

Eesti koolinoorte 53. bioloogiaolümpiaadi lõppvoor

Taimeanatomia - ja füsioloogia



Eesnimi:

Perekonnanimi:

Kool:

Klass :

Õppejõud: Evi Padu, Mikk Välbe

TÖÖÜLESANNE 1

ÕHULÕHEDE PINDALA MÕÕTMINE JA STUDENT'I T-TESTI RAKENDUS (36p)

1.1. Valmistada preparaadid toataimede *Tradescantia spathacea* Sw. (Roio tradeskantsia) ja *Leucojum vernum* (märtsikelluke) lehe alumisest epidermist. Selleks lõigata lõiketeraga alumisse epidermi sälk ja rebida pintsetiga epiderm lahti. Preparaat asetada alusklaasil paiknevasse veetilka ja katta katteklaasiga. Mõõta mõlemal preparaadil kümne õhulõhe pikkus ja laius.

1.2. Mõõtmistulemuste alusel leida, kas *Leucojum vernum* õhulõhede pindala erineb statistiliselt *Tradescantia spathacea* Sw. õhulõhede pindalast, kasutades Student'i t-testi. Arvutused teostada kalkulaatoriga.

1.3. Arvutada *Tradescantia spathacea* Sw. ja *Leucojum vernum* õhulõhede pindala protsenti lehe pindalast.

Töövahendid: valgusmikroskoop, objekt- ja okulaarmikromeeter, prepareerimisvahendid, *Tradescantia spathacea* Sw. ja *Leucojum vernum* lehed.

Töö läbiviimine

Õhulõhede suuruse mõõtmine

Rakkude ja organellide suuruse mõõtmiseks kasutatakse okulaarmikromeetrit. Okulaarmikromeeter on skaala, mis asetseb mikroskoobi tuubusesse. (Lisaks okulaarmikromeetrile võib mõõtmiseks kasutada okulaarvärku. Sellisel juhul on vaateväljas skaala asemel ruudustik). Skaala (võrgustiku) abil mõõdetakse uuritavad objektid. Okulaarmikromeetri skaala jaotuse väärtus erinevate objektiivide suurenduste korral on erinev.

Okulaarmikromeetri kalibreerimiseks kasutatakse objektmikromeetrit. Objektmikromeeter asetatakse mikroskoobi aluslauale analoogselt preparaatidega. Objektmikromeeter on 1 mm pikkune skaala, mis on ristjoontega jaotatud sajaks võrdseks lõiguks s.t. skaala iga jaotus on 10 µm. Objektmikromeeter asetatakse mikroskoobi aluslauale ja selle abil kaliibritakse okulaarmikromeetri jaotuse väärtus (okulaarvärku ruudu külje pikkus).

Kalibreerimist alustatakse tavaliselt kõige väiksema suurendusega objektiivist. Okulaarmikromeetri skaala jaotuse määramiseks (kalibreerimiseks) tuleb mikroskoobi vaatevälja saada okulaar- ja objektmikromeetri skaalad üheaegselt. Seejärel määratakse, mitu objektmikromeetri skaala jaotust mahub okulaarmikromeetri skaala ühe jaotuse sisse. Kui näiteks kümme, siis on okulaarmikromeetri jaotuse väärtus kasutatud objektiivide suurenduse korral $10 \mu\text{m} \times 10 = 100 \mu\text{m}$. Arvestada tuleb, et kalibreerimistäpsus on suurem, kui ei piirduta ühe okulaarmikromeetri jaotusega, vaid määratakse, mitu objektmikromeetri jaotust mahub viiesse või rohkemasse okulaari mikromeetri jaotusesse. Sama protseduuri korratakse ka teiste objektiivide suurendustega, mida kasutatakse mõõtmisel. Samuti tuleb määrata mikroskoobi vaatevälja **diameeter** 10x suurendusega objektiivide kasutades.

Kalibreerimise lõpetamisel võib asuda preparaatide mõõtmisele. Selleks asendatakse objektmikromeeter preparaadiga ja fikseeritakse mitu okulaarmikromeetri jaotust mahub mõõdetava õhupilu pikkusesse ja laiusesse. Okulaarmikromeetri jaotuste arvu korrutamisel ühe jaotuse väärtusega leitakse õhulõhe pikkus ja laius. Kanda saadud tulemused tabelitesse 3 ja 4.

Arvutada pikkuse ja laiuse alusel mõlema taime kümne õhulõhe pindala kasutades valemit

$$S = a \times b \times \pi/4,$$

(Õhulõhe sarnaneb ellipsile. Õhulõhe pindala arvutamise valemis a on õhulõhe pikkus b on õhulõhe laius kõige laiemal kohal). Tabelitesse 3 ja 4 kirjutada õhulõhede pindalade reaalsed väärtused.

Mõõtmistulemuste statistiline töötlus

Selleks, et hinnata, kas teatud rakkude kogumi parameetrid (pikkus, laius, õhulõhede pindala jne.) on erinevad teise rakkude kogumi vastavatest parameetritest, kasutatakse mitmesuguseid statistilisi meetodeid, näiteks *Studenti* t-testi.

Student'i t-testi kasutatakse väikeste korduste arvuga mõõtmistes normaaljaotusega populatsioonide jaoks kehtivate hüpoteeside testimiseks. Testi kujundas 1908. a William Sealy Gosset (pseudonüümiga Student). Testi võib kasutada näiteks selgitamiseks, kas kaks sõltumatut kogumit on võrdse keskmisega või mitte, nagu antud praktilises töös õhulõhede pindala suuruse erinevuse uurimisel kahel taimeliigil.

Kõigepealt arvutatakse erinevate mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmine (\bar{x}). Iga üksikmõõtmise tulemus asub teatud piirkonnas aritmeetilise keskmise ümbruses. Et kindlaks määrata mõõtmistulemuste varieeruvuse piirid, arvutatakse mõõtmistulemuste standardhälve s , kasutatades valemit:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

milles s on mõõtmistulemuste aritmeetilise keskmise standardhälve (ruuthälve)

n on tehtud mõõtmiste arv;

\bar{x} on aritmeetiline keskmine

x_i on üksikud mõõtmistulemused.

Standardhälbe leidmiseks kalkulaatoriga tuleb teha järgmised arvutused:

1. Leida arvude kogumi aritmeetiline keskmine.
2. Arvutada iga üksiku mõõtmistulemuse kõrvalekalle aritmeetilisest keskmisest.
3. Iga kõrvalekalle võtta ruutu ja saadud tulemused summeerida.
4. Saadud summa jagada vabadusastmete arvuga ($n - 1$).
5. Saadud jagatisest võtta ruutjuur.

Läbiviidud arvutuste tulemused esitatakse tabelites kujul $\bar{x} \pm s$

Õhulõhede pindalade suuruse erinevuse analüüsimiseks arvutatakse nn. Studenti koefitsient (t), kasutades valemit:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}},$$

Studenti koefitsiendi leidmiseks kalkulaatoriga tuleb läbi viia järgmised arvutused:

1. Leida kahe arvude kogumi aritmeetilised keskmised \bar{x}_1 ja \bar{x}_2 ning nende vahe.
2. Arvutada kahe kogumi standardhälbed s_1 ja s_2 .
3. Arvutada kahe kogumi standardvead SE vastavalt valemile

$$SE_1 = \frac{s_1}{\sqrt{n_1}} \text{ ja } SE_2 = \frac{s_2}{\sqrt{n_2}}$$

4. Arvutada mõlema kogumi standardvea ruut ja saadud arvud summeerida.
5. Summast võtta ruutjuur.
6. Leida t väärtus vastavalt valemile
7. Arvutada vabadusastmete arv $f = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$.
8. Võrrelda saadud t väärtust tabelist leitava kriitilise t väärtusega (t_{kr}).

Kui valemist leitud t väärtus (märki arvestamata) on suurem kui tabelist leitud kriitiline t väärtus (t_{kr}), siis erinevused kahe kogumi vahel on statistiliselt tõestatud, vastasel juhul

erinevused ei ole statistiliselt tõestatud. Tabelist t_{kr} valimisel on esitatud t_{kr} väärtused kolmel erineval usalduslâvel e. olulisuse nivool ($\alpha=0.95$; $\alpha=0.99$; $\alpha=0.999$). Mõiste usalduslâvi (confidence level) on seotud mõistega usalduspiirid (confidence interval). Usalduspiirid annavad väärtuste vahemiku, mis sisaldavad andmete kogumiku teatud parameetri. Usalduslâvi on tõenäosus, $(1-a)$, millega mõõdetud suuruse tegelik väärtus asub usalduspiirides. Kui $a = 0.05 = 5\%$, siis usalduslâvi $= (1 - 0,05) = 0,95 = 95\%$.

Tabel 1. Studenti kriitilised t väärtused (t_{kr}) sõltuvalt vabadusastmete arvust ja usalduslâvest

Vabadusastmete arv f	t_{kr}		
	$\alpha=0.95$	$\alpha=0.99$	$\alpha=0.999$
1	12.71	63.66	636.62
2	4.30	9.92	31.60
3	3.18	5.84	12.94
4	2.78	4.60	8.61
5	2.57	4.03	6.86
6	2.45	3.71	5.96
7	2.36	3.50	5.40
8	2.31	3.36	5.04
9	2.26	3.25	4.78
10	2.23	3.17	4.59
12	2.18	3.06	4.32
14	2.14	2.98	4.14
16	2.12	2.92	4.02
18	2.10	2.88	3.92
20	2.09	2.85	3.85

Tulemused ja vormistus

Mikroskoobi nr.**1**.....

Näitena on kasutatud ühe konkreetse mikroskoobi abil saadud tulemusi.

NB! Kõigepealt tehke ära mõõtmised, seejärel asuge arvutama!

Tabel 2 Vaatevälja diameeter, okulaarmikromeetri skaala või okulaaris paikneva võrgustiku kõige väiksema jaotise väärtus ja selle leidmiseks registreeritud väärtused objektiivi erinevatel suurendustel. (3p)

Objektiivi suurendus	Okulaarmikromeetri skaala jaotiste arv (okulaarvõrgu ruutude arv)	Vastav objektmikromeetri skaala jaotiste arv	Okulaarmikromeetri skaala jaotise väärtus (μm)
10x	10	10	10
40x	20	5	2,5
Vaatevälja diameeter 10x objektiivi suurenduse korral (μm)	1800		

Tabelid 3 ja 4. Õhulõhede mõõtmed. (Esitada tabelites õhulõhede pikkus ja laius, nende alusel arvutada õhulõhe pindala ja pindaladele vastavad aritmeetilised keskmised ja standardhälbed.)

Tabel 3. *Tradescantia spathacea* Sw. (5p)

Objektiivi suurendus	Õhulõhe pikkus		Õhulõhe laius		Õhulõhe pindala (μm^2)	Aritmeetiline keskmine	Hälbe suurus keskmisest	Hälbe ruut
	(okulaar mikro-meetri jaotuste arv)	(μm)	(okulaar mikro-meetri jaotuste arv)	(μm)				
40X	16	40	5	12,5	393	308,2	-84,8	7191
	18	45	4	10	353		-44,8	2007
	15	37,5	4	10	294		14,2	202
	17	42,5	5	12,5	417		-108,8	11837
	18	45	3	7,5	265		43,2	1866
	16	40	5	12,5	393		-84,8	7191
	14	35	4	10	275		33,2	1102
	15	37,5	3	7,5	221		87,2	7604
	16	40	4	10	314		-5,8	34
	16	40	2	5	157		151,2	22861
	Pindala keskmine \pm standardhälve				308,2 \pm 82,9			

Tabel 4. *Leucjum vernum*(5p)

Objektiivi suurendus	Õhulõhe pikkus		Õhulõhe laius		Õhulõhe pindala (μm^2)	Aritmeetiline keskmine	Hälbe suurus keskmisest	Hälbe ruut		
	(okulaar mikro-meetri jaotuste arv)	(μm)	(okulaar mikro-meetri jaotuste arv)	(μm)						
40X	15	37,5	4	10	294	213,9	-80,1	6416		
	14	35	3	7,5	206		7,9	62		
	12	30	2,5	6,25	147		66,9	4476		
	16	40	2	5	157		56,9	3238		
	13	32,5	1	2,5	64		149,9	22470		
	13	32,5	3	7,5	191		22,9	524		
	17	42,5	4	10	334		-120,1	14424		
	14	35	4	10	275		-61,1	3733		
	12	30	3	7,5	177		36,9	1362		
	15	37,5	4	10	294		-80,1	6416		
	Pindala keskmine \pm standardhälve				213,9 \pm 83,7					

Tabel 5. Teostada Studenti t väärtuse arvutuskäik ja võrdlus kriitilise t väärtusega. Vormistada t ja t_{kr} võrdlemisest tehtav järeldus. (6p)

	Õhulõhe pindala	s	SE_1	SE_2	$SE_1^2 + SE_2^2$	$\sqrt{SE_1^2 + SE_2^2}$	t	t_{kr}
<i>Tradescantia spathaceae</i>	308,2	82,9	26,5	26,2	1389	37,3	2,528	2,10
<i>Leucojum vernum</i>	213,9	83,7						

Järeldus: *Tradescantia spathaceae* õhulõhede pindala on statistiliselt tõestatult suurem kui *Leucojum vernum*'il 95% usaldusläve korral, sest t on suurem kui t_{kr} .

Tabel 6. Arvutamaks õhulõhede pindala protsenti lehe pindalast, esitada vajalikud andmed alljärgnevas tabelis. (5p)

Liik	Õhulõhede arv vaateväljas	Õhulõhe keskmine pindala (μm^2)	Vaatevälja diameeter (μm)	Vaatevälja pindala (μm^2)	Õhulõhede lehepinna kohta arv cm^2	Õhulõhede pindala lehe pindalast (%)
<i>Tradescantia spathaceae</i>	33	308,2	1800	2544690	1297	0,40
<i>Leucojum vernum</i>	62	213,9	1800	2544690	2436	0,52

Küsimused:

1. Millest sõltub t väärtus Studenti testis? (2p)

Kahe kogumi keskmiste väärtusest ja kahe kogumi standardvigade suurusest (vastavalt töös esitatud Student'i koefitsiendi arvutamise valemile). Õigeks vastuseks on loetud ka täpne valemis olevate tehete kirjeldus.

2. Miks õhulõhede arvu registreeritakse kõige väiksema objektiivsuse suurendusega? (2p)

Väiksema suurendusega on vaatevälja pindala kõige suurem ja võimalus sattuda lehe osale keskmisest suurema või väiksema õhulõhede arvuga kõige väiksem.

3. Miks Student'i testi rakendamine tõstab kahe liigi anatoomiliste erinevuste kohta tehtud järelduse usaldusväärsust? (2p)

Lisaks keskmiste erinevusele arvestatakse ka standardhälbe/standardvea suurust ja millistes piirides katsetulemused varieeruvad. Praktiliselt puudub võimalus, et uue mõõtmise läbiviimisel standardvigade erinevus keskmise suhtes erineb ja saadakse esialgsele vastupidised tulemused.

4. Milleks on õhulõhed vajalikud? (tehke kasti x õige vastuse korral ja o vale vastuse korral) (2p)

- a) Hingamiseks
- b) Veevahetuseks
- c) Fotosünteesiks
- d) Gaasivahetuseks
- e) Lämmastiku saamiseks

Igasse kasti saab teha ristikese, sest õhulõhede kaudu liigub veeaur, hapnik hingamiseks, süsihappegaas fotosünteesiks ja õhulõhede kaudu võib siseneda ka näiteks lämmastikdioksiid (NO_2) (Rogers H. et al. Science 1979 vol 206.333-335).

5. Millest on tingitud õhulõhede avanemine hommikul? (Märkige tabelis õige vastuste grupp x-ga.) (2p)

- a) turgori vähenemine sulgrakkudes
- b) turgori suurenemine sulgrakkudes
- c) kaaliumi kontsentratsiooni vähenemine sulgrakkudes
- d) kaaliumi kontsentratsiooni suurenemine sulgrakkudes
- e) malaadi kontsentratsiooni vähenemine sulgrakkudes
- f) malaadi kontsentratsiooni suurenemine sulgrakkudes

a,c,e	
b,d,f	
a,c,f	
b,c,e	
a,d,e	

Õhulõhede avanemiseks peab turgor (rakusisaldise rõhk rakuseinale) sulgrakkudes suurenema. Turgor suureneb, kui ainete kontsentratsioon (kaalium, malaat) sulgrakkudes kasvab ja rakkudesse liigub täiendav kogus vett. Õige vastus b, d, f.

6. Mis võiks olla põhjuseks, et enamikul taimedel on õhulõhed lehe alumisel pinnal? (2p)

Lehe alumine külg on pööratud võra/taime sisemuse poole, kus veeauru sisaldus õhus on suurem. Vee aurustumine õhulõhede kaudu ja oht sattuda veedefitsiidi tingimustesse on väiksem.

TÖÖÜLESANNE 2

VARRE ANATOMILINE EHITUS (12p)

Õunapuu *Malus domestica* Borkh võrsest valmistatakse mikrotoomiga 20 - 60 µm paksused ristlõigud (**need on valmis tehtud**) ja nendest 2 preparaati:

- värvitud 5 min Lugoli lahusega (KJ ja joodi vesilahus);
- värvitud floroglutsiiniga.

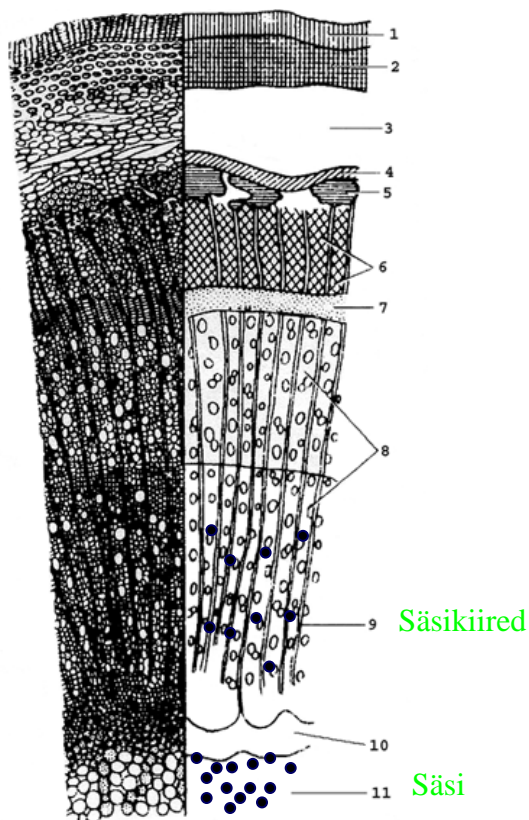
Töövahendid: valgusmikroskoop, prepareerimisvahendid, Lugoli lahus (2.0 g KJ ja 1 g J lahustatakse 5 ml vees ja viiakse 300 ml-ni), 5%-line floroglutsiini lahus etanoolis, 25%-line H₂SO₄, õunapuuvõrse lõigud

Töö läbiviimine

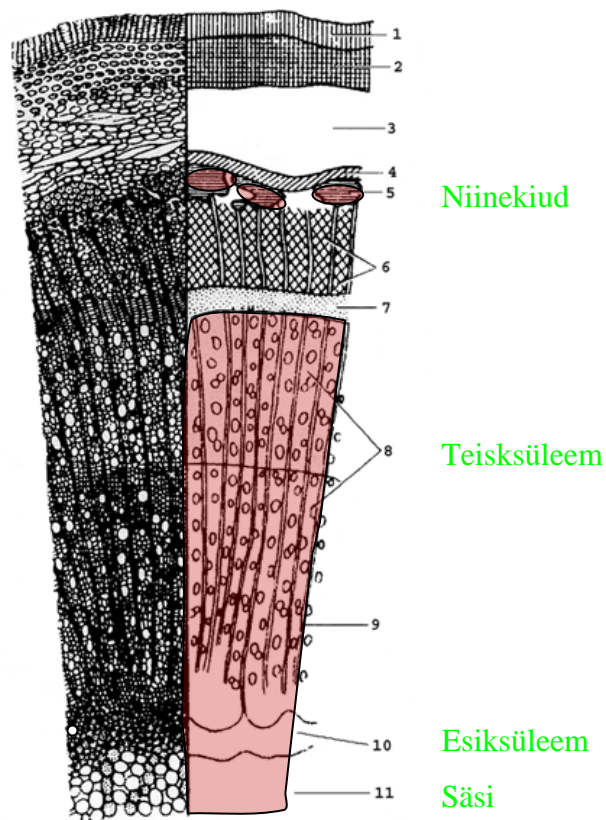
Lugoli lahusega värvimisel asetada alusklaasidel paiknevatele varrelõikudele värvilahus. (Terve lõik peab olema lahusega kaetud). Värvuse moodustumisel katta lõigud katteklaasiga.

Floroglutsiinireaktsiooni teostamiseks asetatakse alusklaasil paiknevale lõigule viieks minutiks 2-3 tilka 5%-list floroglutsiini lahust etanoolis. Seejärel lisatakse 3-4 tilka 25%-list väävelhapet. Oodatakse kuni moodustub intensiivne värvus ja lõigud kaetakse katteklaasiga. Värvuse tekke piirkondade määramiseks vaadatakse preparaate valgusmikroskoobis.

Joonisel 1a tähistada piirkonnad mis värvusid Lugoli lahusega ja joonisel 1b piirkonnad mis värvusid floroglutsiiniga. **Tähistada nende piirkondade anotoomilised nimetused.**



Joonis 1a. (2p)



Joonis 1b. (2p)

Küsimused:

1. Millist ainet värvib Lugoli lahus? **(2p)**

Tärklis

2. Millist ainet värvib floroglutsiin? **(2p)**

Ligniini (jooniselt 1b on näha, et puitunud on ksüleemirakkude, säsirakkude ja niinekiudude seinad).

3. Kas talvel on õunapuu okstes varuaineid? **(2p)**

Jah, näiteks tärklis (joonisel 1a on näha, et tärklis varuainena talletatakse taimevarres säsis ja säsi kiirtes)

4. Mitme aastases õunapuuoksast olid tehtud teie poolt uuritud lõigud? Põhjendage. **(2p)**

1 aastastest, sest näha oli ainult üks aastaring.