

Код студента: \_\_\_\_\_

## **22-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА**

**10 - 17 июля, 2011**

**Тайпей, Тайвань**



### **ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 4**

#### **АНАТОМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ**

**Общее количество баллов:100**

**Продолжительность: 90 минут**

Дорогие Участники!

- В этом тесте вам будут даны 2 задания:  
Задание I: Анатомия растений (**60 баллов**)  
Задание II: Физиология и генетика растений (**40 баллов**)
- Проверьте перед началом работы **ваш Код Студента** на **Листе Ответов** и на Листе для расположения препаратов.
- Впишите ваши результаты и ответы в **Лист Ответов. Ответы, вписанные в Лист Вопросов, оцениваться не будут.**
- Проверьте, получили ли вы все материалы, перечисленные для каждого задания. Если чего-нибудь из перечисленного недостает, **поднимите свою карточку.**
- Убедитесь, что вы правильно распределили время для выполнения вашей работы.
- Прекратите работу **немедленно** после заключительного звонка.
- По окончании теста вложите **Лист с ответами, Листы с заданиями, Распечатку результатов и Лист для расположения препаратов** (без препаратов) в прилагаемый конверт. Наш ассистент сразу соберет их.
- Не разрешается выносить листы бумаги или материалы из лаборатории

**ЖЕЛАЕМ УДАЧИ!!**

## Задание 1 (60 баллов)

### Анатомия растений

<b><u>Оборудование:</u></b>	<b><u>Количество</u></b>
1. Предметные стекла (в коробке)	20
2. Покровные стекла (в коробке)	30
3. Бинокулярный микроскоп (с объективами с увеличением в 4X, 10X и 40X раз)	1
4. Окуляр-микрометр	1
5. Одностороннее лезвие (в коробке)	5
6. Чашка Петри (в коробке)	1
7. Пинцет (в коробке)	1
8. Маркер	1
9. Бумажные салфетки	1
10. Бумажное полотенце	1
11. Емкость для отходов	1

<b><u>Материалы:</u></b>	<b><u>Количество</u></b>
1. Бидистиллят	50 мл в пробирке
2. 1 N соляная кислота (HCl) (в коробке)	5-10 мл в пробирке
3. Прозрачный лак для ногтей (в коробке)	1 пробирка
4. Препараты X, Y и Z срезов корня растения K в коробке подписанной буквой K	по 1 препарату каждого
5. Чашка Петри, разделенная на четыре части, в каждой из которых находятся образцы растений V, W, M, N, P, Q, R, S	2 чашки Петри
6. Лист с разметкой (с кодом студента) для размещения препаратов с приготовленными вами срезами для проверки	1 лист

---

## Часть А: Строение корня растения (общее количество 10 баллов)

### Введение:

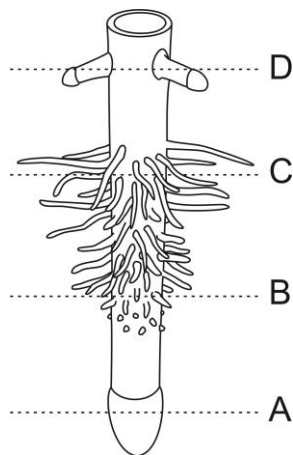


Рисунок 1. Типичное строение верхушки корня растения

На трех препаратах (X, Y и Z) представлены поперечные срезы (находящиеся внутри кружков на предметном стекле) различных частей корня растения К. Вы должны определить, является ли растение К однодольным или двудольным, для того, чтобы дать ответ позднее. Рассмотрите эти срезы под микроскопом и дайте ответ на следующие вопросы.

### Q1.A.1. (2 балла за каждый ответ, общее количество баллов 6)

Какой части корня, обозначенной на Рисунке 1, соответствует каждый из срезов X, Y и Z?

Отметьте знаком «X» правильные ответы в Листе Ответов.

### Q.1.A.2. (4 балла, один выбор)

В каком направлении происходит созревание первичной ксилемы корня (ткани, созревающие раньше → ткани, созревающие позже)? Отметьте знаком «X» правильные ответы в Листе Ответов.

## **Часть В: Строение стебля растения (общее количество баллов 6)**

### **Введение:**

Аккуратно приготовьте из кусочков стебля растений V и W поперечные срезы соответствующей толщины и поместите их на предметные стекла. Добавьте каплю воды на срез и накройте покровным стеклом. Рассмотрите срезы под микроскопом и дайте ответ на следующие вопросы. Вы должны определить, является ли растение V и W однодольным или двудольным, чтобы дать ответ позднее. После завершения выполнения части В поместите приготовленные вами препараты на **размеченный лист, поднимите карточку** и ассистент поставит печати в клетках для ваших препаратов.

### **Q.1.B. (3 балла за каждое растение, баллы будут засчитаны лишь в том случае, если выбраны все правильные ответы, общее количество баллов 6)**

Какой характер имеет распределение проводящих пучков в стеблях растений V и W?

Отметьте знаком «**X**» правильные ответы в Листе Ответов.

## **Часть С: Строение листа растения (общее количество баллов 14)**

### **Введение:**

Вначале найдите верхний и нижний эпидермис листьев у растений М и N. Ответьте на следующие вопросы. Вы должны определить, является ли растение М и N однодольным или двудольным, чтобы дать ответ позднее. После завершения выполнения этой части поместите приготовленные вами препараты на **размеченный лист, поднимите карточку** и ассистент поставит печати в клетках для ваших препаратов.

### **Q.1.C.1 (8 баллов)**

#### **Наблюдение устьиц у растения М:**

Отделите полоски верхнего и нижнего эпидермиса листьев рукой или соскоблите ненужные части листа, оставив только эпидермис. Поместите каждую из этих эпидермальных тканей эпидермальной частью вверх на отдельные предметные стекла.

Добавьте к каждому образцу ткани каплю воды и накройте покровным стеклом.

Рассмотрите препараты под микроскопом и проведите измерения при помощи окулярного микрометра. При наблюдении под объективом с увеличением 4X самое маленькое деление микрометра составляет приблизительно 30  $\mu\text{m}$ . Дайте ответы на следующие вопросы в

Листе Ответов.

(a) Измерение размера устьица верхнего эпидермиса:

i) Какова величина одного наименьшего деления шкалы окулярного микрометра

при увеличении линзы объектива 40X? (1 балл)

ii) Измерьте длину 3 замыкающих клеток, затем усредните их длину (3 балла)

(b) Измерение плотности устьиц на нижнем эпидермисе:

i) Какова приблизительная площадь поля зрения при увеличении объектива 40X? (1 балл)

ii) Рассмотрите 3 поля зрения и подсчитайте количество устьиц в каждом из них.

Затем определите среднюю плотность устьиц (3 балла)

**Q.1.C.2 (6 баллов, баллы будут засчитываться только в том случае, если будут выбраны все правильные ответы)**

**Изучение ткани листа растения N:**

Покройте прозрачным лаком для ногтей верхний и нижний эпидермис листа. После высыхания лака осторожно отделите слои лака и поместите их на предметное стекло, эпидермальной стороной вверх. Добавьте к каждому образцу каплю воды, накройте покровным стеклом. Для наблюдения используйте подходящее увеличение. Определите распределение устьиц в верхнем и нижнем эпидермисе и предположите в соответствии со структурой тканей листа местообитание растения N. Отметьте знаком «X» правильные ответы в Листе Ответов.

**Часть D: Однодольные или двудольные растения (5 баллов)**

**Q.1.D (1 балл за каждый ответ, общее количество баллов 5)**

Определите, являются растения K, V, W, M и N однодольными или двудольными. Отметьте знаком «**X**»

правильные ответы в Листе Ответов.



## **Часть Е: Кристаллы кальция в растительных клетках (20 баллов)**

### **Введение:**

У некоторых растений имеются идиобласты, которые могут образовывать полигональные кристаллы оксалата кальция или кристаллы карбоната кальция. Приготовьте аккуратно при помощи лезвия из образцов четырех растений (P, Q, R, S) поперечные срезы необходимой толщины и поместите их на отдельные предметные стекла. Добавьте к каждому срезу каплю воды и накройте его покровным стеклом. Рассмотрите срезы под микроскопом и проверьте наличие кристаллов кальция. Если кристаллы присутствуют, определите их местонахождение в ткани (присутствие или отсутствие в клетках проводящих пучков), затем осторожно поднимите покровное стеклышко, уберите избыток воды вокруг препарата и добавьте к нему несколько капель HCl. Опять накройте препарат покровным стеклом и рассмотрите его под микроскопом. Сделайте предположение относительно типа присутствующих кристаллов. После окончания части Е расположите ваши препараты на размеченный лист для проверки. **Поднимите карточку** и ассистент поставит печати в клетках для ваших препаратов.

**Q.1.E (6 баллов за каждое растение, в котором присутствуют кристаллы, баллы будут засчитываться только в том случае если будут выбраны все правильные ответы; 2 балла за растение, в котором нет кристаллов; общее количество баллов 20)**

Основываясь на ваших наблюдениях, внесите соответствующие буквы в таблицу в Листе Ответов.

Растения: P; Q; R; S

Локализация кристаллов: **A** (большинство кристаллов присутствует в клетках проводящих пучков)  
**B** (кристаллы отсутствуют в клетках проводящих пучков)  
Типы кристаллов: **C** (полигональные кристаллы оксалата кальция); **D** (кристаллы карбоната кальция)

### **Документация (общее количество баллов 10)**

После окончания всех частей (от A до E) задания I, перепроверьте еще раз, проставлены ли все печати на вашем **размеченном листе**. Если нет, то **поднимите вашу карточку** и ассистент проверит ваш лист (каждый препарат оценивается по 0,5 балла, всего 5 баллов).

## Задание II (40 баллов)

### Физиология и генетика растений

#### Приборы общего пользования

ELISA ридер

#### Приборы

#### Количество

1	Микропипетки P200 и P1000	по 1
2	Наконечники для микропипеток P200 и P1000	по 1 коробке
3	Планшет 96-луночный	1
4	Микропробирки (Эппендорфы) объемом 1,5 мл для приготовления стандартных растворов (используйте Эппендорфы, подписанные 0μM, 25μM, 50μM, 100μM, 200μM, 400μM)	12 (6 дополнительных неподписанных)
5	Микроштатив с 80 ячейками / штатив для пробирок с 4-мя отверстиями	по 1
6	Вортекс (для перемешивания)	1
7	Маркерный карандаш	1

#### Материалы

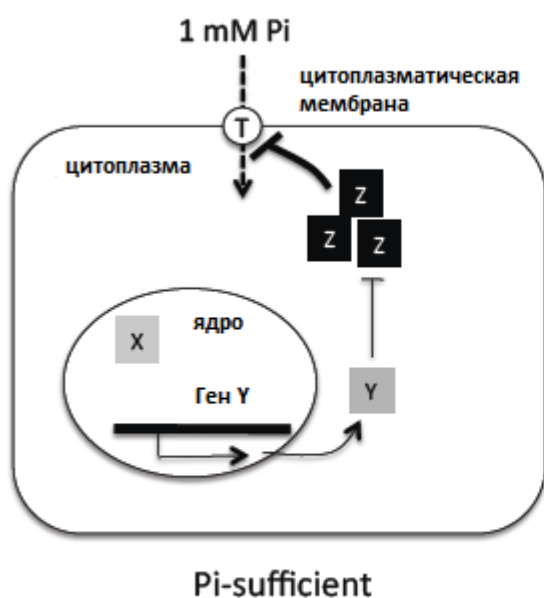
#### Количество

1	Раствор для определения фосфата (обозначенный как “Solution A”)	10 мл в пробирке
2	Раствор 400 μM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (обозначенный как “Solution B”)	10 мл в пробирке
3	Бидистиллят (обозначенный как “ddH <sub>2</sub> O”)	50 мл в пробирке
4	6 проб для тестирования (находящихся в Эппендорфах, обозначенных как образцы #1, #2, #3, #4, #5 и #6)	

## Введение:

Фосфат является важным элементом питания растений, который входит в состав клеточных мембран, нуклеиновых кислот и богатых энергией соединений, таких как АТФ. Отсутствие фосфора может оказывать значительное влияние на рост и развитие растений. Растения могут чувствовать изменение содержания фосфата в среде и соответственно регулировать экспрессию своих генов, изменяя в клеточной мембране активность ферментов транспорта фосфата, поддерживая таким образом постоянство концентрации фосфата внутри растения. Используя модельное растение *Arabidopsis*, ученые обнаружили, что клетки корня отвечают на условия достаточного обеспечения фосфатом (Pi-sufficient; т.е. 1 мМ) или условия дефицита фосфата (Pi-deficient; т.е. 10 мкМ) как показано на Рисунках 2 и 3 соответственно:

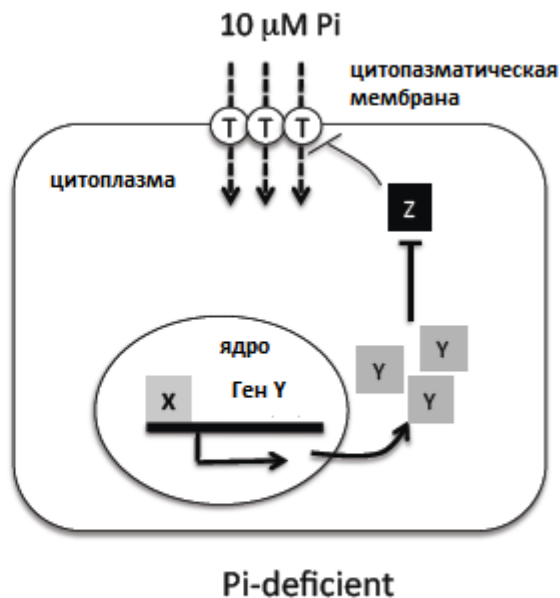
**Рисунок 2**



**Pi-sufficient**

**Условия обеспечения фосфатом**

**Рисунок 3**



**Pi-deficient**

**Условия недостатка фосфата**

В условиях достаточного обеспечения фосфатом *Arabidopsis* (Pi-sufficient), (Рис. 2),

белок Z осуществляет отрицательную регуляцию уровня белка T в плазматической мембране, который отвечает за транспорт фосфата в клетки с целью предотвращения повышенного поглощения фосфата, приводящего к токсичности. С другой стороны, при недостаточности фосфата (Pi-deficient), (Рис. 2), фактор транскрипции X усиливает экспрессию гена Y, увеличивая тем самым уровень белка Y. Белок Y может способствовать разрушению белка Z, что приводит к увеличению уровня белка T и, соответственно, повышенному поглощению фосфата. Таким образом, уровень фосфата в побеге растения пропорционален эффективности его поглощения в корне.

Уровень фосфата у растения может значительно меняться, если экспрессия генов, кодирующих белки T, X, Y и Z, нарушается мутацией или трансгеном. Поэтому физиологи растений могут использовать такой мутант или трансгенные растения для выяснения роли и взаимодействия этих генов в механизме регуляции гомеостаза фосфата.

Предоставленные вам 6 образцов в микропробирках Эппендорф были экстрагированы из побегов пяти линий *Arabidopsis* (от A до E), выращенных либо в условиях достаточного обеспечения фосфатом (1 мМ) или при его дефиците (10 мкМ) как описано в Таблице 1. Растение *Arabidopsis* A - это растение дикого типа, а растения B, C, D и E являются либо нокаут-мутантами (КО; нулевой мутант с полной потерей функции гена), либо растениями мутантной линии со сверхэкспрессией генов T, X, Y или Z. Вы должны будете измерить уровень фосфата в каждом образце и определить принадлежность образца (его характеристики) на основании критериев, описанных на Рисунках 2 и 3. Каждый образец был приготовлен путем экстракции 20 проростков, сырой вес которых представлен в Таблице 1, и объем экстрактов был доведен до 10 мл бидистиллированной водой ddH<sub>2</sub>O.

**Таблица 1**

Номер образца	Растение	[Pi] в среде	Сырой вес проростков (мг)
1	A	1 мМ	40,4
2	A	10 мкМ	17,3
3	B	1 мМ	28,0
4	C	1 мМ	39,2
5	D	1 мМ	30,6
6	E	1 мМ	33,8

Используйте предоставленное оборудование и растворы для измерения концентрации фосфата в каждом образце, как описано в ходе работы.

**Ход работы:**

1. Для построения калибровочной кривой приготовьте путем последовательных разведений 400  $\mu\text{M}$  раствора  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Solution B) водой ddH<sub>2</sub>O в микропробирках объемом 1,5 мл растворы фосфата со следующими концентрациями: 0, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{M}$ . Для тщательного перемешивания растворов при разведении используйте Вортекс. Для каждой концентрации объем должен составлять не менее 0,5 мл разведенного стандартного раствора. При помощи дозатора со свежим наконечником перенесите по 0,1 мл каждого стандартного раствора в указанные лунки в 96-луночный планшет как показано на Рисунке 4. Сделайте пробу для каждой концентрации в двух повторях.

**Рисунок 4 Положение стандартных растворов и образцов на 96-луночном планшете**

	Стандарты		Образцы				Стандарты					
A		0		#1	#1		0					
B		25		#2	#2		25					
C		50		#3	#3		50					
D		100		#4	#4		100					
E		200		#5	#5		200					
F		400		#6	#6		400					
G												
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

2. Перенесите по 0,1 мл каждого экстракта проростков в указанные лунки в 96-луночный планшет как показано на Рисунке 4 в двух повторностях.

3. Добавьте в каждую лунку, содержащую как стандарты, так и образцы, по 0,1 мл раствора для определения фосфата (Solution A). Осторожно перемешайте содержимое лунок постукиванием по планшетке сбоку.
4. После окончания этапа 3 **поднимите карточку** и подождите ассистента, который поможет вам измерить оптическую плотность реакционной смеси при 820 нм на ELISA ридере.
5. Ассистент распечатает ваш результат и отдаст его вам. Напшите на распечатке ваш Код Студента.
6. Дайте ответ на следующие вопросы:



**Q.2.1. (общее количество баллов 18)**

Вычислите среднее значение оптической плотности для каждого образца и каждого стандарта. Для построения калибровочного графика используйте разграфленную бумагу в Листе Ответов. **(0,5 балла за каждую правильную точку калибровочного графика)**

Определите концентрацию фосфата в экстрактах и рассчитайте содержание фосфата в нмоль на мг сырого веса проростков образцов от 1 до 6. Внесите результаты в таблицу в Листе Ответов. **(2 балла за каждую измеренную вами концентрацию фосфата, 0,5 балла за каждое рассчитанное вами значение содержания фосфата в нмоль/мг)**

**Q.2.2. (Множественные ответы, 4 балла. Баллы будут начисляться если выбраны все правильные ответы)**

Определите, является ли каждое утверждение верным или неверным для растений, у которых содержание фосфата (нмоль/мг) выше, чем у дикого типа. Отметьте знаком «**X**» правильный ответ в Листе Ответов.

- (A) У этого растения фактор X не может активироваться, что и приводит к повышению поглощения фосфата.
- (B) Потеря у этого растения функции гена Y приводит к увеличению поглощения фосфата.
- (C) Потеря у этого растения функции гена Z приводит к увеличению поглощения фосфата.
- (D) Это растение несет трансген, который сверхэкспрессирует ген Y, что вызывает потерю ингибирования белка T, приводящее к высокой активности поглощения фосфата.
- (E) Белок T у этого растения имеет дефект, и это делает невозможным эффективное поглощение фосфата.

(F) Фактор транскрипции X у этого растения несет мутацию, что делает его неспособным связываться с промотором гена Y.

**Q.2.3. (2,5 балла за каждый ответ, общее количество баллов 10)**

Основываясь на результатах эксперимента, сопоставьте растения (B, C, D или E) с соответствующими описаниями в Листе Ответов.

**Q.2.4. (один ответ, 4 балла)**

Если растение дикого типа (W), нокаут-мутант по гену X (X), и нокаут-мутант по гену Y (Y) вырастить в одних и тех же условиях недостаточности фосфата, то каким будет уровень фосфата в стеблях этих растений, если расположить их от самого низкого уровня к самому высокому? Отметьте знаком «X» правильный ответ в Листе Ответов.

(A)  $X < W < Y$

(B)  $Y < W < X$

(C)  $W < X < Y$

(D)  $W < Y < X$

(E)  $X < Y < W$

(F)  $Y < X < W$

**Q.2.5. (один ответ, 4 балла)**

Вестерн-блоттинг является методом для определения уровня специфического белка с помощью антител. Какой из следующих рисунков наиболее вероятно является результатом Вестерн блот анализа белков Y и Z из экстрактов белков образцов #1 и 2? Отметьте знаком «X» правильный ответ в Листе Ответов.

