

۱۱/۳/۲۰۱۹

اکوفیزیولوژی گیاهی

سید امیر آصف آگاه / علیرضا تجمیلیان / سید محمد حسین غفاری

مواد و وسایل مورد نیاز

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> ویال A,B | <input type="checkbox"/> سمپلر ۱۰۰-۱۰۰۰ |
| <input type="checkbox"/> سرسمپلر ۱۰۰-۱۰۰۰ | <input type="checkbox"/> بورت |
| <input type="checkbox"/> چسب | <input type="checkbox"/> پایه |
| <input type="checkbox"/> نشان زرد | <input type="checkbox"/> ویال |
| <input type="checkbox"/> نشان قرمز | <input type="checkbox"/> لوله موئین (دو عدد) |
| <input type="checkbox"/> پیپت | <input type="checkbox"/> کاغذ |
| <input type="checkbox"/> کاغذ TLC (دو عدد) | <input type="checkbox"/> فالكون T |
| <input type="checkbox"/> فالكون حاوی استون | <input type="checkbox"/> فالكون F |
| <input type="checkbox"/> فالكون حاوی هگزان | <input type="checkbox"/> فالكون E (عصاره E) |
| <input type="checkbox"/> تانک TLC | <input type="checkbox"/> ویال I |
| <input type="checkbox"/> ماژیک | <input type="checkbox"/> فالكون S |
| <input type="checkbox"/> پیپت فیلر | <input type="checkbox"/> ارلن مایر |

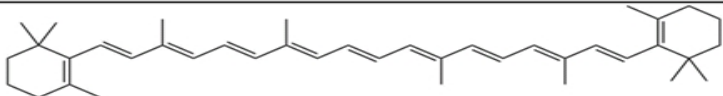
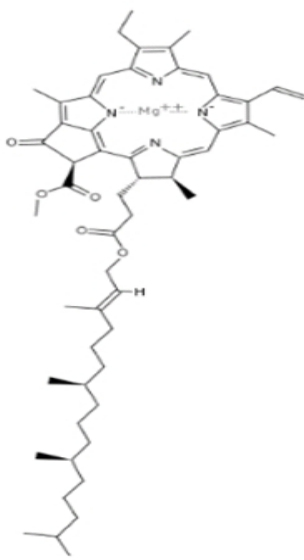
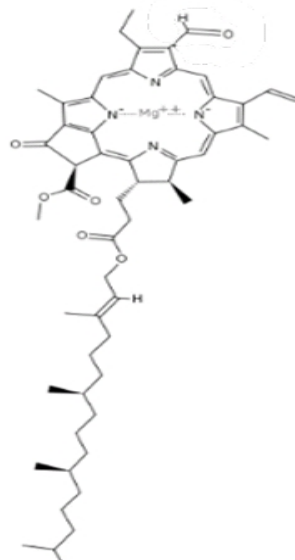
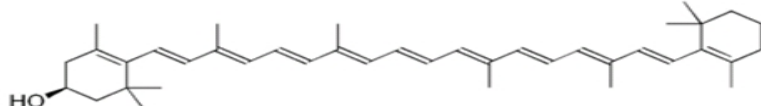
- پروفیسور "اوده" به تازگی آفت جدیدی را در گیاهان باغی در نواحی شمال ایران کشف کرده است که باعث vein clearing, reduced yield, chlorosis (yellowing) severe necrotic leaf spots و abnormal coloration of flowers می‌شود. او می‌خواهد به سرعت مکانیسم عمل آفت را کشف کند تا بتوانند با آن مقابله کرده و جلوی خسارت بیشتر را بگیرد. به همین منظور آزمایشاتی را طراحی کرده و در اجرای آنها از شما به عنوان دانش‌پژوهان زیست‌شناسی درخواست کمک کرده است.

بخش اول: شناسایی کیفی رنگیزه‌ها با استفاده از TLC (نمره ۹)

- مقداری از عصاره برگ تهیه شده از گیاهان آفت زده و مقداری از عصاره برگ تهیه شده از گیاهان سالم در اختیار شما قرار داده شده است.
- ۱. ۱۰ میلی لیتر از محلول هگزان:استون (۳:۷) به تانک TLC خود اضافه کنید و درب تانک را ببندید.
- ۲. به آرامی با یک مداد حاشیه‌های کاغذ TLC خود را ۱ سانتی متر از سطح‌های پایین و بالا علامت گذاری کنید. یک خط پایین و یک خط بالای کاغذ TLC خود رسم کنید. روی خط پایین A و B را نشان بدهید.
- ۳. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره A را پیتاژ و آن را به صورت نقطه‌ای در مرکز خط پایین کاغذ TLC لود کنید. همین کار را برای عصاره B نیز انجام دهید.
- ۴. پس از خشک شدن کاغذ TLC، آن را درون تانک قرار دهید.
- ۵. پس از اتمام فرآیند، با بالا بردن نشان قرمز کاغذ TLC خود را به مسئولین آزمایشگاه تحویل دهید. (نمره ۸)

- مقدار R_f را برای هر کدام از رنگیزه‌های هر دو نمونه بنویسید. رنگیزه‌ها را از جدول پایین شناسایی کنید. (نمره ۴)

باند	مقدار R_f	شماره رنگیزه در جدول
۱		
۲		
۳		
۴		

No.	Pigment	Chemical structure
1	β -carotene	
2	chlorophyll a	
3	chlorophyll b	
4	xanthophylls	

- چرا فتوفیتین را جزو رنگیزه‌های اصلی حساب نمی‌کنیم؟ (۲نمره/ پاسخ نادرست ۰،۵ نمره منفی)

☐ در کلروپلاست حضور ندارد.

☐ در فتوسنتز نقش ندارد.

☐ باعث واکنش رنگیزه‌ها با سیلیکاژل می‌شود.

☐ در جلبک‌های اجدادی وجود ندارد.

☐ در گیاهان پیشرفته وجود ندارد.

- درستی یا نادرستی گزاره‌های زیر را مشخص کنید. (۵نمره/ به ازای هر پاسخ نادرست ۱ نمره منفی)

☐ تفاوت مقدار R_f کلروفیل a و b به دلیل تفاوت وزن مولکولی آنها است.

☐ تفاوت مقدار R_f کلروفیل ها و بتاکاروتن به دلیل قطبیت آنها است.

☐ آفت بر روی غلظت کلروفیل b تاثیر می‌گذارد.

☐ گیاه A تحت حمله آفت قرار گرفته است.

☐ اگر محلول تانک قطبی تر باشد رنگیزه ها به خوبی جدا نمی‌شوند.

بخش دوم: اندازه گیری کمی رنگیزه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (۲نمره)

- نمونه‌های A و B در اختیار شما قرار گرفته است که یکی مربوط به گیاه آفت زده و دیگری مربوط به گیاه کنترل است

1. با بالا بردن نشان زرد از مسئولین آزمایشگاه بخواهید تا برای استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به شما نوبت دهد. (۱۲۰ ثانیه)

2. نیم میلی‌لیتر از هر عصاره را به کووت‌هایی که در اختیارتان قرار دارد، انتقال دهید.

3. به هر کووت ۳ میلی لیتر استون اضافه کرده و خوب پیپتاژ کنید.

4. جذب نمونه‌ها را در دو طول موج ۶۴۹ و ۶۶۵ نانومتر اندازه‌گیری کنید.

- مقادیر جذب خود را بنویسید. غلظت‌های کلروفیل a و b و کل را با استفاده از معادله‌های زیر بدست آورید. (۷نمره)

$$\text{Total chlorophyll (mg/L)} = 20.0 (A_{649}) + 6.1 (A_{665})$$

$$\text{Chlorophyll a (mg/L)} = -5.76 (A_{649}) + 13.7 (A_{665})$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/L)} = 25.8 (A_{649}) - 7.7 (A_{665})$$

عصاره	جذب در ۶۴۹ nm	جذب در ۶۶۵ nm	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b
C					
D					

- نسبت کلروفیل a به b را برای عصاره‌های A و B محاسبه کنید. (۲نمره)

عصاره	نسبت کلروفیل a به b
C	
D	

- درستی یا نادرستی گزاره‌های زیر را مشخص کنید. (۳نمره/ به ازای هر پاسخ نادرست ۱ نمره منفی)

☐ گیاه A تحت حمله آفت قرار گرفته است.

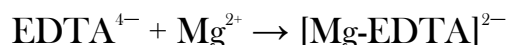
☐ هنگام آلودگی به آفت تجزیه کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b است.

☐ نرخ فتوسنتزی گیاه B از گیاه A بیشتر است.



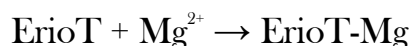
بخش سوم: تیتراسیون منیزیم (۲۲نمره)

- پروفوسور "اوده" برای بررسی اینکه آیا علائم ایجاد شده در اثر اختلال جذب منیزیم رخ داده است عصاره‌ی E را به ترتیب از گیاهان آفت زده استخراج کرد. وی با انجام بررسی‌های گوناگون و متعدد دریافته است که غلظت منیزیم در نمونه‌های طبیعی در بازه ۰,۰۱۵ تا ۰,۰۳۵ مولار قرار دارد. پروفوسور به دلیل حجم زیاد آزمایشات از شما خواسته است بررسی‌های لازم بر روی نمونه E را انجام داده و نتیجه را به او گزارش دهید. توصیه پروفوسور به شما استفاده از تیتراسیون کمپلکسومتری Mg-EDTA است:
- در این روش برای تعیین میزان منیزیم موجود در محلول از واکنش کمپلکس شدن Mg با EDTA (اتیلن‌دی-آمین‌تترااستیک‌اسید) استفاده می‌شود. در این تیتراسیون از شناساگر اریوکروم‌بلک‌تی (EBT) استفاده می‌شود.
- واکنش‌های داخل محلول به این صورت است:



(این واکنش در pH حدود ۱۰ ایجاد شده توسط بافر، به نسبت یک به یک بین EDTA و Mg انجام می‌شود.)

- واکنش شناساگر: ErioT آبی و ErioT-Mg صورتی می‌باشد.



۱. 10ml از نمونه (عصاره E) را داخل ارلن بریزید.
 ۲. 20ml از محلول EDTA (0.025 M - فالكون T) به ارلن اضافه کنید.
 ۳. 10ml از بافر (فالكون N)، 50ml آب مقطر و 1ml از محلول شناساگر EBT (ویال I) اضافه کنید.
 ۴. محلول داخل ارلن را با استفاده از محلول استاندارد منیزیم کلرید (0.0125 M - فالكون S) تیتتر کنید تا به رنگ صورتی ثابتی (Endpoint) برسید.
 ۵. برای بار دوم نیز آزمایش را تکرار کنید.
- محاسبات لازم را انجام داده و غلظت منیزیم عصاره E را بر حسب میلی‌مولار گزارش کنید.

	محاسبات (۱۰نمره)
	پاسخ نهایی (۱۰نمره)

- به توجه به نتایج آزمایش به نظر شده آیا علائم مشاهده شده در گیاهان به علت کاهش غلظت منیزیم است؟ (۲نمره)



بخش چهارم: بررسی ارتباط حضور حلزون و گیاهان آفت زده (۲۱نمره)

پروفسور اوده متوجه حضور حلزون هایی در اکوسیستم این باغ شده‌است. این نظریه در ذهن او مطرح شده‌است که آسیب رساندن این حلزون به گیاهان باغ، باعث انتقال این آفت می‌شود. یکی از راه های بررسی این فرضیه استفاده از جدول احتمال 2×2 است. (جدول پایین) اگر نمونه شامل گیاه آفت زده (x) و حلزون (y) بود آن را در دسته "a"، فقط حاوی y باشد در دسته b، فقط حاوی x باشد در دسته c و اگر حاوی هیچ گونه‌ای نباشد آن را در دسته d در نظر می‌گیریم.

شکلی که در صفحه آخر آمده‌است پراکندگی گیاهان بیمار و گیاهان سالم و حلزون را نشان می‌دهد. (مساحت هر مربع $0.25m^2$ است.)

- نتایج خود را در جدول بنویسید و همه خانه‌های خالی را پر کنید. (۵نمره)

Total	Snail absent	Snail present	
			Infected plant Present
			Infected plant Absent
۴۰			Total



Species y	Species x		Total
	Present	Absent	
Present	a	b	a+b
Absent	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	n

$$n = a+b+c+d$$

Probability of obtaining species x, $P(x) = (a+c)/n$

Probability of obtaining species y, $P(y) = (a+b)/n$

Joint probability(JP): the probability of both species x and y being present,

$$JP = P(x) \times P(y)$$

Expected joint occurrences = $n \times JP$

Significance level for Chi-squared statistical test (χ^2)

df	Significance level (α)	
	0.05	0.01
1	3.841	6.635
2	5.991	9.210
3	7.815	11.345



- $P(x)$ را محاسبه کنید. (۶، + نمره)

- $P(y)$ را محاسبه کنید. (۶، + نمره)

- JP را محاسبه کنید. (۶، + نمره)

- Expected joint occurrences را محاسبه کنید. (۶، + نمره)

- تست مربع کای با یک درجه آزادی به شیوه زیر محاسبه می‌شود:

$$n = a + b + c + d$$

$$\chi^2 = \frac{n(ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

- χ^2 را محاسبه کنید. (۵نمره)

- قدرت وابستگی گیاهان بیمار و حلزون ها توسط فاکتور V به شیوه زیر محاسبه می‌شود.

$$V = \frac{ad - bc}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}$$

- V از منفی یک (ارتباط بسیار منفی) تا مثبت یک (ارتباط بسیار مثبت) متغیر است و اگر صفر باشد یعنی هیچ ارتباطی نیست.

- V را محاسبه کنید. (۳نمره)

- درباره همبستگی حضور حلزون و گیاهان بیمار چه می‌توان گفت؟ (۶، ۱نمره)

Association V value	Strong — $-1=V \leq -0.6$	Moderate — $-0.6 < V \leq -0.2$	None $-0.2 < V < 0.2$	Moderate + $0.2 \leq V < 0.6$	Strong + $0.6 \leq V = 1$

- با توجه به اطلاعات سوال و استدلال خودتان به صحیح یا غلط بودن موارد زیر را مشخص کنید. (۴ نمره/ به ازای هر پاسخ نادرست ۱ نمره منفی)

- ☐ اگر از کoadرات بزرگتری استفاده کنیم نتایج دقیق تری بدست می‌آوریم.
- ☐ در آزمایش بالا فرض صفر تست مربع کای ما که گونه‌ها به صورت رندوم پخش شده اند رد شده است.
- ☐ اگر تعداد نمونه‌های کoadرات را بالا ببریم دقت اندازه‌گیری ما برای سنجش قدرت ارتباط بالا می‌رود.
- ☐ حلزون‌ها میتوانند با وارد کردن آسیب فیزیکی به گیاهان سالم شیوع این بیماری را در باغ تشدید کنند.



بخش پنجم: بررسی شیوع آفت به باغ‌های مجاور (۶ نمره)

- یکی از خصوصیات مهم هر جمعیت، تراکم آن می‌باشد. هر سه سال یک بار از هر باغ نمونه برداری با کoadرات صورت می‌گیرد تا تراکم گیاهان محاسبه و ثبت گردد. پس از تلاش فراوان پروفیسور **اوده** موفق به ریشه کن کردن آفت از باغ "الف" شد. اما این احتمال وجود دارد که این آفت به سایر باغ‌ها نیز منتقل شده باشد و به دلیل عدم حساسیت شدید گیاهان این باغ‌ها نسبت به آفت کاهش شدید تراکم دیده نشده باشد. به دلیل هزینه بالای تست‌های مولکولی برای شناسایی گیاهان آفت زده، برای شناسایی باغ‌هایی که آفت به آنها نفوذ کرده است پروفیسور انجام بررسی‌های آماری را توصیه کرده است. شما مسئول بررسی تاثیر ویروس روی گیاه شبدر (گیاهی که در باغ "م" رشد داده شده است) هستید و باید تحقیق کنید این آفت باعث کاهش تراکم شبدر شده است یا خیر. نتایج نمونه برداری گیاه شبدر در دو سال ۹۴ و ۹۷ به صورت زیر می‌باشد، در این نمونه برداریها باغ به ۱۰ قسمت تقسیم شده و با روش نمونه برداری با کمک چارچوب تراکم در این قسمت‌ها محاسبه شده است.

نمونه برداری سال ۹۴		نمونه برداری سال ۹۷	
شماره قسمت	تراکم (نفر/ متر مربع)	شماره قسمت	تراکم (نفر/ متر مربع)
1	3.1	1	1.8
2	2.9	2	2.5
3	2.8	3	2
4	1.4	4	2.3
5	2.3	5	3.1
6	3	6	2.5
7	2	7	1.4
8	1.7	8	2.1
9	3.2	9	0.6
10	1.6	10	2.1

- وضعیت تراکم در سال ۹۷ نسبت به سال ۹۴ چگونه است؟ (۲نمره)



- برای مقایسه میانگین‌ها از student's t-test استفاده می‌کنیم.

$$s^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad SE = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SE}$$

نمونه برداری سال ۹۴ (۴نمره)		نمونه برداری سال ۹۷ (۴نمره)	
شماره قسمت	(X - \bar{x})	شماره قسمت	(X - \bar{x})
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
5		5	
6		6	
7		7	
8		8	
9		9	
10		10	

- محاسبه آماره SE (۲نمره):



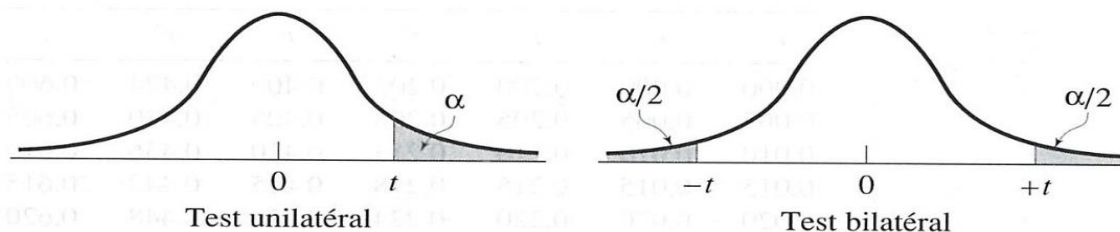
- محاسبه آماره t (۳نمره):



- اختلاف میانگین‌ها معنادار است یا تصادفی؟ (۱نمره)



Table t : points de pourcentage supérieurs de la distribution t



Seuil de signification pour le test unilatéral									
	.25	.20	.15	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
Seuil de signification pour le test bilatéral									
dl	.50	.40	.30	.20	.10	.05	.02	.01	.001
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.620
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.599
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.768
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.496
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.390
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291

