

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**KATEDRA BIOFYZIKY**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Sledování biologické aktivity listů rajčete pomocí jevu koherenční zrnitost**

Vypracoval: Jakub Pechník

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Pavel Horváth, Ph.D.

Forma studia: prezenční

Olomouc 2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jakub Pechník
Název práce:	Sledování biologické aktivity listů rajčete pomocí jevu koherenční zrnitost
Typ práce:	Experimentální
Pracoviště:	Společná laboratoř optiky Univerzity Palackého a Fyzikálního ústavu Akademie věd ČR
Vedoucí práce:	RNDr. Pavel Horváth, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	<p>Jev koherenční zrnitost se obvykle využívá ke studiu povrchových vlastností (drsnosti a deformace) různých typů materiálů zejména v technických oborech. Nicméně tento jev lze také využít pro studium procesů probíhajících uvnitř daného materiálu. Proto jsme se rozhodli využít interdisciplinárně, tedy ke studiu dynamických vlastností biologických vzorků. Cílem této práce bylo navrhnout a testovat bezkontaktní neinvazivní techniku pro měření biologické aktivity listu rajčete po jeho oddělení od mateřské rostliny. Byla navržena měřicí metoda využívající odečítání po sobě následujících snímků struktur koherenční zrnitosti. Pro kvantifikaci strukturních změn vzorku byl vybrán statistický ukazatel – směrodatná odchylka. Na rozdíl od ostatních prací jsme navíc porovnávali biologickou aktivitu v žilce (pokles aktivity) a v mezofylu (nárůst aktivity) listu, mezi nimiž jsme odhalili významné rozdíly. Navržená metoda se prokázala být dostatečně robustní pro měření strukturních změn v daném biologickém materiálu a získané výsledky poukazují na významnou heterogenitu v rámci jednoho listu, kterou je třeba vzít v úvahu v dalších studiích.</p>
Klíčová slova:	Koherenční zrnitost, rajče, vadnutí, oddělený list, biologická aktivita, neinvazivní měření
Počet stran:	40
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Jakub Pechník

Title of thesis: Monitoring of biological activity of tomato leaves by speckle effect

Type of thesis: Experimental

Department: Joint Laboratory of Optics of Palacky University and Institute of Physics of the Academy of Sciences of the Czech Republic

Supervisor: RNDr. Pavel Horváth, Ph.D.

The year of defence: 2019

Abstract: The speckle effect is usually used to study the surface properties (roughness and deformation) of various types of materials, especially in technical fields. However, this phenomenon can also be used as a tool for studying the processes occurring within the material. Therefore we decided to use it interdisciplinarily, i.e. to study dynamic properties of biological samples. The aim of this work was to design and test a non-contact non-invasive technique for measuring the biological activity of a tomato leaf after its detachment from the plant. We designed a technique using subtracts of the consecutive frames of speckle pattern. To quantify the structural changes in the sample, a statistical indicator – standard deviation was chosen. Unlike other papers, we also compared the biological activity inside the vein (decrease in activity) and in the mesophyll (increase in activity) of the leaf, among which we found significant differences. The proposed method has proven to be sufficient for measuring structural changes in a given biological material and the obtained results indicate significant heterogeneity within a single leaf, which is to be considered in other studies.

Key words: Speckle, tomato, wilting, detached leaf, biological activity, non-invasive measurement

Number of pages: 40

Number of attachments: 2

Language: Czech

Děkuji vedoucímu bakalářské práce RNDr. Pavlu Horváthovi, Ph.D. za jeho příkladné vedení, čas věnovaný konzultacím a přípravě experimentu. Dále děkuji RNDr. Petru Šmídovi, Ph.D. za čas věnovaný konzultacím a odbornou pomoc nejen při programování skriptů v software Mathematica. Děkuji také Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D. za podnětné konzultace a rovněž za pomoc při výsevech a pěstování rostlin a jejich přepravě na místo měření ve Společné laboratoři optiky.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením RNDr. Pavla Horvátha, Ph.D., a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne .....

## OBSAH

1. ÚVOD .....	1
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Pojem koherenční zrnitost .....	3
2.2 Typy koherenční zrnitosti.....	4
2.3 Vlastnosti koherenční zrnitosti .....	5
2.4 Statistické vlastnosti koherenční zrnitosti.....	9
2.5 Aplikační potenciál koherenční zrnitosti .....	10
2.6 Metody analýzy aktivity zkoumaného biologického vzorku pomocí jevu koherenční zrnitost.....	12
2.6.1 Metoda GD (z anglického generalized difference) .....	13
2.6.2 Metoda WGDs (z anglického weighted generalized differences).....	13
2.6.3 Metoda Fujiiho (z anglického Fujii's method) .....	13
2.6.4 Inverzní Fujiiho metoda (z anglického inverse Fujii's method) .....	14
3. CÍL PRÁCE .....	15
4. MATERIÁL A METODY .....	16
4.1 Rostlinný materiál .....	16
4.2 Použitá aparatura .....	17
4.3 Postup měření a vyhodnocení dat .....	19
5. VÝSLEDKY .....	23
6. DISKUSE.....	29
7. ZÁVĚR.....	31
8. SEZNAM LITERATURY .....	32
PŘÍLOHY .....	34
Příloha 1 Spektrální odezva a datový list čipu ZORAN použité CMOS kamery .....	34
Příloha 2 Skript v software Mathematica.....	38

## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obr. 1** Ilustrace k vzniku pole koherenční zrnitosti po odrazu od předmětu s drsným povrchem. (převzato z Horváth a Šmíd 2012)

**Obr. 2** Graf závislosti intenzity světla rozptýleného na plastidech a světla odraženého od povrchu zkoumaného vzorku na úhlu směru pozorování při osvětlení vzorku světlem jehož barva je různá od barvy vzorku. (modifikováno z Briers 1975)

**Obr. 3** Graf závislosti intenzity světla rozptýleného na plastidech a světla odraženého od povrchu zkoumaného vzorku na úhlu směru pozorování při osvětlení vzorku světlem jehož barva je stejná jako barva vzorku. (modifikováno z Briers 1975)

**Obr. 4** Časový vývoj aktivity listů fazole měřený každou hodinu po oddělení listu od stonku s užitím kvantitativních ukazatelů: aproximovaná entropie (**a**), vzorkovací entropie (**b**),  $q$ -Tsallis entropie (**c**),  $q$ -variance (**d**), absolutní hodnota z diferencí (**e**), moment setrvačnosti (**f**), zobecněná diference (**g**). (převzato z Zhong a kol. 2013)

**Obr. 5** Fotografie vypěstované rostliny rajčete *Lycopersicon esculentum* připravené k následnému měření. Uvedeno měřítko.

**Obr. 6** Náčrt (schéma) experimentální sestavy.

**Obr. 7** Fotografie experimentální sestavy.

**Obr. 8** Detailní pohled na studovanou oblast listu. List byl upevněn (zafixován) pomocí hliníkové podložky a papírového rámečku, který zabraňuje průchodu světla v důsledku ohybu na okraji listu, jehož struktura se v důsledku vadnutí narušuje.

**Obr. 9** Ilustrace zvolených oblastí zájmu ve snímku směrodatné odchylky pro sledování vývoje biologické aktivity během uvádání odděleného listu. **Žlutě** je vyznačena oblast uvnitř hlavní žilky listu. **Zeleně** je vyznačena oblast v mezofylu. Vzdálenost obou oblastí ve snímku je 20 pixelů.

**Obr. 10** Časová závislost průměrné směrodatné odchylky uvnitř hlavní žilky listu z prvního (**A**), druhého (**B**), třetího (**C**), čtvrtého (**D**) měření, aproximační křivky ze všech naměřených dat uvnitř hlavní žilky (**E**), časová závislost směrodatné odchylky v mezofylu z prvního (**F**), druhého (**G**), třetího (**H**), čtvrtého (**I**) měření, aproximační křivky ze všech naměřených dat v mezofylu (**J**).

**Obr. 11** Časové řady snímků směrodatných odchylek mezi 0. a 14. hodinou po oddělení listu ze všech provedených měření. Vertikální osa udává čas po oddělení listu.

**Obr. 12** Časové řady snímků směrodatných odchylek mezi 15. a 47. hodinou po oddělení listu ze všech provedených měření. Vertikální osa udává čas po oddělení listu.

**Obr. 13** Struktura adresářů, ze které skript pro zpracování snímků struktur koherenční zrnitosti načítá data.

# 1. ÚVOD

Po oddělení listu od mateřské rostliny nastávají dva procesy: vodní stres, který má za následek pokles turgoru doprovázený vadnutím listu, a poškození pletiv (tzv. wounding). Měření procesů probíhajících v rostlinném pletivu v důsledku různých forem stresu se obvykle provádí kontaktními až destruktivními metodami. Například Malone (1992) využil ke snímání tloušťky listu popálené rostliny pšenice kontaktní snímače polohy. Podobný přístup použili také Stanković a kol. (1997) ke snímání změn rozměrů slunečnicového stonku po popálení listu. Mancuso (1999) měřil deformaci stonku popálené vinné révy pomocí tenzometrů umístěných na opačných stranách stonku, spojených v tzv. Wheatstonově můstku. Systémovou akumulaci rostlinných stresových hormonů po popálení listu tabáku měřili Hlaváčková a kol. (2006) pomocí HPLC–MS metody vyžadující oddělení a kompletní destrukci měřeného listu před vlastní purifikací. Podobně stanovení exprese stresových genů (RT–PCR) případně stanovení vodního potenciálu při stresu rostlin suchem jsou destruktivními metodami (Vojta a kol. 2016). Jak je uvedeno výše, tyto metody vyžadují minimálně kontakt mezi měřicí aparaturou a vzorkem až destrukci rostlinného pletiva, což může způsobit nechtěné zkreslení výsledků.

Tyto poznatky nás vedly k myšlence sestavit měřicí systém, který by snímání změn v biologických vzorcích vystavených stresu prováděl neinvazivně. Jako ideální pro naše účely se jeví metody optické. Presentujeme neinvazivní optickou metodu pracující na základě jevu koherenční zrnitosti, která umožňuje sledování změn nejen makroskopických a povrchových, nýbrž také strukturních změn uvnitř opticky propustného pletiva.

Jev koherenční zrnitosti a jeho praktické využití je v současnosti stále více předmětem výzkumu. Představuje fenomén vedoucí k novým a často netradičním aplikacím v řadě přírodovědných a technických oborů. Toto potvrzuje mimo jiné také rostoucí publikační zájem věnovaný tomuto jevu v posledních dvaceti letech. Nemalý vliv na prudký nárůst aplikací na bázi koherenční zrnitosti má rovněž rozvoj moderních technologií, softwaru a elektroniky. Lze říci, že současný technologický trend způsobuje obecně renesanci klasických měřicích optických metod a celé klasické optiky vůbec.

Jev koherenční zrnitost je využíván v řadě vědeckých oborů jako fyzika (například mechanika těles nebo astronomie), ale také biologie či lékařství. Cílem zkoumání bývá stav deformace povrchu předmětu či biologická aktivita živých vzorků.

V teoretické části práce je uveden princip měření s využitím koherenční zrnitosti, který spočívá ve vysokofrekvenčním snímání sérií snímků struktury koherenční zrnitosti od zkoumaného vzorku, a dále je věnována pozornost různým metodikám pro zpracovávání naměřených dat za účelem obdržení maximální informace o zkoumaném vzorku. Obsahem praktické části je experiment, v němž provádíme měření časového vývoje struktury koherenční zrnitosti od zkoumaného vzorku. Inspirací nám byla metodika analýzy koherenční zrnitosti, kterou publikoval Kadono a kol. (2003) a která využívá diference mezi každými dvěma v čase po sobě pořízenými snímky struktury koherenční zrnitosti.

Výsledky experimentu jsou zároveň součástí širšího teoretického a aplikačního výzkumu jevu koherenční zrnitost, na kterém pracují RNDr. Pavel Horváth, Ph.D., který je současně mým vedoucím práce, a RNDr. Petr Šmíd, Ph.D., který je mým konzultantem. Oba výše zmínění vědečtí pracovníci informují pravidelně širokou veřejnost ve svých odborných publikacích.



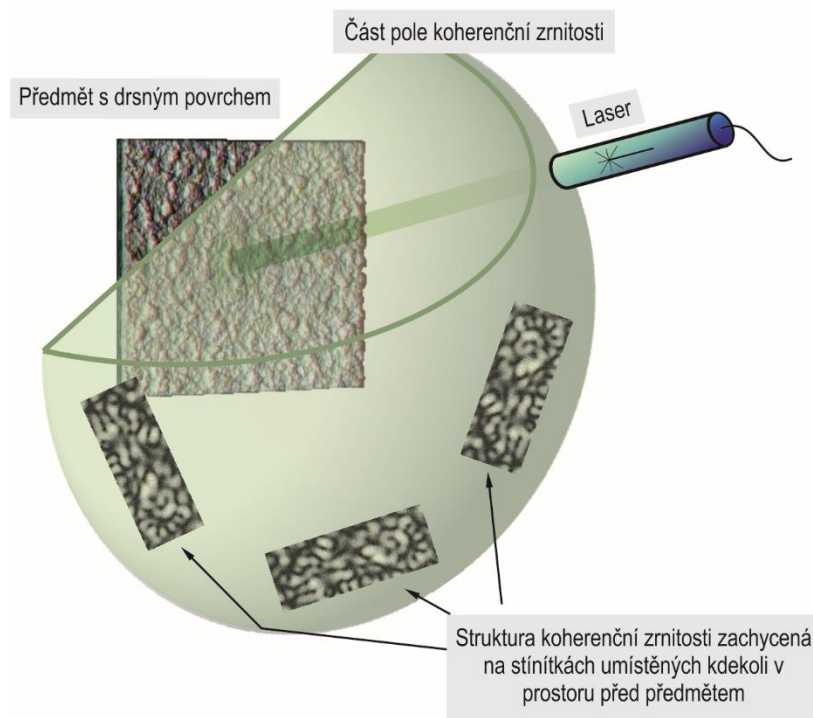
## 2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

### 2.1 Pojem koherenční zrnitost

V odborné literatuře se doslovná definice pojmu koherenční zrnitost liší, nicméně její obecný význam zůstává stejný.

Dainty (1984) definuje koherenční zrnitost (z anglického speckle) jako optický jev vznikající při dopadu koherentního světelného svazku na drsný povrch předmětu. Přitom musí platit, že změny mezi výškami reliéfu povrchu předmětu v různých bodech jsou minimálně na úrovni vlnové délky dopadajícího světelného svazku. Jev vzniká, jestliže je koherentní světlo odráženo od drsného povrchu předmětu, nebo jestliže světelná vlna prochází fázovým prostředím s náhodnými fluktuacemi indexu lomu. Dle Hrabovský a kol. (2001) je podstatou tohoto jevu interference světelných vln šířících se odrazem nebo rozptylem od mikroskopických plošek povrchu předmětu nebo rozptylem na náhodně rozložených rozptylujících částicích při průchodu světla prostředím.

Horváth a Šmíd (2012) popisují rovněž vznik koherenční zrnitosti při průchodu koherentního, případně částečně koherentního světla předmětem s difúzně rozptylujícím rozhraním.



**Obr. 1** Ilustrace k vzniku pole koherenční zrnitosti po odrazu od předmětu s drsným povrchem. (převzato z Horváth a Šmíd 2012)

Jev se vyznačuje vznikem světlých a tmavých skvrn, které je možno pozorovat, například, pomocí stínítka umístěného v libovolném místě prostoru. Prostor před osvětleným předmětem, ve kterém vzniká koherenční zrnitost, je označován jako pole koherenční zrnitosti (Obr. 1). Rovinný řez polem koherenční zrnitosti se nazývá struktura koherenční zrnitosti. Ta vypovídá o povrchových vlastnostech předmětu a je možné ji zaznamenat pomocí detektorů nebo stínítek vložených dovnitř pole koherenční zrnitosti. Při detekci struktury koherenční zrnitosti získáváme informaci o vlastnostech skvrn v rovinném řezu pole koherenční zrnitosti. Sledujeme pouze plošný řez zrny, která jsou ve skutečnosti trojrozměrnými objekty v prostoru. Celá zrna lze zobrazit (vizualizovat) z mnoha struktur koherenční zrnitosti zaznamenaných v rovinách definovaných pohybem detektoru ve směru kolmém na jeho účinnou plochu (Horváth a Šmíd 2012).

V souvislosti s využitím koherenční zrnitosti v biologii se v anglicky psaných publikacích objevuje pojem biospeckle. Saúde a kol. (2012) definují tento pojem jako prostředek (nástroj) sloužící k výzkumu a studiu aktivity biologických materiálů, které pouhým okem nelze zaznamenat. Přitom poznamenávají, že základem technik, které využívají biospeckle, je pořízení sekvence snímků struktury koherenční zrnitosti od laserem osvětleného povrchu zkoumaného biologického vzorku. Sekvence snímků jsou dále zpracovávány a analyzovány, přičemž je možno získat představu o míře aktivity zkoumaného vzorku. Jednotlivým přístupům analýzy sekvence snímků je podrobněji věnována kapitola 2.6.

## 2.2 Typy koherenční zrnitosti

Z hlediska prostředí, ve kterém se šíří pole koherenční zrnitosti, rozlišujeme v optice dva typy koherenční zrnitosti (Horváth a Šmíd 2012):

1. Objektivní koherenční zrnitost se šíří volným prostředím. To znamená, že v prostoru mezi předmětem a rovinou detekce není umístěn žádný optický systém.
2. Subjektivní koherenční zrnitost nastává v případě, že je mezi předmětem a detektorem světla umístěn optický systém. Struktura měřeného pole koherenční zrnitosti je pak ovlivněna také parametry tohoto optického systému.

## 2.3 Vlastnosti koherenční zrnitosti

Důležitou vlastností při analýze koherenční zrnitosti je vlastní velikost skvrn ve struktuře koherenční zrnitosti. Omezíme-li se na případ objektivního pole koherenční zrnitosti, pak pro střední velikost  $d$  skvrny v rovině pozorování platí vztah (Ennos 1984)

$$d \approx 1,2 \cdot \frac{\lambda \cdot z}{D}, \quad (1)$$

kde  $\lambda$  představuje vlnovou délku použitého světla,  $z$  je vzdálenost detektoru od zkoumaného předmětu (vzorku) a  $D$  je průměr osvětlené kruhové plošky povrchu předmětu. Ze vztahu (1) vyplývá, že s rostoucí vzdáleností detektoru od předmětu a rostoucí vlnovou délkou použitého světla, roste také velikost skvrn pozorovatelných prostřednictvím detektoru v poli koherenční zrnitosti. Naopak se zvětšujícím se průměrem osvětlené plošky povrchu předmětu se tyto skvrny zmenšují. Vhodnými úpravami zmíněných geometrických a optických parametrů měřicí sestavy je možné definovaně měnit velikost generovaných skvrn (Horváth a Šmíd 2012).

Mimo změn pole koherenční zrnitosti v důsledku geometrických parametrů lze pozorovat také závislosti na vlastnostech světla, jako jsou například vlnová délka světla nebo stupeň koherence. Zcela koherentní světlo se vyznačuje jednotkovou hodnotou stupně koherence a maximální rozlišitelností skvrn pozorovaných ve struktuře koherenční zrnitosti. Kontrast (respektive viditelnost skvrn) je maximální. Pole koherenční zrnitosti v takovém případě vzniká v celém poloprostoru před předmětem. Hustota pravděpodobnosti intenzity v jednom libovolném bodě pole koherenční zrnitosti se řídí exponenciálním pravděpodobnostním rozdělením. Zcela nekoherentní světlo naopak představuje nulovou hodnotu stupně koherence a strukturu koherenční zrnitosti vůbec nepozorujeme. Pro dosažení co možná nejlepší viditelnosti jevu je tedy vhodné použití koherentního zdroje světla, kterým je například laser nebo laserová dioda (Horváth a Šmíd 2012).

Briers (1975) uvádí, že pokud je osvětlený objekt biologickým vzorkem (například list rostliny nebo ovoce), lze pozorovat časové fluktuace struktury koherenční zrnitosti. Rychlost fluktuace závisí na vlnové délce světla, kterým je vzorek osvětlován, na barvě vzorku a na úhlu směru pozorování. Autorův experiment dokazuje, že při osvětlení červeným světlem helium–neonového laseru, červené rajče generuje při pozorování v čase rychlejší fluktuace struktury koherenční zrnitosti než zelené rajče. Opačná situace nastane v případě, že na vzorky svítí zelený svazek argonového laseru.

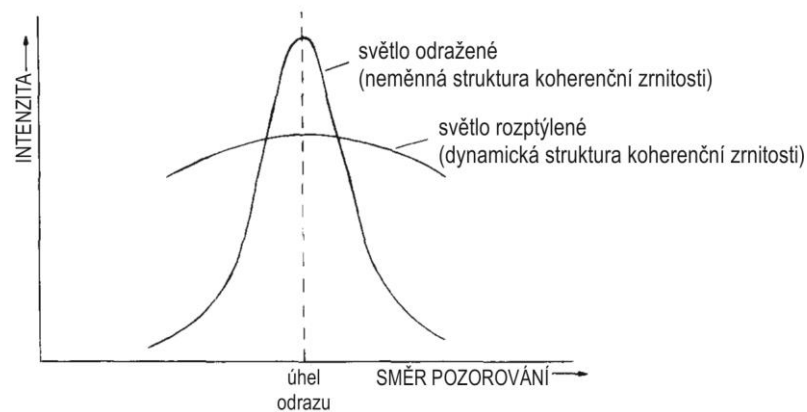
Pro tyto úvahy Briers předpokládá, že povrch vzorku je nehybný, kdežto plastidy jsou během měření v pohybu.

Příčinou barvy rajčete je tedy přítomnost plastidů (chloroplasty a lykopen, chromoplasty) v jeho buňkách, které selektivně rozptylují některé složky dopadajícího světla. Červené rajče tedy na svých chromoplastech rozptyluje červené světlo, kdežto zelené světlo je absorbováno. Zelené rajče naopak selektivně rozptyluje zelené světlo a absorbuje červené. Zachycené světlo ze vzorku osvětleného při pokusu, který provedl Briers (1975), je tedy složeno ze dvou složek. První složkou je světlo rozptýlené na plastidech („scattered component“) a druhou složkou je světlo odražené od povrchu vzorku („quasi-specular component“). Výsledek experimentu popsany v článku naznačuje, že intenzita světla rozptýleného plastidy je mnohem méně závislá na směru pozorování (detekce) než intenzita světla odraženého od povrchu vzorku (Obr. 2 a Obr. 3). Čím více se směr pozorování odchyluje od přímého směru odrazu paprsků, tím méně intenzivní světlo obou složek detekujeme. Závislost intenzity detekovaného světla na úhlu směru pozorování je nicméně mnohem strmější u světla odraženého než u světla rozptýleného.

Jestliže je barva biologického vzorku odlišná od barvy laserového svazku (například červené rajče a zelený světelný svazek), dominantní složkou detekovaného světla je světlo odražené od povrchu vzorku. Briers (1975) uvádí, že v tomto případě je pozorovaná struktura koherenční zrnitosti neměnná. Obr. 2 zobrazuje závislost intenzity složek rozptýleného a odraženého světla na úhlu směru pozorování pro tuto situaci.



**Obr. 2** Graf závislosti intenzity světla rozptýleného na plastidech a světla odraženého od povrchu zkoumaného vzorku na úhlu směru pozorování při osvětlení vzorku světlem jehož barva je různá od barvy vzorku. (modifikováno z Briers 1975)



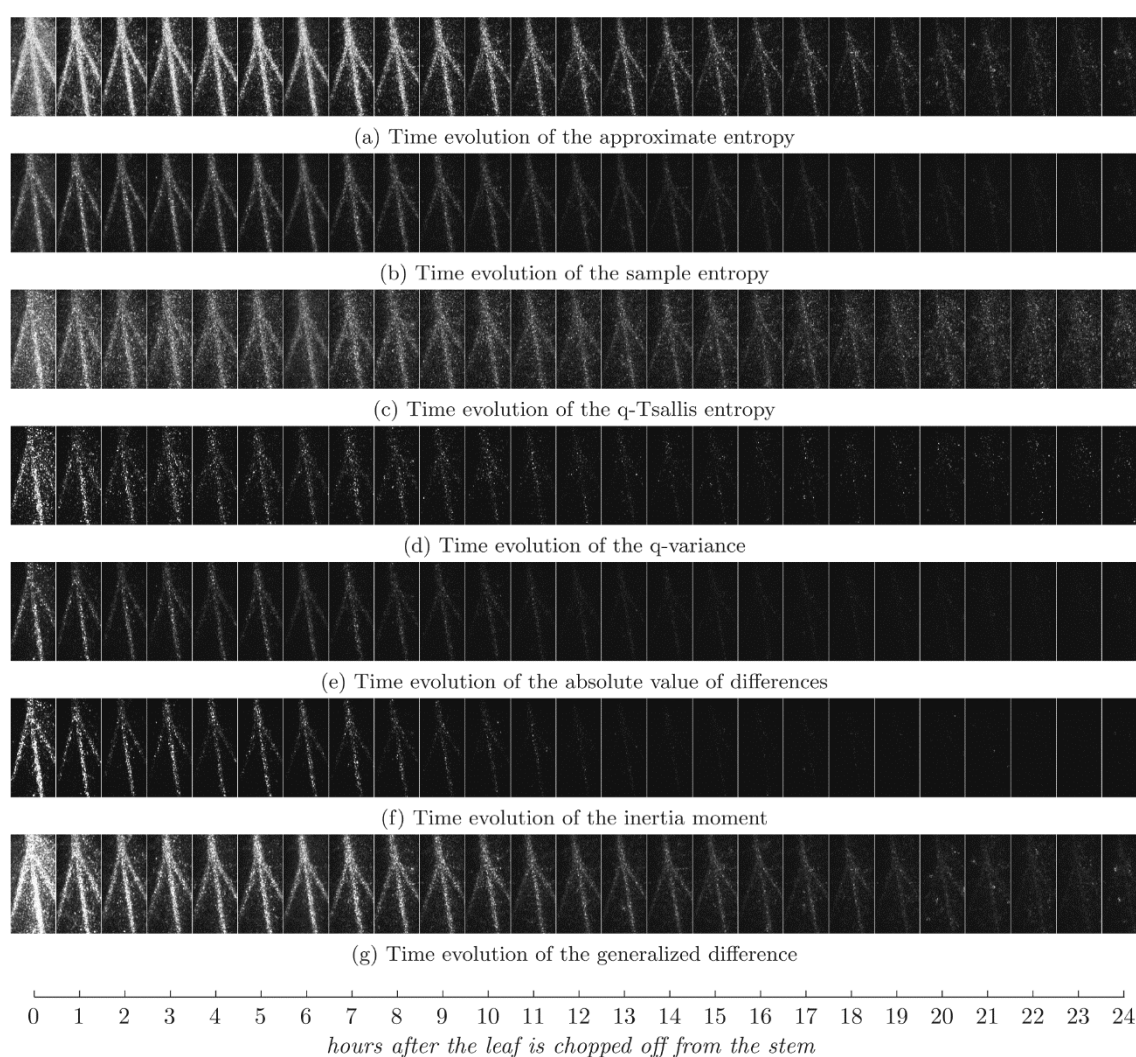
**Obr. 3** Graf závislosti intenzity světla rozptýleného na plastidech a světla odraženého od povrchu zkoumaného vzorku na úhlu směru pozorování při osvětlení vzorku světlem jehož barva je stejná jako barva vzorku. (modifikováno z Briers 1975)

Pokud je barva biologického vzorku stejná jako barva osvětlení (Obr. 3), dominantní složkou detekovaného světla je světlo rozptýlené na plastidech. V tomto případě pozorujeme dynamickou strukturu koherenční zrnitosti, která je v přímém směru odrazu méně výrazná.

Podle Briers (1975) měření na listu, při osvětlení zeleným argonovým laserem, ukazuje nejrychlejší fluktuace struktury koherenční zrnitosti poblíž cévních svazků, jejichž mikroskopická analýza potvrzuje výskyt aktivních chloroplastů právě v těchto oblastech.

Zhong a kol. (2013) v experimentu poukazují na několik dalších ukazatelů, které lze využít k posouzení časové závislosti biologické aktivity vzorku zkoumané rostliny. List rostliny může měnit svou strukturu v závislosti na klimatu, stavu rostliny a stresu. Stres může vyústit ve změny jako je třeba uzavření průduchů, snížení turgoru a v krajních případech i v buněčnou smrt. Autoři se v této souvislosti zabývají analýzou drsnosti povrchu listu v jeho různých místech s využitím znalostí ze statistického popisu struktury koherenční zrnitosti (byla použita autokorelační funkce) a dále pozorováním změn ve vnitřní mikrostruktuře listu pomocí analýzy sérií snímků struktury koherenční zrnitosti zaznamenaných s definovanou časovou prodlevou. Mikrostruktuře listu ovlivňují souhrnné změny probíhající uvnitř listu, které jsou například v publikacích Kadono a kol. (2003), Zhong a kol. (2013) označovány biologickou aktivitou, proto jsme v rámci předložené práce termín biologické aktivity převzali.

Při analýze experimentu, ve kterém oddělený list rostliny osvětlovali červeným světlem z laserové diody a strukturu koherenční zrnitosti generovanou po odrazu snímali CCD kamerou, Zhong a kol. (2013) naměřené snímky posoudili z pohledu různých kvantitativních ukazatelů (Obr. 4). Těmito ukazateli jsou entropie,  $q$ -variance, difference snímků, moment setrvačnosti a absolutní hodnota z difference snímků. Přestože článek již neuvádí přesný postup při výpočtech s využitím těchto klíčových ukazatelů, řady snímků, které autoři v článku prezentují, mají jednu společnou vlastnost, a sice tmavnutí výsledných snímků s rostoucím časem po oddělení listu.



**Obr. 4** Časový vývoj aktivity listů fazole měřený každou hodinu po oddělení listu od stonku s užitím kvantitativních ukazatelů: aproximovaná entropie (a), vzorkovací entropie (b),  $q$ -Tsallis entropie (c),  $q$ -variance (d), absolutní hodnota z diferencí (e), moment setrvačnosti (f), zobecněná difference (g).  
(převzato z Zhong a kol. 2013)

## 2.4 Statistické vlastnosti koherenční zrnitosti

Struktura koherenční zrnitosti je charakterizována náhodným rozložením interferenčních maxim a minim, které lze analyzovat pomocí statistiky. Horváth a Šmíd (2012) uvádějí, že při statistickém popisu koherenční zrnitosti považujeme charakteristické veličiny světelné vlny (intenzitu a fázi) za spojité náhodné veličiny. Ve statistickém vyhodnocení přitom používáme střední hodnoty zkoumaných veličin, abychom odlišili fluktuace způsobené odrazem světelného vlnění od povrchu předmětu od fluktuací jiných náhodných vlnění. Tyto střední hodnoty hledáme dle Goodman (1985) středováním přes soubor mnoha makroskopicky stejných, ale mikroskopicky různých odrazných, popřípadě opticky propustných povrchů předmětu.

V této práci se věnujeme statistickým vlastnostem pole koherenční zrnitosti 1. řádu, tedy vlastnostem v jednom bodě pole koherenční zrnitosti za předpokladu, že je pole koherenční zrnitosti plně vyvinuté (je použit zdroj úplně koherentního a polarizovaného světla). Z předpokladů vyplývá, že uvažované pole má ve všech bodech před předmětem stejnou polarizaci a světelné vlny odražené od předmětu se v daném bodě skládají koherentně (sčítají se jejich komplexní amplitudy). Pro intenzitu a fázi vlny, jakožto spojité náhodné veličiny v jednom bodě prostoru, a pro jejich funkce hustoty pravděpodobnosti  $p_I(v)$  a  $p_\phi(w)$  platí vzorce:

$$p_I(v) = \frac{1}{\langle I \rangle} e^{-\frac{v}{\langle I \rangle}}, \quad (2)$$

$$p_\phi(w) = \text{Rect} \frac{w}{2\pi}, \quad (3)$$

kde  $\langle I \rangle$  je označení střední hodnoty pro intenzitu,  $v$  je hodnota intenzity,  $w$  je hodnota fáze.

Platnost vzorce (2) experimentálně potvrdil McKechnie (1974) měřením ve 23000 bodech pole koherenční zrnitosti a Dainty (1984) měřením 2400 bodů pole koherenční zrnitosti. Z rovnic vyplývá, že intenzita se v bodě plně vyvinutého pole koherenční zrnitosti řídí klesajícím exponenciálním rozložením pravděpodobnosti. Nejpravděpodobnější hodnotou intenzity v bodě plně vyvinutého pole koherenční zrnitosti je tedy nulová hodnota (tmavý bod). Fáze v bodě pole koherenční zrnitosti se za stejných podmínek řídí rovnoměrným rozdělením pravděpodobnosti na intervalu  $(-\pi, \pi)$ . Horváth a Šmíd (2012) uvádějí, že výše zmíněné statistické vlastnosti 1. řádu platí jak pro objektivní, tak i pro subjektivní pole koherenční zrnitosti. Obecnému

popisu statistických vlastností pole koherenční zrnitosti se velmi podrobně věnuje Goodman (1975).

## 2.5 Aplikační potenciál koherenční zrnitosti

Předmětem zkoumání jevu koherenční zrnitosti bývají analýzy změny pole (respektive struktury) koherenční zrnitosti v čase, které dávají pro předmět generující pole koherenční zrnitosti informaci o postupných strukturních změnách jeho povrchu (nebo objemu v případě fázového předmětu). U měřicích metod využívajících jev koherenční zrnitosti přitom nedochází k mechanickým interakcím se zkoumaným předmětem. Takové bezkontaktní (neinvazivní) metody lze výhodně aplikovat na předměty zkoumání, které jsou náchylné na mechanické poškození (například živé tkáně), a zabránit tak zavedení chyb měření a poškození vzorku.

Horváth a Šmíd (2012) zmiňují možnosti využití tohoto jevu v praxi při měření refrakčního stavu lidského oka, měření indexu lomu kapalin, nebo stanovování drsnosti a deformace povrchu předmětu. Principem metod, které předkládá Leger a kol. (1975) pro stanovení drsnosti povrchu vzorku je korelace dvou struktur koherenční zrnitosti generovaných od stejného místa zkoumaného vzorku a osvětlovaného postupně pod dvěma různými úhly osvětlení. Ze změřené závislosti korelačního koeficientu a známého úhlu mezi prvním a druhým osvětlovacím svazkem lze určit drsnost povrchu vzorku.

Salazar a Barientos (2013) využívají korelaci struktur koherenční zrnitosti ke studiu povrchů materiálů používaných pro konstrukce letounů. V této oblasti je přesná informace o povrchu materiálů zvláště důležitá, protože změny v mikroskopické struktuře povrchů mohou být známkou poškození těchto materiálů. Detekují se tedy nepravidelnosti v drsnosti povrchu, které pomáhají najít místo poškození v plášti letounů.

V lékařství na základě časové analýzy struktury koherenční zrnitosti probíhají například analytická měření průtoku krve krevním řečištěm. K tomuto účelu existuje zobrazovací technika LSCI (z anglického laser speckle contrast imaging), kterou se podrobně zabývá Briers (2001). Principem techniky je osvětlení sledovaného vzorku laserovým světlem a záznam obrazu vzniklé struktury koherenční zrnitosti digitálním fotoaparátem. Více k této metodě je uvedeno v kapitole 2.6.



Sandker a kol. (2014) publikovali studii, ve které se zabývají praktickou využitelností koherenční zrnitosti pro Allenův test (Mehrotra 2015). Při výkonu Allenova testu pacient sevře ruku v pěst a stlačí se tepny *Arteria radialis* a *Arteria ulmaris* tak, aby krev neprotékala do dlaně. Když pacientovi zblednou prsty a dlaň, povolí ruku a uvolní jednu ze zmíněných tepen. Testuje se doba prokrvení dlaně od uvolnění tepny. Sandker a kol. (2014) uvádí, že v důsledku pohybu červených krvinek dochází k rozptylu koherentního osvětlení z laserového zdroje a generuje se dynamicky se měnící pole koherenční zrnitosti. Toto se pak dá využít ke sledování průtoku krve (krevní perfuze). Autoři provedli třicet měření na různých pacientech, při kterých byl test vykonán nejprve zdravotní sestrou za obvyklého postupu (bez využití jevu koherenční zrnitosti) a poté také pomocí časové analýzy struktury koherenční zrnitosti. Uvedená měření nepotvrdila mezi sebou žádný statisticky významný rozdíl mezi naměřenými dobami prokrvení dlaně. Braga (2011) konstatuje také možnost využití jevu koherenční zrnitosti k zobrazení a studiu pohybu spermií.

V biologii se také setkáváme s využitím jevu koherenční zrnitosti pro zobrazování biologické aktivity rostlin. Na jeho základě lze sledovat jak okamžitý stav rostliny, tak také dlouhodobý vývoj. Costa a kol. (2018) poukazují na schopnost časové analýzy struktury koherenční zrnitosti předpovědět vznik podlitin na povrchu brambor, k němuž dochází s prodlevou po mechanickém poškození brambory, například při sklizni. Snahu využít koherenční zrnitosti pro účely detekce vadných potravin, u kterých vada není pouhým okem zaznamatelná, projeví ve své publikaci také Amaral a kol. (2013). Autoři deklarují možnost využití podobné analýzy na stanovení kvality hovězího masa.

Kadono a kol. (2003) se při zkoumání koherenční zrnitosti motivují environmentální problematikou ve snaze najít způsob, jak sledovat stres rostlin způsobený faktorem zhoršujícího se životního prostředí na naší planetě. V článku se autoři zabývají znečištěním životního prostředí rychlým vývojem průmyslu. Důsledkem průmyslového pokroku jsou například kyselé deště, které mají pro flóru zničující efekt. Autoři této studie patří k navrhovatelům vyhodnocování sérií snímků struktur koherenčních zrnitostí pomocí vzájemného odečtu každých dvou po sobě následujících snímků. Ze všech rozdílových snímků je pak sestaven průměrný rozdílový snímek – jeden obrázek vypovídající o celé naměřené sérii snímků. Tento obrázek je tmavý, pokud pořízené snímky struktury koherenční zrnitosti s definovaným časovým zpožděním nevykazují změnu v čase (biologická aktivita je utlumená), nebo světlý, pokud se od sebe pořízené snímky struktury koherenční zrnitosti s definovaným

časovým zpožděním liší (biologická aktivita je prokazatelná). Vhodná velikost časové prodlevy mezi snímky závisí podle autora na zkoumaném materiálu a aktivitě uvnitř zkoumaného vzorku. Čím přesněji je tento parametr zvolen, tím lépe je možné aktivitu vzorku vizualizovat. Protože se aktivita uvnitř vzorku na různých místech různí, volba frekvence snímání se provádí na základě testovacích měření.

Kadono aplikuje výše popsanou metodu na rostlině *Syngonium*, která byla předem stresována uměle vytvořeným znečištěním (kyselý déšť připravený z vody a roztoku kyseliny sírové, kyseliny chlorovodíkové a kyseliny dusičné v poměru 2:1:1, pH 2.0). Výsledkem byla časová řada průměrných rozdílových snímků struktur koherenční zrnitosti. Tyto rozdílové snímky byly na začátku měření světlé, po dvou dnech od aplikace kyselého deště však začaly rozdílové snímky tmavnout. Jak již bylo zmíněno, toto tmavnutí značí pokles biologické aktivity rostliny. Zřetelný pokles biologické aktivity listu rostliny se objevil po třech týdnech, ale i v této době nebyly tyto změny okem pozorovatelné. Nejsvětějšími místy na rozdílových snímcích po dobu celého měření byly cévní svazky.

Podobnou časovou řadu obdrželi Kadono a kol. (2003) také při testování vlivu ozónu (hlavní složky smogu v atmosféře) na list rostliny (*Syngonium*), která byla během experimentu vystavena různým koncentracím tohoto plynu v okolním prostředí. Toto měření ukázalo negativní vliv plynu na rostlinu již po 10 hodinách od začátku měření. Autor také uvádí, že jedna z testovaných rostlin byla nakažena virem, jehož důsledkem byla černá skvrna na listu rostliny. Snímání struktur koherenční zrnitosti od zkoumaného listu tento virus dokázalo předpovědět dříve, než byl okem zaznamenaný (Kadono a kol. 2003).

## 2.6 Metody analýzy aktivity zkoumaného biologického vzorku pomocí jevu koherenční zrnitosti

Jak již bylo výše zmíněno, koherenční zrnitost představuje mimo jiné nástroj k výzkumu aktivity biologických vzorků. Společným základem těchto metod je pořízení sekvence snímků struktury koherenční zrnitosti generované zkoumaným vzorkem. Sekvence snímků jsou dále analyzovány a zpracovávány za účelem získání informací o míře aktivity zkoumaného vzorku (Saúde a kol. 2012).

Existuje mnoho již známých a zavedených přístupů k analýze sekvence snímků struktur koherenční zrnitosti. Zde si uvedeme ty nejvýznamnější.

### 2.6.1 Metoda GD (z anglického generalized difference)

V této metodě (Saúde a kol. 2012) se nejprve pro každý snímek pořízené sekvence  $n$  snímků určí součet absolutních hodnot diferencí mezi tímto referenčním snímkem a snímky po něm následujícími. Výsledek je poté stanoven jako kumulativní součet těchto součtů diferencí. Předpokládáme-li, že aktivitu v pixelu  $p$  snímku odráží sekvence celých čísel  $s_p = [x_0, x_1, x_2, \dots, x_{n-1}]$ , kde  $x_i$  udává digitální hodnotu odpovídající barvě v daném pixelu  $p$  ve snímku s pořadovým číslem  $i$ , lze metodu matematicky popsat rovnicí

$$GD(s_p) = \sum_{i=0}^{n-2} \sum_{j=i+1}^{n-1} |x_i - x_j|. \quad (4)$$

### 2.6.2 Metoda WGDs (z anglického weighted generalized differences)

Metoda WGDs (Saúde a kol. 2012) je modifikací metody GD. Na rozdíl od metody GD jsou součty absolutních hodnot diferencí omezeny na oblast  $w$  snímků následujících po referenčním snímku. Obecně je definována rovnicí

$$WGD(w, s_p) = \sum_{i=0}^n \sum_{j=i+1}^{i+w} |x_i - x_j| q_j. \quad (5)$$

Váhové koeficienty  $q_j$  jsou pak zpravidla voleny tak, aby nabývaly hodnoty 0 mimo oblast zájmu  $w$  snímků a hodnoty 1 uvnitř této oblasti. Nulové váhové koeficienty tak eliminují naměřená data ležící mimo oblast zájmu.

### 2.6.3 Metoda Fujiiho (z anglického Fujii's method)

Fujiiho metoda byla původně navržena pro měření toku krve (Fujii a kol. 1985, Fujii a kol. 1987). Fujiiho metodu charakterizuje vztah

$$F(s_p) = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{|x_i - x_{i+1}|}{x_i + x_{i+1}}. \quad (6)$$

Použití této metody pro objekty s vysoce odrazným povrchem je nevýhodné. Hodnota jmenovatele ve vztahu (6) roste s vyšší mírou odraženého světla, a proto místa studovaného objektu s vyšším jasem jsou více „penalizována“ hodnotou jmenovatele. Výsledek Fujiiho metody na dvou místech stejného objektu o stejné míře biologické

aktivity může tedy být různý v závislosti na lokální míře jasu povrchu. Proto Saúde a kol. (2012) navrhli inverzní metodu Fujiiho.

#### 2.6.4 Inverzní Fujiiho metoda (z anglického inverse Fujii's method)

Tato metoda je modifikací metody Fujiiho a je popsána vztahem

$$F_i(s_p) = \sum_{i=0}^{n-1} |x_i - x_{i+1}| \cdot (x_i + x_{i+1}). \quad (7)$$

Inverzí jmenovatele ve vztahu (6) se zvyšuje projev probíhající aktivity v místech s vyšším jasem.

Poslední dvě zmíněné metody při analýzách berou v potaz také vliv jasu studovaného objektu v různých místech jeho povrchu, potažmo odrazivosti povrchu. Saúde a kol. (2012) mimo jiné demonstrují aplikace obou verzí Fujiiho metody na minci natřené bílým inkoustem s vysokou odrazivostí.

Výše uvedené metody včetně Kadono a kol (2003) a Zhong a kol. (2013) nám byly inspirací v pořízení sekvence snímků struktury koherenční zrnitosti a v hledání informace o míře biologické aktivity z rozdílů po sobě následujících snímků. Naším účelům nejbližší biologický model – list rostliny – zvolili ve svých publikacích Kadono a kol. (2003) a Zhong a kol. (2013), proto jsme v této práci vycházeli z jejich postupů (více v předchozích kapitolách 2.3 a 2.5).

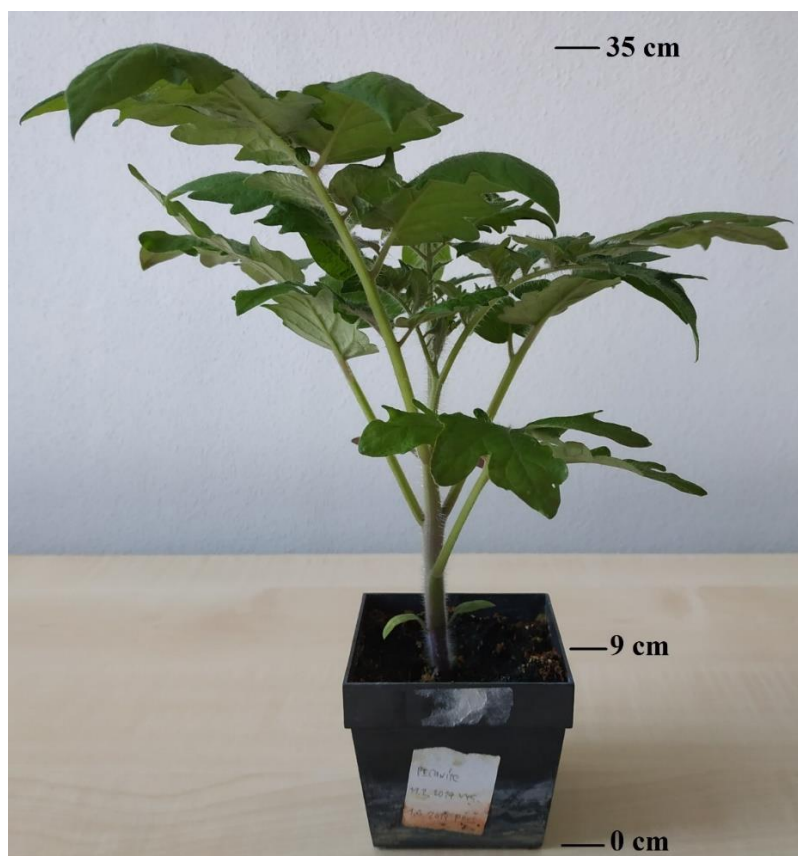
### 3. CÍL PRÁCE

1. Zpracování rešerše.
2. Zavedení metodiky pro měření časového vývoje strukturních změn v listu rajčete pomocí jevu koherenční zrnitosti vzniklého po průchodu světelného svazku tímto listem.
3. Pozorování biologické aktivity listu v průběhu 47 hodin po oddělení od mateřské rostliny.
4. Kvantitativní vyhodnocení strukturních změn ve dvou definovaných oblastech listu rajčete, uvnitř hlavní žilky a v mezofylu, pomocí statistického ukazatele stanoveného ze sérií záznamů struktur koherenční zrnitosti.
5. Zjistit reprodukovatelnost výsledků měření a možnost aplikace metody při studiu stresu rostlin.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Rostlinný materiál

Rostliny rajčete *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker jsme pěstovali ve fytokomoře typu SGC 170, Weiss Gallenkamp, Velká Británie. Fytokomora měla nastavený denní i noční režim, přičemž kvantová ozáření ve výšce rostlin při denním režimu činila  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , v nočním režimu byla ve fytokomoře tma. Denní režim probíhal vždy v časech 7:00 hod – 21:00 hod, noční režim v časech 22:00 hod – 6:00 hod. Mezi režimy probíhalo v intervalu jedné hodiny postupné rozsvěcování a zhasínání. Během denního režimu byla ve fytokomoře teplota 23 °C, zatímco v nočním režimu 20 °C. Relativní vlhkost vzduchu činila v denním režimu 35 % a v nočním 40 %. Protože měření byla časově náročná, bylo nutno provést 3 výsevy rostlin, přičemž první výsev proběhl 20. 9. 2018, druhý výsev 20. 12. 2018 a poslední



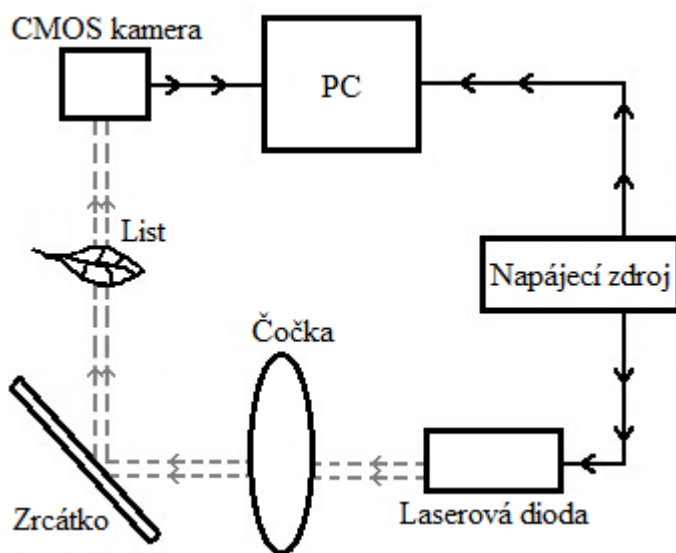
**Obr. 5** Fotografie vypěstované rostliny rajčete *Lycopersicon esculentum* připravené k následnému měření. Uvedeno měřítko.

výsev 11. 2. 2019. Substrát byl sterilizován při teplotě 70 °C po dobu 30 minut, poté zchlazen, zvlhčen a následně do něj byly vysety semena zkoumaných rostlin.

Při každém výsevu bylo do předem připraveného substrátu zasazeno 11 semen rajčete. V experimentu používáme nekvetoucí, zhruba měsíc staré rostliny rajčete. Hnojení rostlin probíhalo 1× týdně (hnojivo Kristalon Start) a zalévání 3× týdně. Použité rostliny byly zhruba 25 cm vysoké a měly 8 listů. Všechna měření jsme prováděli na plně vyvinutém zdravém postranním lístku zdravého listu.

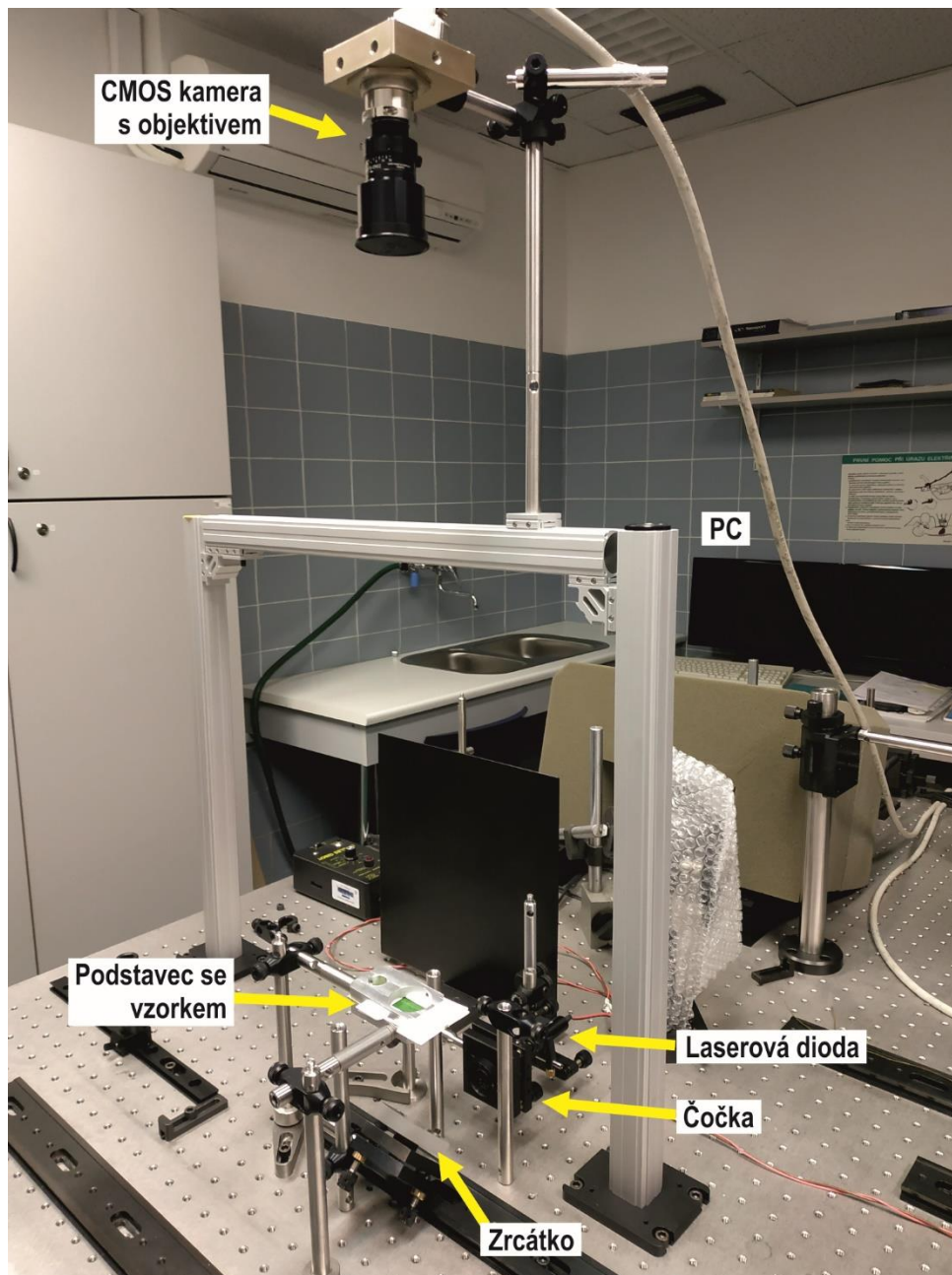
#### 4.2 Použitá aparatura

Pro realizaci měření jsme nejprve navrhli samotnou podobu experimentu s příslušnou měřicí sestavou. Sestrojená měřicí sestava se skládala ze základních komponent, kterými jsou laserová dioda, čočka, zrcátko, držák s otvorem pro umístění a uchycení listu, CMOS kamera s objektivem, počítač (PC) a napájecí zdroj. Konkrétně se jedná o laserový diodový modul ALA5–3–650 o vyzařované vlnové délce 650 nm a výstupním výkonu svazku 3 mW pro napájecí napětí 5 V, maticovou CMOS kameru s monochromatickým čipem ZORAN ZR 32112 MLC (detailnější informace o čipu kamery lze najít v Příloze 1), která má rozlišení  $1288 \times 1032$  pixelů<sup>1</sup>(px), s velikostí



**Obr. 6** Náčrt (schéma) experimentální sestavy.

<sup>1</sup> Pixel reprezentuje nejmenší světlocitlivý element CMOS kamery.



**Obr. 7** Fotografie experimentální sestavy.

každého pixelu  $7,5 \times 7,5 \mu\text{m}^2$  a volitelnou osmibitovou nebo desetibitovou barevnou hloubkou (256 nebo 1024 odstínů šedé), a konečně objektiv Schneider Kreuznach Tele – Xenar 2.2/70.

Prezentované výsledky experimentu odpovídají nastavení osmibitové barevné hloubky. Kamera byla řízena pomocí komerčního software EPIX XCAP v 2.2, ve kterém jsme na kameře nastavili oblast zájmu (area of interest) na hodnoty  $600 \times 584$  px, expozici (exposure) 35,152 ms a zisk (gain) 3,3 dB.



Z výše popsaných komponent jsme vytvořili měřicí aparaturu tak, aby struktura koherenční zrnitosti generovaná při průchodu světla z laserové diody skrz oddělený list, byla snímána CMOS kamerou a data následně uložena do PC (viz Obr. 6 a Obr. 7).

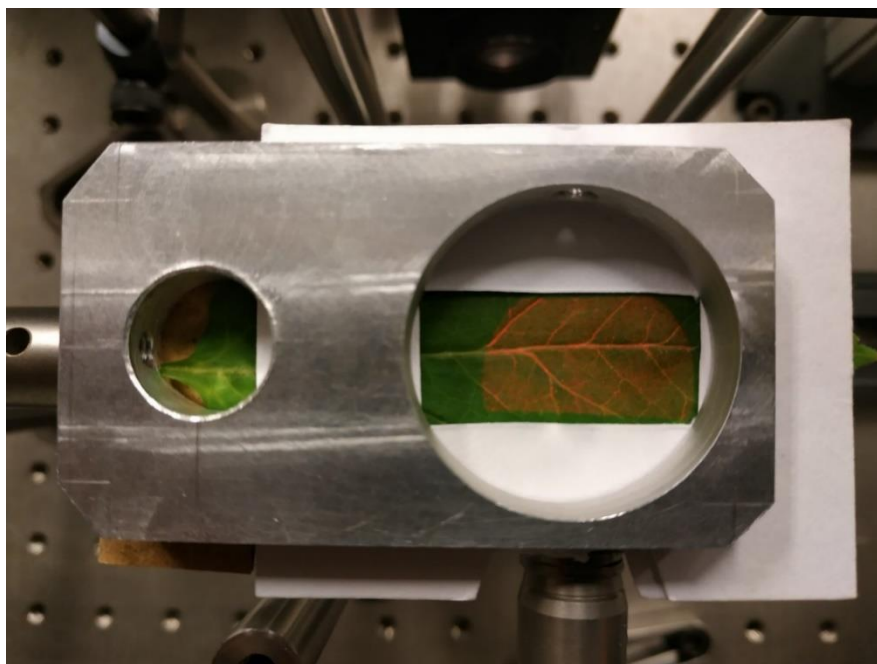
Díky propojení kamery a počítače jsme výsledky zaznamenané CMOS kamerou softwarově ukládali do příslušného adresáře v PC a následně vyhodnotili v software Mathematica, jehož zdrojový kód je uveden v Příloze 2.

Jak již bylo řečeno výše, vlnová délka použitého světla laserové diody byla 650 nm. Protože je v tomto případě červená barva světla z diody doplňková k zelené barvě listu, vylučujeme v souladu s Briers (1975) význačné fluktuace struktury koherenční zrnitosti v důsledku pohybu chloroplastů. Zurzycki (1980) a Galland a Senger (1988) přitom pro červené světlo (o vlnové délce  $\lambda = 650$  nm) vylučují pohyby chloroplastů úplně. Výkon svazku z laserového modulu byl změřen po jeho odrazu od zrcátka a dosahoval přibližně hodnoty 0,1 mW pro napájecí napětí laserového modulu 4,5 V. V průběhu měření byl tento výkon stabilizován. Průměr osvětlené kruhové oblasti na listu činil 2,2 cm.

#### 4.3 Postup měření a vyhodnocení dat

Metodika měření byla adaptována dle Zhong a kol. (2013). Mezi jednotlivými sériemi měření (celkem bylo provedeno 48 sérií měření) jsme ponechávali hodinový časový interval a každá série měření obsahovala 100 pořízených snímků struktur koherenční zrnitosti. Mezi snímky v rámci jedné série jsme zvolili časový interval 100 ms. Tento interval nebyl volen na základě poznatků z rešerše, nýbrž byl stanoven dle technických možností použitého počítače a kamery s ohledem na pozorovatelnost struktury koherenční zrnitosti. Měření bylo prováděno za naprosté tmy, neboť jakékoli parazitní světlo mimo světlo z laserové diody by mělo za následek zkreslení naměřených dat užití CMOS kamery. Při měření je dále nežádoucí také jakýkoli pohyb měřeného vzorku, v jehož důsledku by docházelo k znehodnocení výsledků, a proto jsme využili speciální uchycení zkoumaného listu mezi dvě hliníkové podložky (Obr. 8).

Na jednotlivých snímcích zaznamenaných CMOS kamerou lze pozorovat strukturu koherenční zrnitosti v okamžiku pořízení snímku. Tyto snímky, jak si popíšeme později, byly dále zpracovány v software Mathematica (Příloha 2).



**Obr. 8** Detailní pohled na studovanou oblast listu. List byl upevněn (zafixován) pomocí hliníkové podložky a papírového rámečku, který zabraňuje průchodu světla v důsledku ohybu na okraji listu, jehož struktura se v důsledku vadnutí narušuje.

Provedli jsme celkem čtyři plnohodnotná měření v délce 47 hodin, ve kterých jsme, v souladu s metodikou popsanou výše, pořizovali jednotlivé série snímků koherenční zrnitosti pozorovaného vzorku listu rostliny. První série byla pořízena vždy bezprostředně (do 1 minuty) po oddělení listu od mateřské rostliny. Každá následující série byla zaznamenána 60 minut po sérii předchozí, přičemž poslední 48. série byla pořízena 47 hodin od oddělení listu. List byl při měření zatížen hliníkovou podložkou. Hmotnost podložky byla zvážena na laboratorních vahách a činila 38,7 g. V důsledku poklesu turgoru docházelo ke změně tvaru listu (vadnutí), pohybu listu a ke zvyšování propustnosti světla v některých jeho částech. Pokud by se do kamery dostalo světlo přímo ze světelného zdroje, způsobilo by znehodnocení naměřených dat. Z tohoto důvodu jsme omezili plochu listu v držáku pomocí papírového rámečku, který v místech vadnutí listu zajišťuje dodatečné clonění.

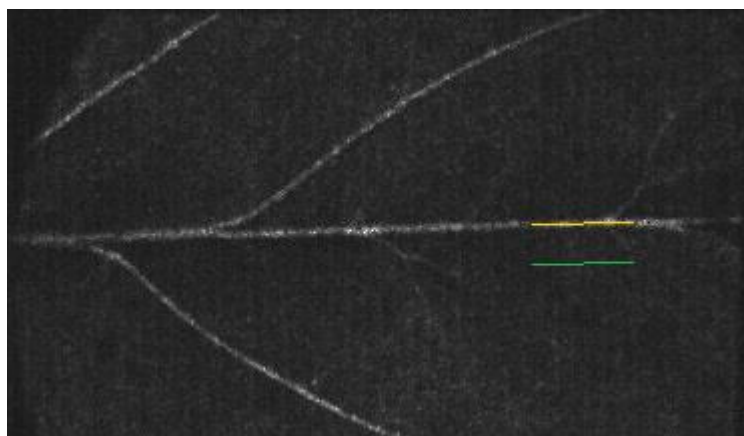
Pro každé ze čtyř měření jsme v rámci všech sérií snímků struktur koherenční zrnitosti provedli pomocí skriptu vytvořeného v software Mathematica nejprve operaci odečtení mezi všemi sousedními snímky v sérii. Výstupem pro každé měření, po aplikování této operace na pořízenou sérii snímků, je nová série 99 rozdílových snímků. Tuto sérii rozdílových snímků jsme dále charakterizovali pomocí směrodatné

odchylky, která je kvantitativním ukazatelem fluktuací v naměřeném souboru dat. Pro vysokou míru biologické aktivity ve struktuře listu plyne vysoká hodnota směrodatné odchylky, a naopak při nízké biologické aktivitě ve struktuře listu fluktuace téměř nepozorujeme a směrodatná odchylka je nižší. Směrodatná odchylka je tedy kvantitativním ukazatelem vystihujícím míru biologické aktivity. Obecný vztah pro výpočet směrodatné odchylky  $std$  je

$$std(s_p) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}, \quad (8)$$

kde sekvence  $s_p = [x_1, x_2, \dots, x_N]$  odráží aktivitu v pixelu  $p$ ,  $N$  je celkový počet rozdílových snímků (v našem případě 99),  $x_i$  udává digitální hodnotu odpovídající barvě v daném pixelu  $p$  v  $i$ -tém rozdílovém snímku a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr v daném pixelu  $p$  v sekvenci rozdílových snímků. Výsledkem výpočtu  $std$  je tedy vždy jediná matice hodnot (snímek směrodatné odchylky), jejíž každý prvek kvantifikuje v příslušném pixelu  $p$  míru strukturních změn, které ve vzorku probíhají během časového intervalu (10 s) pořizování dané série snímků struktury koherenční zrnitosti.

Abychom mohli charakterizovat biologickou aktivitu zkoumaného listu v čase po oddělení listu od mateřské rostliny, porovnáváme parametr  $std$  v každé ze 48 pořizovaných sérií struktur koherenční zrnitosti. Zaměřili jsme se především na definované lokální oblasti listu, přičemž první oblast byla zvolena uvnitř hlavní žilky listu a druhá oblast byla zvolena v mezofylu (Obr. 9). Vzdálenost mezi oběma zvolenými oblastmi našeho zájmu činila ve snímku 20 pixelů (což odpovídalo reálné vzdálenosti na listu přibližně



**Obr. 9** Ilustrace zvolených oblastí zájmu ve snímku směrodatné odchylky pro sledování vývoje biologické aktivity během uvádání odděleného listu. **Žlutě** je vyznačena oblast uvnitř hlavní žilky listu. **Zeleně** je vyznačena oblast v mezofylu. Vzdálenost obou oblastí ve snímku je 20 pixelů.

1,2 mm). Oblasti zájmu byly ve snímku zvoleny ve tvaru úsečky o velikosti 50 pixelů (tomu odpovídá reálná vzdálenost na listu 3 mm). Z hodnot směrodatných odchylek pro každý pixel ve zvolené oblasti jsme vypočítali průměrnou hodnotu, tzv. průměrnou směrodatnou odchylku, která pro náš účel charakterizuje aktivitu v dané oblasti listu v každé ze 48 pořízených sérií.

Průměrné hodnoty směrodatné odchylky v oblastech zájmu studovaného listu jsme uvedli do tabulky (Tab. 1, kapitola 5). Dále jsme vykreslili příslušné grafy (Obr. 10, kapitola 5), které udávají závislost těchto hodnot průměrné směrodatné odchylky na čase od oddělení listu. Trendy dat uvedené v grafech tedy zobrazují vývoj biologické aktivity ve zvolených oblastech zájmu studovaného listu v průběhu 47 hodin po oddělení tohoto listu od mateřské rostliny. Pro vykreslení těchto trendů jsme zvolili aproximaci Bézierovými křivkami (Wolfram 2019). Bézierova křivka je jednou z mnoha parametrických křivek určených řídicím polygonem – lomenou čarou určenou polohovými vektory bodů  $\mathbf{P}_0, \mathbf{P}_1, \dots, \mathbf{P}_n$ . Pro výpočet Bézierovy křivky  $\mathbf{C}(t)$   $n$ -tého stupně pro  $n + 1$  zadaných kontrolních bodů platí

$$\mathbf{C}(t) = \sum_{i=0}^n B_{i,n}(t) \mathbf{P}_i, \quad (9)$$

$$B_{i,n}(t) = \binom{n}{i} t^i (1-t)^{n-i}, \quad (10)$$

kde  $t \in \langle 0,1 \rangle$ ,  $B_{i,n}$  značí  $i$ -tý Bernsteinův polynom  $n$ -tého stupně. Křivka prochází přesně koncovými body  $\mathbf{P}_0$  a  $\mathbf{P}_n$ , přičemž její tečna v počátečním bodě  $\mathbf{P}_0$  je rovnoběžná s vektorem  $\mathbf{P}_1 - \mathbf{P}_0$  a tečna v koncovém bodě  $\mathbf{P}_n$  je rovnoběžná s vektorem  $\mathbf{P}_n - \mathbf{P}_{n-1}$ .

## 5. VÝSLEDKY

V této kapitole si shrneme dosažené výsledky měření. Provedli jsme celkem čtyři měření vývoje biologické aktivity listu po odejmutí od mateřské rostliny, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1). V každém měření bylo provedeno 48 sérií záznamů struktur koherenční zrnitosti a na každou sérii tak připadá jeden snímek výsledné směrodatné odchylky. V této tabulce uvádíme hodnoty průměrné směrodatné odchylky ve zvolených oblastech zájmu (uvnitř hlavní žilky listu a v mezofylu ve vzdálenosti 20 pixelů od hlavní žilky).

Hodnoty průměrných směrodatných odchylek uvedeny v tabulce (Tab. 1) jsou vykresleny také graficky (Obr. 10). Grafy A až D reprezentují časovou závislost biologické aktivity uvnitř hlavní žilky listu, postupně pro první až čtvrté měření a analogicky grafy F až I reprezentují tuto závislost pro oblast mezofylu. Dále grafy E a J představují shrnutí všech naměřených dat v hlavní žilce listu a v mezofylu.

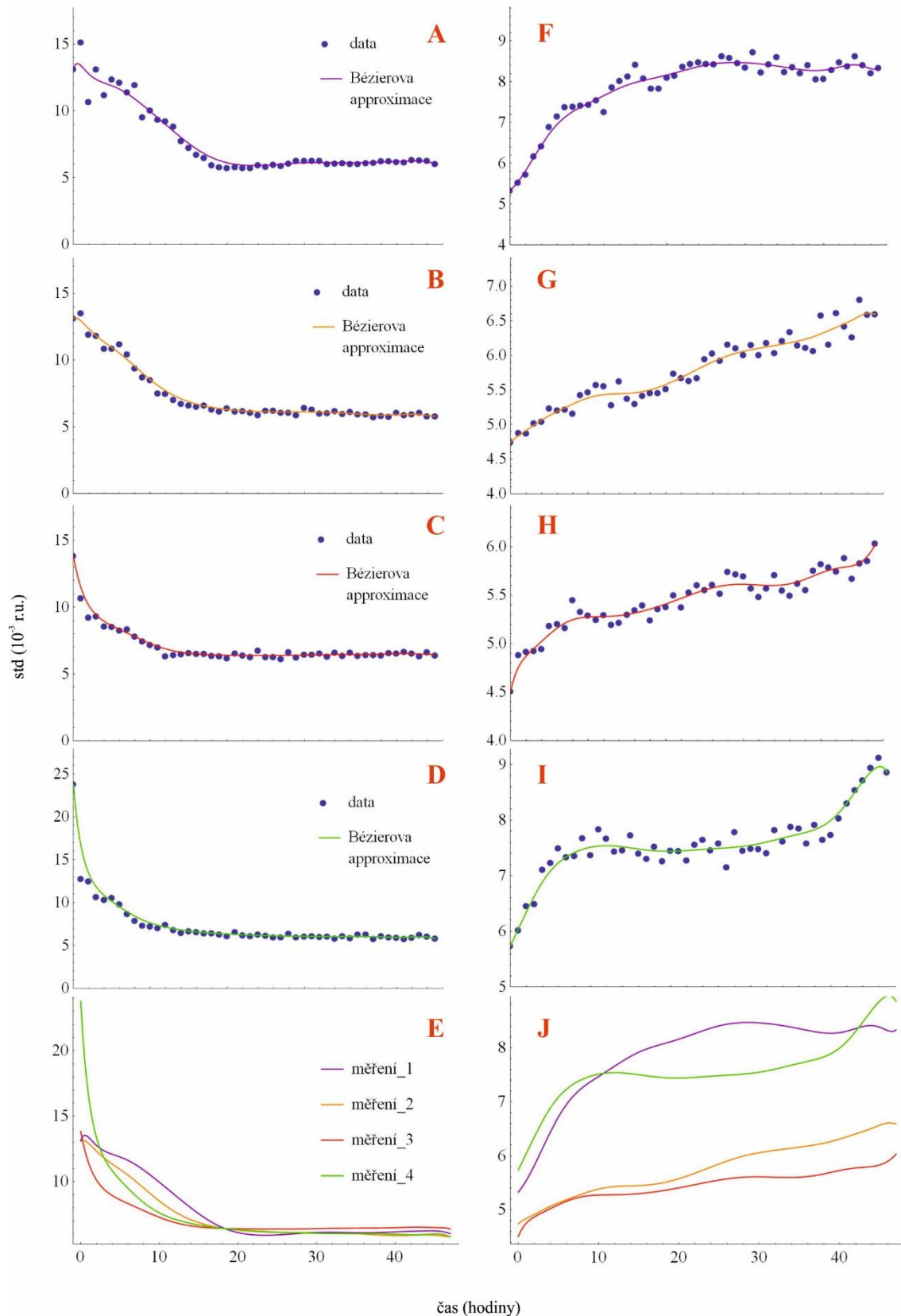
Rovněž poskytujeme čtenáři snímky směrodatných odchylek z celého průběhu měření, ve kterých lze pro názornost sledovat časový vývoj biologické aktivity v celé sledované ploše listu (Obr. 11 a Obr. 12).

**Tabulka 1**

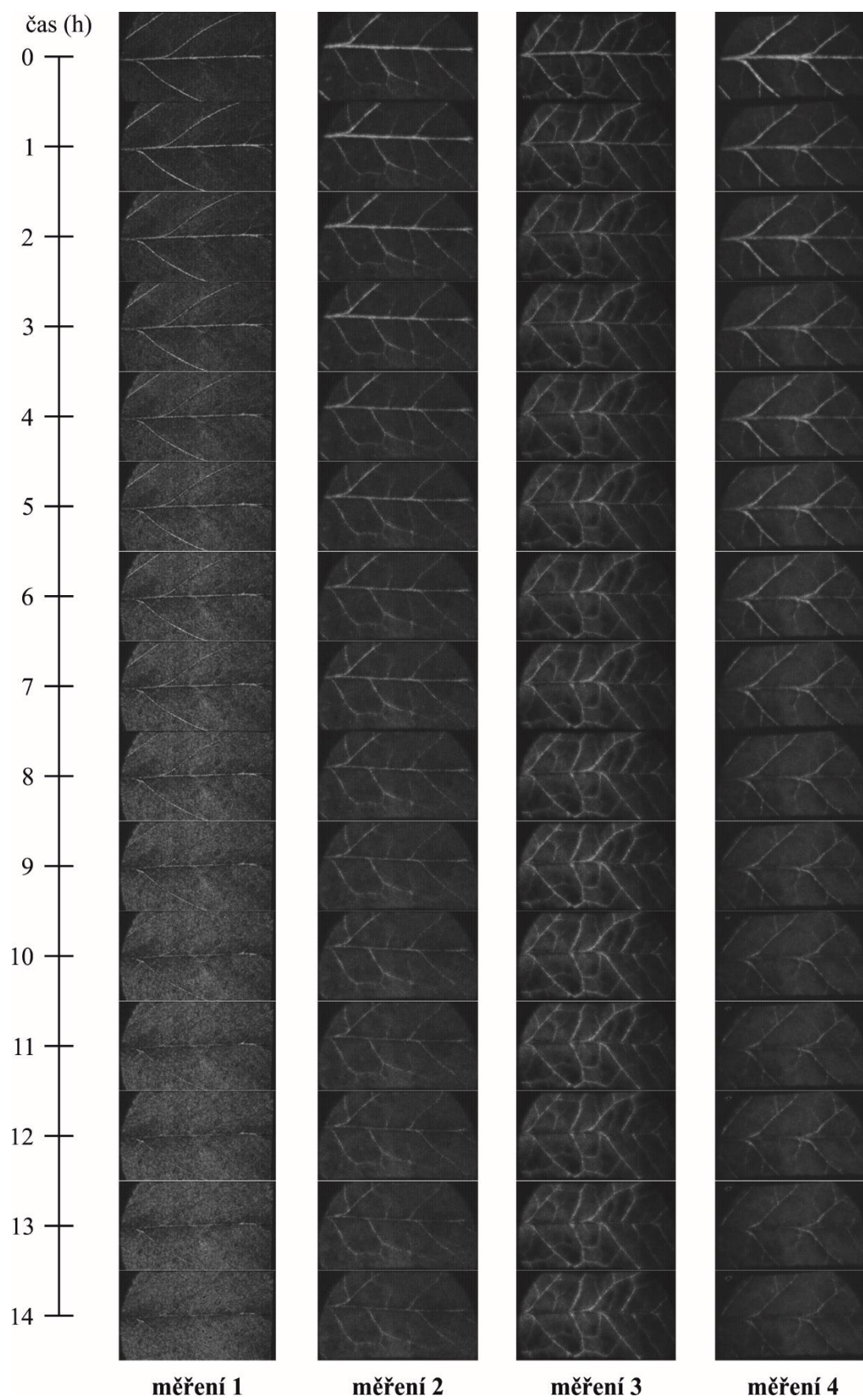
Průměrné směrodatné odchylky pro první, druhé, třetí a čtvrté měření. První sloupec tabulky udává čas po oddělení listu od mateřské rostliny mezi 0. a 47. hodinou po oddělení listu.

V dalších sloupcích tabulky jsou uvedeny příslušné hodnoty průměrných směrodatných odchylek uvnitř zvolených oblastí zájmu v hlavní žilce listu a v mezofylu.

Čas [h]	Směrodatná odchylka [ $10^{-3}$ r.u.]							
	Měření 1		Měření 2		Měření 3		Měření 4	
	Žilka	Mezofyl	Žilka	Mezofyl	Žilka	Mezofyl	Žilka	Mezofyl
0	13,11	5,33	13,12	4,74	13,83	4,51	23,79	5,74
1	15,13	5,52	13,52	4,88	10,66	4,88	12,76	6,02
2	10,68	5,72	11,91	4,88	9,22	4,91	12,50	6,46
3	13,13	6,17	11,81	5,02	9,32	4,93	10,63	6,49
4	11,18	6,42	10,86	5,04	8,57	4,95	10,31	7,11
5	12,36	6,89	10,86	5,24	8,53	5,18	10,55	7,24
6	12,12	7,15	11,20	5,21	8,25	5,20	9,81	7,49
7	11,39	7,38	10,43	5,22	8,37	5,16	8,68	7,33
8	11,96	7,39	9,39	5,16	7,81	5,45	7,87	7,36
9	9,52	7,41	8,71	5,43	7,45	5,33	7,31	7,68
10	10,05	7,44	8,51	5,47	7,18	5,29	7,21	7,37
11	9,35	7,54	7,51	5,57	7,00	5,24	7,04	7,84
12	9,23	7,26	7,48	5,56	6,33	5,29	7,40	7,67
13	8,83	7,86	7,04	5,28	6,41	5,20	6,81	7,44
14	7,74	8,02	6,72	5,63	6,47	5,22	6,46	7,46
15	7,24	8,13	6,61	5,37	6,58	5,30	6,67	7,73
16	6,71	8,42	6,52	5,30	6,50	5,35	6,55	7,40
17	6,47	8,08	6,59	5,42	6,50	5,39	6,43	7,31
18	5,95	7,83	6,31	5,46	6,35	5,24	6,42	7,52
19	5,78	7,83	6,15	5,46	6,34	5,36	6,27	7,27
20	5,73	8,10	6,40	5,52	6,18	5,38	6,11	7,45
21	5,80	8,14	6,14	5,74	6,53	5,50	6,54	7,44
22	5,73	8,37	6,19	5,67	6,39	5,38	6,19	7,28
23	5,73	8,44	6,06	5,63	6,27	5,53	6,10	7,56
24	5,94	8,48	5,87	5,67	6,75	5,60	6,28	7,65
25	5,83	8,44	6,21	5,95	6,28	5,55	6,12	7,46
26	5,98	8,42	6,20	6,03	6,28	5,61	5,93	7,58
27	5,88	8,62	6,05	5,92	6,13	5,51	5,94	7,15
28	6,06	8,58	6,07	6,16	6,64	5,74	6,39	7,78
29	6,26	8,45	5,87	6,10	6,24	5,72	5,97	7,46
30	6,26	8,34	6,42	6,01	6,45	5,70	6,05	7,49
31	6,26	8,73	6,30	6,15	6,45	5,57	6,08	7,48
32	6,27	8,23	5,99	6,01	6,55	5,48	5,99	7,41
33	6,02	8,43	6,01	6,18	6,29	5,57	6,04	7,82
34	6,07	8,60	6,18	6,04	6,61	5,71	5,83	7,62
35	6,08	8,23	5,97	6,21	6,35	5,55	6,08	7,88
36	6,03	8,35	6,13	6,34	6,59	5,50	5,85	7,85
37	6,03	8,20	5,94	6,14	6,37	5,62	6,28	7,58
38	6,07	8,40	5,95	6,11	6,43	5,55	6,28	7,92
39	6,13	8,06	5,73	6,06	6,42	5,75	5,78	7,65
40	6,25	8,07	5,81	6,58	6,39	5,82	6,08	7,74
41	6,24	8,28	5,77	6,16	6,56	5,79	5,96	8,03
42	6,18	8,48	6,05	6,61	6,54	5,75	5,90	8,30
43	6,15	8,38	5,88	6,42	6,66	5,88	5,78	8,55
44	6,32	8,62	5,93	6,26	6,54	5,67	5,90	8,72
45	6,29	8,41	6,06	6,80	6,32	5,83	6,24	8,94
46	6,27	8,20	5,79	6,59	6,64	5,85	6,03	9,13
47	6,02	8,33	5,80	6,60	6,38	6,03	5,79	8,86

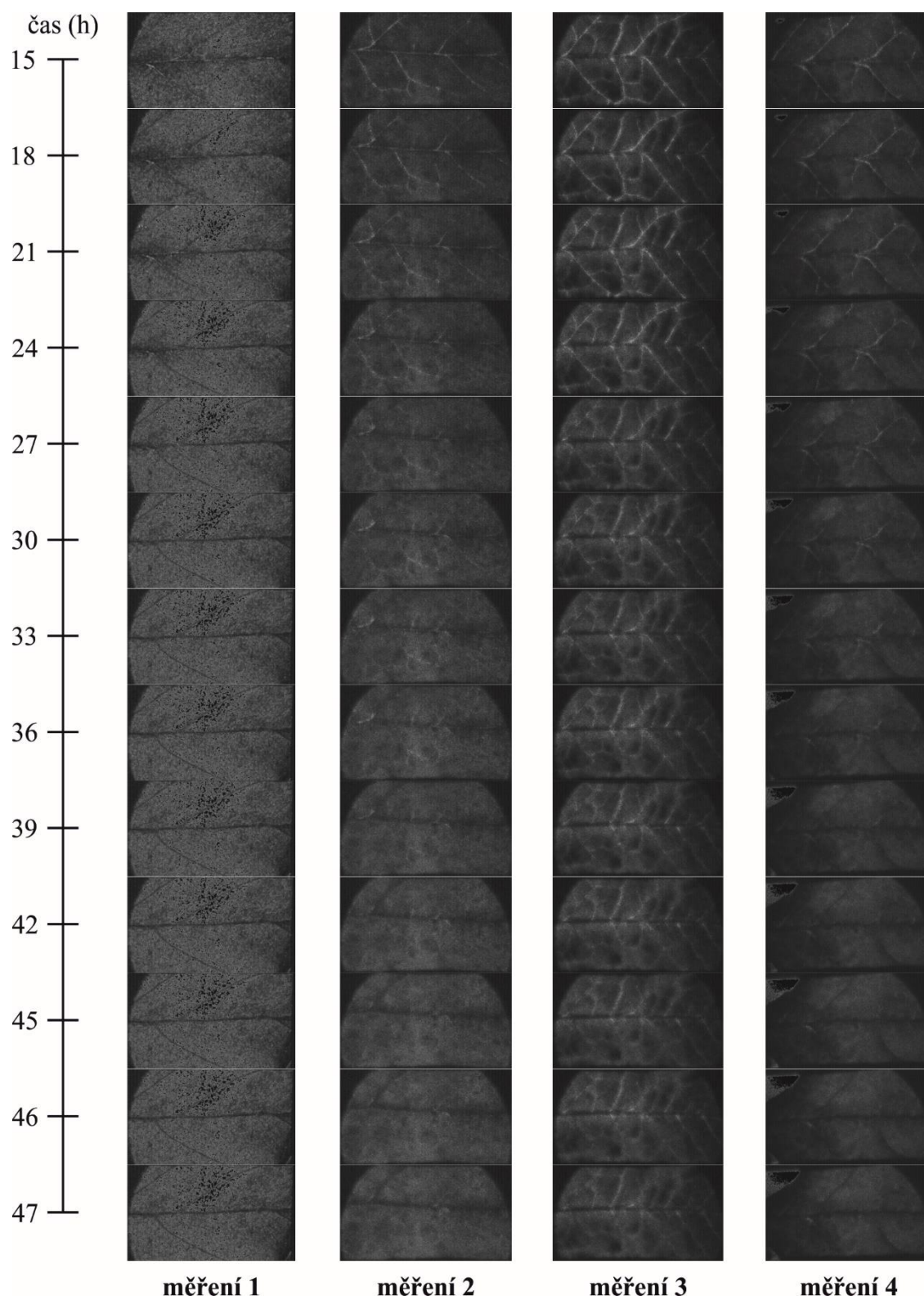


**Obr. 10** Časová závislost průměrné směrodatné odchylky uvnitř hlavní žilky listu z prvního (A), druhého (B), třetího (C), čtvrtého (D) měření, aproximační křivky ze všech naměřených dat uvnitř hlavní žilky (E), časová závislost směrodatné odchylky v mezofylu z prvního (F), druhého (G), třetího (H), čtvrtého (I) měření, aproximační křivky ze všech naměřených dat v mezofylu (J).



**Obr. 11** Časové řady snímků směřodatných odchylek mezi 0. a 14. hodinou po oddělení listu ze všech provedených měření. Vertikální osa udává čas po oddělení listu.





**Obr. 12** Časové řady snímků směrodatných odchylek mezi 15. a 47. hodinou po oddělení listu ze všech provedených měření. Vertikální osa udává čas po oddělení listu.

Shrneme-li dosažené výsledky našich měření, můžeme konstatovat, že společnou vlastností všech měření uvnitř hlavní žilky listu je prudký pokles biologické aktivity během několika hodin po oddělení listu. Míra poklesu aktivity zpravidla s rostoucím časem po oddělení listu klesá a zhruba 19 hodin po oddělení listu se míra biologické aktivity uvnitř hlavní žilky listu prakticky ustaluje (Obr. 10). Čas ustálení biologické aktivity v oblasti uvnitř hlavní žilky listu je podobný pro všechna čtyři měření. Pro různé testované listy se lišily pouze číselné hodnoty průměrných směrodatných odchylek, se kterými pracujeme během celého měření, nicméně trend změn zůstává stejný (Tab. 1). V oblasti mezofylu pozorujeme zpravidla trend nárůstu číselných hodnot průměrné směrodatné odchylky odrážející zvýšení biologické aktivity v této části listu. Ačkoli kinetika nárůstu je obdobná pro všechna čtyři měření, číselné hodnoty průměrné směrodatné odchylky se mezi některými měřenými listy zřetelně liší (Obr. 10).

## 6. DISKUSE

Předkládaná práce je jedinečná v interdisciplinárním a nekontaktním přístupu k monitorování stresu rostlin. Protože použití uvedeného optického jevu vyžaduje rozsáhlé teoretické „know-how“, na dané téma je pouze několik pilotních studií s nedostatečným popisem metodik a výpočtů, proto uvedená práce vyžadovala rozsáhlé vlastní modifikace. K vyhodnocení experimentu, který je součástí praktické části této práce, jsme se rozhodli inspirovat metodikou publikovanou autory Kadono a kol. (2003), Zhong a kol. (2013). Autoři odečítají každé dva po sobě následující snímky struktury koherenční zrnitosti, čímž získávají informaci o strukturních změnách ve vzorku během měření. Nově vzniklou sérii rozdílových snímků nakonec popisují prostřednictvím zvoleného kvantitativního ukazatele (v případě Kadono a kol. je tímto ukazatelem průměr, Zhong a kol. demonstrují výsledky s užitím hned celé řady nedostatečně popsaných kvantitativních ukazatelů, viz Obr. 4, kapitola 2.3). Narozdíl od výše zmíněných publikací jsme v naší práci zvolili kvantitativním ukazatelem tzv. směrodatnou odchylku, která se ukázala být vhodnou k charakterizaci míry fluktuace dat. Navíc využití jevu koherenční zrnitosti při průchodu (nikoli odrazu) koherentního světla zkoumaným listem rajčete nám umožnilo zachytit změny nejen na povrchu listu ale i uvnitř. Závislost struktury koherenční zrnitosti na prostorovém uspořádání experimentálních komponent měřicí aparatury nám zároveň zajistila značnou flexibilitu pro konkrétní cíle měření. Provedli jsme čtyři měření na průchod světelného svazku laserové diody skrze oddělený list rostliny, při kterých jsme generovanou strukturu koherenční zrnitosti snímali CMOS kamerou. Měření jsme prováděli bezprostředně po oddělení listu (do 1 minuty) a poté každou následující hodinu po dobu 47 hodin.

Zatímco výše zmínění autoři vizualizují biologickou aktivitu v celém listu sestavením časové řady snímků kvantitativního ukazatele biologické aktivity, my jsme se v této práci zaměřili na konkrétní oblasti uvnitř hlavní žilky a v mezofylu, kde lze předpokládat velmi odlišnou biologickou aktivitu. Tato hypotéza byla podložena našimi výsledky, kde byly naměřeny dokonce opačné trendy biologické aktivity v žilce (pokles) a v mezofylu (nárůst) během několika hodin po oddělení listu od mateřské rostliny. Výsledky měření v oblasti uvnitř hlavní žilky listu odpovídají výsledkům experimentů monitorujících biologickou aktivitu v celých listech *Syngonium* (Kadono a kol. 2003) a fazole (Zhong a kol. 2013), kde autoři podobně jako my pozorovali ztmavnutí dané

oblasti. V oblasti mezofylu se námi naměřený trend od zmíněných publikací naopak různí. Zatímco Kadono a kol. (2003) a Zhong a kol. (2013) zaznamenávají v důsledku stresování rostliny pokles biologické aktivity v mezofylu v čase (ztmavnutí), všechna naše měření poukazují na postupné rozsáhlejší strukturní změny v této oblasti listu (zesvětlení mezofylu). Tyto rozsáhlé změny jsou ještě podtrženy grafy závislosti průměrné směrodatné odchylky na čase. Námi zvolený kvantitativní ukazatel se tedy prokázal být dostatečně citlivý. Zjištěná heterogenita v rámci jednoho listu může být způsobena odlišnými anatomickými i optickými vlastnostmi těchto částí listu a také jejich rozdílnou fyziologickou reakcí na vystavený stres.

Byť naše práce nepřímo vycházela z uvedených pilotních studií, v těchto studiích používali autoři jiný rostlinný druh nebo stres a také odlišné výpočty pro vyhodnocení výsledků. Odlišné rostlinné druhy se liší počtem trichomů na listech, odrazivostí, strukturou povrchu a propustností listů. Dalšími významnými faktory vyvolávajícími změřené strukturní změny mohou být ztráta turgoru (a následné uzavírání průduchů, pokles vodního potenciálu či nárůst propustnosti listu) a poškození pletiv vlivem utržení listu.

Reprodukovatelnost výsledků experimentu nasvědčuje tomu, že je možné naši metodiku měření strukturních změn v listech rostlin po vystavení stresu uplatnit i v dalších experimentech. Jak poukázali Kadono a kol. (2003) a Costa a kol. (2018), optickými metodami lze neinvazivně odhalit včasný stres rostlin ještě před tím, než je stres prokazatelný pouhým okem. Na základě literatury a našich získaných dat mají optické metody velký aplikační potenciál v stresové biologii rostlin. Nicméně prezentovaná optická metodika nám nedokáže odhalit konkrétní fyziologické příčiny pozorovaných strukturních změn v listu. Těmito příčinami bychom se chtěli zabývat v naší další práci na neoddělených (intaktních) listech rostliny po aplikaci stresu.

## 7. ZÁVĚR

1. Byla vypracována rešerše na dané téma, na jejímž základě jsme se nepřímo inspirovali při vlastním měření a výpočtech při vyhodnocování výsledků.
2. Podařilo se nám vyvinout metodiku pro měření časového vývoje strukturních změn v listu rajčete po oddělení z rostliny pomocí jevu koherenční zrnitosti po průchodu koherentního světelného svazku tímto listem. Metodika měření využívá záznamu časové řady snímků struktury koherenční zrnitosti. Změny v listu se vyhodnocují na základě odečtu každých dvou po sobě následujících snímků struktur koherenční zrnitosti.
3. Biologickou aktivitu v listu rajčete jsme pozorovali pořizováním snímků struktur koherenční zrnitosti během 47 hodin po oddělení listu od mateřské rostliny. První série snímků byla v rámci každého měření pořízena bezprostředně (do 1 minuty) po oddělení listu od mateřské rostliny. Biologická aktivita byla vyhodnocována jak v celém listu, tak ve dvou definovaných oblastech zájmu – v hlavní žilce a v mezofylu listu.
4. Pro kvantitativní analýzu strukturních změn listu rajčete jsme zvolili statistický ukazatel, kterým je směrodatná odchylka. K jeho výpočtu byl použit software Mathematica, ve kterém jsme pomocí skriptu vzniklého ve Společné laboratoři optiky zpracovali pořízené série snímků struktur koherenční zrnitosti. Ve snímcích směrodatných odchylek jsme v definovaných oblastech zájmu, uvnitř hlavní žilky listu a v mezofylu, stanovili průměrné směrodatné odchylky, které charakterizují strukturní změny v dané oblasti listu v každé ze 48 pořízených sérií.
5. Výsledky ze všech čtyř měření vykazují velmi dobrou reprodukovatelnost a domníváme se tedy, že je možné navrženou metodiku měření časového vývoje strukturních změn v listu rajčete pomocí jevu koherenční zrnitosti uplatnit i při dalším studiu stresu rostlin.

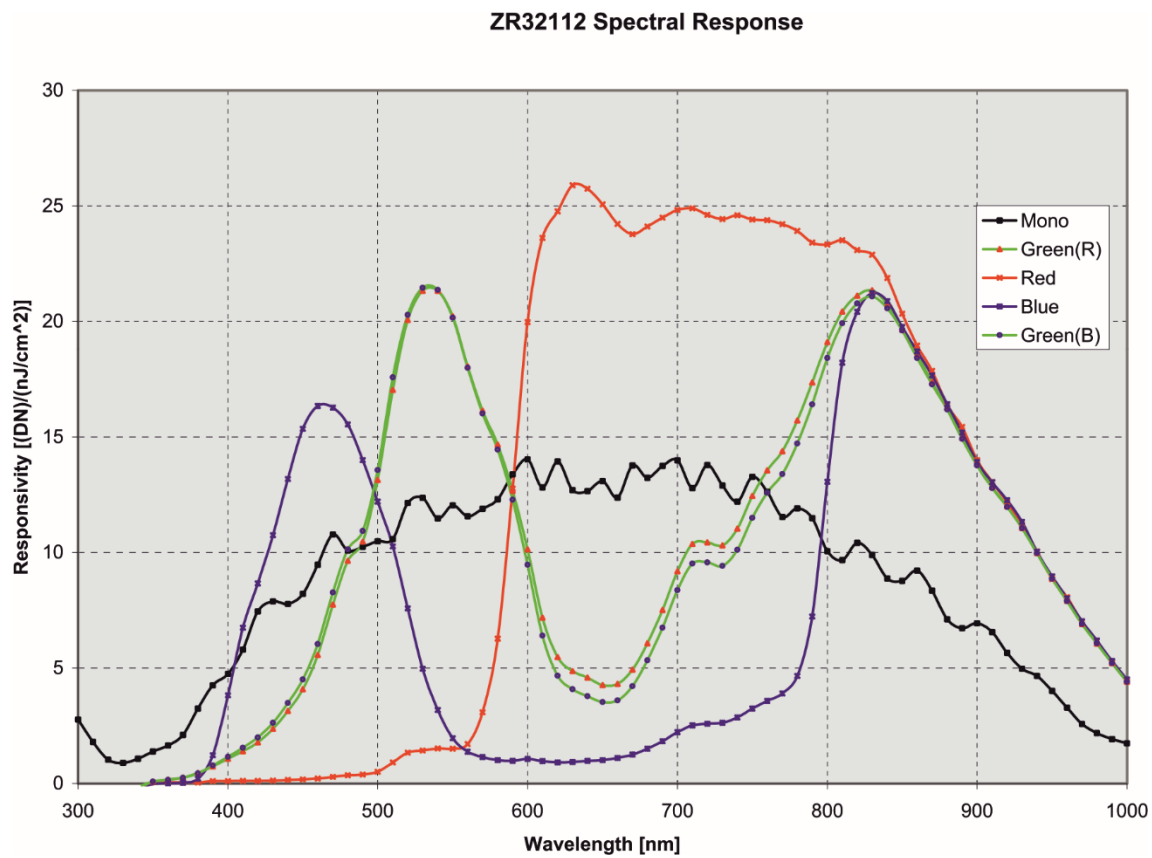
## 8. SEZNAM LITERATURY

- Amaral I., Braga R., Ramos E., Ramos A., Abreu R., Roxael E. (2013) Application of biospeckle laser technique for determining biological phenomena related to beef aging. *Journal of Food Engineering* **119**, 135–139.
- Braga R.A., Nobre C.M.B., Costa A.G., Sáfaci T., da Costa F.M. (2011) Evaluation of activity through dynamic laser speckle using the absolute value of the differences. *Optics Communications* **284**, 646–650.
- Briers D. (2001) Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological Measurement* **22**, 35–66.
- Briers D. (1975) Wavelength dependence of intensity fluctuations in laser speckle patterns from biological specimens. *Optics Communications* **13**, 324–326.
- Costa A.G., Braga R.A., Boas V., Eduardo V.B., Risso M. (2018) Early prediction of internal bruising in potatoes by biospeckle laser technique. *African Journal of Agricultural Research* **13**, 691–697.
- Dainty J.C. (1984) Laser speckle and related phenomena, Springer, Berlin, Germany, 287 stran.
- Ennos A.E. (1984) Speckle interferometry. In: *Laser Speckle and Related Phenomena*. (Dainty J. C.), Springer, Berlin, Germany, 203–253.
- Fujii H., Asakura T., Nohira K., Shintomi Y., Ohura T. (1985) Blood flow observed by time-varying speckle. *Optical Society of America* **10**: 3.
- Fujii H., Nohira K., Yamamoto Y., Ikawa H., Ohura T. (1987) Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing part 1. *Applied Optics* **26**: 24.
- Galland P., Senger H. (1988) The role of flavins as photoreceptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **1**, 277–294.
- Goodman J.W. (1985) Statistical optics, John Wiley & Sons, New York, USA. 550 stran.
- Goodman J.W. (1984) Statistical properties of laser speckle patterns. In: *Laser Speckle and Related Phenomena*. (Dainty J. C.), Springer, Berlin, Germany, 9–75.
- Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J., Novák O., Špundová M., Strnad M. (2006) Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* **225**: 235–244.
- Horváth P., Šmíd P. (2012) Koherenční zrnitost a její vybrané aplikace, Univerzita Palackého, Olomouc, Czech Republic. 57 stran.
- Hrabovský M., Bača Z., Horváth P. (2001) Koherenční zrnitost v optice, Univerzita Palackého, Olomouc, Czech Republic. 300 stran.
- Kadono H., Takahashi G., Toyooka S. (2003) Monitoring of biological activity of plant using difference-image of biospeckle. *19th Congress of the International Commission for Optics: Optics for the Quality of Life* **4829**, 955–956.
- Leger D., Mathieu E., Perrin J.C. (1975) Optical surface roughness determination using speckle correlation technique. *Applied Optics* **14**, 872–877.
- Malone M. (1992) Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings. *Planta*. **187**, 505–510.
- Mancuso S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 55–61.
- McKechnie T.S. (1974) Measurement of some second order statistical properties of speckle. *Optik* **39**, 258–267.
- Mehrotra S. (2015) Allen Test: An accurate and objective modification. *Scalpel* **10**: 4.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998) Fyziologie rostlin. Academia, Praha, Czech Republic. 484 stran.
- Salazar F., Barrientos A. (2013) Surface roughness measurement on a wing aircraft by speckle correlation. *Sensors* **13**, 11772–11781.

- Sandker S.C., Hondebrink E., Grandjean J.G., Steenbergen W. (2014) Laser speckle contrast analysis for quantifying the Allen test: a feasibility study. *Lasers in Surgery and Medicine* **46**, 186–192.
- Saúde A.V., de Menezes F.S., Freitas P.L.S., Rabelo G.F., Braga R.A. (2012) Alternative measures for biospeckle image analysis. *Journal of the Optical Society of America A* **29**, 1648–1658.
- Stanković B, Zawadzki T, Davies E. (1997) Characterization of the variation potential in sunflower. *Australian Journal of Plant Physiology* **115**, 1083–1088.
- Vojta P., Kokáš F., Husičková A., Grúz J., Bergougnoux V., Cintia F., Jiskrová E., Ježilová E., Mik V., Yoshihisa I., Galuszka P. (2016) Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress. *New Biotechnology* **33**: 5.
- Wolfram Mathworld: <http://mathworld.wolfram.com/BezierCurve.html> (13.5.2019).
- Zhong X., Wang X., Cooley N., Farrell P., Moran B. (2013) Application of laser speckle pattern analysis for plant sensing. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering* **8761**: 6
- Zurzycki J. (1980) Blue–light–induced intercellular movements. In: *The Blue Light Syndrome*. (Senger H.), Springer, Berlin, Germany, 50–68.

# PŘÍLOHY

## Příloha 1 Spektrální odezva a datový list čipu ZORAN použité CMOS kamery







# 1288x1032 Digital Image Sensor

## Description

The PixelCam™ ZR32112 is a high-performance CMOS image sensor for digital still and video camera products.

With its *Distributed-Pixel Amplifier™* design the pixel response is independent of its distance from the CDS circuitry. This unique architecture results in an extremely uniform pixel array. The result is a sensor with extremely low "fixed-pattern noise" without the need for off-chip "background frame subtraction" circuitry.

The bank of analog front-end circuits quantize each pixel to 10 bit resolution. This highly parallel approach eases speed requirements on individual analog circuits and reduces overall power consumption. Separate programmable Red, Green and Blue PGA circuitry enables analog-domain color balance.

The flexibility of the ZR32112 output image format permits the trade-off between resolution and frame rate. The output window size may be reduced to increase the frame rate. The output may also be sub-sampled to scan the entire array at reduced resolution and high frame rate. The image output may also be horizontally "mirrored" and vertically "flipped".

## Features

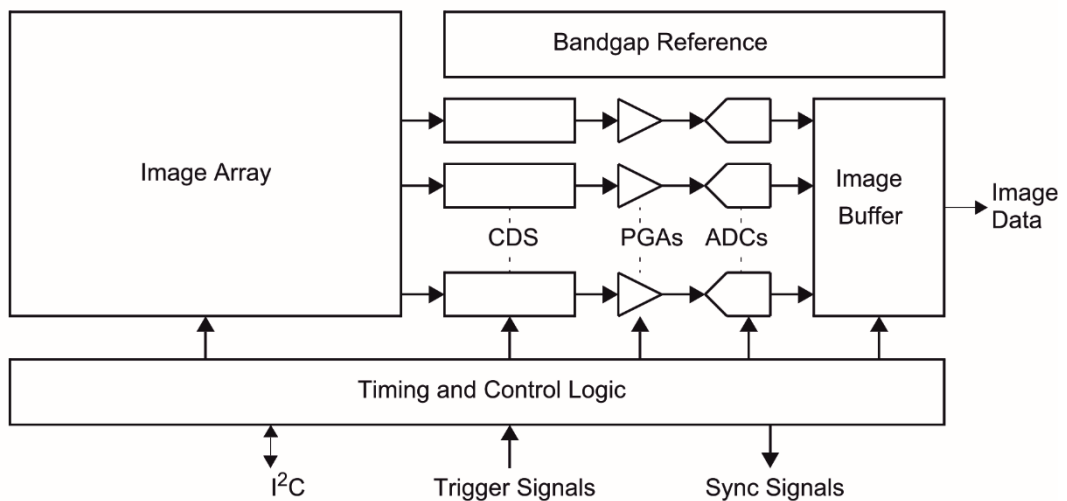
- No Dark Frame Subtraction Required
- Still Frame and Video Modes
- Analog Color Balance PGA
- Programmable Exposure Control
- Movable & Sizable Output Window
- Mirrored and Flipped Scan Modes
- Decimation by 2 or 4 Subsampling
- Optically Black Reference Pixels
- I<sup>2</sup>C Control Interface
- Single Voltage Power Supply
- Internally Generated Reference Voltages

## Key Specifications

Active Resolution	1288 x 1032
Array Diagonal	12.3mm
Pixel Pitch	7.5um x 7.5um
Color Filter Array	RGB Bayer
Scanning Mode	Progressive
Maximum Pixel Rate	16MHz
Full Frame Rate	9.3 fps (1280x1024)
Decimate by 2 Frame Rate	32.4 fps (640x480)
Decimate by 4 Frame Rate	102 fps (322x258)
Dynamic Range	66dB
R, G and B PGA Gain	0 to 14dB
ADC Resolution	10 bits
Supply Voltage	3.3V
Power Dissipation	260mW

### Ordering Information

Product	Package	Order Number
ZR32112 Color	44 LCC	ZR32112-PLC
ZR32112 Monochrome	44 LCC	ZR32112-MLC





**ZORAN**

**ZR32112**

# 1288x1032 Digital Image Sensor

## Pin Descriptions

NAME	PIN	TYPE	DESCRIPTION
<b>Supply Signals</b>			
AVDD0, AVDD1, AVDD2, AVDD3	44, 36, 35, 10	IN	Analog Supply Pins.
AGND0, AGND1, AGND2, AGND3	42, 37, 34, 9	OUT	Analog Ground Pins.
DVDD0, DVDD1	12, 1	IN	Digital Supply Pin.
DGND0, DGND1	13, 2	OUT	Digital Ground Pin.
IOVDD0	22	IN	Digital I/O Supply Pins.
IOGND0	23	OUT	Digital I/O Ground Pins.

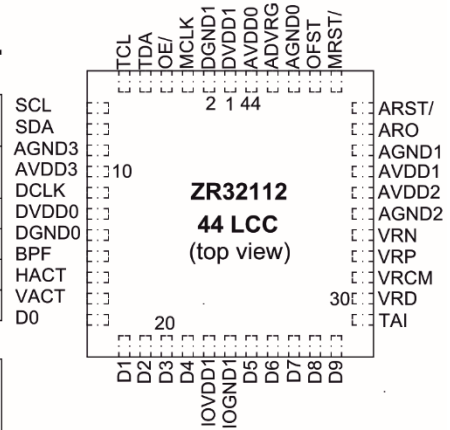
<b>Output Pixel Data Signals</b>			
D0, D1, ..., D9	17, 18-21, 24-28	OUT	Pixel Output Data Bits 0 (LSB), to 9 (MSB).

<b>Timing and Control Signals</b>			
MCLK	3	IN	Master Clock. Clocks all of the ZR32112's internal state machines.
MRST/	40	IN	Master Reset. Active low device reset. Must be driven low for at least two MCLK periods after powerup.
ARO	38	IN	Array Read Out. Begins readout of pixel values in Still Frame mode. Should be held low in Video Mode.
ARST/	39	IN	Array Reset. Stops the current frame readout, automatically switches the ZR32112 into Still Frame Mode, resets pixel values, and starts integration for a new frame. Should be held high in Video Mode.
OE/	4	IN	Pixel Data Output Enable. 0=enabled; 1=tri-stated
DCLK	11	OUT	Data Output Clock. Same Frequency as MCLK, with internal signal delays matched to D0-D9, BPF, HACT, and VACT.
BPF	14	OUT	Black Pixel Flag. Asserted when output is an optically black pixel.
HACT	15	OUT	Horizontal Active. High during active pixel output.
VACT	16	OUT	Vertical Active. High during image frame output.

<b>Configuration Register I<sup>2</sup>C Signals</b>			
SCL	7	IN	I <sup>2</sup> C Serial Clock. SCL maximum frequency is $f_{MCLK}/4$ .
SDA	8	IN/OUT	I <sup>2</sup> C Serial Data. (open collector, bi-directional)
OFST	41	IN	I <sup>2</sup> C Base Address Offset. 0=I <sup>2</sup> C base address is 60h; 1=I <sup>2</sup> C base address is 62h.

<b>Analog Reference Signals</b>			
VRP	32	OUT	Voltage Reference Positive. Bypass to AVDD with a 0.1uF.
VRN	33	OUT	Voltage Reference Negative. Bypass to VRP with 0.1uF.
VRCM	31	OUT	Voltage Reference Common Mode. Bypass to AGND with 0.1uF.
ADVRG	43	IN	Reset Ground Reference. Normally connected to AGND.
VRD	30	IN	Pixel Reset Voltage Reference. Normally connected to AVDD.

<b>Production Test Signals and N.C. Pins</b>			
TDA	5	IN	Test Serial Data Input Signal. Connect to Ground.
TCL	6	IN	Test Serial Data Clock Signal. Connect to Ground.
TAI	29	IN	Analog Input Test Signal. Connect to AGND.





# ZR32112

## 1288x1032 Digital Image Sensor

### Electrical Characteristics

#### Absolute Maximum Ratings

VDD Supply Voltage	-----	-0.3V to 7.0V
DC Voltage at any input pin	-----	-0.3V to VDD+0.3V
DC Current at any input pin	-----	-10mA to +10mA
Storage Temperature	-----	-40C to +125C
Max Solder Temperature (less than 10 minutes)	-----	230C

#### Recommended Operating Conditions

VDD Supply Voltage	-----	3.0V to 3.6V
Temperature	-----	0C to 70C

Note: VDD represents any supply voltage (AVDD, DVDD, or IOVDD). Voltages are relative to GND (AGND, DGND, or IOGND, respectively.)

#### Pixel Array Characteristics. Room Temp. VDD=3.3V, f<sub>MCLK</sub>=16MHz unless stated otherwise.

SYMBOL	DESCRIPTION	CONDITIONS	MIN	TYP	MAX	UNITS
Total Resolution	Total array size including black pixels			1304 x 1032		pxls x pxls
Active Resolution	Total R, G and B pixels			1288 x 1032		pxls x pxls
Black Pixels	Black, Optically Shielded Pixels.	Optically Shielded on the ZR32112-PLC (color) Unshielded on the ZR32112-MLC (mono)		16		pxls / line
Pixel Pitch	Sensor Element Area			7.5 x 7.5		mm x mm
FF-M	Fill Factor for the ZR32112-MLC			51		%
FF-C	Fill Factor for the ZR32112-PLC			63		%
DRK	Mean Dark Signal Accumulation	Dark Condition <sup>1</sup> , Full Frame Exposure <sup>2</sup> , Includes Offset.		38	80	codes
SENS-M	ZR32112-MLC Monochrome Sensitivity	Noise based ISO-Sensitivity (ISO 12232: 1998(E))		TBD		ISO
SENS-C	ZR32112-PLC Color Sensitivity	Noise based ISO-Sensitivity (ISO 12232: 1998(E))		TBD		ISO
SAT	Saturation Level			1023		codes
Noise	Temporal Noise			0.40	TBD	codes
Single Pixel Dynamic Range	Ratio of pixel saturation level to temporal noise.			66		dB

1. A mechanical shutter is closed so there is no illumination on the sensor array.

2. Video mode, with a full frame exposure (i.e. Reg 12h = 03h, Reg 13h = FFh), 107ms with a 16MHz MCLK.

## Příloha 2 Skript v software Mathematica

V této příloze si stručně popíšeme skript pro zpracování pořízených snímků struktur koherenční zrnitosti. Tento skript byl poskytnut Společnou laboratoří optiky v rámci řešení této práce a byl optimalizován pro software Mathematica v 9.1 a operační systém Microsoft Windows XP.

Celé měření sestává ze série snímků pořízených kamerou v hodinovém intervalu. Série snímků jsou ukládány do adresářů (viz Obr. 13) označených pořadovým číslem. Celé měření se nachází v adresáři s názvem označujícím den, měsíc a rok počátku měření.

```
C:\Mereni\  
  2019-02-21\  
    01  
    02  
    03
```

**Obr. 13** Struktura adresářů, ze které skript pro zpracování snímků struktur koherenční zrnitosti načítá data.

Soubory snímků struktur koherenční zrnitosti mají v každé sérii snímků název `imgXXX.tif`, kde trojice `XXX` představuje pořadové číslo souboru v sérii. Soubory jsou číslovány od 0, takže první soubor má název `img000.tif`, druhý `img001.tif`, atd. Typ souboru snímku je TIF (Tagged Image File Format) s barevným rozlišením 8 bitů (256 úrovní šedi).

Protože skriptem se zpracovávají soubory postupně v každé sérii, je žádoucí před jeho aplikováním na danou sérii souborů uvolnit paměť blokovanou daty z jeho předchozí aplikace a ověřit uvolnění paměti pro další uložení dat.

```
ClearAll["Global`*"]  
Print[N[MemoryInUse[]/2^20], " MiB"]
```

Po uvolnění veškeré paměti by skriptem vypsaná číslice měla být vždy „0 MiB“.

`Import dat` ze souborů pořízených snímků struktur koherenční zrnitosti se provádí pomocí seznamu `nazev`, který obsahuje názvy těchto souborů. V dalším kroku se tento seznam vytvoří. Text uvedený mezi závorkami `( * *)` reprezentuje doplňující komentář.

```

adr1 = "c:\\Mereni\\2019-02-21"; (* adresar s merenim *)
adr2 = "24"; (* poradove cislo serie*)
adr = adr1 <> "\\\" <> adr2; (* sestav cestu k serii souboru *)
nazev = {}; (* inicializuj seznam nazvu souboru *)
souborOd = 0; (* cislice prvnioho snimku v serii *)
souborDo = 99; (* cislice poslednioho snimku v serii *)
krok = 1; (* vyber snimky vzdalene o krok kroku*)

(* sestav seznam nazvu souboru *)
For[i = souborOd, i <= souborDo, i = i + krok,
  If[i < 10, pomStr = "00", If[i < 100, pomStr = "0", pomStr = ""];
  nazev = Append[nazev, "img" <> pomStr <> ToString[i] <> ".tif"];
]
{pocetSouboru} = Dimensions[nazev];
Print["Počet souborů: ", pocetSouboru]

```

V dalším kroku se vytvoří matice o stejné dimenzi jako pořízený snímek struktury koherenční zrnitosti, do které se uloží průměrné hodnoty vypočtené z rozdílů načtených normovaných dat vždy dvou po sobě následujících snímků. Výsledná hodnota v prvku matice na dané souřadnici je stanovena pomocí odpovídající série normovaných hodnot načtených ze stejné souřadnice všech snímků dané série. Data ze souborů jsou během načítání funkcí `Import` konvertovaná do 32 bitového čísla s plovoucí desetinnou čárkou.

```

(* dej velikost snimku a vytvor nulovou matici soucet typu Real32*)
obr1 = Import[adr <> "\\\" <> nazev[[1]]];
{radku, sloupcu} = Dimensions[ImageData[obr1]];
soucet = Table[0., {radku}, {sloupcu}];

(* dej soucty rozdilu po sobe jdoucích snimku *)
Monitor[
  For[i = 1, i <= pocetSouboru - 1, i = i + 1,
    obr1 = ImageData[Import[adr <> "\\\" <> nazev[[i]]], "Byte"]/255.;
    obr2 = ImageData[Import[adr <> "\\\" <> nazev[[i + 1]]],
      "Byte"]/255.;
    soucet = soucet + (obr2 - obr1);
    obr1 = .;
    obr2 = .;
  ]
, i]

(* vypocti prumerne hodnoty *)
prumer = soucet/(pocetSouboru - 1);
soucet =.

```

V následujícím kroku se na každé souřadnici snímku stanoví směrodatná odchylka `std` pomocí vypočtené průměrné hodnoty nacházející se na stejné souřadnici matice `prumer`.

```

(* dej matici soucet o stejne dimenzi jako snimek pro*)
(* soucet kvadratu odchylek od prumernych hodnot *)
soucet = Table[0., {radku}, {sloupcu}];

(* dej soucet kvadratu odchylek od prumernych hodnot *)
Monitor[
  For[i = 1, i <= pocetSouboru - 1, i = i + 1,
    obr1 = ImageData[Import[adr <> "\\\" <> nazev[[i]]], "Byte"]/255.;
    obr2 = ImageData[Import[adr <> "\\\" <> nazev[[i + 1]]],
      "Byte"]/255.;
    diff = obr2 - obr1;
    soucet = soucet + (diff - prumer)^2;
    obr1 = .;
    obr2 = .;
  ]
, i]

(* dej rozptyl var *)
var = soucet/(pocetSouboru - 2);
soucet = .

(* vypocti smerodatnou odchylku std *)
std = Sqrt[var];

```

Na závěr se matice vypočtených směrodatných odchylek uloží do souboru na disk počítače. K jejich archivaci se použije soubor typu TIF s barevnou hloubkou 32 bitů totožnou s počtem bitů, které jsou použity pro reprezentaci hodnoty směrodatné odchylky. Tato barevná hloubka umožňuje archivovat hodnoty směrodatné odchylky s přesností až na 9 desetinných míst. Nedojde tak ke zkreslení vypočtených hodnot směrodatných odchylek během jejich uložení a dále soubor typu TIF nabízí rychlou vizualizaci vypočtených dat.

```

obrStd = Image[std, "Real32"];
Export[adr1 <> "\\\" <> "std" <> adr2 <> ".tif", obrStd,
  "BitDepth" -> 32, "ImageEncoding" -> "ZIP"]

```