

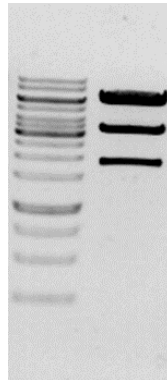
**Autorské riešenia**

**Obidve praktické úlohy sú pripravené na 80 minút, na test odporúčame 90 minút . Max. počet bodov za test je 90, za praktickú úlohu č.1 je max. počet 45 bodov a za praktickú úlohu č.2 je max. počet 45 bodov. Úspešný riešiteľ musí mať nad 50 % bodov. V prípade rovnosti bodov rozhoduje počet bodov za test.**

**Praktická úloha č. 1 – Autorské riešenie**

*Výsledok analýzy:*

Správny výsledok analýzy dĺžky fragmentov testovanej vzorky DNA po agarózovej gélovej elektroforéze



**Presný postup, výsledkom ktorého je získanie správneho restričného profilu ..... 15 bodov**

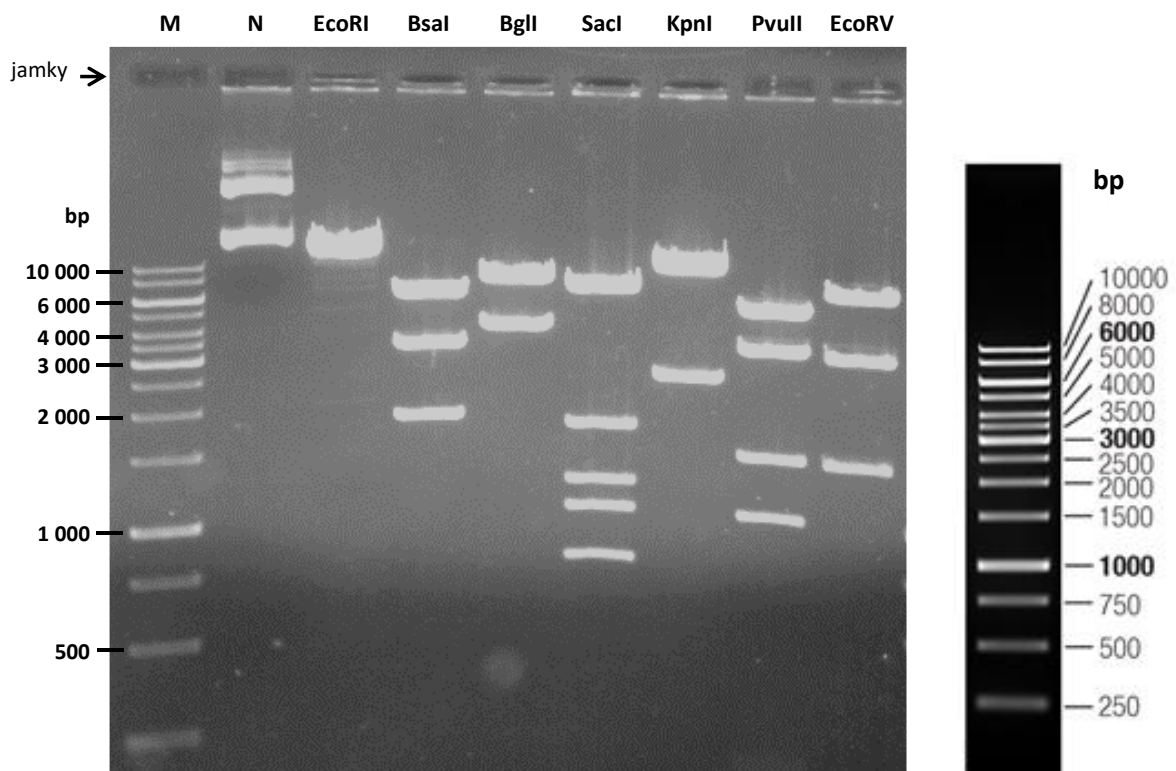
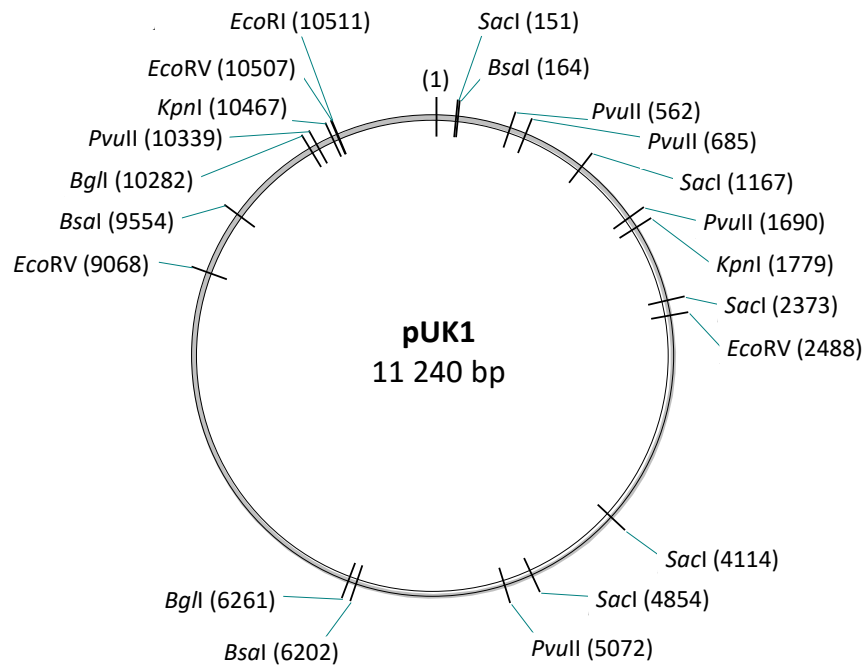
Testovaná vzorka DNA bola štiepená restričnou endonukleázou **BsaI** ..... **2 bod**

Dĺžky jednotlivých fragmentov testovanej vzorky DNA sú **6 038 bp + 3 352 bp + 1 850 bp**

..... **3 body**

**Spolu za praktickú úlohu**

..... **20 BODOV**

**A**

**Obr. 2. Mapa plazmidu pUK1 použitého na restrikčnú analýzu a jeho restrikčné profily získané štiepením vybranými restrikťázami.**

**A.** Mapa kružnicovej molekuly pUK1 (dĺžka 11 240 bázových párov „bp“) s vyznačenými polohami restrikčných miest pre vybrané restrikťázy. V zátvorke je uvedené poradie prvého nukleotidu restrikčného miesta vzhľadom k celkovej dĺžke plazmidu.

**B.** Restrikčné profily plazmidu pUK1 po separácii agarovou gélovou elektroforézou. Označenia dráh (ak nie je uvedené inak) nesú názov restrikčnej endonukleázy, ktorej štiepením plazmidu pUK1 bol získaný príslušný restrikčný profil.

M – ukazovateľ molekulových veľkostí DNA (úplný popis je schematicky znázornený vpravo od gélu)

N – neštiepený plazmid pUK1

1. V ktorej dráhe gélu na Obr. 2B sa nachádza fragment DNA, ktorý definuje presnú dĺžku plazmidu pUK1? Aká je dĺžka tohto fragmentu?

**Dráha „EcoRI“ – dĺžka 11 240 bp ..... 2 body**

**Štiepením plazmidu len v jednom mieste (restriktázou EcoRI, ktorá má len 1 rozpoznávacie/restriktčné miesto) sa kružnicová molekula DNA len „otvorí“, linearizuje a zodpovedá presnej dĺžke plazmidu.**

2. V ktorej dráhe gélu na Obr. 2B vidíme molekuly DNA, ktorých dĺžka nemôže byť určená pomocou ukazovateľa molekulových veľkostí DNA? Stručne vysvetlite prečo.

**Dráha „N“ ..... 1 bod**

**Zdôvodnenie: ..... 3 body**

**Pôvodná, neštiepená molekula plazmidu má kružnicový tvar, kvôli špiralizácii DNA môže vytvárať rôzne formy plazmidovej DNA (napr. superšpiralizovanú alebo relaxovanú). Všetky ostatné dráhy, vrátane dráhy s ukazovateľom molekulových veľkostí DNA (dráha „M“), obsahujú lineárnu DNA. Tieto dve formy – kružnicová a lineárna – sa pohybujú v agarózovom géli rozdielne, a preto nemôžu byť porovnávané.**

3. Jeden z restriktčných profilov na Obr. 2B nie je kompletný. O ktorý profil ide? Ktorý z fragmentov, ktoré očakávate po štiepení pUK1 príslušnou restriktázou, chýba a prečo? Navrhnete, ako by ste zmenili podmienky experimentu tak, aby ste získali všetky fragmenty tohto konkrétneho restriktčného profilu.

**Restriktčný profil získaný restriktázou PvuII (dráha „PvuII“) chýba najkratší fragment s dĺžkou 123 bp ..... 2 body**

**Zdôvodnenie ..... 3 body**

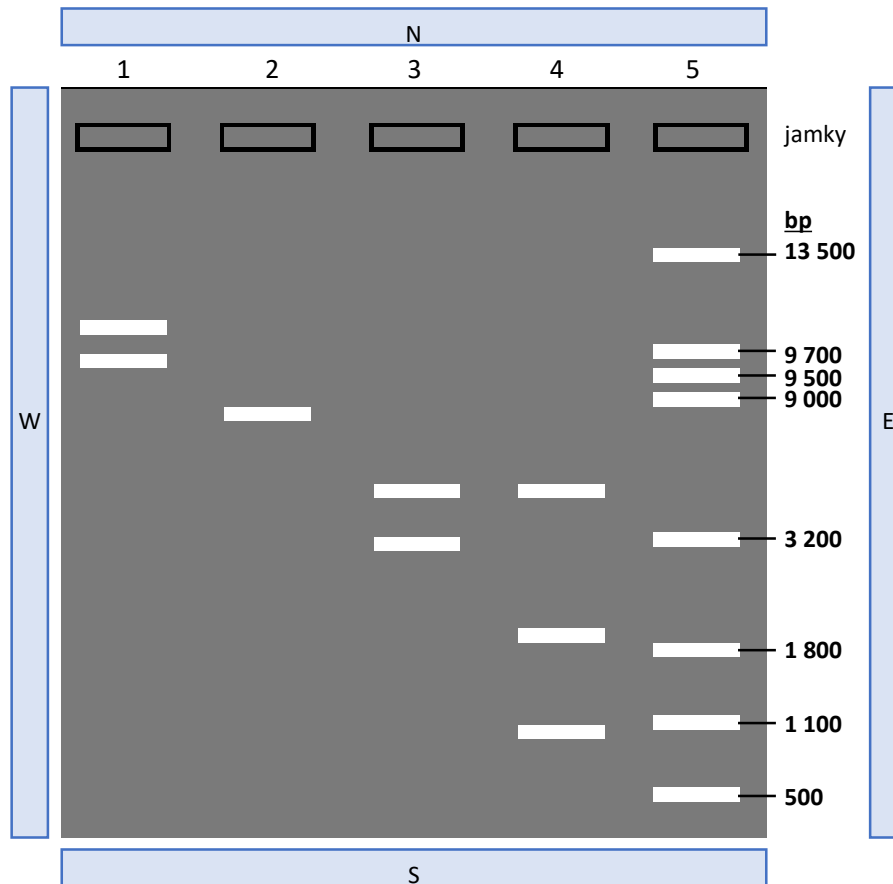
**Počet restriktčných miest prítomných v plazmide pre danú restriktázu určuje počet fragmentov očakávaný po štiepení touto restriktázou.**

**V mape plazmidu je pre enzým PvuII vyznačených 5 restriktčných miest, jeho štiepením má vzniknúť 5 fragmentov s dĺžkou 5 267 bp + 3 382 bp + 1 463 bp + 1 005 bp + 123 bp. Príslušná dráha „PvuII“ v agarózovom géli obsahuje len 4 dlhšie fragmenty, ktorých dĺžka zodpovedá očakávaným veľkostiam (porovnaním s ukazovateľom molekulových veľkostí DNA v dráhe „M“). Najkratší fragment s veľkosťou 123 bp sa v géli pohyboval tak rýchle, že v priebehu separácie fragmentov DNA elektroforézou prešiel celou dĺžkou gélu a vytekol z neho, do elektroforetického tlmivého roztoku v aparátúre. Pri pohľade na ukazovateľ molekulových veľkostí DNA je možné si túto skutočnosť overiť – jeho najkratší fragment „250 bp“ sa nachádza tesne pri konci gélu, tj. všetky kratšie fragmenty z gélu vytekli.**

**Ktorékoľvek logicky správne riešenie ..... 3 body**

**Príklady možných riešení:**

- skrátiť čas separácie restričných fragmentov, napr. zo 40 minút na 20 – 30 minút
  - separovať restričné fragmenty v hustejšom agarózovom géli, napr. 2 %, vďaka čomu je možné spoľahlivo oddeliť fragmenty DNA s dĺžkou 100 – 2 000 bp
  - skombinovať obe možnosti, aj kratší čas separácie aj hustejší agarózový gél
4. Po štiepení plazmidu pKGE restričnými endonukleázami *DraI* a *SacI* a po následnej elektroforéze v agarózovom géli ste získali restričné profily schematicky znázornené na Obr. 3.



**Obr. 3. Restričné profily plazmidu pKGE získané štiepením restriktázami.**

- 1 – neštiepený plazmid pKGE
- 2 – plazmid pKGE štiepený restriktázou *DraI*
- 3 – plazmid pKGE štiepený restriktázou *SacI*
- 4 – plazmid pKGE štiepený restriktázou *DraI* a *SacI* súčasne
- 5 – ukazovateľ molekulových veľkostí DNA

Pri elektroforetickom delení umiestnenie kladnej elektródy predstavuje elektróda ...S.... (uvedte písmeno v príslušnom modrom obdĺžniku). Svoju odpoveď stručne zdôvodnite.

**Označenie elektródy** ..... 1 bod

**Zdôvodnenie** ..... 3 body

**Keďže nukleové kyseliny majú záporný náboj (vďaka fosfátovým zvyškom, ktoré obsahujú), po vytvorení elektrického poľa sa začnú pohybovať smerom od záporne nabitej elektródy (katódy „N“) ku kladne nabitej elektróde (anóde „S“).**

5. Aká je približná dĺžka plazmidu pKGE?

**Správna odpoveď je akákoľvek hodnota z intervalu 8000 – 9000 bp ..... 1 bod**

Celkovú dĺžku plazmidu je možné získať po štiepení takou restriktázou, ktorá pôvodne kružnicový plazmid linearizuje, tj. v jeho štruktúre má len 1 rozpoznávacie/restrikčné miesto. Po štiepení tak vzniká len 1 fragment predstavujúci celkovú dĺžku plazmidu. Jeden fragment je v dráhe č. 2, ktorá predstavuje restriktčný profil získaný po štiepení restriktázou *DraI*. Veľkosť tohto lineárneho fragmentu potom možno porovnať s lineárnymi fragmentmi ukazovateľa molekulových veľkostí DNA (dráha 5), a tak určiť približnú dĺžku plazmidu pKGE, tj. 8000 bp až (necelých) 9000 bp.

6. Koľkokrát sa v molekule pKGE nachádza sekvencia 5'-GAGCTC-3'?

**2-krát**

..... **2 body**

Nakoľko táto sekvencia je restriktčným miestom pre enzým *SacI* (vid'. teória a Obr. 1), indíciou na riešenie je dráha č. 3 s restriktčným profilom pKGE získaným práve touto restriktázou a obsahujúcim 2 fragmenty. Tie je možné z kružnicovej molekuly plazmidu získať len v tom prípade, ak v jeho štruktúre má *SacI* dve restriktčné miesta.

7. Ako by vyzerala dráha 3, ak by restriktáza *SacI* nebola katalyticky aktívna? Z Obr. 3 vyberte dráhu, ktorá by zodpovedala takémuto stavu:

**Ako dráha 1**

..... **2 body**

Dráha 3 by vyzerala ako dráha 1 – plazmid by nebol vôbec štiepený, tvorený by bol nelineárnymi molekulami DNA pohybujúcimi sa v géli rozdielne ako lineárne fragmenty DNA získané po štiepení restriktázami (dráhy 2 – 4), príp. ako lineárne fragmenty DNA ukazovateľa molekulových veľkostí DNA (dráha 5).

8. Ako by vyzerala dráha 4, ak by restriktáza *SacI* nebola katalyticky aktívna? Z Obr. 3 vyberte dráhu, ktorá by zodpovedala takémuto stavu:

**Ako dráha 2**

..... **2 body**

Dráha 4 by vyzerala ako dráha 1 – plazmid by bol štiepený len restriktázou *DraI*, vznikol by len 1 lineárny fragment DNA.

**Spolu za teoretické úlohy a otázky**

..... **25 BODOV**

**CELKOM ZA ÚLOHU**

..... **45 BODOV**

## Praktická úloha č. 2

### Téma: **Anatómia a fyziológia rastlín – fotomorfogenéza**

Pomôcky: mikroskop, spektrofotometer (pre skupinu), žiletka, pinzeta, podložné a krycie sklíčka, strička s vodou, skúmavky, centrifúga (ideálne do dvojice), automatická pipeta 1mL, sterilné špičky (do dvojice), rukavice, extrakčný pufr (HCl:izopropanol:voda 1:18:82)

Príprava rastlinného materiálu:

Približne týždeň pred praktikom budú na filtračný papier do dvoch väčších nádob vysiate semená horčice bielej (*Sinapis alba*). Po dobu 72 hodín budú obe nádoby uchované v tme. Následne rastliny v jednej z nádob budú presunuté na svetlo a zvyšná nádoba bude ponechaná v tme. Tesne pred praktikom dostane každý súťažiaci na misku označenú písmenom A zopár klíčkov klíčiach v tme a na misku označenú písmenom B zopár klíčkov klíčiach v tme.

Pre spektrofotometriu bude rastlinný materiál pripravený nasledovne: Na filtračný papier budú vo viacerých nádobách vysiate semená horčice bielej. Po dobu 72 hodín budú uchovávané v tme. Po presune na svetlo budú odoberané klíčkové listy z 10 rastlín do zvaženej skúmavky v intervaloch 0/3/6/9 hodín pre každého súťažiaceho. Materiál bude zmrazený až do dňa prípravy praktickej úlohy. Do každej skúmavky bude pridaný 1mL extrakčného pufru (HCl : izopropanol : voda v pomere 1:18:82) a skúmavky budú 5 min na termobloku pri teplote 95°C. Skúmavky budú ihneď presunuté do tmy, kde budú uchované pri izbovej teplote cez noc a až tesne pred praktikom rozdelené medzi súťažiacich.

**Úloha 1:** Z nasledujúcich možností vyberte znaky, ktoré sú charakteristické pre fotomorfogenézu, skotomorfogenézu alebo sa vyskytujú u oboch vývinových programov. Výber označte krížikom v tabuľke.

Znak	Fotomorfogenéza	Skotomorfogenéza	Oba vývinové programy
Zelené sfarbenie klíčnych listov	X		
Apikálny háčik (Apical hook)		X	
Predĺžený hypokotyl		X	
Primárny koreň			X

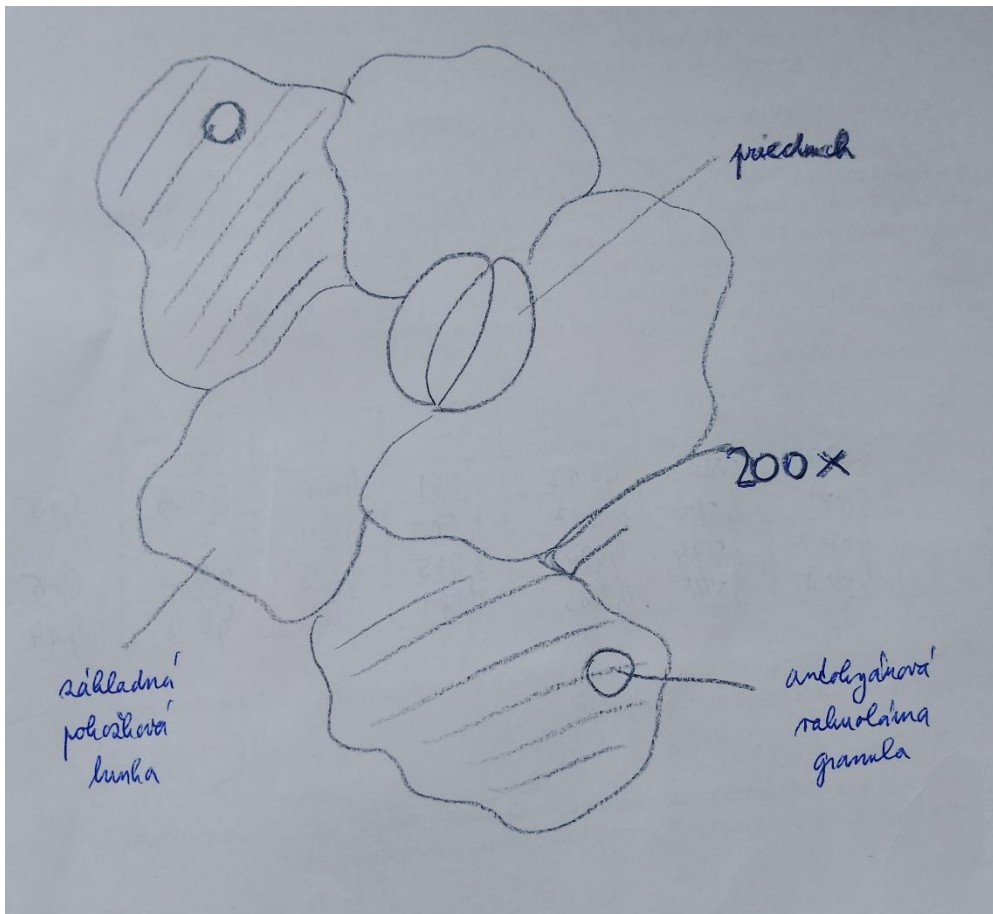
Za každý správny krížik 0,5 b, maximálne 2 b.

**Úloha 2:** Zakreslite pokožkový preparát klíčového listu horčice siatej. Popíšte všetky zakreslené štruktúry a vyšrafujte štruktúry, kde ste pozorovali fialové sfarbenie a akumuláciu antokyánov.

Študenti zakreslia pokožku klíčového listu horčice bielej– nákres obsahuje mierne laločnaté základné pokožkové bunky (2 b), prieduchy (2 b), vyšrafované sú výlučne niektoré základné pokožkové bunky (2 b), príp. antokyánové vakuolárne inklúzie, ktoré sú pozorovateľné ako fialové granule. Kreslia ceruzkou (1b) a uvádzajú zväčšenie (1b).

Za úlohu maximálne 8 b.

Modelový náčrt:



**Úloha 3:** Uvedte, akú funkciu v liste majú zvyšné pigmenty znázornené na obrázku 1:

Priamo sa účastnia fotosyntézy (1b).

**Úloha 4:** Vyplňte tabuľku:

Modelový príklad:

Vzorka	Hmotnosť prázdnej skúmavky (g)	Hmotnosť skúmavky s klíčkami (g)	Hmotnosť čerstvej biomasy (FW) (g)	A <sub>535</sub>	A <sub>650</sub>	Relatívny obsah antokyánov (g <sup>-1</sup> )
001	0,9893	1,0577	0,0684	0,068	0,018	0,415
301	0,9959	1,0557	0,0598	0,069	0,020	0,418
601	1,0370	1,0839	0,0469	0,083	0,018	0,925
901	1,0464	1,1061	0,0597	0,109	0,010	1,457

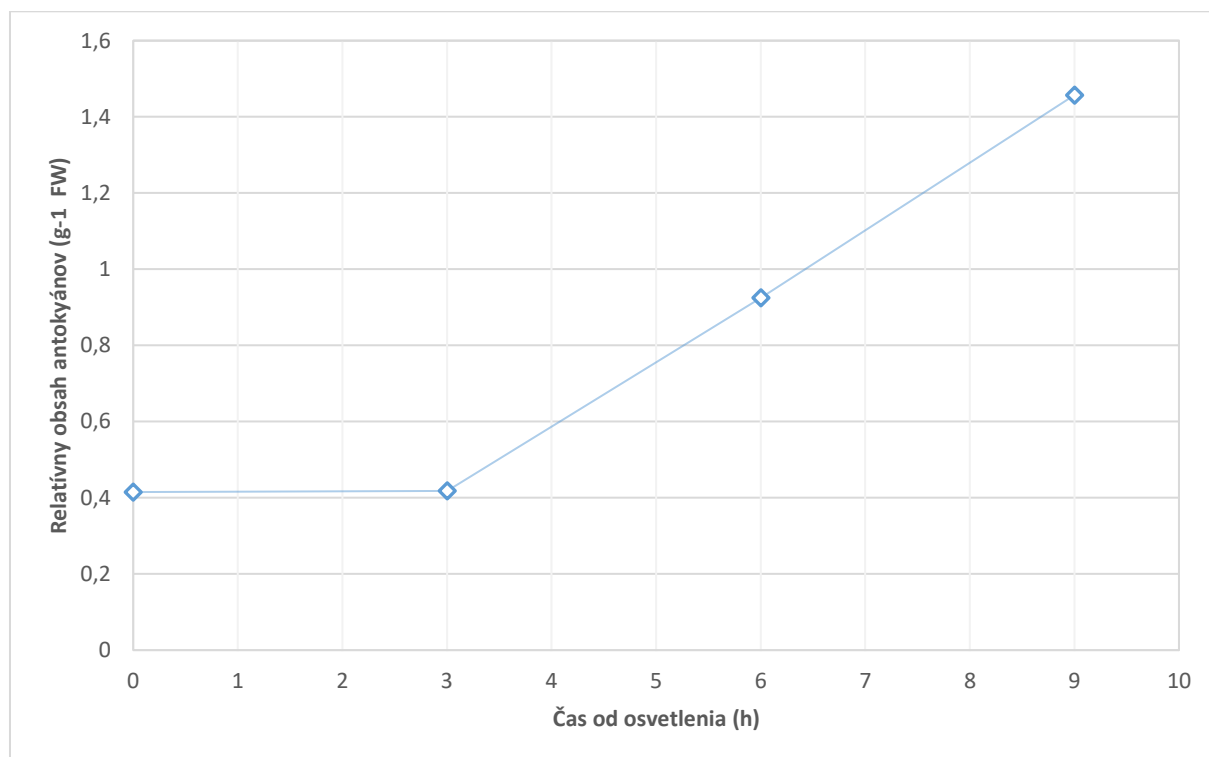
Za správne spočítanú hmotnosť čerstvej biomasy 0,5 b za každé správne vyplnené pole, 0,5 b za každé meranie a 0,5 b za každý správny výpočet relatívneho obsahu antokyánov.

Dokopy maximálne 8 b.

**Úloha 5:** Na priložený milimetrový papier zakreslite graf závislosti relatívneho obsahu antokyánov v klíčkoch horčice bielej na čase od osvetlenia klíčkov.

Graf by mal mať na y osi vyneseny relatívny obsah antokyánov a na x osi čas od osvetlenia (1 b), osi by mali byť popísané so správnou jednotkou (1 b), za každý správne vyneseny bod udelíme 1 b. Za spojenie bodov 1 b. Relatívny obsah antokyánov nestúpa medzi 0 a 3h a potom stúpa (1 b)

Dokopy maximálne 8 b.



**Úloha 6:** Prečo je zistený obsah antokyánov relatívny a nie absolútny, príp. aký dodatočný experiment by sme museli previesť, aby sme vedeli určiť presnú koncentráciu antokyánov?

Bolo by potrebné zhotoviť štandardnú krivku – nariediť čistý antokyán (napríklad delfinidín chlorid) do rôznych koncentrácií a zmerať ich absorbanciu. Z krivky by potom bolo možné odčítať pre namerané hodnoty absorbancie prislúchajúcu koncentráciu antokyánov v každej vzorke.

Za správne zdôvodnenie 3 b.

**Úloha 7:** Čo sme používali ako blank pri meraní absorbancie?

Extrakčný pufor (1 b).

**Úloha 8:** Ako by ste vysvetlili zmenu relatívneho obsahu antokyánov medzi časom 0 a prvým meraním?

Nedochádza k zmene – ide o lag fázu (2 b), je potrebný čas k aktivácii génovej expresie biosyntézy antokyánov (2 b).

Dokopy maximálne 4 b.

**Úloha 9:** Rastlina registruje svetelný signál pomocou fotoreceptorov. Fotoreceptory sú tvorené neproteínovou zložkou (prostetickou skupinou) absorbujúcou svetlo určitej vlnovej dĺžky a proteínovou zložkou, ktorej štruktúra sa po absorpcii svetla zmení. Práve táto zmena spúšťa signálnu dráhu. Uvedte 3 rodiny fotoreceptorov u rastlín a časť svetelného spektra, ktorú absorbujú (napr. červené svetlo).

fytochrómy – červené svetlo, fototropíny – modré svetlo, kryptochrómy – modré svetlo, UVR8 – UV-B svetlo, ZEITLUPE rodina – modré svetlo



Uvedú 3 z vymenovaných rodín fotoreceptorov, za každú 1 b, dokopy maximálne 3 b.

**Úloha 10:** *Predpokladáme, že absorpcia svetla určitej vlnovej dĺžky spúšťa signálnu dráhu vedúcu k biosyntéze antokyánov v klíčiach rastlínach. Navrhnite experiment, ktorým by ste preukázali účasť určitého fotoreceptoru v tomto procese.*

Jednou z možností je využitie nulových mutantov v génoch kódujúcich proteínovú zložku fotoreceptorov. Napríklad ak by sme chceli overiť účasť kryptochrómu v tejto signálnej dráhe, mohli by sme využiť dvojitého mutantu *cry1 cry2*. Vystavili by sme ho rovnakým podmienkam ako divoký typ (72 h tma + 3/6/9 h svetlo) a merali obsah antokyánov v listoch. Ak sa kryptochróm účastní signálnej dráhy, u mutantu by sme v reakcii na ožiarenie nepozorovali nárast obsahu antokyánov (narozdiel od divokého typu).

Za každý plauzibilný návrh 5 b. Maximálne 5 b za úlohu.

**Úloha 11:** *Okrem klíčnych listov sa antokyány akumulujú aj v iných rastlinných orgánoch, kde plnia rôzne funkcie. Uveďte ďalší príklad akumulácie antokyánov a príslušnú funkciu.*

Napríklad kvety, plody – signálna funkcia. Za správne uvedení orgán + funkciu 1 b + 1 b.

Maaximálne 2 b.

**SPOLU MAXIMÁLNE 45b**

**Zdroje obrázkov:**

**Eichhorn Bilodeau S., B.-S. Wu, A.-S. Rufyikiri, S. MacPherson, M. Lefsrud.** 2019. An Update on Plant Photobiology and Implications for Cannabis Production. *Frontiers in Plant Science* 10: 296.

Odpověďová tabuľka

Kód
-----

	A	B	C	D	E	Body
1.	a	a, b, e	b			2,5
2.	a) látka A – inhibitor 2, látka B – inhibitor 1, b) 2-násobne					3
3.	x		x		x	1,5
4.	CH	CH	M			1,5
5.		x		x		2
6.	5	2	1	4	7	2,5
7.	III.	I.	II.	IV.		2
8.	A. 0,02 [uznať čokolvek v rozmedzí 0,01 – 0,04]; B. iii.					3
9.	I. B, C <del>II.-A</del>					4
10.			x			2
11.	x		x			2
12.		x			x	2
13.	x		x			3
14.		x	x			2
15.	x					2
16.	x					2
17.	3	2	4	1		2
18.					x	2
19.		x		x		2
20.	x	x			x	1,5
21.	x	x		x		1,5
22.			x			2
23.		x		x	x	1,5
24.		x		x		2
25.			x			3
26.	1/4	1/3				3
27.	0,50	0,35	1725	4725	1050	3,5
28.				x		2
29.				x		2
30.	x		x			2
31.	I. 23 II. 1/16					4
32.	76,7					3
33.	x					2
34.		x	x			2
35.				x		2
36.	x	x			x	1,5
37.		x	x			2
38.			x	x		2
39.	x					2
40.	NNNNN					2,5
Spolu						90

Praktická úloha 1.

Autor: doc. RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD.

Recenzia: Mgr. Filip Červenák, PhD.

Praktická úloha č.2

Autor: Mgr. Oliver Pitoňak

Recenzia: Mgr. Jaroslav Ferenc, PhD.

Autori: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD., Mgr. Zuzana Dzirbíková, PhD., Mgr. Tomáš Augustín, PhD., Mgr. Katarína Juríková, PhD., Mgr. Jaroslav Ferenc, PhD., Mgr. Lukáš Janošík, Ján Hunák, Dominik Kopčak, Bc. Veronika Kučminová, Tomáš Kompiš, Matúš Grieš

Recenzia: Mgr. Zuzana Dzirbíková, PhD.

Test zostavil: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.

Redakčná úprava: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.

Slovenská komisia Biologickej olympiády

Vydal: NIVAM Národný inštitút vzdelávania a mládeže, Bratislava 2023