

Pracownia botaniczna i mykologiczna

Liczba punktów <small>(wypełnia KGOB)</small>	/ 30
--	------

PESEL	Imię i nazwisko	Grupa				Nr
		Czerwona	Niebieska	Zielona	Żółta	

Zaznacz znakiem X swoją grupę

Czas: 90 min.

Łączna liczba punktów do zdobycia: 30

Pracownia składa się z dwóch części: botanicznej i mykologicznej.

Dobra rada: Wykonanie preparatu z części 1. wymaga ok. 15 min. maceracji tkanek korzenia w barwniku. Po zalaniu korzenia barwnikiem i nastawieniu minutnika na 15 minut, można rozpocząć rozwiązywanie części 2.

*Korzenie w mieszaninie barwiącej powinny przebywać **co najmniej 15 min.**, zatem wydłużenie tego czasu jest korzystne (w tym czasie można skończyć część 2).*

CZĘŚĆ 1.

Zadaniem uczestnika jest wykonanie analizy kariotypu i charakterystyki podziałów (wyliczenie indeksu mitotycznego i fazowego) wierzchołków wzrostów korzeni rośliny kontrolnej oraz poddanej działaniu nieznanego czynnika.

Do obserwacji wykonanego preparatu należy użyć mikroskopu, wykorzystując obiektywy o powiększeniu do 40×.

Materiały i narzędzia:

1. Dwie kolorowe próbówki o poj. 1,5 ml, jedna podpisana KONTROLNA, druga TRAKTOWANA. Każda z nich zawiera jeden korzeń rośliny jednoliściennej: utrwalony i przechowywany w 70% etanolu.
2. Mikroskop z obiektywami: 4×, 10× (lub 20×) i 40×.
3. Butelka z zakraplaczem zawierająca barwnik – acetoorceinę.
4. Pęseta.
5. Żyletka.
6. Igła preparacyjna.
7. Tacka styropianowa, na której wykonujemy barwienia.
8. Minutnik.
9. 2 szkiełka podstawowe.
10. Szkiełka nakrywkowe.
11. Bibuła filtracyjna.
12. Krystalizator na zlewki.
13. Ołówek automatyczny.
14. Rękawiczki jednorazowe.

Wykonanie preparatu:

Przed wykonaniem preparatu **załóż rękawiczki** – w mieszaninie barwnika znajduje się kwas octowy lodowaty i kwas solny, które mogą działać drażniąco na skórę i błony śluzowe.

1. Przy pomocy pęsety wyjmij delikatnie korzeń z próbówki na szkiełko podstawowe (staraj się złapać korzeń pośrodku, by nie uszkodzić tkanki merystematycznej wierzchołka wzrostu), przyjrzyj mu się uważnie.
2. Umieść szkiełko na ciemnym polu obok. Stożek wzrostu, z którego należy wykonać preparat, jest zaostroszony i bardziej biały, gdyż zawiera małe komórki z gęstą cytoplazmą.
3. Żyłką odetnij fragment ok. 0,5 cm od strony stożka wzrostu, resztę korzenia możesz wyrzucić.
4. Na korzeń nanieś 2 krople barwnika i pozostaw do maceracji na co najmniej 15 min.
5. Tak samo postąp z drugim korzeniem (Pamiętaj by podpisać szkiełka: korzeń KONTROLNY, korzeń TRAKTOWANY).
6. Połóż szkiełko nakrywkowe na korzeń, na to nałóż kawałek bibuły, delikatnie dociśnij otwartą dłoń. UWAGA! Jeśli czujesz opór, oznacza to, że tkanka nie uległa jeszcze maceracji – poczekaj 2-3 min. i spróbuj raz jeszcze.
7. Trzonkiem igły preparacyjnej delikatnie popukaj w szkiełko preparacyjne nad zgniecionym korzeniem, by komórki rozłożyły się pojedynczą warstwą. Pomaga również „głaskanie” preparatu w kierunku od centrum (gdzie komórek jest najwięcej) na zewnątrz.
8. Im delikatniejszy odcień preparatu, tym lepsza dyspersja komórek i łatwiejsza późniejsza obserwacja.
9. Oczyszcz preparat z nadmiaru barwnika używając bibuły.
10. Umieść preparat w łapach stolika mikroskopu i zacznij obserwację, poczynając od najmniejszego powiększenia.

Na podstawie obserwacji komórek odpowiedz na następujące pytania.

Zadanie 1. (2 pkt)

Ile par chromosomów znajduje się w komórce rośliny?

- a) 4
- b) 8
- c) 12
- d) 16

Zadanie 2. (10 pkt)

Oblicz indeks mitotyczny i fazowy dla preparatu kontrolnego i traktowanego.

Dla ułatwienia zapoznaj się z załącznikiem nr 1.

- *Ustaw ostrość w losowo wybranym polu widzenia (od obiektywu 4× do 40×) i sprawdź czy widoczna jest pojedyncza warstwa komórek (jeśli nie, wybierz losowo inne pole).*

- Policz wszystkie komórki w polu widzenia i zapisz wynik w tabeli.
- W tym samym polu widzenia wyszukaj komórki w profazie, metafazie, anafazie i telofazie, a wyniki zapisz w tabeli.
- Następnie ustaw kolejne pole widzenia – czynność powtarzaj do momentu zliczenia **minimum 500** komórek. Jeśli masz już np. 470 komórek i losujesz kolejne pole, to policz **wszystkie** komórki w polu widzenia, a nie tylko brakujące 30.

IM – Indeks Mitotyczny = odsetek komórek dzielących się w populacji wszystkich komórek merystematycznych:

$$IM = \frac{P+M+A+T}{P+M+A+T+I} \times 100\%$$

P, M, A, T, I – poszczególne fazy cyklu mitotycznego lub komórkowego: profaza (P), metafaza (M), anafaza (A), telofaza (T) oraz interfaza (I; rozumiana jako faza między podziałami mitotycznymi).

IF – Indeks Fazowy = odsetek komórek w danej fazie mitozy w populacji komórek dzielących się. Poniżej przykład dla indeksu fazowego komórek w profazie:

$$IF_P = \frac{P}{P+M+A+T} \times 100\%$$

Preparat z korzenia kontrolnego:

		profaza	metafaza	anafaza	telofaza	bez podziału	wszystkie komórki
liczba komórek	Pole 1						
	Pole 2						
	Pole 3						
	Pole 4						
	Pole 5						
suma							
IF (%)						IM (%) =	

Preparat z korzenia traktowanego:

		profaza	metafaza	anafaza	telofaza	bez podziału	wszystkie komórki
liczba komórek	Pole 1						
	Pole 2						
	Pole 3						
	Pole 4						
	Pole 5						
suma							
IF (%)						IM (%) =	

Zadanie 3. (5 pkt)

Zaobserwuj, czy podane nieprawidłowości znalazłeś w preparacie wykonanym z korzenia traktowanego.

a) mikrojądra:

TAK NIE

b) minucje (fragmenty chromosomów powstałe w wyniku delecji):

TAK NIE

c) komórki wielojądrzaste:

TAK NIE

d) komórki z nietypowym kształtem jądra:

TAK NIE

e) mosty chromosomowe:

TAK NIE

f) chromosom pierścieniowy:

TAK NIE

g) zmieniony indeks fazowy (o min. 10 punktów procentowych w stosunku do próby kontrolnej):

TAK NIE

h) C-metafazę:

TAK NIE

i) C- anafazę:

TAK NIE

j) C-telofazę:

TAK NIE

Zadanie 4. (3 pkt)

Jaki związek zastosowano w próbie traktowanej, jeśli obserwowałeś zaznaczone przez siebie nieprawidłowości?

- a) Truciznę preprofazową (hamująca syntezę białek, RNA, DNA i metabolizm oddechowy).
- b) Związek mutagenny (powodujący mutacje DNA i aberracje chromosomowe).
- c) Inhibitor wrzeciona podziałowego (skutkujący nieprawidłowym obrazem mitozy, tzw. C-mitoza).
- d) Czynniki genotoksyczne – promieniowanie jonizujące (powodujący mutacje DNA i aberracje chromosomowe).

CZĘŚĆ 2.

Zadaniem uczestnika jest identyfikacja dwóch gatunków grzybów strzępkowych w oparciu o obserwację ich wzrostu na podłożu mineralnym zawierającym pojedyncze źródła węgla.

Każdy z uczestników otrzyma:

1. uszczelnione parafilmem szalki Petriego z dwoma gatunkami grzyba (oznaczonego jako **A** i **B**) i czterema wariantami podłoża z różnymi źródłami węgla: **1** – pektyna, **2** – skrobia, **3** – wodny agar (gdzie agar jest jedynym źródłem węgla), **4** – celuloza.

PRZYKŁAD: Szalka oznaczona jako „B2” zawiera grzyba z gatunku „B” rosnącego na podłożu „2” (zawierającym skrobię).

UWAGA! Szalki są wielokrotnego użytku – **nie należy ich otwierać!**

UWAGA! Podłoże oznaczone cyfrą **1 (pektyna)** jest bardzo trudne do odpowiedniego zestalenia, przez co w temperaturze pokojowej ma konsystencję bardzo gęstego dżemu.

Należy obchodzić się z nim ostrożnie (nie odwracać szalki denkiem do góry i nie wstrząsać).

2. kwadrat z czarnego papieru ułatwiający obserwację wzrostu kolonii.

Zadanie 5. (8 pkt)

Na podstawie obserwacji szalek określ, czy dany gatunek grzyba jest zdolny do wzrostu na pożywkach zawierających określone źródła węgla. Wpisz w odpowiednie pole tabeli znak „+” (plus), jeśli grzyb jest zdolny do wzrostu, albo znak „-” (minus) – jeśli nie wykazuje wzrostu.

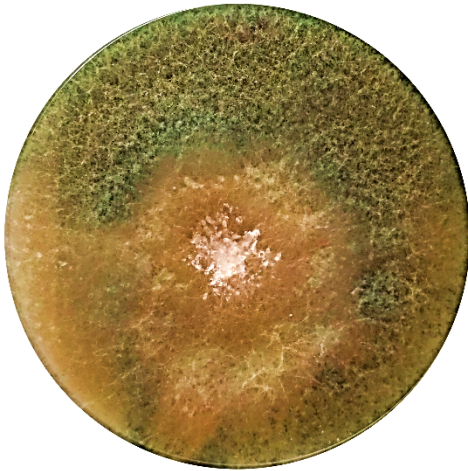
	Pektyna (1)	Skrobia (2)	Wodny agar (3)	Celuloza (4)
Grzyb A				
Grzyb B				

Zadanie 6. (2 pkt)

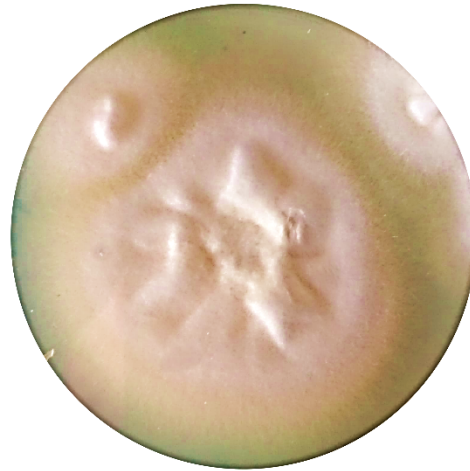
W oparciu o charakterystyki czterech rodzajów grzybów strzępkowych określ, które z nich kryją się pod oznaczeniami A i B.

Dla ułatwienia dla każdego z opisanych gatunków przygotowano zdjęcie obrazujące jego wzrost kolonii na podłożu bogatym (nielimitującym).

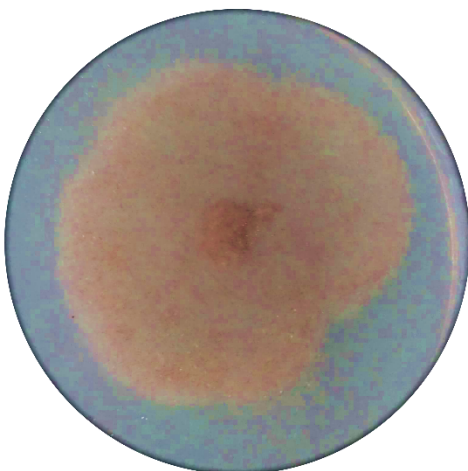
Trichoderma sp.



Lecanicillium sp.



Mucor sp.



Mortierella sp.



Trichoderma sp. Grzyby saprofityczne, często spotykane w glebie i na gnijącym drewnie, ale także na owocach. Kolonie z początku hialinowe (przejrzyste), z czasem po produkcji konidiów przybierają zielonkawą barwę. Na ubogich podłożach szybko tracą zdolność do sporulacji, ale są w stanie na nich rosnąć.

Lecanicillium sp. W większości grzyby entomopatogenne, infekujące liczne gatunki owadów. Wielu przedstawicieli tego rodzaju może także bytować w glebie. Produkują enzymy zdolne do rozkładania nierozpuszczalnych w wodzie biopolimerów (takich jak chityna), ale na podłożach niezawierających prostych cukrów (mono- i disacharydów) na ogół nie zarodnikują rosnąc w postaci białych, hialinowych strzępek tworzących pomarszczone kolonie.

Mucor sp. Jedne z bazalnych grzybów saprofitycznych, niewyspecjalizowane. Tworzą szybko rosnące, watowate kolonie o barwie białej lub żółtawej, z dużymi, czarnymi zarodnikami na wyraźnym trzonku. Są stosunkowo ograniczone enzymatycznie – większość nie produkuje enzymów zdolnych do rozkładania celulozy czy lignin i do wzrostu wymagają rozpuszczalnych w wodzie węglowodanów.

Mortierella sp. Często spotykane grzyby glebowe, ekologiczni oportuniści. Do optymalnego wzrostu zazwyczaj wymagają bogatego podłoża, na którym tworzą komórczakowe strzępki. Ich kolonie są hialinowe, z niewielkimi, czarnymi zarodnikami (bez trzonków), podobne do tych spotykanych w rodzaju *Mucor*. Zazwyczaj posiadają zdolność do rozkładania chityny, ksylanu oraz hemicelulozy (choć praktycznie nigdy celulozy).

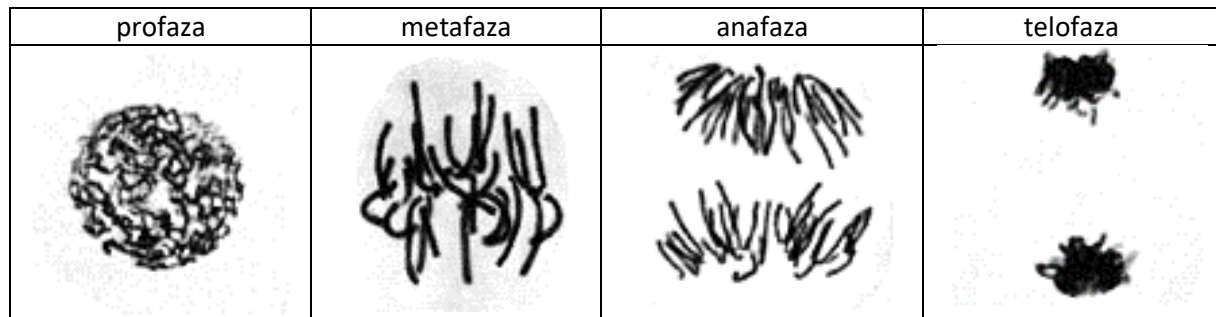
ODPOWIEDŹ

Grzyb A

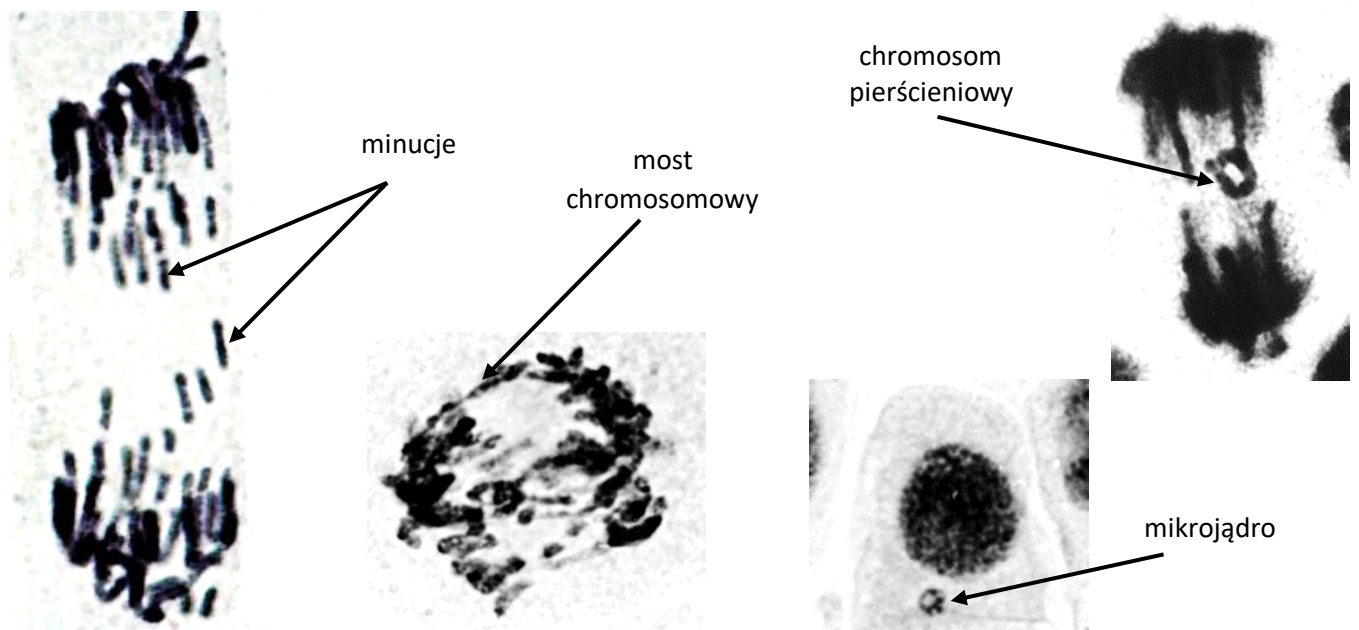
Grzyb B

Załącznik 1.

Prawidłowe fazy mitozy:



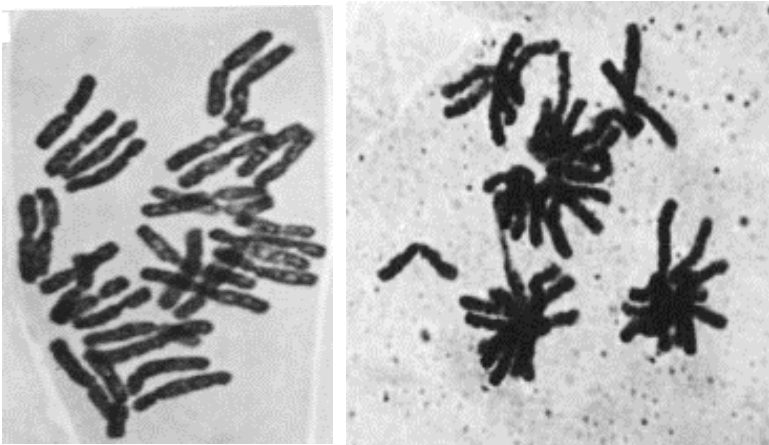
Efekty działania związków genotoksycznych, cytotoksycznych i innych trucizn:



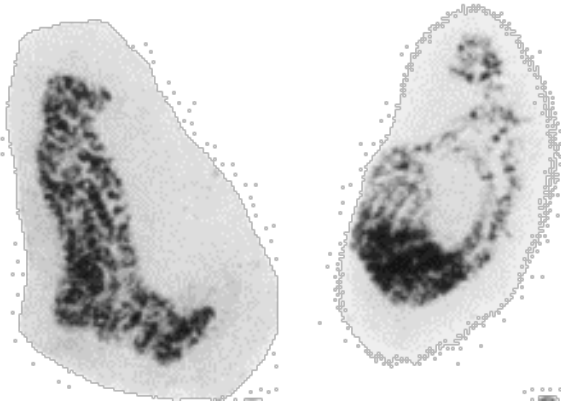
C-metafaza:



C-anafaza:



C-telofaza:



48 Olimpiada Biologiczna

Pracownia botaniczna i mykologiczna – zasady oceniania rozwiązania zadań

Zadanie 1. (0–2 pkt)

- 2 pkt – za wskazanie odpowiedzi **b** (8).
- 0 pkt – za odpowiedź nieprawidłową lub brak odpowiedzi.

Zadanie 2. (0–10 pkt)

- 5 pkt – za każdą z dwóch poprawnie wypełnionych tabeli (razem 10 pkt), składowe:
 - 3 pkt – zaobserwowanie komórek dzielących się i dzielących się, poprawnie rozpoznane fazy mitozy, liczba komórek powyżej 500;
 - 1 pkt – za poprawne wyliczenie indeksu mitotycznego (wzorcowy indeks mitotyczny dla preparatu 1,5–2,0%; zaliczany jako poprawny w przedziale 1–20%);
 - 1 pkt – za poprawne wyliczenie indeksu fazowego (dla wszystkich faz).
- 0,5 pkt – za niepoprawne obserwacje w tabeli, nieprawidłowe rozpoznanie faz mitozy, ze szczególnym uwzględnieniem przeszacowania profazy.
- 0 pkt – za odpowiedź nieprawidłową lub brak odpowiedzi, lub odpowiedź udzieloną nie na podstawie obserwacji preparatu.

Przykłady ocen pojedynczych tabel:

- Poprawnie wyliczone indeksy, ale nieprawidłowa liczba komórek dzielących się – z naciskiem na przeszacowanie profaz. Przy $IM < 20\%$ – połowa wartości maksymalnej za tabelę, czyli 2,5 pkt.
- Prawidłowe obserwacje, prawidłowe podstawienie do wzorów dla indeksów fazowych, ale brak wyliczenia w % (tylko zapis w postaci np. $x \cdot 100/y$) – obniżenie punktacji o 0,5 pkt dla każdego indeksu, czyli w sumie 4 pkt.
- Prawidłowe obserwacje, wyliczenie indeksów, ale $IM > 20\%$ – obniżenie o 0,5 pkt, czyli 4,5 pkt.
- Przeszacowanie fazy innej niż profaza lub kilku faz, lub za mała liczba komórek, ale zrozumienie zasady wyliczenia obydwu indeksów (mimo nieprawidłowych wyników) – 1 pkt za całość.

Zadanie 3. (0–5 pkt)

- 0,5 pkt – za każdą prawidłową odpowiedź (razem 5 pkt).
- 0 pkt – za odpowiedź nieprawidłową lub brak odpowiedzi.

Prawidłowe odpowiedzi:

a) NIE b) NIE c) NIE d) TAK e) NIE f) NIE g) TAK h) TAK i) TAK j) TAK

Zadanie 4. (0–3 pkt)

- 2 pkt – za wskazanie odpowiedzi c (inhibitor wrzeciona podziałowego).
- 0 pkt – za odpowiedź nieprawidłową lub brak odpowiedzi.

Zadanie 5. (0–8 pkt)

- 1 pkt – za poprawne określenie zdolności do wzrostu (lub jej braku) na przygotowanych podłożach dla każdego wariantu doświadczenia (razem 8 pkt).
- 0 pkt – za odpowiedź nieprawidłową lub brak odpowiedzi.

Prawidłowe odpowiedzi:

	Pektyna	Skrobia	Wodny agar	Celuloza
Grzyb A	-	+	+	+
Grzyb B	+	+	+	+

Zadanie 6. (0–2 pkt)

- 1 pkt – za prawidłowe rozpoznanie każdego rodzaju w oparciu o podane opisy (razem 2 pkt).
- 0 pkt – za odpowiedź nieprawidłową lub brak odpowiedzi.

Prawidłowe odpowiedzi:

Grzyb A: *Trichoderma* sp.

Grzyb B: *Lecanicillium* sp.