигуры. Используя инструкцию измерьте стороны у квадратов и длину произвольной линии, правильные результаты измерений представлены на рисунке 5. При измерениях допускаются погрешности до 0,1–0,2 см.

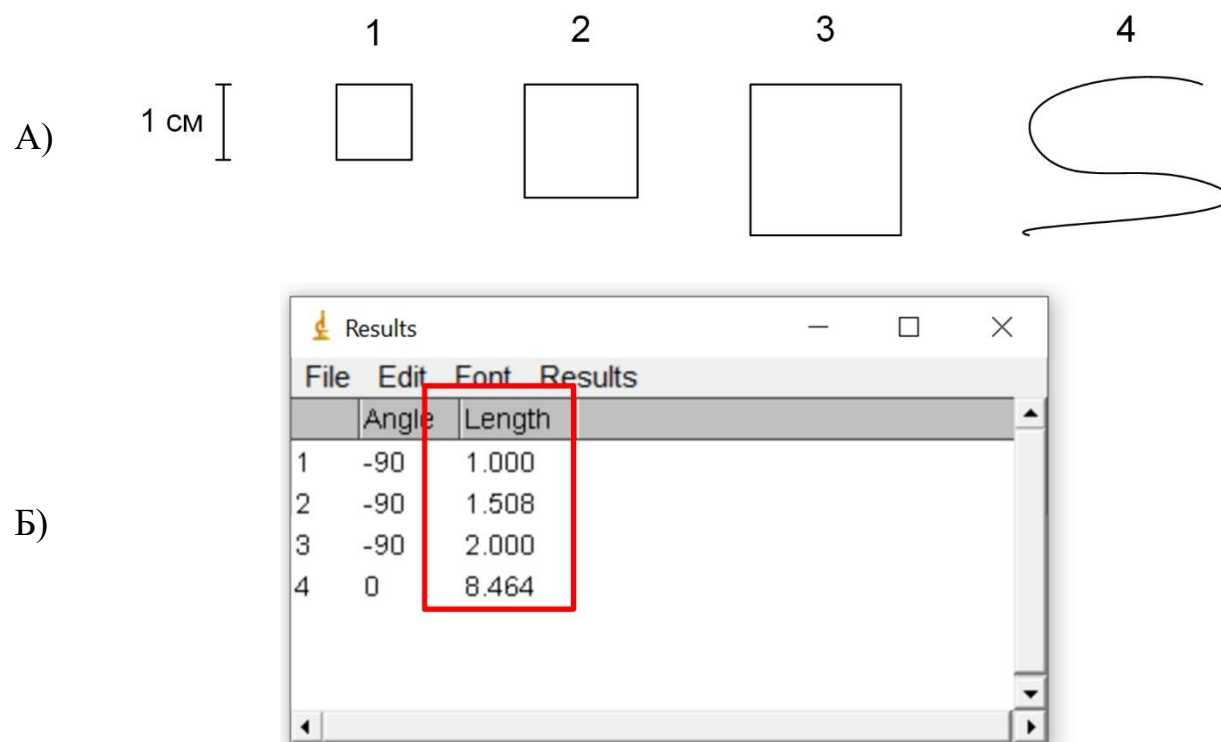


Рисунок 5 – «Тестовое» изображение (А) и результаты измерений
длины фигур на изображении (Б)

После успешного освоения программы приступайте к выполнению задания! Удачи!

2.1 Анализ длины корней.

Произведите измерение длины корней модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. и важной сельскохозяйственной культуры – *Triticum aestivum* L., культивируемых на средах с добавлением антиоксидантов различной природы в условиях окислительного стресса в течение 10 суток. Условия окислительного стресса были созданы посредством добавления в среду смеси, генерирующей гидроксильный радикалы – 0,1 ммоль/л раствор Фентона.

Все необходимые для выполнения задания фотографии расположены в папках «*Arabidopsis*» и «*Triticum*», по 1 изображению для каждого из вариантов:

- 1 вариант – контроль (среда без добавления антиоксидантов);
- 2 вариант – среда с добавлением «чистой» аскорбиновой кислоты;
- 3 вариант – среда с добавлением отвара шиповника;
- 4 вариант – среда с добавлением отвара клюквы.

Необходимо измерить длину самого длинного корня у каждого из растений на фото и заполнить таблицу 1, указав среднюю длину корней для каждого из вариантов. Обратите внимание, что в таблице 1 также уже отмечена средняя длина растений в контрольных условиях без внесения стрессора!

Обратите внимание, что калибровку необходимо осуществлять для каждой фотографии!

Таблица 1 – Длина корней *Arabidopsis thaliana* L. и *Triticum aestivum* L. на 10 сутки культивирования на средах с добавлением антиоксидантов в условиях окислительного стресса (8 баллов: по 1 баллу за ячейку).

Вариант среды культивирования	Средняя длина корня, см	
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Triticum aestivum</i>
Контроль (без стресса)	4,5	11,8
Контроль (со стрессом)	2,3	7,1
Аскорбиновая кислота	4	7,7
Шиповник	3	11,4
Клюква	2,9	10,4

2.2 Определение концентрации аскорбиновой кислоты в растительных отварах.

Перед началом эксперимента производилось определение содержания аскорбиновой кислоты (АК) в отварах шиповника и клюквы. Данный этап является необходимым, поскольку во все варианты среды нужно было внести равную концентрацию АК независимо от ее происхождения. Для измерения концентрации АК был применен метод спектрофотометрии – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ с целью количественного определения входящих в их состав соединений. Метод основан на измерении спектров поглощения в оптической области электромагнитного излучения. Водные растворы АК при нейтральных значениях pH в ультрафиолетовой области спектра дают сильное поглощение **при 265 нм**, в связи с чем измерения проводились при данной длине волны.

Результаты измерений представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Оптическая плотность водных отваров шиповника и клюквы

	Шиповник	Клюква
$D_{265\text{нм}}$	0,39	0,26

Для определения изначальной концентрации АК в отварах Вам необходимо построить калибровочную кривую (рисунок 6) по данным

зависимости оптической плотности отвара от концентрации АК, представленным в таблице 3.

Таблица 3 – Данные зависимости оптической плотности отвара от концентрации аскорбиновой кислоты

[АК], ммоль/л	1	3	5	10	15	20
$D_{265\text{нм}}$	0,03	0,1	0,15	0,3	0,5	0,65

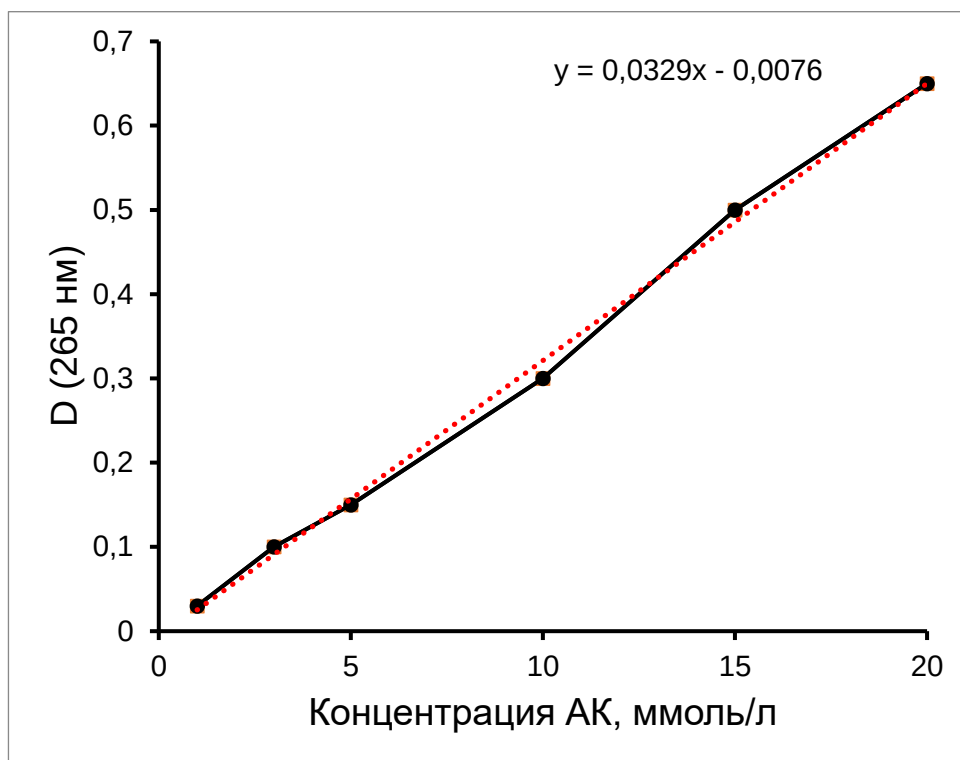


Рисунок 6 – Кривая зависимости оптической плотности отвара от концентрации аскорбиновой кислоты (1 балл)

Также, для получения более точных результатов, постройте калибровочную кривую (точечная диаграмма) в программе Microsoft Excel. На полученную диаграмму добавьте линию тренда (добавить элемент диаграммы → линия тренда → линейная) и отобразите на диаграмме уравнение линии тренда (добавить элемент диаграммы → линия тренда → дополнительные параметра линии тренда → показать уравнение на диаграмме), по которому и рассчитайте концентрацию АК в анализируемых отварах.

Напишите уравнение линии тренда для полученного калибровочного графика (1 балл).

Уравнение линии тренда: $y = 0,0329x - 0,0076$

Заполните таблицу 4, указав концентрацию АК (2 знака после запятой) в проанализированных отварах (1 балл: по 0,5 балла).

Таблица 4 – Концентрация аскорбиновой кислоты в водных отварах шиповника и клюквы

	Шиповник	Клюква
[АК], ммоль/л	12,09	8,13

2.3 Сделайте выводы относительно полученных результатов, ответив на ряд вопросов.

Обратите внимание, что приведенные в работе данные могут отличаться от литературных источников, при ответе на вопросы 1-3 руководствуйтесь непосредственно полученными результатами!

2.3.1 Какое из проанализированных растений является более чувствительным к окислительному стрессу? На основании каких критериев вы пришли к такому выводу? (1 балл)

Arabidopsis thaliana

Ингибирование длины корней в контрольном варианте с добавлением стрессора по отношению к контролю без стрессора (%) выше, чем у пшеницы

2.3.2 Наблюдается ли видоспецифичность действия у протестированных антиоксидантов? Какой(ие) из протестированных антиоксидантов проявил(и) наиболее эффективное стресс-протекторное действие по отношению к растениям *Arabidopsis thaliana* L. и *Triticum aestivum* L.? (0,75 балла)

Да

Для Arabidopsis thaliana – аскорбиновая кислота

Для Triticum aestivum – отвар шиповника

2.3.3 Связана ли разница в стресс-протекторном действии протестированных антиоксидантов с концентрацией, внесенной в различные варианты сред АК? Почему? (0,75 балла)

Нет

Во все варианты среды вносилась равная концентрация АК независимо от ее происхождения (информация из пояснительного текста!)

2.3.4 Всегда ли можно экстраполировать данные, полученные в экспериментах на модельных растениях на другие виды? Приведите пример из проанализированного эксперимента. (1 балл)

Нет

*Например, в проанализированном эксперименте была показана видоспецифичность для модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. и *Triticum aestivum* L.*

2.3.5 Какие еще растения, произрастающие на территории Республики Беларусь, содержат в своем составе высокую концентрацию аскорбиновой кислоты? (полным считается ответ начиная от 4 растений) (0,5 балла)

Черная смородина; Облепиха

Петрушка; Сладкий перец; Капуста

2.3.6 Какие ферменты принимают участие в защите растительных клеток от окислительного стресса? (1 балл)

Супероксиддисмутаза

Каталаза

Пероксидаза