

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

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Monitorování souvislosti změn koherenční zrnitosti listu rostliny s optickými  
a fyziologickými parametry listu**

Vypracoval: Jakub Pechník

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.

Forma studia: prezenční

Olomouc 2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jakub Pechník
Název práce:	Monitorování souvislosti změn koherenční zrnitosti listu rostliny s optickými a fyziologickými parametry listu
Typ práce:	Experimentální
Pracoviště:	Katedra biofyziky Univerzity Palackého, Společná laboratoř optiky Univerzity Palackého a Fyzikálního ústavu Akademie věd ČR
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	<p>Přestože je jev koherenční zrnitost velmi dobře fyzikálně popsán, jeho uplatnění v bioaplikacích je nízké, v rostlinném světě téměř žádné. Příčinou může být fakt, že nejsou dostatečně objasněny fyziologické procesy, které změny ve strukturách koherenční zrnitosti odrážejí. V naší práci jsme proto zvolili komplexní biofyzikální přístup, tj. současné sledování optického jevu koherenční zrnitost a vybraných fyziologických parametrů rostliny rajčete <i>in vivo</i>. Byly snímány změny struktury koherenční zrnitosti generované listem během měřeného pohybu chloroplastů mezi dvěma krajními pozicemi. Tytéž změny struktury koherenční zrnitosti byly monitorovány v reakci vzdálených oblastí listu na lokální vysokoteplotní stres se současnou detekcí propustnosti listu. Ke kvantifikaci strukturních změn listu bylo použito až osm zavedených metod obrazové analýzy koherenční zrnitosti. Současné měření pohybu chloroplastů, propustnosti listů a změn struktur koherenční zrnitosti poukázalo na významné ovlivnění průběhu jevu koherenční zrnitost fyziologickým jevem, tj. pohybem chloroplastů. Navíc se jev koherenční zrnitost prokázal jako slibný neinvazivní prostředek k detekci mírného (vysokoteplotního) stresu rostlin.</p>
Klíčová slova:	Koherenční zrnitost, rajče, pohyby chloroplastů, vysokoteplotní stres, neinvazivní měření, propustnost listu
Počet stran:	66
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jakub Pechník

Title of thesis: Monitoring of the relationship between the changes in plant leaf speckle effect and the optical and physiological parameters of the leaf

Type of thesis: Experimental

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

Supervisor: Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.

The year of defence: 2022

Abstract: Although the speckle effect is very well described in terms of physics, its use in bioapplications is negligible, almost none in the plant science. This may be due to the fact that the physiological processes hidden behind speckle changes are poorly understood. We therefore opted for a comprehensive biophysical approach in our work, which means a simultaneous monitoring of the speckle effect and selected physiological parameters of tomato plants *in vivo*. Changes in leaf-generated speckle patterns were monitored during a measured chloroplast movement between their two extreme positions. The speckle pattern together with leaf transmittance were also measured in distant intact areas of the leaf that was locally high-temperature stressed. In order to quantify structural changes of the leaf by speckle pattern, up to eight established methods of image analysis were used. The simultaneous measurements of chloroplast movement, leaf transmittance, and changes in speckle patterns, revealed a significant impact of the physiological phenomenon chloroplast movement on the course of the speckle effect. In addition, the speckle effect has shown to be a promising non-invasive tool for detection of mild (high-temperature) stress in plants.

Key words: Speckle, tomato, chloroplast movements, high-temperature stress, non-invasive measurement, leaf transmittance

Number of pages: 66

Number of attachments: 2

Language: Czech

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D. za její příkladné vedení, čas věnovaný odborným konzultacím a přípravě experimentů a za pomoc při výsevech a pěstování rostlin a jejich přepravě na místo měření ve Společné laboratoři optiky. Dále děkuji RNDr. Petru Šmídovi, Ph.D. a RNDr. Pavlu Horváthovi, Ph.D. za podnětné konzultace a odbornou pomoc nejen při přípravě experimentů.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Vladimíry Nožkové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce. Všechny prezentované fotografie a schémata byly pořízeny na Katedře biofyziky UP a ve Společné laboratoři optiky UP a FZÚ AV ČR a jsou prezentovány se souhlasem obou pracovišť.

V Olomouci dne .....

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	1
<b>2. PŘEHLED PROBLEMATIKY</b> .....	2
2.1 Koherenční zrnitost v biologii .....	2
2.2 Přístupy k analýze aktivity vzorku pomocí jevu koherenční zrnitost .....	3
2.2.1 Skalární analýzy .....	3
2.2.2 Obrazové analýzy .....	4
2.2.2.1 Kontrastová analýza koherenční zrnitosti (Laser Speckle Contrast Analysis) .....	5
2.2.2.2 Zobecněný rozdíl (Generalized Difference).....	6
2.2.2.3 Fujiho metoda (Fuji) .....	6
2.2.2.4 Absolutní hodnota z rozdílů (Absolute Value of Differences) .....	6
2.2.2.5 Moment setrvačnosti (Inertia Moment) .....	7
2.2.2.6 MHI (Motion History Image) .....	7
2.3 Měření biologických materiálů pomocí jevu koherenční zrnitost.....	8
2.3.1 Koherenční zrnitost při měření účinků stresu, kolonizace, či k taxonomickému zařazení rostlin .....	10
2.3.2 Stres rostlin a pohyby chloroplastů .....	14
2.3.2.1 Uspořádání chloroplastů v rostlinné buňce .....	14
2.3.2.2 Mechanismus pohybu chloroplastů .....	17
2.3.2.3 Pohyby chloroplastů a vliv teploty .....	19
2.3.2.4 Další faktory ovlivňující pohyby chloroplastů .....	20
2.3.2.5 Princip měření pohybu chloroplastů .....	21
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	24
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	25
4.1 Rostlinný materiál.....	25
4.2 Postup měření a vyhodnocení dat .....	26
4.2.1 Pilotní experiment .....	26
4.2.1.1 Aparatura pro pilotní experiment .....	27
4.2.2 Ostré experimenty.....	28
4.2.2.1 Souvislost změn ve struktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů .....	28
4.2.2.2 Změna struktury koherenční zrnitosti listu po lokálním vysokoteplotním stresu .....	31
4.2.2.3 Aparatura pro ostré experimenty .....	35
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	38
5.1 Pilotní experiment .....	38
5.2 Souvislost změn ve struktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů .....	39
5.3 Změna struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu .....	42
5.4 Ověření citlivosti koherenční zrnitosti v reakci na pohyby chloroplastů .....	52
<b>6. DISKUSE</b> .....	56
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	59

<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>60</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>64</b>
<b>Příloha 1 Script v software GNU Octave .....</b>	<b>64</b>
<b>Příloha 2 Spektrum dichroického filtru FD1B.....</b>	<b>66</b>

# 1. ÚVOD

Měření fyzikálních parametrů souvisejících s fyziologickými procesy v rostlinných pletivech bylo historicky prováděno řadou kontaktních metod. Důležitý pokrok v tomto odvětví přineslo v nedávné době uplatnění optického jevu koherenční zrnitost v biologii, které umožňuje monitorovat děje v biologických vzorcích bezkontaktně. Koherenční zrnitost vzniká tehdy, když je dopadající svazek koherentního světla odražen od drsného povrchu vzorku, nebo jestliže prochází fázovým prostředím vzorku s náhodnými fluktuacemi indexu lomu. Světelné vlny odražené od vzorku či prošlé vzorkem následně interferují v prostoru okolo vzorku. Vzniklá interferenční maxima a minima jsou umístěním stínítka či kamery do prostoru před/za vzorkem pozorovatelná jako světlé a tmavé skvrny. Koherenční zrnitost byla v minulosti dobře popsána z fyzikálního hlediska a byla občas využívána k monitorování biologických vzorků. V těchto aplikacích však mnohdy chybí přesná interpretace biologických procesů, které generovanou koherenční zrnitost ovlivňují. Tento fakt nás vedl k myšlence zaměřit se na konkrétní fyziologické procesy v rostlinném pletivu a jejich identifikaci pomocí jevu koherenční zrnitost.

Vědomi si náročnosti současného monitorování změn ve struktuře koherenční zrnitosti a fyziologických procesů, vybrali jsme nejprve proces významně ovlivňující propustnost listů, tj. pohyb chloroplastů. Z fyzikální podstaty jevu koherenční zrnitost jsme předpokládali, že by se pohyb chloroplastů měl v jevu koherenční zrnitost významně promítnout. Dále jsme chtěli zjistit, zda by se jev koherenční zrnitost mohl použít k neinvazivní časné detekci stresu rostlin a mohl by tak být v budoucnu využit v zemědělské praxi. Zvolili jsme proto lokální vysokoteplotní stres a snímali jev koherenční zrnitost ve vedlejším pletivu. Práce navazuje na bakalářskou práci Pechník (2019), ve které jsme poprvé využili vlastní navrženou měřicí aparaturu k interdisciplinárnímu zkoumání dynamických vlastností biologických vzorků pomocí jevu koherenční zrnitost.

## 2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

### 2.1 Koherenční zrnitost v biologii

Jev koherenční zrnitost (KZ) je již velmi dobře fyzikálně popsán a jeho podstatou je rozptyl koherentního světla na částicové struktuře osvětleného materiálu. Jev se vyznačuje vznikem světlých a tmavých interferenčních skvrn v poloprostoru nad nebo pod osvětleným materiálem (Horváth a Šmíd 2012) a jeho detailním fyzikálním popisem jsme se zabývali již v bakalářské práci (Pechník 2019). Dosud však chybí přesná biologická interpretace koherenční zrnitosti (Kurenda a kol. 2010) jako následek historického vývoje, neboť koherenční zrnitost byla dříve využívána zejména k analýze statických neživých předmětů (např. Leger a kol. 1975). Při použití některých velmi citlivých optických metod (např. holografická interferometrie) byl tento jev dokonce považován za parazitní, neboť výrazně snižoval rozlišení holografického obrazu (Dyrseth 1996).

Výhodou monitorování vzorků pomocí koherenční zrnitosti je především neinvazivní povaha metody, ale také její potenciální flexibilita (konfigurace laser-objekt-detektor může být provedena horizontálně i vertikálně). Důležitá je ale rovněž skutečnost, že většina nastavení vyžaduje pořízení velkého množství snímků struktury koherenční zrnitosti ke spolehlivému popisu změn v biologickém vzorku. Kvůli vysoké citlivosti metody na vnější vibrace je třeba brát ohled na správné přizpůsobení experimentální konfigurace a lokalizaci konkrétního měření (Zdunek a kol. 2014).

Braga (2017) vidí potenciál uplatnění koherenční zrnitosti zejména v komerčních přenosných zařízeních na základě dostupných, ale dostatečně robustních laserů a kamer. Tato zařízení by měla najít praktické uplatnění především v zemědělství, k analýze plodů a semen. Bylo již prokázáno, že technické nároky koherenční zrnitosti na kvalitu obrazu a rychlost snímání jsou v dnešní době dosahovány dokonce i chytrými telefony (Catalano a kol. 2019). Přestože však kamery, lasery a počítače využívané v experimentálních konfiguracích zaznamenaly v posledních letech zjevný technologický pokrok, samotné experimentální konfigurace ke snímání koherenční zrnitosti nebyly dosud uspokojivě popsány (Vieira a Braga 2020). S koherenční zrnitostí navíc souvisí faktor neuspořádaného pohybu fyzických částic, který je obtížně kvantifikovatelný pro potenciální přípravu kalibračních modelů (Zdunek a kol. 2014). Hlavním omezením používání koherenční zrnitosti v praxi zůstává její technická náročnost a její použití je tedy dosud limitované na optické laboratoře a vědecké účely.



## 2.2 Přístupy k analýze aktivity vzorku pomocí jevu koherenční zrnitost

V odborné literatuře je v současné době popsáno několik přístupů k analýze biologického vzorku pomocí jevu koherenční zrnitost. Společným základem těchto přístupů je pořízení série snímků struktury koherenční zrnitosti. Správný výběr specifického přístupu k analýze jednotlivých dat je klíčový a významně se odráží v čitelnosti změn ve změřených datech.

### 2.2.1 Skalární analýzy

Nejběžnějšími metodami, využívanými především k popisu vzorků prostorově homogenních (například práce se zemědělskými plody, živočišnými a lidskými tkáněmi nebo bakteriemi), jsou skalární analýzy. V rámci těchto přístupů je celá série snímků struktury koherenční zrnitosti popsána jedinou hodnotou, nesoucí význam kvantifikátoru biologických změn (Vieira a Braga 2020). Jednou z běžně využívaných skalárních analýz je například výpočet skalárního momentu setrvačnosti ( $im$ ) pomocí matice společného výskytu **COM** (Arizaga a kol. 1999), podle vztahu

$$im = \sum_{ij} COM_{ij} |i - j|^2 . \quad (1)$$

Prvním krokem při výpočtu skalárního momentu setrvačnosti je vytvoření takzvané matice **THSP** (z angl. Time History Speckle Pattern, Braga a kol. 2017). Horizontální rozměr matice **THSP** tvoří pořadí snímků struktury koherenční zrnitosti v sérii a alespoň jeden další rozměr tvoří prostorové souřadnice snímku struktury koherenční zrnitosti. Časově úspornější způsob vytvoření **THSP** zahrnuje převedení dat ze snímků struktury koherenční zrnitosti na jeden rozměr. To může být provedeno například výpočtem průměrné hodnoty nebo směrodatné odchylky z hodnot v každém řádku snímků struktury koherenční zrnitosti. Z matice **THSP** je dále vypočtena matice společného výskytu **COM** (z angl. co-occurrence matrix). Matice **COM** je čtvercová matice, jejíž výška ( $I$ ) a potažmo šířka ( $J$ ) jsou určeny počtem úrovní signálu v matici **THSP**. Například v osmibitovém systému snímání s celkem 256 úrovněmi šedi na intervalu  $\langle 0;255 \rangle$  tedy tvoří čtvercovou matici **COM** 256 řádků a 256 sloupců, tedy  $I = J = 256$ . Hodnoty prvků na pozicích  $ij$  v matici **COM** (koeficienty  $COM_{ij}$  v rovnici (1)) prezentují informaci o tom, kolikrát se ve dvou po sobě jdoucích sloupcích matice úroveň signálu o hodnotě  $j$  změnila na úroveň signálu o hodnotě  $i$ . Na hlavní diagonále matice **COM** tak vystupují situace, kdy se struktura koherenční zrnitosti (v rámci jakýchkoli dvou sousedních snímků v sérii)

v čase nemění. V oblastech matice **COM** daleko od diagonály ( $i \ll j$ , nebo  $j \ll i$ ) jsou naopak zastoupeny situace, kdy ve struktuře koherenční zrnitosti ze snímku na snímek dochází k výrazným změnám. Z rovnice (1) vyplývá, že skalární moment setrvačnosti nabývá nulové hodnoty právě tehdy, když je struktura koherenční zrnitosti úplně statická (během celé série neměnná). V takovém případě totiž všechny nenulové hodnoty matice **COM** leží na její hlavní diagonále, kde  $i = j$ . Pokud je však koherenční zrnitost dynamická, skalární moment setrvačnosti roste k vysokým kladným hodnotám. Skalární moment setrvačnosti  $im$  reprezentuje míru rozprostření hodnot matice společného výskytu **COM** kolem hlavní diagonály.

### 2.2.2 Obrazové analýzy

K analýze aktivity prostorově nehomogenních vzorků (například biologických tkání či pletiv) slouží obrazové analýzy (Vieira a Braga 2020). Na rozdíl od skalárních analýz mají výsledky těchto přístupů podobu matic. Výsledné matice je možno zobrazit jako obrázky s různými úrovněmi šedi, nebo jako barevné obrázky. V rámci této práce budeme využívat první variantu zobrazení výsledných matic, přičemž nulovým hodnotám prvků matic bude přiřazena černá a maximálním hodnotám prvků matic (v našem případě konkrétně hodnotám 255) bude přiřazena bílá barva.

Mezi obrazové analýzy patří mimo jiné metoda Fujii (Fujii a kol. 1987), metoda zobecněného rozdílu GD (z angl. Generalized Difference, Arizaga a kol. 2002), nebo tzv. kontrastová analýza koherenční zrnitosti LASCA (z angl. Laser Speckle Contrast Analysis, Briers a Webster 1996). Braga a kol. (2009) využili všechny tři výše zmíněné metody k monitorování kořenových pletiv. Costa a kol. (2017) použili k zjištění obsahu oleje v plodu palmy *Acrocomia aculeata* obrazovou analýzu AVD (z angl. Absolute Value of Differences). Draijer a kol. (2009) použili metodu LASCA ke snímání propustnosti tkání. V porovnání s jinými metodami jako například LDPI (Laser Doppler Perfusion Imaging, Svanberg a kol. 1997), které nebyly na bázi koherenční zrnitosti, byla výhodou metody LASCA možnost využití kamer s nízkými rychlostmi snímání. Kontrastová analýza se rovněž prokázala jako jednoduchá, rychlá a levná metoda k detekci poškození ovocných plodů (Yan, 2017).

Předpokládejme, že hodnoty měřeného jasu v jednotlivých pixelech snímků struktury koherenční zrnitosti udávají celá čísla z intervalu  $\langle 0, 255 \rangle$ . Pak symbol  $I_k$ , použitý společně v níže uvedených vztazích, nese význam matice čísel reprezentující

všechny pixely  $k$ -tého snímku struktury koherenční zrnitosti, v sérii o celkovém počtu  $N$  snímků. Takto definované matice  $\mathbf{I}_k$  popisující celou analyzovanou sérii  $N$  snímků struktury koherenční zrnitosti mohou být dosazeny do zcela obecných fyzikálních vztahů. Například do vztahu pro aritmetický průměr (tzv. metoda AVG):

$$\mathbf{AVG} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \mathbf{I}_k \quad (2)$$

nebo do vztahu pro směrodatnou odchylku (tzv. metoda STD):

$$\mathbf{STD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (\mathbf{I}_k - \langle \mathbf{I} \rangle)^2} . \quad (3)$$

Důležité je poznamenat, že aby bylo možno operace provádět, všechny matice, a tedy i všechny snímky struktury koherenční zrnitosti z analyzované série, musí mít stejné rozměry.

Šest z běžně využívaných přístupů k analýze biologické aktivity živých vzorků matematicky popsali Braga a kol. (2016b): (1) kontrastovou analýzu koherenční zrnitosti LASCA, (2) zobecněný rozdíl GD, (3) Fujiiho metodu, (4) moment setrvačnosti IM, (5) absolutní hodnotu z rozdílů AVD, (6) metodu MHI (Motion History Image), kterou využili například Ansari a kol. (2016b) k monitorování ischémie mozkových tepen u myši.

### 2.2.2.1 Kontrastová analýza koherenční zrnitosti (Laser Speckle Contrast Analysis)

Kontrastová analýza, popsána vztahem

$$\mathbf{C} = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (4)$$

je podle Braga a kol. (2016a) prostým podílem mezi směrodatnou odchylkou (3) a průměrem (2) ze série snímků struktur koherenční zrnitosti. Pro sérii snímků struktur koherenční zrnitosti, v jejichž horizontálním směru vystupují pixely s pořadovými čísly  $x = [1, 2, 3, \dots, N]$  a v jejichž vertikálním směru vystupují pixely s pořadovými čísly  $y = [1, 2, 3, \dots, N]$  jsou nejprve vypočteny všechny hodnoty směrodatných odchylek  $\sigma_{x,y}$  a průměrů  $\langle I \rangle_{x,y}$ , tj. například pro první pixel vlevo nahoře jsou ze všech snímků série struktur koherenční zrnitosti vypočteny hodnoty  $\sigma_{1,1}$  a  $\langle I \rangle_{1,1}$ , pro poslední pixel ze snímků vpravo dole dostáváme  $\sigma_{N,N}$  a  $\langle I \rangle_{N,N}$ . Výsledná matice  $\sigma$  je tak tvořena prvky  $\{\sigma_{1,1} \dots \sigma_{N,N}\}$  a výsledná matice  $\langle I \rangle$  je tvořena prvky  $\{I_{1,1} \dots I_{N,N}\}$ . Prvky výsledné matice  $\mathbf{C}$  jsou dány operací dělení mezi prvky výchozích matic  $\sigma$ ,  $\langle I \rangle$  opět vždy v jejich odpovídajících pozicích. Jestliže je koherenční zrnitost statická, směrodatné odchylky

$\sigma_{x,y}$  jsou nulové a výsledný snímek **C** je tmavý. Rostoucí míra dynamičnosti koherenční zrnitosti posouvá kontrast **C** směrem k vyšším hodnotám.

#### 2.2.2.2 Zobecněný rozdíl (Generalized Difference)

Zobecněný rozdíl popsany rovnicí

$$\mathbf{GD} = \sum_{k=1}^{N-1} \sum_{l=1}^{N-k} \frac{2}{N} |\mathbf{I}_k - \mathbf{I}_{k+l}| \quad (5)$$

spočívá v kumulativním součtu všech kombinací absolutních rozdílů mezi snímky struktury koherenční zrnitosti v analyzované sérii, v jednom směru (index reprezentující pořadí snímku v sérii musí vždy nabývat u menšence nižších hodnot než u menšitele). Braga a kol. (2005) uvádí, že jestliže je aktivita biologického vzorku vysoká, výsledná hodnota GD dosahuje vysokých hodnot (světlý obraz). Jestliže je naopak aktivita nízká, odpovídající výsledek analýzy obsahuje nízké hodnoty GD (tmavý obraz).

#### 2.2.2.3 Fujiiho metoda (Fujii)

Fujiiho metoda popsána vztahem

$$\mathbf{F} = \frac{200}{(N-1)} \sum_{k=1}^{N-1} \frac{|\mathbf{I}_k - \mathbf{I}_{k+1}|}{(\mathbf{I}_k + \mathbf{I}_{k+1})} \quad (6)$$

znamená pro každou sérii snímků struktury koherenční zrnitosti výpočet absolutních rozdílů mezi všemi po sobě následujícími snímky  $|\mathbf{I}_k - \mathbf{I}_{k+1}|$ , a dělení výsledků těchto operací příslušnými průměry  $\frac{(\mathbf{I}_k + \mathbf{I}_{k+1})}{2}$ . Výsledek předchozí operace je dále převeden do tvaru procent po vynásobení výrazem  $\frac{100}{(N-1)}$ . Cílem metody Fujii je tedy určit, jak se mění absolutní rozdíl po sobě jdoucích snímků struktury koherenční zrnitosti vůči jejich průměrné hodnotě.

#### 2.2.2.4 Absolutní hodnota z rozdílů (Absolute Value of Differences)

Analýza absolutní hodnotou z rozdílů, popsána vztahem

$$\mathbf{AVD} = \frac{1}{N-1} \sum_{k=1}^{N-1} |\mathbf{I}_k - \mathbf{I}_{k+1}| \quad (7)$$

je průměrnou hodnotou z absolutních hodnot rozdílů mezi všemi po sobě následujícími snímky struktury koherenční zrnitosti v sérii. Hodnota AVD roste s rostoucí rychlostí změn ve vzorku.

### 2.2.2.5 Moment setrvačnosti (Inertia Moment)

Moment setrvačnosti, popsán vztahem

$$\mathbf{IM} = \frac{1}{N-1} \sum_{k=1}^{N-1} (\mathbf{I}_k - \mathbf{I}_{k+1})^2 \quad (8)$$

je průměrnou hodnotou z druhých mocnin rozdílů mezi všemi po sobě následujícími snímky struktury koherenční zrnitosti v sérii. Oproti přístupu AVD se díky druhé mocnině ve vztahu zvyšuje kontrast mezi oblastmi s vyšší aktivitou a oblastmi s nižší aktivitou. Pokud je aktivita biologické tkáně nízká, změny intenzity ve snímcích struktury koherenční zrnitosti v závislosti na čase jsou pomalé, a hodnoty IM jsou nízké. Naopak, pokud je aktivita vysoká, také hodnoty IM jsou vysoké (Braga a kol. 2005).

### 2.2.2.6 MHI (Motion History Image)

Motion History Image, popsán vztahy

$$\mathbf{MHI} = 255 \sum_{i=0}^{N-2} \mathbf{T}_{N-i} h_i \quad (9)$$

$$h_i = \frac{N-1-i}{N(N-1)/2} \quad (10)$$

$$\mathbf{T}_k = (T_{x,y}), T_{x,y} = \begin{cases} 1 & \text{pokud } |I_{x,y,k} - I_{x,y,k-1}| > U \\ 0 & \text{pokud } |I_{x,y,k} - I_{x,y,k-1}| \leq U \end{cases} \quad (11)$$

nuluje veškeré rozdíly mezi dvěma sousedními snímky struktury koherenční zrnitosti, které nepřesahují zavedenou mez. Mez je definována libovolně zvoleným koeficientem  $U$ . Oblastem, ve kterých se tak neděje, přísluší ve výsledné matici nulové hodnoty, což zajišťuje podmínka pro prvky  $T_{x,y}$  matic  $\mathbf{T}_k$  (indexy  $x, y$  udávají horizontální a vertikální umístění prvků v maticích  $\mathbf{T}$  a ve snímcích struktur koherenční zrnitosti  $\mathbf{I}$ , index  $k$  udává pořadová čísla snímků v sérii). Význam koeficientu  $h_i$  spočívá v postupném přiřazování vyššího významu rozdílům mezi sousedními snímky směrem od začátku ke konci analyzované série. V rovnici (9) pro  $i = N-2$ , dosazujeme  $\mathbf{T}_2$ , které obdržíme rozdílem mezi prvními dvěma snímky  $\mathbf{I}_2$  a  $\mathbf{I}_1$  z rovnice (11). Pro  $i = 0$  dosazujeme  $\mathbf{T}_N$ , které dostaneme rozdílem mezi posledními dvěma snímky  $\mathbf{I}_N$  a  $\mathbf{I}_{N-1}$ . Na začátku analyzované série tedy index  $i$  dosahuje hodnoty  $i = N-2$ , a pro konec série platí  $i = 0$ . Z rovnice (10) pro koeficient  $h_i$  plyne rostoucí význam strukturálních změn vzorku směrem od začátku ke konci série. Na začátku série pak  $h_{N-2} = \frac{2}{N(N-1)}$  a na konci série  $h_0 = \frac{2}{N}$ . Koeficient  $h_0$  tak dosahuje  $N-1$ -krát vyšší hodnoty než koeficient  $h_{N-2}$ . V analýze MHI se tedy

nejjasněji zobrazují změny zaznamenané na konci pořízené série snímků struktury koherenční zrnitosti a metoda je proto s výhodou využívána také ke snímání strukturních změn vzorku v reálném čase (Ansari a kol. 2016b).

### 2.3 Měření biologických materiálů pomocí jevu koherenční zrnitost

Předmětem akademické diskuze na téma koherenční zrnitost (KZ) v souvislosti s biologickými vzorky byly v posledních letech především časové změny ve struktuře koherenční zrnitosti, často nevhodně obecně označované jako biologická aktivita. Tento nepřesný termín budeme nadále označovat zkratkou BA a užívat pouze v případě jeho převzetí z odborných článků. Přestože byly vyvinuty různé postupy kvantifikace časových změn struktury KZ a bylo poukázáno na mnoho fyziologických dějů, se kterými by tyto změny mohly souviset, nebyly doposud navrženy algoritmy jejich vyhodnocování, které by umožnily rozlišit konkrétní biologické procesy (Rabal a Braga 2009) a tím přesně změny struktury KZ fyziologicky interpretovat. Neprobádaná mezera v této oblasti je způsobena jejím interdisciplinárním charakterem, kdy jsou měření biologických vzorků pomocí jevu KZ často popisována čistě fyzikálně bez fyziologického potažmo komplexně biofyzikálního přístupu.

V kombinaci s biologickým materiálem využil koherenční zrnitost jako první N. Abramson (cit. v Briers 1975), který pozoroval změny ve struktuře KZ při osvětlení jablka. Objevil tak neinvazivní a účinnou alternativu k dříve používaným destruktivním (vyhodnocení obsahu škrobu, vyhodnocení obsahu rozpuštěných látek, měření kyselosti, měření tvrdosti plodu) a nedestruktivním (VIS/NIR spektroskopie, spektroskopie zpětného rozptylu, fluorescence chlorofylu) metodám vyhodnocování fáze zralosti plodů. V následujících letech se koherenční zrnitosti v biologii dostávalo značné akademické pozornosti. Koherenční zrnitost byla s úspěchem využívána v celé řadě nových aplikací. Například k monitorování pohybu krve v cévách (Fujii a kol. 1985, Asakura 1988, Ansari a kol. 2015), ke sledování gravitropie (Dyrseth 1996), ke stanovení klíčivosti rostlinných semen (Braga a kol. 2003, Men a kol. 2015), k hodnocení kvality celé řady potravinářských a zemědělských výrobků (Rabelo a kol. 2005, Zdunek a Cybulska 2011, Charget a kol. 2012, Jamshidi a kol. 2017, Costa a kol. 2018 aj.), k určení propustností živočišných tkání (Draijer a kol. 2009, Ansari a kol. 2016b, Ansari a kol. 2017), k monitorování očního třesu (Kenny a kol. 2013), k detekci růstu plísňových kolonií (Vincitorio a kol. 2013), ke sledování poškození biologického materiálu v důsledku

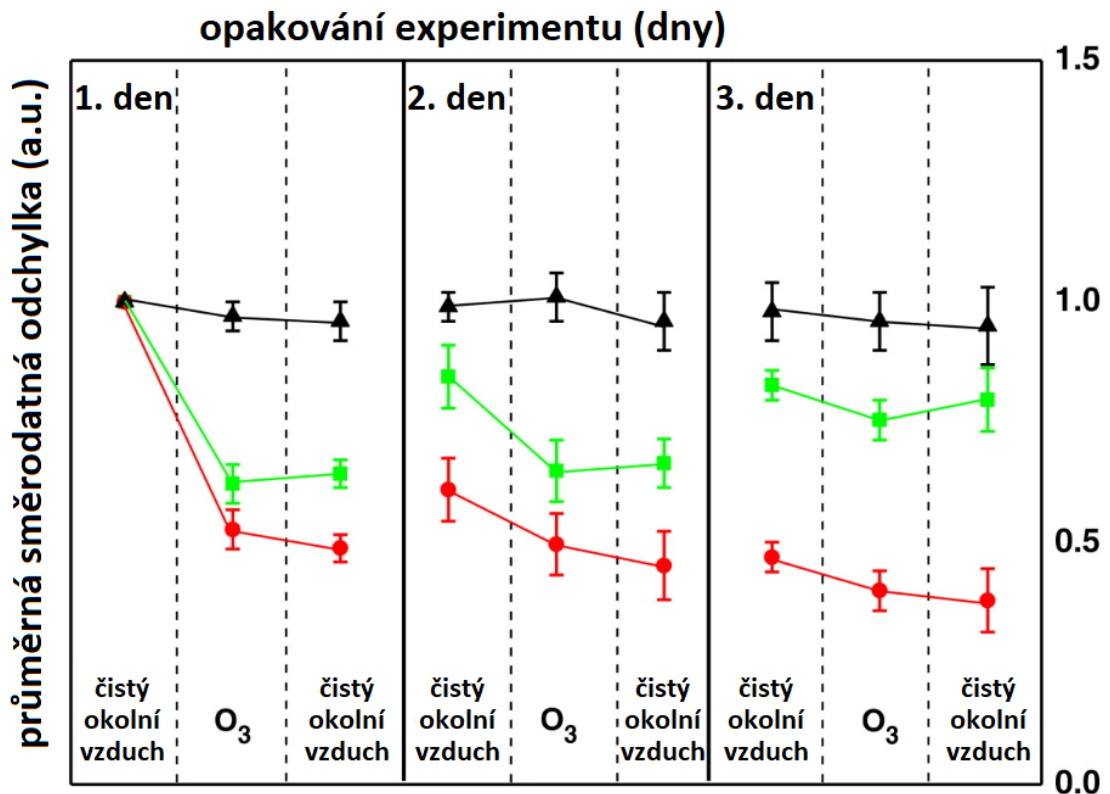
stresování chemickými látkami (Thilakarathne a kol. 2014), k testování účinnosti léků na základě mobility parazitů v testovacím médiu (Ansari a kol. 2016a), k analýze obsahu látek (např. oleje, škrobu) v plodech a určení ideální doby sklizně (Costa a kol. 2017, Nader a kol. 2019), k nepřímému zobrazování samoopravných procesů v polymerech (van der Kooij a kol. 2017), k pokusu o sestrojení kvalitativní taxonomie listů rostlin na základě jejich vitality (Ansari a kol. 2018), ke zkoumání reakcí hlístic na tepelný stres (O'Callaghan a kol. 2018) a na stres chemikáliemi (O'Callaghan a kol. 2019), nebo v neposlední řadě k nepřímé detekci obsahu vody v semenech dřeviny *Moringa oleifera* (Silva a kol. 2020).

Přes výše uvedené široké aplikace koherenční zrnitosti v biologickém světě, její souvislost s fyziologickými i biochemickými jevy byla dosud popsána velmi neurčitě bez podpory odpovídajících experimentů jinými metodami. Oulamara a kol. (1989) popisují tzv. biologickou aktivitu (BA) rostlinných materiálů jako důsledek dvou vnitrobuněčných pohybů: kontinuálního pomalého pohybu chloroplastů a amyloplastů v cytoplazmě a náhodného rychlého pohybu minerálů v buněčných vakuolách. Tyto pohyby závisí na teplotě, intenzitě dopadajícího světla a na okolním elektrickém poli. Rychlosti pohybů částic dosahují hodnot 1 - 1000  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ . Autoři nicméně nevyvinuli metodu k separování příspěvků jednotlivých pohybů k celkové BA. Zhao a kol. (1997) považují BA za prostředek k detekci vitality a stárnutí rostlin. Zdůrazňují přitom, že snímanou BA kriticky ovlivňuje místo, ve kterém je měření prováděno. BA má odrážet metabolismus a průtoky živin ve vénách botanických vzorků, nicméně autoři přiznávají, že přesná povaha tohoto vztahu je složitá a nepochopená. Zatímco v lidských cévách se částice pohybují především jedním směrem, u botanických vzorků na každém zvoleném místě probíhá pohyb v náhodných směrech a s velmi širokým rozsahem rychlostí. Braga a kol. (2009) poukazují na vztah BA k procesům jako buněčný růst, dělení buněk ale také k vnitrobuněčným procesům jako například pohyby organel a cytoplasmy nebo biochemické reakce. Kurenda a kol. (2010) tvrdí, že BA měřená v jablku je zřejmě důsledkem biochemických metabolických procesů, zatímco fyzikální jevy jako Brownův pohyb nebo difúze mohou být detekovatelné pomocí KZ až při teplotách nižších než 10 °C. Zdunek a kol. (2014) konstatují, že BA koreluje s fyziologickými změnami během zrání a vývoje rostlin a s defekty a nemocemi.

### 2.3.1 Koherenční zrnitost při měření účinků stresu, kolonizace, či k taxonomickému zařazení rostlin

Jedna z aplikací koherenční zrnitosti v posledních letech je hodnocení vlivu různých typů biotických a abiotických stresů na botanické vzorky.

Thilakarathne a kol. (2014) se zaměřují na expozici japonské rýže cv. *Koshihikari* troposférickému ozónu ( $O_3$ ). Nadměrná expozice ozónu vyvolává oxidativní poškození listů rostlin, neboť ozón se v apoplastu rozpadá za vzniku buňkám nebezpečných reaktivních forem kyslíku (superoxidový radikál, peroxid vodíku, hydroxidový radikál). Autoři byli schopni ukázat souvislost mezi objemem ozónu v prostředí vzorku a změnami ve struktuře koherenční zrnitosti, které popsali směrodatnou odchylkou. U rostlin v prostředí o koncentraci ozónu  $240 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$  nabývaly ihned po expozici měřené směrodatné odchylky nižších hodnot, než u vzorků v prostředí o koncentraci ozónu  $120 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$ , a také výrazně nižších hodnot než u vzorků bez expozice (viz obr. 1).

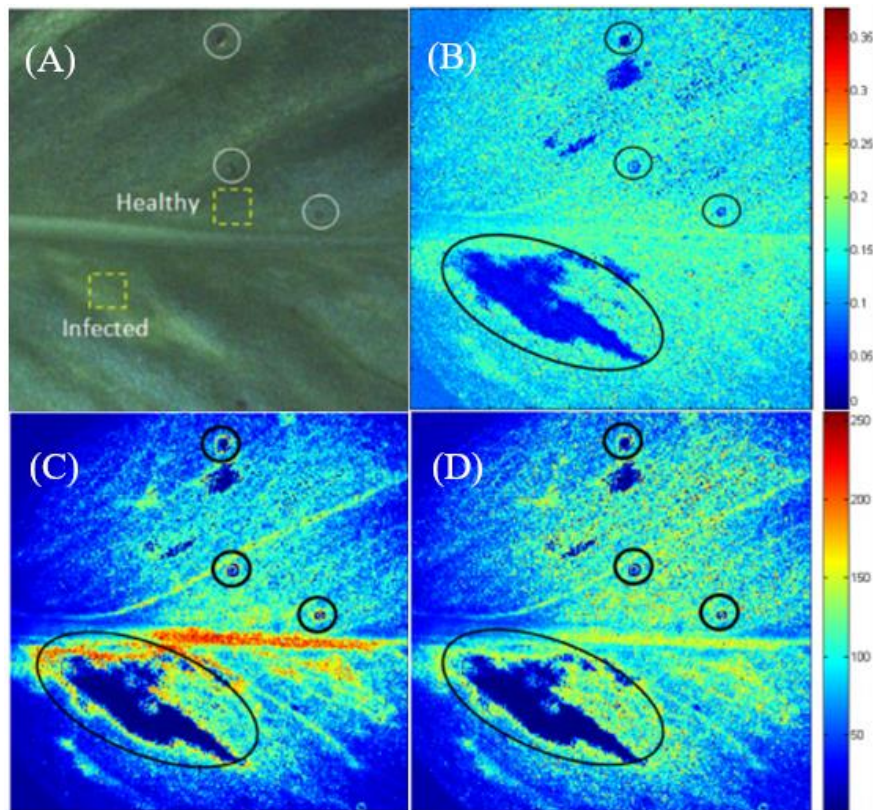


**Obr. 1** Expozice rýže cv. *Koshihikari* troposférickému ozónu: vertikální osa představuje průměrné směrodatné odchylky ve struktuře koherenční zrnitosti, na horizontální ose je čas. Rýže byla vystavena koncentraci ozónu  $0 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$  (černě),  $120 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$  (zeleně) a  $240 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$  (červeně). Během každého dne bylo pořízeno měření před- (první sloupec), během- (druhý sloupec) expozice ozónu a po- (třetí sloupec) uvolnění ozónu z prostředí rostliny. Byla sledována schopnost vzorku regenerovat po opakovaném vystavení pletiva ozónu během tří po sobě následujících dnů (modifikováno z Thilakarathne a kol. 2014).



Tento trend využili autoři k vyvození závěru, že směrodatné odchylky ze struktur koherenční zrnitosti odráží míru vitality rýže *Koshihikari*. Z naměřených dat vyplynulo, že zatímco při expozici rostlin ozónu v koncentraci  $120 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$  byly listy během následujících dnů schopny částečné regenerace, při koncentraci ozónu  $240 \text{ nl}\cdot\text{l}^{-1}$  byla již poškození listů nevratná. Thilakarathne a kol. (2014) tímto demonstrují potenciál koherenční zrnitosti pro užití v zemědělství za účelem zvýšení kvality i kvantity výnosů zemědělských plodin.

Také Ansari a kol. (2018) využili koherenční zrnitost jako nástroj k hodnocení vitality listů s cílem rozlišit zdravé oblasti listových pletiv od oblastí nakažených infekcí. Listy některých bylin jsou v lékařství uplatňovány k léčbě chorob, nicméně kontaminace listů viry nebo mikroorganismy (plísňe, bakterie) snižují jejich kvalitu a mohou vést dokonce k neblahým účinkům na lidské tělo. Ansari a kol. (2018) oddělili listy dvou různých rostlin (*Plumeria rubra* a *Epipremnum aureum*) od mateřské rostliny a snímali je kamerou. Jako ukazatele vitality vzorků použili dříve popsané obrazové analýzy Fujii, LASCA a GD (viz kapitola 2.2) a numerický index *im*. Ansari a kol. (2018) byli nicméně schopni s využitím dříve zmíněných obrazových analýz spolehlivě mapovat infekce v listech *Epipremnum aureum* (viz obr. 2). Místa napadená mikroorganismy se ve výsledcích LASCA, GD i Fujii projevovala jako zřetelné skvrny, snadno rozlišitelné od okolního pletiva.

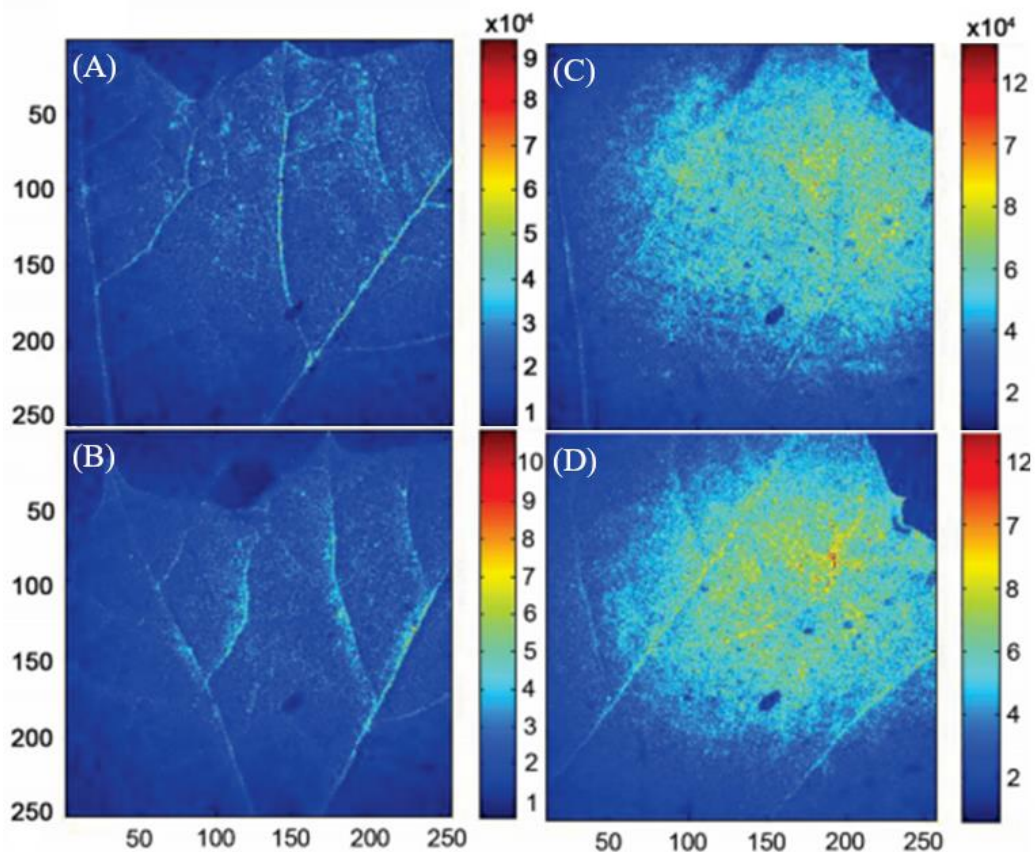


**Obr. 2** Mapy struktury KZ v listu *Epipremnum aureum*: (A) fotografie listu s vyznačením zdravých a infikovaných (kolonizovaných) ploch, (B) obrazová analýza LASCA, (C) obrazová analýza Fujii, (D) obrazová analýza GD. Barevná stupnice odráží hodnoty BA. Modrá barva odráží nízkou úroveň pohybu v pletivu, červená barva představuje vysokou úroveň pohybu v pletivu (modifikováno z Ansari a kol. 2018).

Navíc, pro oddělené listy různých druhů rostlin byly naměřeny různé hodnoty indexu *im*, což autoři vnímají jako vodítko pro možnost sestavení kvalitativní taxonomie listů na základě jejich charakteristických hodnot *im*. Také bylo zjištěno, že po oddělení listu od rostliny probíhá v listech řada fyziologických dějů, které bezpochyby mají vliv také na snímanou strukturu koherenční zrnitosti (viz kapitola 2.3). Dále jsou známy závislosti kinetiky změn ve struktuře koherenční zrnitosti na teplotě (Kurenda a kol. 2010) a vlnové délce osvětlení (Briers 1975). Zůstává tak otázkou, do jaké míry může mít na měřený index *im* vliv nejen druhové zařazení snímaného listu, ale výše zmíněné faktory. Pro taxonomické účely by proto bylo nutné měřit KZ na neoddělených listech a za naprosto stejných experimentálních podmínek.

Koherenční zrnitost představuje důležitý nástroj pro vizualizaci a pochopení složitých interakcí v mikrobiomu. Například D’Jonsiles a kol. (2020) se soustředili na ovlivnění vitality rostlin endofyty (bakterie, sinice, houby). Porovnávali přitom strukturu KZ listů rostlin kolonizovaných endofyty se strukturou KZ listů bez endofytů.

Ke kvantifikaci KZ využili autoři modifikovanou metodu GD. Pro přípravu vzorků bez endofytů byl využit průhledný octan, který zabraňuje kolonizaci (listová kolonizace endofyty je přirozený proces). Výsledkem opakovaného monitorování KZ pro oba typy listů byla obecně rozsáhlejší změna struktury KZ na listech s endofyty (viz obr. 3). Autoři proto tvrdí, že existuje jasný vztah mezi endofytickou kolonizací listů a změnou struktury KZ. U kolonizovaných i nekolonizovaných dřevin *Jaropha curcas* se stejnými podmínkami pěstování byly později navíc statisticky prokázány rozdíly z hlediska některých parametrů biomasy (hmotnost sušiny, obsah a transport vody) a některých parametrů růstu (délka kořenů) ve prospěch kolonizovaných rostlin. Potvrdil se tedy již dříve vyslovený závěr o tom, že kolonizace rostlin endofyty má kladný vliv na jejich vitalitu (Arnold a kol. 2003).



**Obr. 3** Struktura KZ listů bez endofytů (A, B) a listů kolonizovaných endofyty (C, D) obdržena pomocí modifikované obrazové analýzy GD (modifikováno z D'Jonsiles a kol. 2020). Modrá barva odráží nízkou úroveň pohybu v pletivu, červená barva představuje vysokou úroveň pohybu v pletivu.

### 2.3.2 Stres rostlin a pohyby chloroplastů

Vědomi si významného vlivu pohybu chloroplastů na propustnost listů, rozhodli jsme se prvotně zabývat efektem pohybu chloroplastů na pozorovanou strukturu KZ. Považujeme proto za důležité zde stručně popsat uspořádání a pohyby chloroplastů v rostlinné buňce.

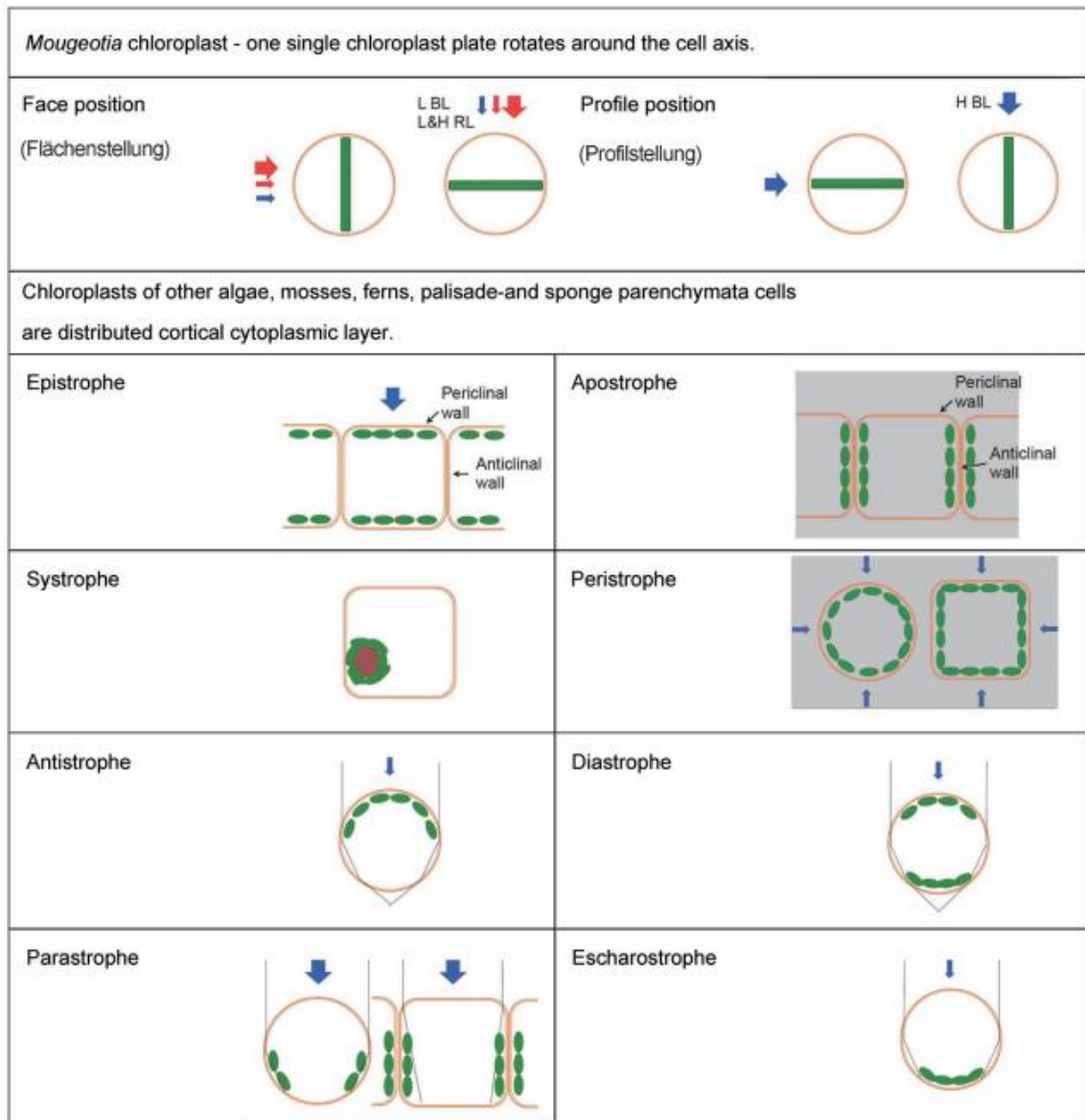
#### 2.3.2.1 Uspořádání chloroplastů v rostlinné buňce

Prvním, kdo systematicky popsal uspořádání chloroplastů v rostlinné buňce, byl Gustav Senn (1908). Senn provedl experimenty měření indexu lomu a relativní tloušťky buněčné stěny, jejichž závěrem se stal přesný popis prostupu světla živými rostlinnými buňkami. Došel tak k závěru, že rozdělení a orientace chloroplastů jsou dány intracelulární distribucí světla.

Jako první klasifikoval Senn (1908) akumulaci chloroplastů v různých rostlinných druzích (*Mougeotia*, *Vaucheria*, *Chromulina*, *Elleosphaera*, *Funaria*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*). Poté navíc sestrojil další klasifikaci, ve které rozdělil orientace chloroplastů mechů, kapradin, jätrovek a řas z hlediska fyzikálních charakteristik dopadajícího světla (intenzity, vlnové délky, intracelulární distribuce světla). Pojmenoval tak celkem deset různých orientací a lokalizací chloroplastů v buňce. Orientace plochy chloroplastů kolmo k dopadajícímu světlu nese název čelní pozice (angl. „*Face position*“) a orientace plochy chloroplastů rovnoběžně se světlem je boční pozice (angl. „*Profile position*“, viz obr. 4). Čelní pozice chloroplastů lze obecně pozorovat ve tmě, ale také při ozáření červeným světlem libovolné intenzity. Pohyb chloroplastů do boční pozice je u vyšších rostlin indukován výhradně modrým světlem, pouze u některých nižších rostlin (*Physcomitrella patens*, *Adiantum capillus*) byl objeven také vliv červeného světla. (Kong a kol. 2012, Kong a Wada 2014). Trojan a Gabrys (1996) uvádí, že také pulzní osvětlení modrým světlem vyvolává odpověď, během které se chloroplasty přesunou z uspořádání v čelní pozici do uspořádání v boční pozici. Důvodem pohybu chloroplastů je podle Kasahara a kol. (2004) regulace využití světla v listu a ochrana fotosyntetického aparátu před fotoinhibicí. Bylo prokázáno, že mutanti s defektem pohybu chloroplastů jsou náchylnější k světelnému poškození fotosystému II.

Senn lokalizace chloroplastů shrnul následovně (viz obr. 4): (1) Epistrophe – při osvětlení střední a nízké intenzity se chloroplasty shromažďují u periklinálních stěn. (2) Apostrophe – chloroplasty se akumulují při tlumeném osvětlení nebo ve tmě

na vnitřním povrchu antiklinálních buněčných stěn. (3) Systrophe – chloroplasty při silném osvětlení obklopují buněčné jádro (často pozorováno u leukoplastů rozsivek). (4) Peristrophe – při tlumeném osvětlení nebo ve tmě jsou chloroplasty pravidelně rozloženy v celé kortikální cytoplazmatické vrstvě. (5) Antistrophe – všechny nebo většina chloroplastů se shromažďují v kortikální cytoplazmatické vrstvě nejbližší k místu zdroje ozáření. Často pozorováno u houbovitého parenchymu, jestliže palisádový parenchym už značně tlumí dopadající světlo. (6) Diastrophe – chloroplasty se akumulují na stranách blízké a vzdálené od zdroje světla. Pozorováno často v epidermálních listových buňkách plovoucích vodních rostlin. (7) Parastrophe – pod silným osvětlením unikají chloroplasty z horních a dolních periklinálních stěn a migrují směrem do zastíněné oblasti antiklinálních stěn. (8) Escharostrophe – chloroplasty se hromadí na straně nejdále od zdroje ozáření. Pozorováno u buněk jeskynního mechu *Schistostega*. Chloroplasty v tomto uspořádání dobře odrážejí dopadající záření a ozařují pozorovatele jiskřivým světlem stejné barvy, jako má chloroplast. U mechu *Schistostega* je to zelená barva, například u řasy *Chromulina* mají chloroplasty žlutou barvu.



**Obr. 4** Přehled lokalizací chloroplastů v rostlinných buňkách. Schémata orientací chloroplastů jsou zobrazena v pravých částech příslušných boxů (převzato z Kataoka 2014).

Kataoka (2014) dále uvádí, že daný typ buňky je obecně schopen přijmout pouze dvě nebo tři z výše uvedených uspořádání chloroplastů. Konkrétní uspořádání, které buňky využívají, závisí na světelných podmínkách prostředí, ve kterém se organismus nachází.

### 2.3.2.2 Mechanismus pohybu chloroplastů

Chloroplasty jsou jedinečnými organelami v rostlinných buňkách, které mnohdy reagují na vnější vlivy prostředí změnou svého intracelulárního umístění. Správná umístění a pohyby chloroplastů jsou nezbytné pro správný růst a vývoj rostlin (Suetsugu a Wada 2008). Přemístění chloroplastů na konkrétní pozice v buňce závisí kromě jiného na samotném buněčném prostředí, především na počtu a velikosti chloroplastů v buňce (Senn 1908, Zurzycki 1980). Rozsáhlé pokroky ve výzkumu v posledních letech umožnily identifikovat a charakterizovat nové komponenty ovládající pohyb chloroplastů, včetně receptorů modrého světla, fototropinů a proteinu CHUP1 vázajícího aktin a spojeného s pohyby chloroplastů (Kong a Wada 2014).

Za nejběžnější vnější podnět pro pohyby chloroplastů je považována intenzita osvětlení. Pohyb chloroplastů vyvolaný světlem se vyskytuje obecně od řas po semenné rostliny (Haupt 1999). U některých řas jako například *Mougeotia scalaris* a *Mesotaenium caldariorum*, jejichž buňky jsou typické jediným plochým chloroplastem, dochází podle intenzity osvětlení k rotování chloroplastu. Čelní plochá strana chloroplastu se přitom orientuje směrem ke světlu nízké intenzity, zatímco boční strana chloroplastu s mnohem menším povrchem se orientuje směrem ke světlu vysoké intenzity. U rostlin, jejichž buňky obsahují více chloroplastů menších rozměrů, dochází typicky ke shromažďování chloroplastů v některé části buňky. Pro maximalizaci zachycení světla využívaného ve fotosyntéze se chloroplasty na slabém světle pohybují směrem ke zdroji světla, což má za následek jejich akumulaci podél periklinální stěny. V rámci ochrany před poškozením vysoce intenzivním zářením se chloroplasty naopak hromadí podél antiklinálních buněčných stěn. Ve tmě se umístění chloroplastů u různých rostlinných druhů liší.

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* se většina chloroplastů ve tmě nachází při periklinální stěně, ale například v buňkách kapradiny *Adiantum capillus-veneris* jsou chloroplasty ve tmě rozmístěny náhodně (Sato a kol. 1999).

Senn ukázal, že pohyb chloroplastů není způsoben pohyby jádra a cytoplazmy, ale je důsledkem aktivních mechanismů. Za pohyby chloroplastů rostlin jsou odpovědné tzv. fototropiny (Kong a kol. 2012). Fototropiny jsou Ser/Thr proteinové kinázy (Briggs a Christie 2002; Nakasako a kol. 2008) reagující na modrou a UVA oblast světelného spektra (Banerjee a Batschauer 2005). Skládají se ze dvou prostetických molekul FMN a 900-1000 zbytků aminokyselin (Briggs a Christie 2002; Nakasako a kol. 2008). Ve vyšších rostlinách byly objeveny dva druhy fototropinů (viz obr. 5): fototropin 1



(phot 1) a fototropin 2 (phot 2). Oba hrají roli při regulacích pohybů chloroplastů. Phot1 aktivuje akumulární pohyb chloroplastů při modrém světle nízké intenzity ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), zatímco phot 2 aktivuje únikové pohyby chloroplastů vyvolané intenzivním modrým světlem ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Sakai a kol. 2001). Většina fototropinů je v rostlinné buňce lokalizována podél plazmatické membrány, bylo však zjištěno, že při konkrétních reakcích na světlo může docházet k jejich přesunu buď do cytoplazmy, anebo do blízkosti Golgiho aparátu (Kong a Wada 2014). Primární roli ve funkci fototropinů hrají jejich domény LOV (LOV1, LOV2, z angl. light oxygen and voltage). Ty vytvářejí vazebné místo pro nekovalentní vazbu FMN 15 chromoforů, které zajišťují jejich fotochemickou aktivitu. Signál z aktivovaných LOV2 domén je dále intramolekulárně přenášen na C-kinázovou doménu a na další komponenty fototropinové dráhy, regulující mimo jiné relokace aktinových vláken, avšak jejich přesná biochemická funkce dosud nebyla plně objasněna (Crosson a Moffat 2001; Nakasako a kol. 2008).



**Obr. 5** Schéma struktury fototropinů (phot1 a phot2) modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Měřítko udává délku řetězce ze sta aminokyselin (modifikováno z Briggs a Christie 2002).

Důležitou roli v zajišťování pohybů chloroplastů v buňce, potažmo ve fixování jejich polohy, hrají specifická tzv. cp-aktinová vlákna, která se od aktinových vláken přítomných v cytoplazmě liší tvarem, délkou a regulačními mechanismy (Kadota a kol. 2009; Kong a Wada 2014). Pozice cp-aktinových vláken vůči vnější membráně chloroplastu obecně určuje směr, kterým se chloroplasty budou pohybovat. Vlivem ozáření intenzivním modrým světlem se cp-aktinová vlákna rychle depolymerizují a akumulují se na neozářené straně chloroplastu, což má za následek únikový pohyb chloroplastů. Naopak ozáření modrým světlem nízké intenzity způsobuje akumulaci cp-aktinových vláken na straně přilehlé ke světlu. Rychlost přeskupování cp-aktinových vláken závisí na intenzitě ozáření. (Kong a kol. 2013). U některých nižších rostlin (např. mech *Physcomitrella patens*), však byly pozorovány také pohyby chloroplastů podél mikrotubulů (Sato a kol. 2003).



### 2.3.2.3 Pohyby chloroplastů a vliv teploty

Pohyby chloroplastů byly studovány u mnoha rostlin, zejména v souvislosti se světelnými signály. Chloroplasty jsou však vysoce citlivé také na tepelný stres, který ovlivňuje různé fotosyntetické procesy včetně biosyntézy chlorofylu, fotochemických reakcí, transportu elektronů a asimilace CO<sub>2</sub> (Hu a kol. 2020). Teplota je proto zásadním faktorem pro vývoj a funkční výkon fotosyntetického aparátu rostlin (Ivanov a kol. 2017). Dopady teploty prostředí na pohyby chloroplastů studovali například Walczak a Gabrys (1980), kteří zjistili, že přemísťování chloroplastů v listech voděnky *Tradescentia* a zběhovce *Ajuga* bylo změnami teploty prostředí silně ovlivněno. Při nižších teplotách (5 °C) se obecně zvyšovala citlivost chloroplastů na světlo v porovnání s vyššími teplotami (20 °C), ve kterých byly reakce chloroplastů méně výrazné. K podobným závěrům došli také Frolec a kol. (2010), kteří zkoumali vliv teplotního stresu na pohyby chloroplastů v listech tabáku *Nicotiana tabacum* (L.) cv. *Samsun* pomocí měření kolimované transmitance. Pohyby chloroplastů byly monitorovány v segmentech listů, ve kterých byl předem skokově nebo postupně aplikován stres zahřátím na různé koncové teploty (25 - 45 °C) a zchlazení zpět na teplotu místnosti. Pro zahřívání na teploty od 40 °C docházelo dokonce k výrazným inhibicím pohybů chloroplastů. Kodama a kol. (2008) ukázali, že chloroplasty kapradiny *Adiantum capillus-veneris* reagují na různé teploty prostředí různým způsobem uspořádání. Zatímco za nízkých teplot (4 °C) se chloroplasty shromažďují u buněčných stěn rovnoběžných se směrem světelného záření, při vyšších teplotách (25 °C) zaujímají naopak uspořádání podél buněčných stěn kolmých k dopadajícímu svazku. Holzinger a kol. (2007) využili teplotní komoru se zabudovaným světelným mikroskopem k postupnému zahřívání listů modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* a současnému zkoumání změn v mikroskopické struktuře plastidů. Bylo zjištěno, že při teplotách nad 35 °C dochází u chloroplastů *Arabidopsis thaliana* k tvorbě dynamických tubulárních struktur na povrchu vnější membrány chloroplastů známých jako tzv. stromuly.

Je známo, že po lokálním stresu rostlin popálením může být zachycena změna některých fyziologických parametrů (elektrický povrchový potenciál, míra transpirace, rychlost fotosyntézy, stomatální vodivost) i ve vzdáleném listu (Hlaváčková a kol. 2006), či v nestresovaných oblastech stejného listu. Již Augustynowicz a kol. (2001) však vyvolali pohyb chloroplastů v izolovaných protoplastech tabáku pouze světlem. Byly tak implicitně vyloučeny potenciální signální dráhy, které by mohly plošně regulovat pohyby

chloroplastů na vyšší než lokální úrovni. To potvrdila později také měření Nauš a kol. (2008), kteří nezaznamenali žádné systémové odezvy v pohybech chloroplastů jako reakci na lokální popálení tabáku *Nicotiana tabacum* (L.) cv. *Samsun*. Zůstává tak aktuální hypotéza uvedena v Tlačka a kol. (1999), že každá buňka nejspíše obsahuje vlastní signalizační systém podílející se na pohybu chloroplastů.

#### 2.3.2.4 Další faktory ovlivňující pohyby chloroplastů

Mimo intenzitu osvětlení a změny teploty byla nicméně v minulých letech pozorována také celá řada jiných vnějších faktorů prostředí, stimulujících přemísťování chloroplastů. Kupříkladu se jedná o mechanický impuls (Sato a kol. 1999, Sato a kol. 2003), ponoření (Mommer a kol. 2005), vodní stres (Kondo a kol. 2004), chemikálie (Tazawa a kol. 1991), bakteriální elicitory (Boccaro a kol. 2007). Charakteristická umístění chloroplastů v různých organismech, jako například mech *Funaria hygrometrica*, rozsívka *Striatella unipunctata*, okřehek *Lemna trisulca* a fazol *Phaseolus vulgaris* ukázal již Senn (1908).

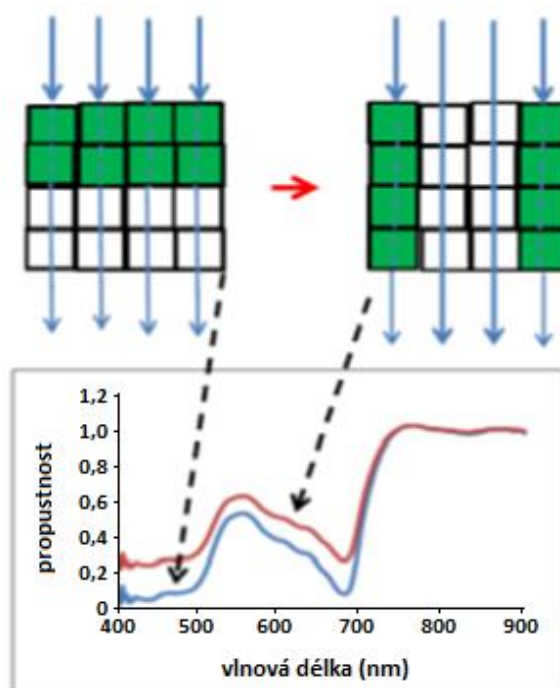
Reakce na mechanický impuls je u různých druhů rostlin různá. Její podstatu u konkrétních modelových rostlin ukázal Sato a kol. (1999). Dotyk rostlinné buňky mikrokapilárou aktivuje regulační reakci, která zahrnuje charakteristické pohyby chloroplastů. Zatímco například u kapradiny *Adiantum capillus-veneris* tato reakce znamená přesun chloroplastů směrem od místa dotyku, například u mechu *Physcomitrella patens* se naopak chloroplasty akumulují v blízkosti dotčené oblasti. Bylo zjištěno, že tyto navzájem protichůdné reakce mají pravděpodobně různou regulaci (Sato a kol. 2003). Zatímco chloroplasty *Adiantum capillus-veneris* se při odpovědi na mechanický stres pohybují pouze podél aktinových vláken a jejich pohyb je přitom pomalejší (cca  $0,5 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ), chloroplasty *Physcomitrella patens* se následkem mechanického impulsu pohybují podél mikrotubulů a jejich pohyb je rychlejší (cca  $2,5 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Oba typy reakce nastávají přibližně do 30 min po mechanickém impulsu. Bylo ukázáno, že při odpovědi na mechanické stresování rostlinných buněk roste koncentrace vápenatých iontů v cytosolu. Sato a kol. (2003) tvrdí, že koncentrace externího  $\text{Ca}^{2+}$  je hlavním determinantem mechanoregulace chloroplastů. Zatímco u pohybů chloroplastů vyvolaných světlem zaujímají chloroplasty zjevně polohu optimální pro fotosyntézu, důvody pro konkrétní regulační změny v souvislosti s mechanickými stimuly jsou dosud neznámé.

Pohyb chloroplastů jako reakce rostlin na umístění do nepřírodných podmínek lze pozorovat také při ponoření rostlin do vody. Mommer a kol. (2005) ukázali, že chloroplasty suchozemských rostlin se ve vodě akumulují podél antiklinálních stěn. Tento jev je v přímém kontrastu s chováním vodních rostlin, jejichž chloroplasty se pod vodou naopak akumulují u periklinální buněčné stěny. Důvodem je podle autorů rozdílný průchod  $\text{CO}_2$ . Zatímco pro suchozemské rostliny je typický průchod  $\text{CO}_2$  mezibuněčnými prostory k chloroplastu, ve vodních listech naopak  $\text{CO}_2$  typicky difunduje přes kutikulu a pokožku. Umístění chloroplastů je tedy nejspíše ovlivněno i dostupností  $\text{CO}_2$ .

Vodní stres je jedním z faktorů, které zesilují poškození rostlin vlivem intenzivního osvětlení. Kondo a kol. (2004) ukázali, že v listech vysušených rostlin dochází k akumulaci chloroplastů do klastrů, jejichž umístění a počet se v různých rostlinných druzích může lišit. Opakovaně bylo pozorováno umístění buněčných jader uvnitř vzniklých chloroplastových klastrů a zároveň také umístění mitochondrií vně klastrů. Je známo, že shlukování chloroplastů má vliv na změnu optických vlastností rostlinné buňky, jako jsou absorptance, odrazivost a propustnost. Podrobnější odbornou interpretaci výsledků však autoři bohužel neuvádí.

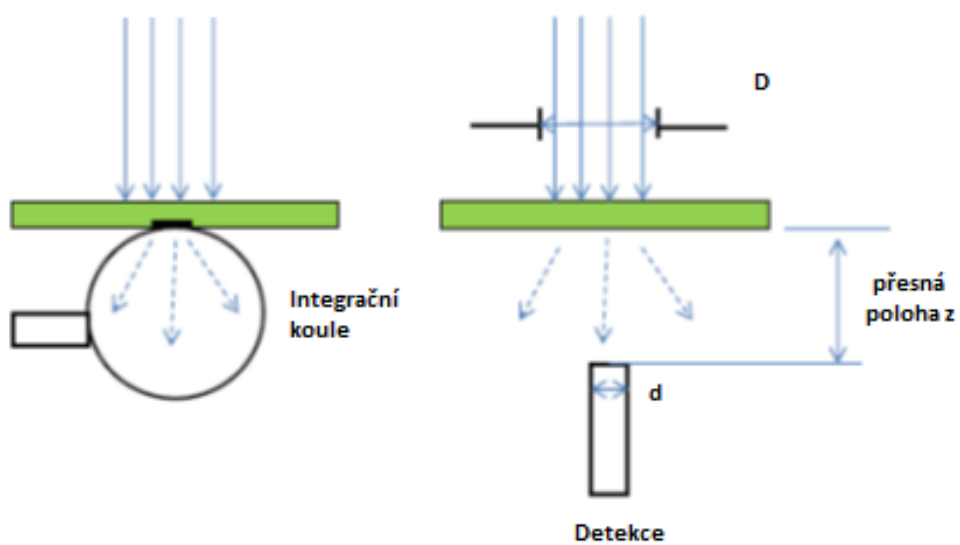
#### 2.3.2.5 Princip měření pohybu chloroplastů

Při osvětlení pletiva listu kolmo k jeho povrchu se mění celková propustnost světla listem v závislosti na okamžitém uspořádání chloroplastů v buňkách listu. Z výše uvedeného popisu možných uspořádání chloroplastů je zřejmé, že v čelním uspořádání (viz obr. 6 vlevo nahoře) chloroplasty stojí v cestě mnohem větší části dopadajících paprsků, než v boční pozici (viz obr. 6 vpravo nahoře), kdy část světelných paprsků prochází buňkou mimo chloroplasty. Měřením změn v propustnosti (transmitanci) listového pletiva lze tedy v reálném čase nepřímou detekovat pohyby chloroplastů z čelní pozice do boční pozice a naopak. Relativní změny v propustnosti rostlinné tkáně jsou výrazné v modré oblasti spektra, při vlnové délce 436 nm (Nauš a kol. 2010, Frolec a kol. 2010).



**Obr. 6** Souvislost uspořádání chloroplastů v buňkách a křivek spektrální propustnosti. Na obrázku **vlevo nahoře** je schéma uspořádání chloroplastů (zelené čtverečky) v tzv. čelní pozici, **vpravo nahoře** v tzv. boční pozici. Modré šipky značí kolmý dopad světla na měřený vzorek. Na obrázku **dole** jsou vyobrazeny křivky spektrální propustnosti, jejichž závislost na uspořádání chloroplastů během měření je naznačena černými šipkami. (modifikováno z PEMFR 2016).

V souvislosti s měřením propustnosti světla rostlinnou tkání jsou rozlišeny kolimovaná a difúzní transmitance (viz obr. 7). Zatímco kolimovaná transmitance bývá detekována pomocí spektrálního radiometru pouze ve směru osvětlení pod měřeným listem a detekována je tedy pouze část prošlého záření, difúzní transmitance je detekována pomocí tzv. integrační koule, speciálně technicky uzpůsobené k záchytu světla v celém poloprostoru za listem. Měřená kolimovaná transmitance závisí na geometrických parametrech uspořádání aparatury (vzdálenost světlovodu od listu, průměr světlovodu, průměr světelného svazku).



**Obr. 7** Schéma měřících aparatur pro snímání difúzní (**vlevo**) a kolimované (**vpravo**) transmittance (modifikováno z PEMFR 2016).

### 3. CÍL PRÁCE

1. Zpracování rešerše na dané téma, tj. koherenční zrnitost v biologii, pohyb chloroplastů.
2. Měření časového vývoje strukturních změn v intaktním listu rostliny rajčete pomocí jevu koherenční zrnitost vzniklého po průchodu světelného svazku tímto listem.
3. Sledování strukturních a optických změn v listu v souvislosti s pohyby chloroplastů. Korelace propustnosti listů se změnou struktury koherenční zrnitosti.
4. Vyhodnocení propustnosti listu pomocí přístrojů ThorLabs PM400 vybaveným čidlem výkonu S130C a SpectraPen SP-100 a vyhodnocení strukturních změn v listu pomocí obrazové metody AVG během pohybu chloroplastů.
5. Pozorování změn struktury koherenční zrnitosti v listu rostliny rajčete před a po vystavení špičky měřeného listu vysoké teplotě.
6. Vyhodnocení strukturních změn v listu po lokálním vystavení vysoké teplotě pomocí vybraných obrazových metod a vzájemné srovnání výsledků získaných dvěma zvolenými metodami v definovaných oblastech zájmu na listu.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Rostlinný materiál

Rostliny rajčete *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. *Moneymaker* (viz obr. 8) byly vypěstovány ve fytokomoře Percival typu AR 100L3, USA. Fytokomora, nacházející se na Katedře biofyziky UP, měla nastavený denní a noční režim. Kvantová ozáření ve výšce rostlin při denním režimu činila  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , v nočním režimu byla ve fytokomoře tma. Denní režim fytokomory probíhal v každém dni po dobu 16 hod, mezi 6:00 a 22:00, noční režim probíhal v časech 22:00 – 6:00. Během denního i nočního režimu byla ve fytokomoře teplota  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  a relativní vlhkost vzduchu 60 %. Protože naše měření byla časově náročná, bylo nutné provést hned 7 výsevů rostlin. První výsev proběhl 14. 10. 2019, druhý výsev 20. 4. 2020, třetí výsev 6. 8. 2020, čtvrtý výsev 21. 9. 2020, pátý výsev 18. 12. 2020, šestý výsev 5. 1. 2021 a sedmý výsev 21. 9. 2021. Zatímco prvních pět výsevů sloužilo na testování funkčnosti sestavené měřicí aparatury pro ostré experimenty ve Společné laboratoři optiky UP a FZÚ AV ČR a pilotní měření, měření s rostlinami z posledních dvou výsevů již byla reprezentativní a jsou uvedena v diplomové práci.



**Obr. 8** Fotografie vypěstované rostliny rajčete *Lycopersicon esculentum* připravené k následnému měření. Uvedeno měřítko.

Substrát byl sterilizován při teplotě 70 °C po dobu 45 min. Před samotným vysetím semen byl nejprve zchlazen a zvlhčen. Při každém výsevu bylo do připraveného substrátu vyseto 15 – 30 semen rajčete. Během růstu byly rostliny dvakrát do týdne zalévány a jedenkrát týdně hnojeny hnojivem Kristalon Start (Agro CS a. s., Říkov, Česká republika). V ostrých experimentech jsme používali přibližně 6 týdnů staré rostliny rajčete s plně vyvinutými zdravými listy. Použité rostliny byly vysoké přibližně 20 – 25 cm.

## 4.2 Postup měření a vyhodnocení dat

Při měření je nežádoucí především jakékoli vystavení měřené rostliny parazitnímu světlu, neboť tak může dojít ke zkreslení naměřených dat. Také je nežádoucí jakýkoli pohyb měřeného vzorku v průběhu měření (v rádech  $\mu\text{m}$ ). Tomu bylo zamezeno jak uchycením rostliny do již dříve navrženého fixujícího systému na antivibračním stole (Pechník 2019), tak krytím měřicí aparatury ochranným obalem z mohutné folie, který zabraňoval rozpořívování měřeného vzorku důsledkem proudění vzduchu v laboratoři.

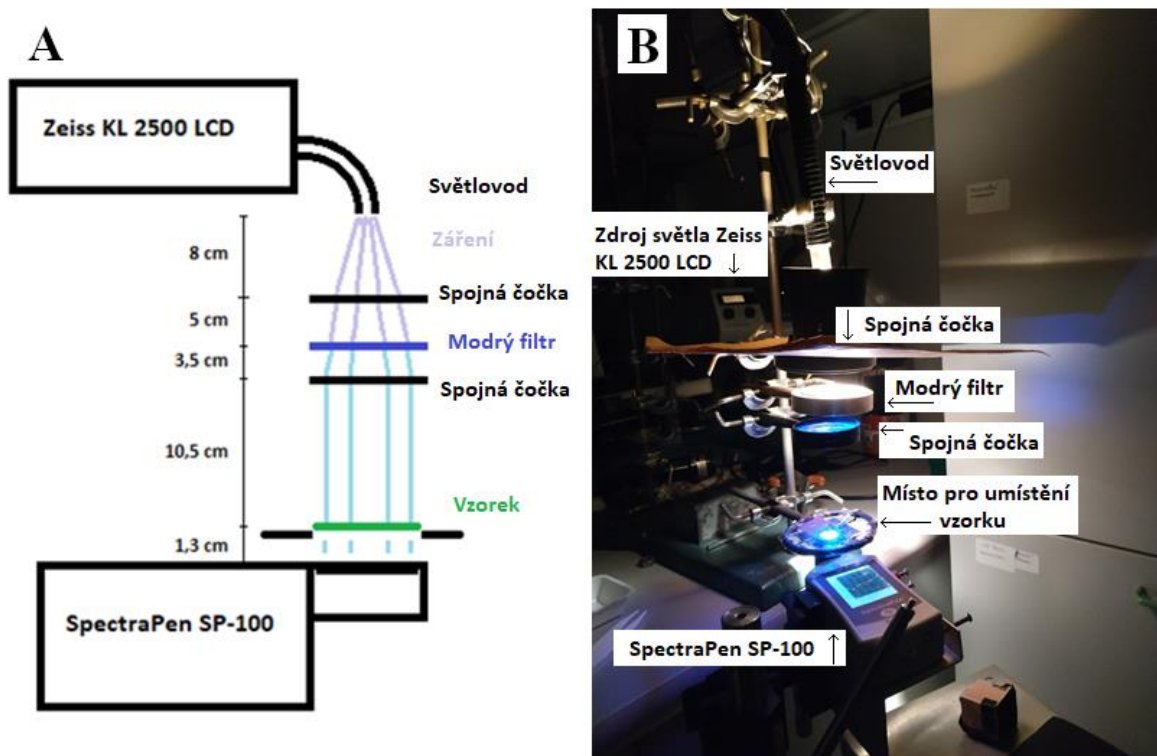
### 4.2.1 Pilotní experiment

V rámci přípravy ostrých experimentů byla nejprve provedena pilotní měření, ve kterých byly monitorovány přechody chloroplastů mezi jejich dvěma krajními pozicemi. Pohyby chloroplastů byly vyhodnocovány na základě měření propustnosti listů pro světlo o vlnové délce  $\lambda = 436 \text{ nm}$ . Účelem měření bylo posoudit časový horizont, ve kterém se dá očekávat plný přesun chloroplastů mezi oběma krajními pozicemi. Během měření o celkové délce 130 min byly nejprve intaktní listy po dobu 60 min vystaveny působení modrého světla o intenzitě  $123 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a následně byly po dobu 70 min umístěny do tmy. Po uplynutí každých deseti minut měření byl list krátkodobě (do 10 s) ozářen modrým světlem o intenzitě  $340 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a byla zaznamenána hodnota okamžité intenzity světla při vlnové délce  $\lambda = 436 \text{ nm}$  prošlého listem v kolimovaném směru (k detekci byl použit přístroj SpectraPen SP-100). Hodnoty propustnosti byly dále vyčísleny jako podíly naměřených okamžitých intenzit světla prošlého listem hodnotou intenzity světla změřené v nepřítomnosti listu.



#### 4.2.1.1 Aparatura pro pilotní experiment

Pilotní experiment byl realizován v laboratoři Katedry biofyziky UP. K jeho realizaci byla využita měřicí sestava složená ze zdroje světla Zeiss KL 2500 LCD (Carl Zeiss s. r. o., Praha, Česká republika), jehož studené světlo bylo přivedeno světlovodem nad vzorek. Mezi vývod světlovodu a vzorek byl dále umístěn modrý filtr a optická soustava pro kolimaci světelného svazku ze světlovodu tvořená dvěma spojnými čočkami. Takto přivedené kolimované záření dopadalo na vzorek v kolmém směru. V poloprostoru za vzorkem byla v kolmém směru detekována kolimovaná transmittance přístrojem SpectraPen SP-100. Schéma je uvedeno níže (viz obr. 9).



**Obr. 9** Schéma měřicí aparatury pro pilotní experiment (A), fotografie měřicí aparatury pro pilotní experiment (B). A: Osa udává vzdálenosti mezi jednotlivými prvky aparatury. B: Záření ze zdroje (Zeiss KL 2500 LCD) je vyvedeno světlovodem nad vzorek. Paprsky záření dále prochází soustavou dvou kolimačních čoček a skrze modrý filtr až na vzorek. Rovnoběžně se vzorkem (listem) je do aparatury umístěn detektor (SpectraPen SP-100), jehož detekční plocha snímá vzorkem propuštěné paprsky záření v kolimovaném směru. Pilotní experiment byl realizován na pracovišti Katedry biofyziky UP.

## 4.2.2 Ostré experimenty

### 4.2.2.1 Souvislost změn ve struktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů

V rámci prvního experimentu jsme provedli celkem 12 plnohodnotných měření závislostí změn měřených struktur KZ na stimulovaných přesunech chloroplastů v rostlinných buňkách. Každá z měřených rostlin rajčete byla nejprve před vlastním měřením umístěna na 60 min do úplné tmy. Tak bylo zajištěno, že výchozí pozice chloroplastů v každé z měřených rostlin bude čelní pozice. Na začátku každého měření byla rostlina nejprve umístěna do měřicího prostoru. List byl zafixován v měřicím prostoru pomocí hliníkové podložky a papírového rámečku, který zabraňoval průchodu nežádoucích paprsků světla v důsledku ohybů světla na okrajích listu.

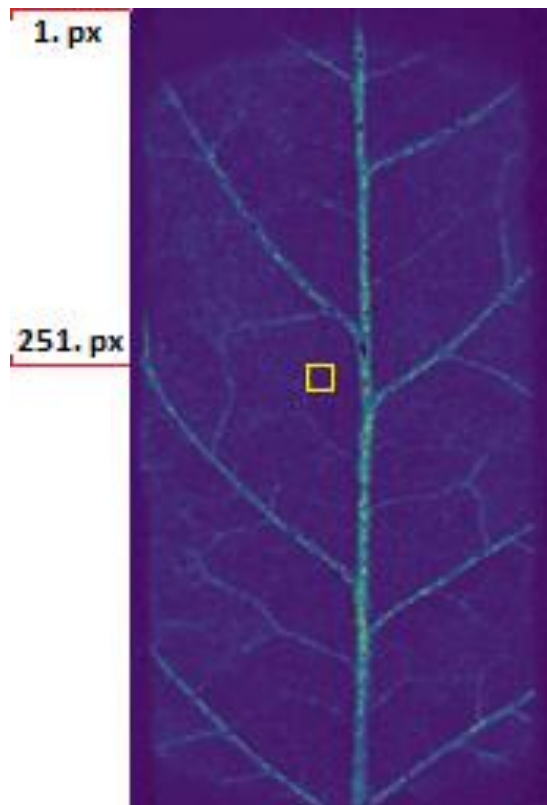
Byla odebrána clona světlu červené laserové diody, která ve výchozím uspořádání bránila proniknutí červeného světla na vzorek. Průchod červeného světelného svazku kolmo listem měřené rostliny zapříčinil vznik jevu koherenční zrnitosti v poloprostoru za měřeným listem. Během první minuty každého měření byla CMOS kamerou pořízena jedna série 30 snímků struktury koherenční zrnitosti (osvětlení vzorku červenou laserovou diodou po dobu 1 min, dále jen I1). Chloroplasty vzorku byly v této době v čelní pozici. Po uplynutí 2 min od začátku měření bylo světlo červené laserové diody zasloučeno a namísto něj bylo na vzorek nasměrováno modré světlo pomocí zrcátka na otočném rameni. Takto byl zahájen další interval měření v délce 60 min (dále jen I2), během kterého byl pomocí přístroje ThorLabs PM400 vybaveného čidlem výkonu S130C (Thorlabs Inc., New Jersey, USA) průběžně snímán výkon prošlého svazku modrého světla vzorkem v kolmém směru. Frekvence zapisování hodnot přístrojem ThorLabs při průběžném snímání výkonu prošlého svazku modrého světla činila 1 Hz. Osvětlení modrým světlem vybudilo pohyb chloroplastů vzorku během I2 z čelní pozice do boční pozice.

Po uplynutí 62 min od začátku měření (na konci I2) bylo světlo procházející modrým filtrem vypnuto a čidlo výkonu ThorLabs bylo umístěno mimo měřicí prostor. Po uplynutí 65 min od začátku měření (3 min po ukončení I2) byla opět odebrána clona světlu červené laserové diody a znovu tak byl v poloprostoru za měřeným listem vygenerován jev koherenční zrnitosti. Takto byl zahájen další interval měření v délce 60 min (dále jen I3), během kterého byla CMOS kamerou každou minutu pořizována jedna série 30 snímků struktur koherenční zrnitosti. Nepřítomnost stimulace modrým světlem způsobovala během I3 návrat chloroplastů vzorku z boční pozice zpět do čelní

pozice (v laboratoři byla během měření úplná tma, výkon červeného svazku použitého pro generování koherenční zrnitosti byl zanedbatelný, pohyboval se v řádu  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Po uplynutí 125 min od začátku měření (na konci I3) bylo ukončeno snímání sérií snímků struktur koherenční zrnitosti. Světlo červené laserové diody bylo znovu zcloněno a namísto něj bylo na vzorek naposledy nasměrováno modré světlo pomocí zrcátka na otočném rameni.

Po uplynutí 126 min od začátku měření byl zahájen poslední interval měření, tj. průběžné snímání výkonu prošlého svazku modrého světla vzorkem v délce 1 min pomocí čidla ThorLabs (dále označeno jako interval I4). Celková doba trvání každého reprodukovatelného měření činila 127 minut. Mezi jednotlivými snímky byl, v každé z pořízených sérií snímků struktur koherenční zrnitosti v rámci technických možností použitého počítače (PC) a s ohledem na pozorovatelnost struktur koherenční zrnitosti, volen interval 130 ms. Snímky struktury koherenční zrnitosti ze všech dvanácti provedených měření jsme nakonec analyzovali s použitím software ImageJ obrazovou metodou AVG (viz kap. 2.2.2).

Analýzu souvislostí změn ve sktruktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů provázela skutečnost, že struktura biologického materiálu vzorku použitého pro experiment je značně opticky heterogenní (především v porovnání optických vlastností žilnatiny a mezofylu listu). Z tohoto důvodu byla ve snímcích struktur koherenční zrnitosti zvolena přibližně opticky homogenní oblast zájmu o velikosti  $20 \times 20$  px (pixelů, viz obr. 10). Pro každý soubor snímků struktur koherenční zrnitosti ( $584 \times 568$  px) z jednoho měření začínal levý horní roh zvolené oblasti zájmu 251 px od horního okraje snímku. Horizontální umístění oblasti zájmu ve snímcích struktur koherenční zrnitosti bylo pro každé měření voleno tak, aby oblast zájmu nezasahovala do žilnatin vzorků a aby tak byla zajištěna co největší optická homogenita analyzované části pletiva.



**Obr. 10** Oblast zájmu (viz **žlutý čtverec**) zvolená ve snímcích struktury koherenční zrnitosti ( $584 \times 568$  px) pro účel analýzy souvislostí změn ve struktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů. První (horní) řádek oblasti zájmu (žlutý čtverec) byl pro všechna měření umístěn 251 px od horního okraje snímků struktur koherenční zrnitosti. Horizontální umístění oblasti zájmu bylo voleno pro každý list jinak, vždy s ohledem na rozmístění žilnatiny v pletivu konkrétního listu, s účelem zaměření opticky homogenní části pletiva k následné analýze.

Průměrné hodnoty z pořízených snímků struktur KZ jsou dále označeny jako průměrná struktura KZ (PSKZ). Tyto hodnoty byly obdrženy analýzou každé z pořízených sérií snímků struktur KZ metodou AVG a poté průměrem všech hodnot náležících oblasti zájmu ve výsledném snímku.

Abychom získali představu o strukturálních změnách, které se udály během jednotlivých intervalů měření ve vzorcích, byly vypočteny procentuální rozdíly mezi krajními hodnotami intervalů I2, I3 a středními hodnotami z odpovídajících krátkých intervalů I1, I4 v délce 1 min. Kupříkladu procentuální nárůst výkonu prošlého modrého světla vzorkem v 1. polovině měření (mezi počáteční a koncovou hodnotou I2) reprezentuje strukturální změny vzorku během 60 min ozařování svazkem modrého světla (pohyb chloroplastů z čelní do boční pozice). Hodnoty procentuálního poklesu průměrné struktury KZ v 2. polovině měření (mezi počáteční a konečnou hodnotou I3) reprezentují strukturální změny vzorku během jeho umístění do tmy po dobu 60 min (velmi slabé

červené světlo) po předchozím vybuzení chloroplastů vzorku do boční pozice (pohyb chloroplastů z boční do čelní pozice).

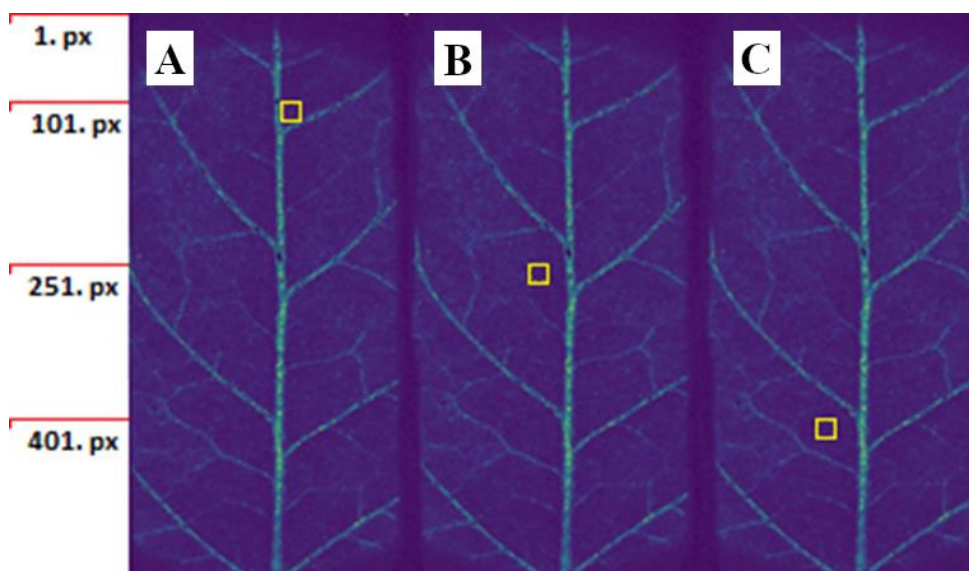
#### 4.2.2.2 Změna struktury koherenční zrnitosti listu po lokálním vysokoteplotním stresu

V rámci druhého experimentu jsme provedli celkem 7 plnohodnotných měření reakcí intaktních listů rajčete na vysokoteplotní stres. Měření zahrnovala pořízení 171 sérií struktur koherenční zrnitosti během celkové doby měření 170 min. První série snímků struktur koherenční zrnitosti byla pořizována vždy bezprostředně po uchycení listu rostliny do upevňovacího systému měřicí aparatury a každá následující série byla pořizována 1 min po sérii předchozí. Frekvence snímání struktur koherenční zrnitosti v rámci jednotlivých sérií zůstala od předchozího experimentu zachována (viz kap. 4.2.2.1). V rámci každého reprodukovatelného měření byl proveden lokální teplotní stres špičky listu měřené rostliny (dále jen LTS) po uplynutí 70 min od začátku měření (bezprostředně po pořízení 71. série snímků struktur koherenční zrnitosti). LTS byl realizován přiložením předem nahřátého (250 °C) topného tělesa na otočném rameni do blízkosti špičky měřeného listu po dobu 45 s. Vertikální vzdálenost mezi povrchem topného tělesa a plochou listu byla 1 mm. Popálené místo bylo vzdálené 3,7 cm od středu sledované oblasti listu ozářené svazkem červené laserové diody. Pro ukončení LTS bylo žhavení topného tělesa vypnuto a pomocí otočného ramena bylo topné těleso odstaveno mimo měřicí prostor. Bylo tedy pořízeno 71 sérií snímků struktury koherenční zrnitosti před LTS, a dále po LTS následovalo pořízení dalších 100 sérií snímků struktury koherenční zrnitosti. Díky dříve provedeným měřením pohybů chloroplastů při umístění rostliny do tmy nám bylo známo, že prvních 70 min měření ve tmě před LTS stačí k tomu, aby se chloroplasty rostlin přesunuly do pozice čelní. Protože navíc LTS pohyby chloroplastů nejspíše inhibuje (Frolec a kol. 2010), výsledky druhého experimentu zřejmě nemohou být ovlivněny pohyby chloroplastů.

Snímky struktury koherenční zrnitosti z takto zaznamenaných 7 měření jsme dále analyzovali s použitím software GNU Octave hned šesti obrazovými metodami: LASCA, FUJII, AVD, GD, IM, MHI (Braga 2009, Ansari a kol. 2016b), a dále také s použitím software ImageJ metodami průměrného snímku (AVG) a směrodatné odchylky (STD, viz kap. 2.2.2). Ze všech těchto metod byly nakonec vybrány dvě (GD a AVG) které jsme využili k detailní analýze reakcí měřených rostlin na tepelný stres z hlediska strukturních změn v různě zvolených konkrétních oblastech listů. Metoda AVG byla

vybrána, protože jako jediná z představených metod odráží propustnost vzorku na rozdíl od ostatních metod, které jsou principem založeny na porovnávání snímků v sérii mezi sebou prostřednictvím operace odečítání. Metoda GD byla ze zbylých metod vybrána náhodně, s ohledem na kvalitu kontrastu ve výsledných snímcích.

Při analýze metodou GD jsme opět vycházeli z metodiky již popsané v kap. 4.2.2.1, kdy jsme ve snímcích struktur koherenční zrnitosti jako oblast zájmu vždy volili přibližně opticky homogenní část mezofylu o velikosti  $20 \times 20$  px (pixelů). Protože u lokálních vysokoteplotních stresů živých vzorků lze očekávat možnou závislost strukturních změn vzorků na vzdálenostech od místa popálení, rozhodli jsme se v rámci tohoto experimentu soustředit nejen na jednu, ale hned na tři oblasti zájmu, které byly pro tento účel zvoleny v různých vzdálenostech od místa popálení (viz obr. 11). Horní řádky zvolených  $20 \times 20$  px oblastí zájmu (vyznačené čtverce) byly ve snímcích struktur KZ umístěny ve vzdálenosti 101 px, 251 px (tato oblast zájmu svým umístěním přesně odpovídá oblasti zvolené pro předchozí experiment, viz kap. 4.2.2.1) a 401 px od horního okraje snímků. Takto zvolené tři oblasti zájmu o velikosti  $20 \times 20$  px dále sloužily pro analýzu změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu metodou GD. Horizontální umístění oblastí zájmu ve snímcích struktur KZ bylo opět pro každý list voleno různě a záviselo na rozmístění žilnatiny konkrétního listu.

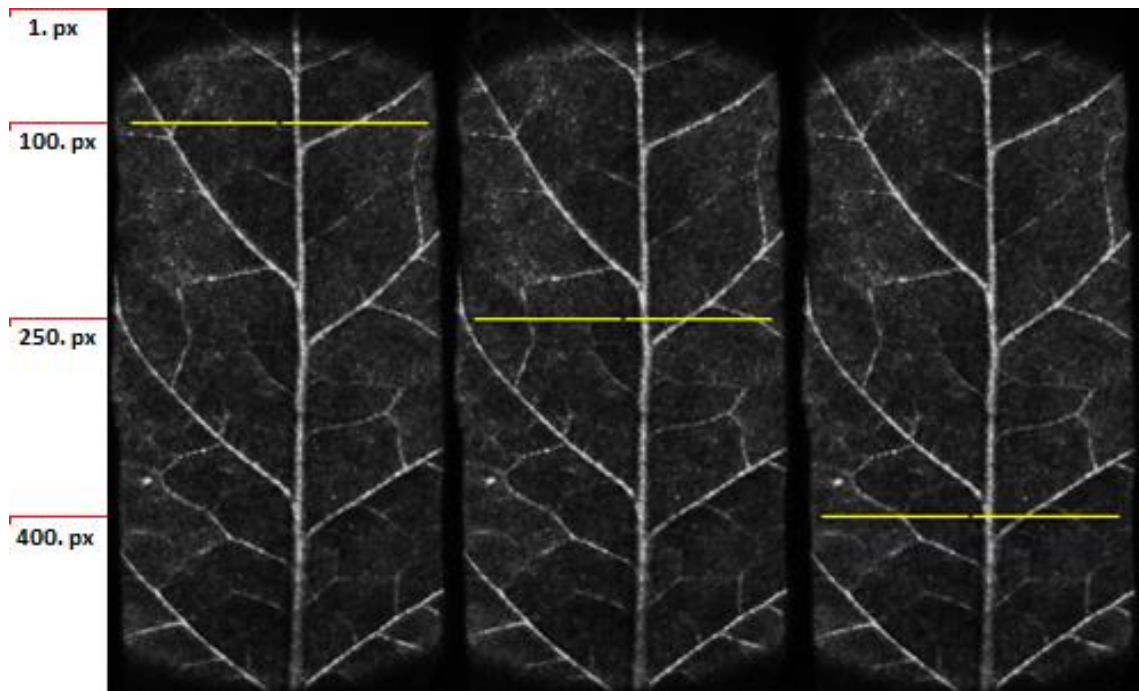


**Obr. 11** Snímky struktur koherenční zrnitosti ( $584 \times 568$  px) se zvolenými oblastmi zájmu (viz žluté čtverce, **A**, **B**, **C**) pro metodu GD k analýze změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu. Všechny oblasti zájmu mají rozměry  $20 \times 20$  px. V **levé** části obrázku je oblast zájmu volená 101 px od horních okrajů snímků struktur KZ, v **prostřední** části obrázku je oblast zájmu volená 251 px od horních okrajů snímků skstruktur KZ, v **pravé** části obrázku je oblast zájmu volená 401 px od horních okrajů snímků skstruktur KZ. Horizontální umístění oblastí zájmu bylo voleno pro každý list jinak, s ohledem na lokaci žilnatiny v pletivu.

Analýza měření obrazovou metodou GD spočívala nejprve ve vypočtení jednoho výsledného snímku pro každou z pořízených sérií snímků struktur KZ metodou GD. Takto bylo v rámci každého měření pro všech 171 sérií snímků struktur KZ vypočteno 171 výsledných snímků. Výsledné snímky vypočtené metodou GD charakterizují změny struktury KZ během doby pořizování příslušné série snímků struktur KZ. Dále jsme se ve výsledných snímcích zaměřili na zvolené oblasti zájmu (viz výše). Ze všech digitálních hodnot, které ve výsledných snímcích náležely dané oblasti zájmu, byla pro každý výsledný snímek a každou oblast zájmu vypočtena průměrná hodnota (průměrná změna struktury koherenční zrnitosti v dané oblasti – dále jen hodnoty PZSKZ). Každá hodnota PZSKZ charakterizuje míru strukturních změn vzorku proběhlých v rámci jedné oblasti zájmu během doby pořizování jedné série snímků struktur KZ. Byly sestrojeny grafy závislosti hodnot PZSKZ na čase pro každou ze zvolených oblastí zájmu.

Druhou metodou vybranou k analýze změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu byla metoda AVG. Výsledný snímek metody AVG však na rozdíl od ostatních obrazových analýz nenese informaci o změnách ve struktuře KZ během času pořízení příslušné série, ale pouze o průměrném stavu struktury KZ během této doby. Změny ve struktuře KZ byly tedy metodou AVG analyzovány porovnáním výsledných snímků mezi sebou. K tomuto účelu byly zvoleny oblasti zájmu v podobě řádků o rozměrech  $230 \times 1$  px (viz obr. 12). Oblasti zájmu byly ve snímcích struktur KZ umístěny ve vzdálenosti 100 px, 250 px a 400 px od horního okraje snímků.





**Obr. 12** Snímky struktur koherenční zrnitosti se zvolenými oblastmi zájmu (viz **žluté úsečky**) použitých k analýze změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu metodou AVG. Všechny oblasti zájmu mají rozměry  $230 \times 1$  px. V **levé** části obrázku je oblast zájmu volená 100 px od horních okrajů snímků struktur KZ, v **prostřední** části obrázku je oblast zájmu volená 250 px od horních okrajů snímků skstruktur KZ, v **pravé** části obrázku je oblast zájmu volená 400 px od horních okrajů snímků skstruktur KZ. Horizontální umístění oblastí zájmu bylo pro každé měření voleno stejně.

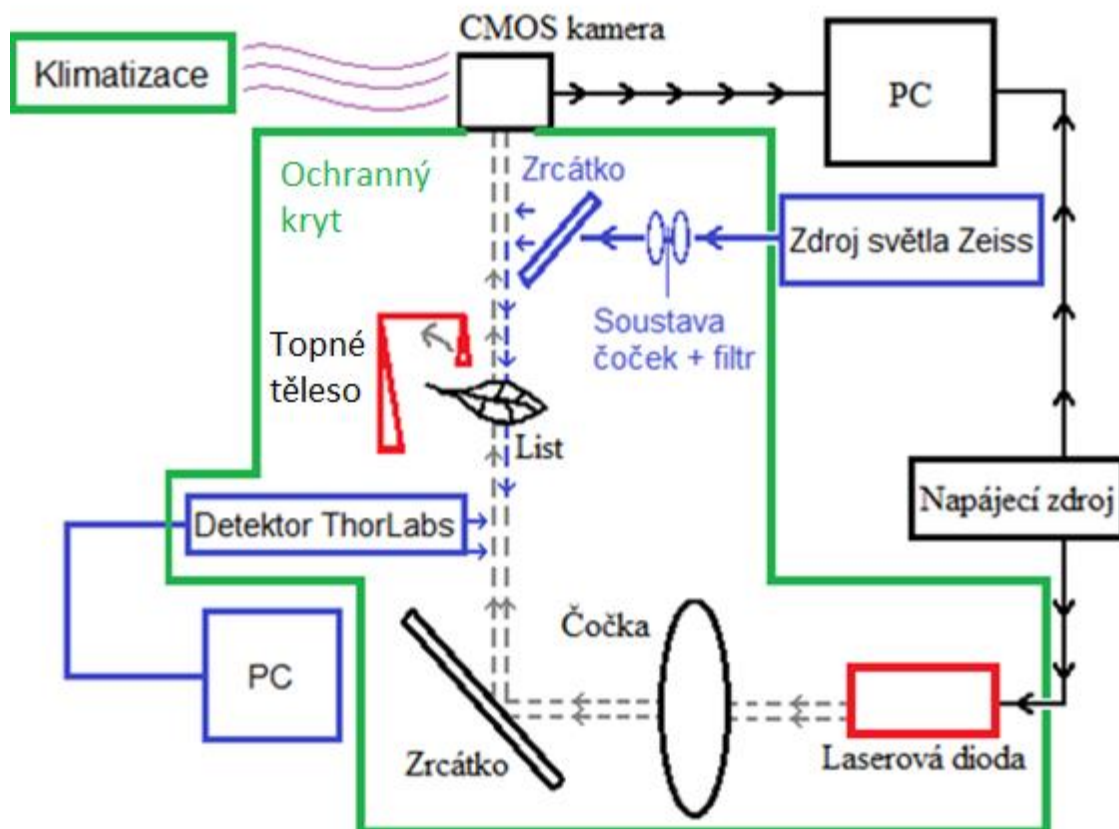
Analýza měření obrazovou metodou AVG nejprve probíhala analogicky výše uvedenému postupu pro metodu GD: metodou AVG byl vypočten vždy jeden výsledný snímek pro každou ze 171 pořízených sérií snímků struktur KZ. Výsledné snímky vypočtené metodou AVG však ukazují pouze průměrné struktury KZ během doby pořizování příslušné série snímků struktur KZ. Všechny 171 výsledných snímků bylo mezi sebou porovnáno z hlediska událostí na zvolených oblastech zájmu. Pro každou oblast zájmu byla vytvořena tzv. mapa THSP (z angl. time history speckle pattern, viz kap. 2.2.1), jejíž principem je postupné seřazení dat z příslušné oblasti zájmu na výsledných snímcích pod sebe. První (horní) řádek jedné mapy THSP tedy tvoří data z prvního výsledného snímku, poslední řádek stejné mapy THSP tvoří data z posledního výsledného snímku ze stejné oblasti zájmu.



Jestliže ve vzorku neprobíhají žádné strukturní změny, mapy THSP obsahují pouze sloupce tvořené pixely stejných barev (struktura KZ se na odpovídající oblasti zájmu nemění). Jakékoli strukturní změny ve vzorku během snímání se naopak v mapě projeví jako lokální zrnitost (změna struktury KZ, změna příslušného řádku THSP oproti okolním řádkům).

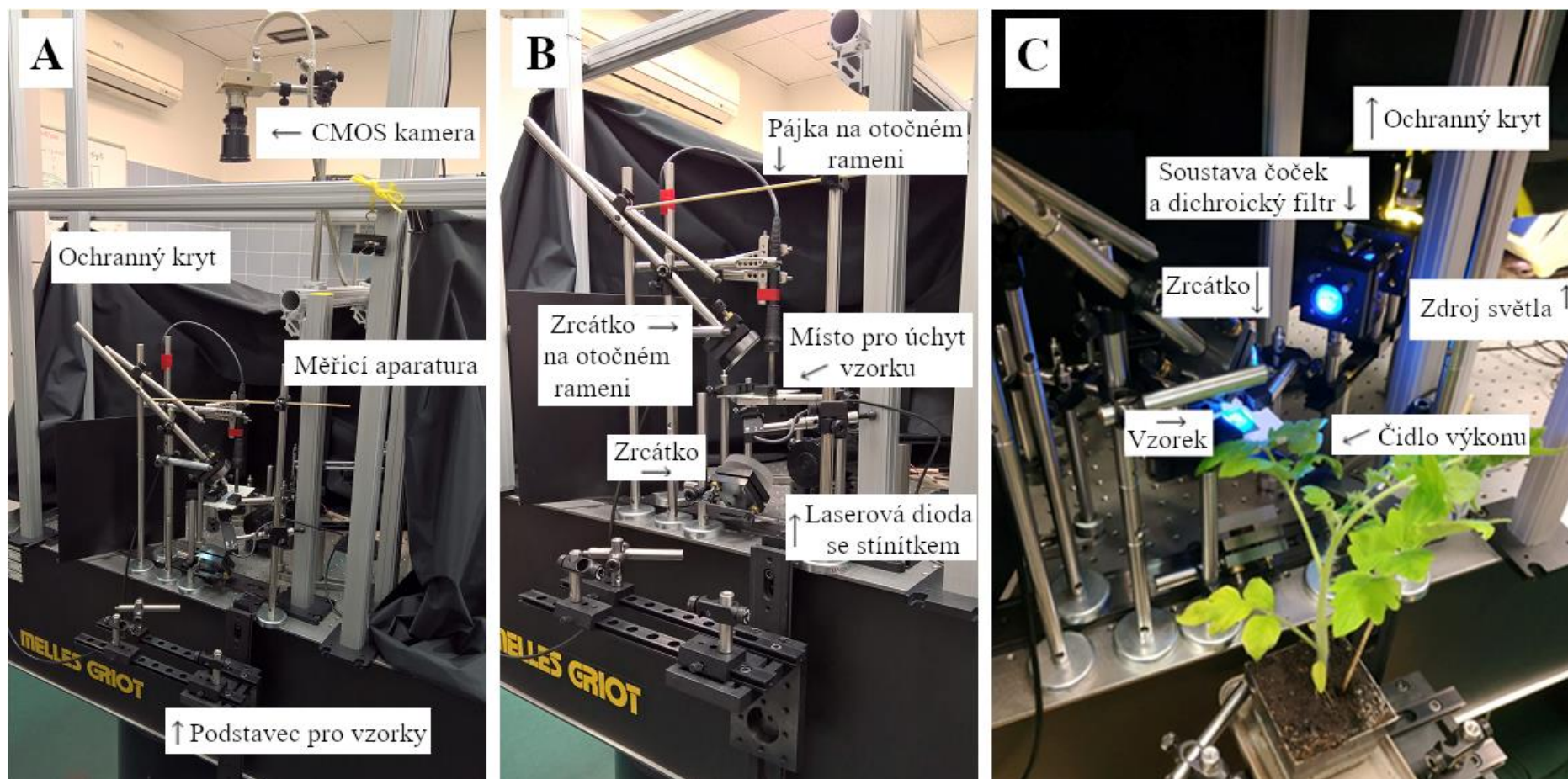
#### 4.2.2.3 Aparatura pro ostré experimenty

K realizaci ostatních experimentů (realizovaných na pracovišti Společné laboratoře optiky UP a FZÚ AV ČR) byla modifikována již dříve navržená měřicí sestava (Pechník 2019), která byla doplněna o klimatizaci místnosti pro regulaci teplotního šumu CMOS kamery (ochlazování místnosti na konstantní teplotu 20 °C) a o ochranný obal k zamezení pohybů listu v důsledku proudění vzduchu v laboratoři. Měřicí sestava (viz obr. 13) rovněž nově obsahovala optickou aparaturu složenou ze zdroje světla Zeiss KL 2500 LCD (Carl Zeiss s. r. o., Praha, Česká republika), dvou bikonvexních čoček a dichroického filtru FD1B umístěného do pozice za první čočkou. Tato nová optická soustava přiváděla na vzorek v kolmém směru modrý kolimovaný svazek světla (spektrum viz Příloha 2) o intenzitě  $130 - 140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . K průběžnému snímání výkonu modrého světla prošlého skrze vzorek v kolmém směru bylo použito detekční čidlo ThorLabs S130C se vzorkovací frekvencí 1 Hz. Pro konkrétní účely experimentů tak bylo možné kdykoli volit mezi přivedením červeného světla z laserové diody na vzorek zároveň se snímáním kamerou, nebo přivedením modrého světla ze zdroje Zeiss KL 2500 (LED s kolimátorem) na vzorek zároveň se snímáním výkonu prošlého světla čidlem ThorLabs S130C. Intenzita červeného světla v úrovni vzorku byla změřena v řádu pouhých  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pro druhý ostrý experiment bylo dále do místa nad vzorkem nainstalováno na otočném rameni topné těleso pájecí stanice Weller PU 81 (Weller s. r. o., Praha, Česká republika) k účelu teplotního stresování experimentálních rostlin. Schéma experimentu je uvedeno níže (viz obr. 13).



**Obr. 13** Schéma experimentu doplněno o nové komponenty (modifikováno z Pechník 2019). Původní komponenty experimentální sestavy jsou zobrazeny **černě**. Doplněná optická sestava k prozařování vzorku modrým světlem včetně detekčních komponent je zobrazena **modře**. **Zeleně** jsou zobrazeny doplněné komponenty, které přímo neinteragují se vzorkem, ale udržují během experimentu žádoucí podmínky v okolním prostředí. **Červeně** je zobrazen zdroj červeného světla (laserová dioda) a topné těleso pájecí stanice sloužící k vysokoteplotnímu stresování vzorku.

CMOS kamera byla řízena komerčním softwarem EPIX XCAP v 2.2, ve kterém byla nastavena velikost celkové snímané plochy na  $584 \times 568$  px (velikost snímků struktur KZ) a expoziční doba 92,709 ms. Zisk snímače kamery (gain) byl nastavován zvlášť pro účely každého experimentu (16 dB pro první experiment, 8 dB pro druhý experiment). Všechny prezentované výsledky odpovídají stupňům šedi s bitovou hloubkou 8 bitů. Během experimentu byly série snímků struktur koherenční zrnitosti ukládány do adresářů v PC a dále byly zpracovávány v softwarech GNU Octave a ImageJ. Zdrojové kódy skriptů jsou uvedeny v sekci Přílohy. Níže jsou prezentovány fotografie měřicí aparatury použité pro ostré experimenty (viz obr. 14).

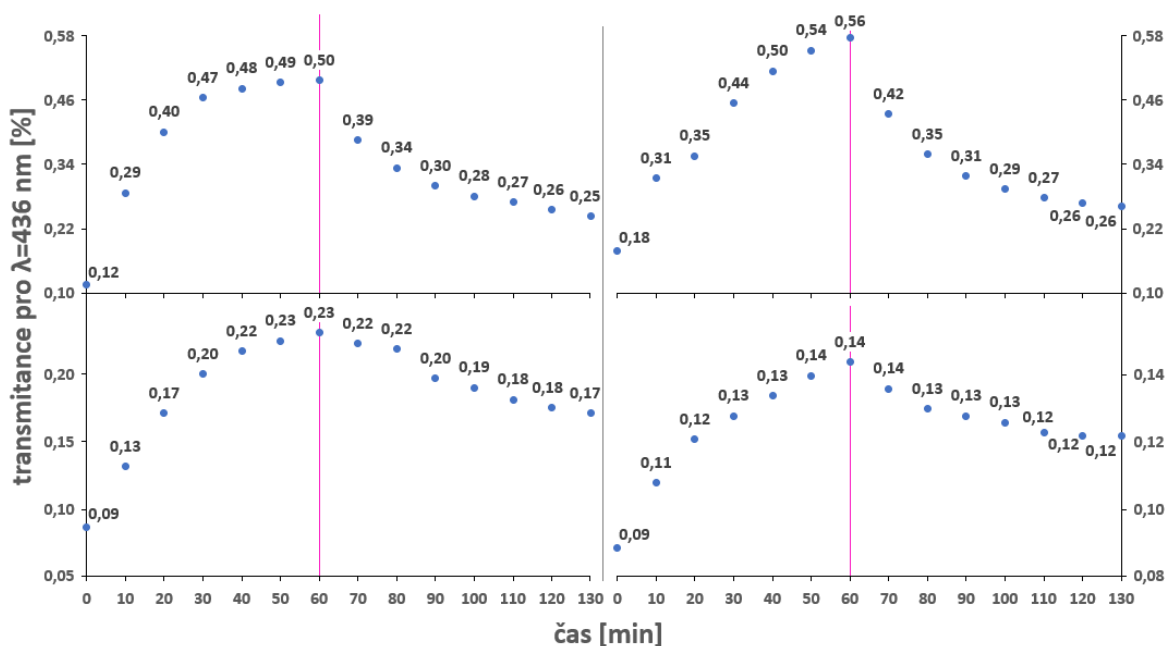


**Obr. 14** Měřicí aparatura pro ostré experimenty (A), bližší pohled na aparaturu pro ostré experimenty (B), část aparatury sloužící ke stimulování pohybu chloroplastů modrým světlem a současnou detekci prošlého modrého světla vzorkem (C). Ostré experimenty byly realizovány na pracovišti Společné laboratoře optiky UP a FZÚ AV ČR.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Pilotní experiment

Přechody chloroplastů mezi jejich dvěma krajními pozicemi, které byly monitorovány v rámci pilotního experimentu, jsou níže prezentovány (viz obr. 15). Provedli jsme celkem čtyři měření, jejichž výsledkem jsou závislosti transmittance vzorku listu pro světlo o vlnové délce  $\lambda = 436$  nm (vertikální osy) na čase (horizontální osy). Odečtení hodnot transmittance probíhalo každých 10 min měření (modré body). Měření bylo rozděleno na dvě fáze: během první fáze v délce 60 min byl vzorek kontinuálně ozařován (oblast nalevo od růžové dělicí čáry), během druhé fáze v délce 70 min byl vzorek ve tmě (oblast napravo od růžové dělicí čáry).



**Obr. 15** Měření pohybu chloroplastů. Grafy zobrazují závislost transmittance při  $\lambda = 436$  nm na čase. **Růžová čára** zvýrazňuje okamžik, kdy bylo zastaveno kontinuální osvětlování listu ( $340 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Hodnoty **před** růžovou čarou vypovídají o nárůstech transmittance při osvětlení listu, během přechodu chloroplastů z pozice čelní do pozice boční. Hodnoty **za** růžovou čarou vypovídají o poklesech transmittance během umístění vzorku ve tmě, během zpětného přechodu chloroplastů z pozice boční do pozice čelní.

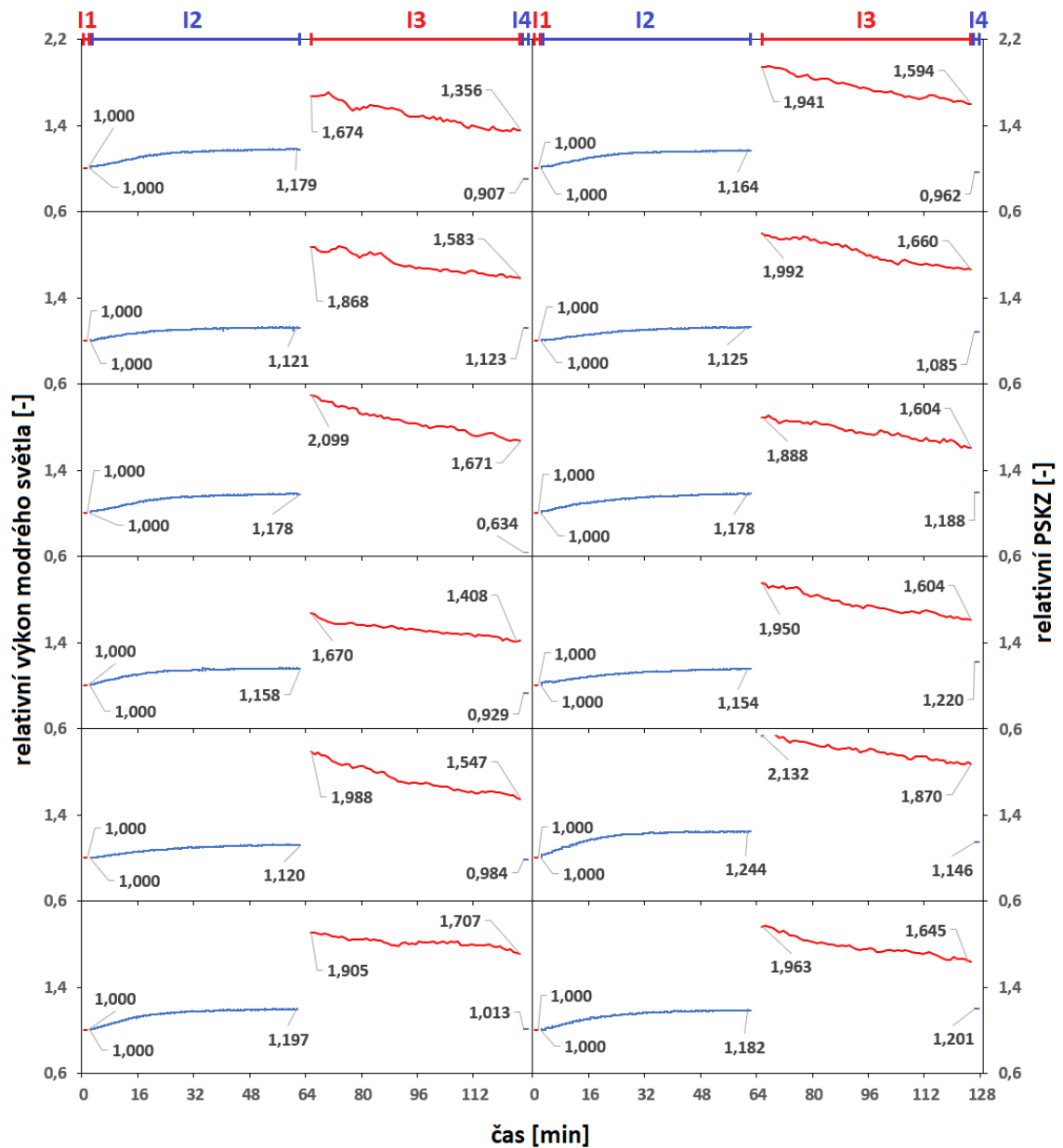
Z výše uvedených výsledků vycházela metodika měření změny struktury KZ vytvořené listem v důsledku pohybu chloroplastů i lokálním vysokoteplotním stresem listu. Tato měření jsou součástí navazujících dvou ostrých experimentů. Na základě

výsledků pilotního experimentu jsme časově rozvrhli oba ostré experimenty. Pro pohyb chloroplastů z jedné pozice do druhé jsme zvolili interval 60 – 70 min. Tepelný stres jsme aplikovali až po 70 min snímání KZ generované listem v naprosté tmě. Takto bylo zabráněno vlivu pohybů chloroplastů na KZ snímanou po popálení rostliny.

## 5.2 Souvislost změn ve struktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů

U všech dvanácti měření prvního ostrého experimentu pozorujeme vzájemně obdobné trendy v závislostech výkonu propuštěného modrého světla a průměrné struktury KZ (PSKZ) na čase (viz obr. 16). Během krátkého intervalu na začátku experimentu I1 v délce 1 min byla u všech měření zaznamenána výrazně nižší hodnota PSKZ než na začátku intervalu I3 (v obr. 16 červeně). Tento výsledek odpovídá očekávání, neboť během krátkého intervalu na začátku měření byly chloroplasty umístěny v čelní pozici a maximalizovaly tak absorpci dopadajícího záření vzorkem. Na začátku I3 byly již chloroplasty umístěny v boční pozici, do kamery proto byla propouštěna větší kvanta záření a hodnoty ve snímaných strukturách KZ oproti předchozímu případu narostly. Výkon prošlého modrého světla vzorkem (v obr. 16 modře) detekován během celého I2 při přechodech chloroplastů z čelní pozice do boční pozice rostl.

Při opačném přechodu chloroplastů z boční pozice zpět do čelní pozice jsme během I3 na zvolené oblasti zájmu zaznamenali s časem klesající hodnoty PSKZ (v obr. 16 červeně). Průměr ze všech hodnot výkonu zaznamenaných během krátkého intervalu I4 v délce 1 min (v obr. 16 modře) měl pro různá měření různý charakter. Pro 8 z 12 měření byly tyto hodnoty nižší než výkon detekovaný na konci intervalu I2, u 4 z 12 měření však byl průměr ze všech hodnot výkonu zaznamenaných během krátkého intervalu v délce 1 min na konci měření vyšší, než hodnota výkonu detekována na konci intervalu I2. Tato diskrepance je nejspíše způsobena stále nehomogenním rozložením chloroplastů po předchozím intervalu I3.



**Obr. 16** Souvislosti změn ve struktuře koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů. **Levá vertikální osa** udává relativní výkon prošlého modrého světla vzorkem. **Pravá vertikální osa** udává relativní hodnoty PSKZ. Data označená v grafech **modrou** barvou jsou detekované relativní hodnoty výkonu prošlého modrého světla vzorkem, data označená **červenou** barvou jsou relativní hodnoty PSKZ. **Vrchní horizontální osa** vyznačuje doby trvání jednotlivých intervalů měření. Čísla jsou v grafech vyznačeny krajní hodnoty těchto intervalů (v případě I1 a I4 je uvedena střední hodnota).

Následující tabulky (viz Tab. 1, Tab. 2) zahrnují kvantifikaci změn ve strukturách vzorků, které se odehrály během jednotlivých intervalů měření. Jsou prezentovány krajní hodnoty dlouhých intervalů měření I2, I3 v délce 60 min a hodnoty reprezentující krátké intervaly měření I1, I4 v délce 1 min (Tab. 1). Pro krátký interval I1 na začátku měření je to PSKZ z jediné pořízené série snímků struktur KZ, pro krátký interval I4 na konci měření je to průměr ze všech hodnot výkonu zaznamenaných během posledního měřicího intervalu. Byly vypočteny procentuální rozdíly těchto hodnot kvantifikující změny PSKZ a změny výkonu prošlého modrého světla pro jednotlivé fáze měření (Tab. 2).

**Tab. 1** Tabulka krajních hodnot jednotlivých intervalů měření u všech 12 rostlin. **První sloupec tabulky** obsahuje pořadová čísla měření. **Druhý sloupec tabulky** obsahuje hodnoty PSKZ (tj. střední hodnoty) naměřené v intervalu I1. **Třetí sloupec tabulky** obsahuje první hodnoty výkonu prošlého modrého světla naměřené v intervalu I2. **Čtvrtý sloupec tabulky** obsahuje poslední hodnoty výkonu prošlého modrého světla naměřené v intervalu I2. **Pátý sloupec tabulky** obsahuje první hodnoty PSKZ naměřené v intervalu I3. **Šestý sloupec tabulky** obsahuje poslední hodnoty PSKZ naměřené v intervalu I3. **Sedmý sloupec tabulky** obsahuje průměrné hodnoty výkonu prošlého modrého světla ze všech hodnot intervalu I4.

Pořadové číslo měření	1. polovina měření I1 + I2			2. polovina měření I3 + I4		
	Střední hodnota	Levá krajní hodnota	Pravá krajní hodnota	Levá krajní hodnota	Pravá krajní hodnota	Střední hodnota
		I1	I2	I2	I3	
1	6,17	0,22	0,26	10,33	8,37	0,20
2	25,11	0,10	0,11	46,91	39,75	0,11
3	17,05	0,22	0,26	35,78	28,48	0,14
4	37,26	0,15	0,17	62,23	52,44	0,14
5	17,00	0,19	0,21	33,71	26,25	0,19
6	45,37	0,20	0,24	86,44	77,46	0,20
7	39,87	0,17	0,20	77,39	63,58	0,16
8	20,40	0,18	0,20	40,63	33,86	0,19
9	24,81	0,16	0,19	46,84	39,80	0,19
10	7,08	0,10	0,12	13,81	11,36	0,12
11	10,38	0,17	0,22	22,13	19,41	0,20
12	13,73	0,17	0,20	26,95	22,58	0,20



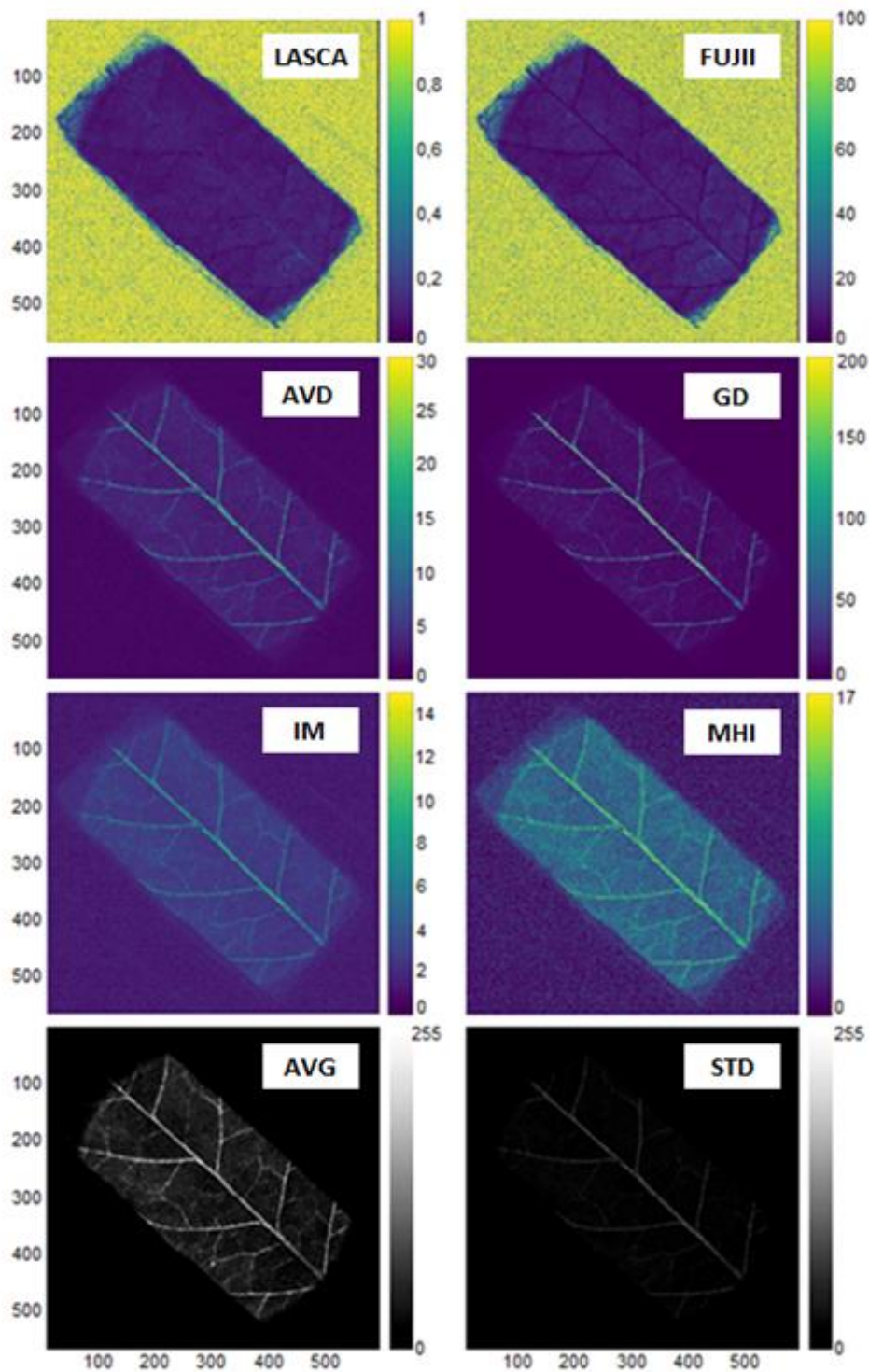
**Tab. 2** Tabulka procentuálních rozdílů mezi krajními hodnotami jednotlivých intervalů měření u všech 12 rostlin. **První sloupec tabulky** obsahuje pořadová čísla měření. **Druhý sloupec tabulky** obsahuje procentuální změny výkonů prošlého modrého světla vypočtené vždy mezi první a poslední hodnotou I2. **Třetí sloupec tabulky** obsahuje procentuální změny PSKZ vypočtené vždy mezi hodnotou PSKZ z krátkého (1 min, I1) snímání struktur KZ a první hodnotou PSKZ v I3. **Čtvrtý sloupec tabulky** obsahuje procentuální změny hodnot PSKZ vypočtené vždy mezi první a poslední hodnotou PSKZ v I3. **Pátý sloupec tabulky** obsahuje procentuální změny výkonů prošlého modrého světla vypočtené vždy mezi poslední hodnotou I2 a průměrnou hodnotou reprezentující poslední (1 min) interval I4 výkonů prošlého modrého světla vzorkem. Kladné hodnoty v tabulce reprezentují nárůsty, záporné hodnoty reprezentují poklesy příslušného parametru.

Pořadové číslo měření	1. polovina měření I1 + I2		2. polovina měření I3 + I4	
	Změna výkonu prošlého modrého světla	Změna PSKZ	Změna PSKZ	Změna výkonu prošlého modrého světla
	(%)	(%)	(%)	(%)
1	18	67	-19	-23
2	12	87	-15	-0
3	18	110	-20	-46
4	16	67	-16	-20
5	12	99	-22	-12
6	20	91	-10	-16
7	16	94	-18	-18
8	13	99	-17	-4
9	18	89	-15	1
10	15	95	-18	6
11	24	113	-12	-8
12	18	96	-16	2

### 5.3 Změna struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu

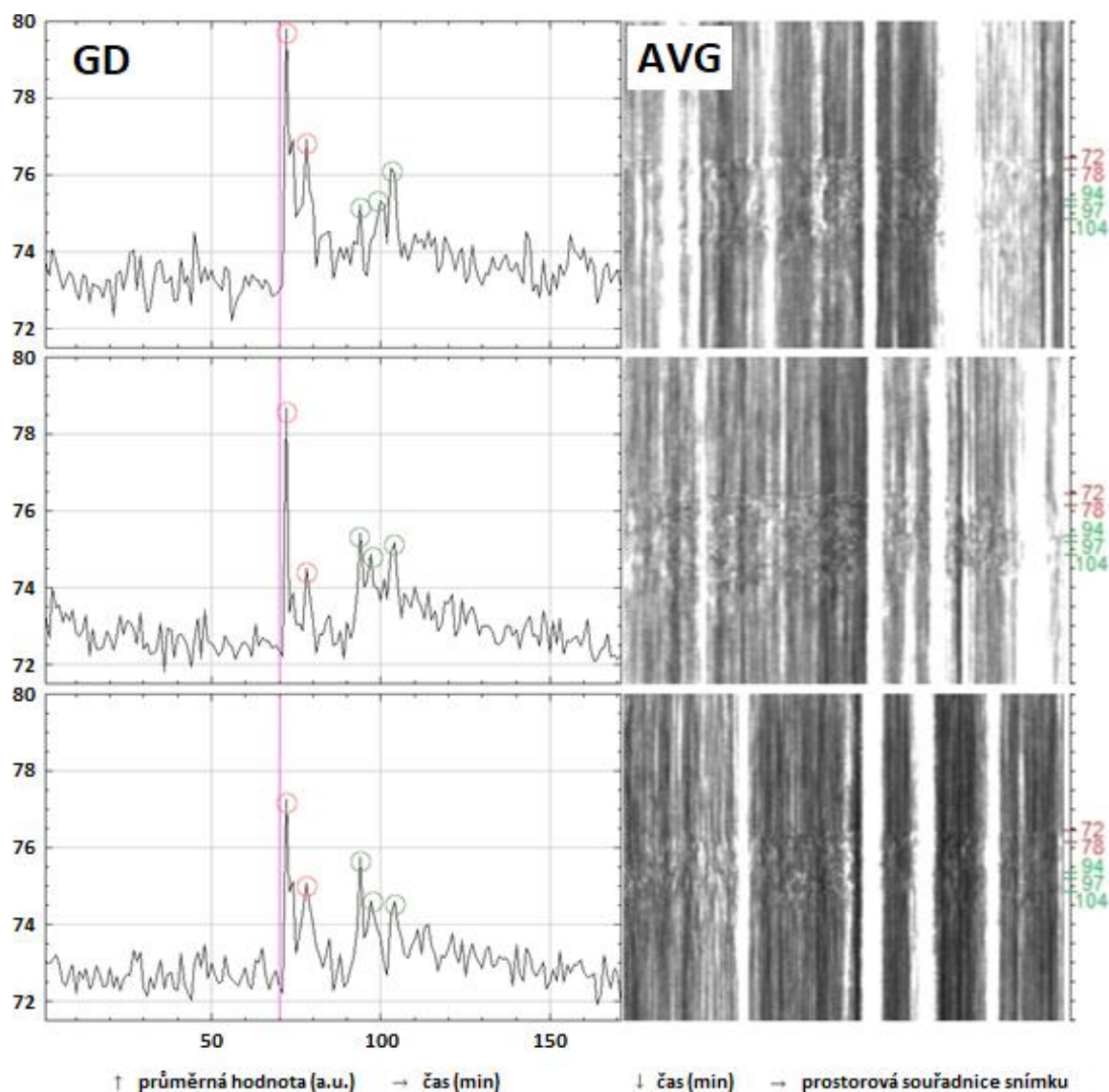
Pro každou z pořizovaných sérií snímků struktur KZ byl s uplatněním různých obrazových analýz vypočten vždy jeden snímek reprezentující změny ve struktuře vzorku v čase pořizování dané série, nebo v případě metody AVG reprezentující průměr z dané série struktur KZ. Výsledné snímky byly vypočteny metodami LASCA, FUJII, AVD, GD, IM, MHI, AVG a STD. Jejich ukázky jsou uvedeny níže (viz obr. 17). Výsledné snímky se škálou šedi byly sestrojeny pomocí software ImageJ. Výsledné snímky s barevnou škálou byly obdrženy s využitím software GNU Octave (Braga a kol. 2016b).



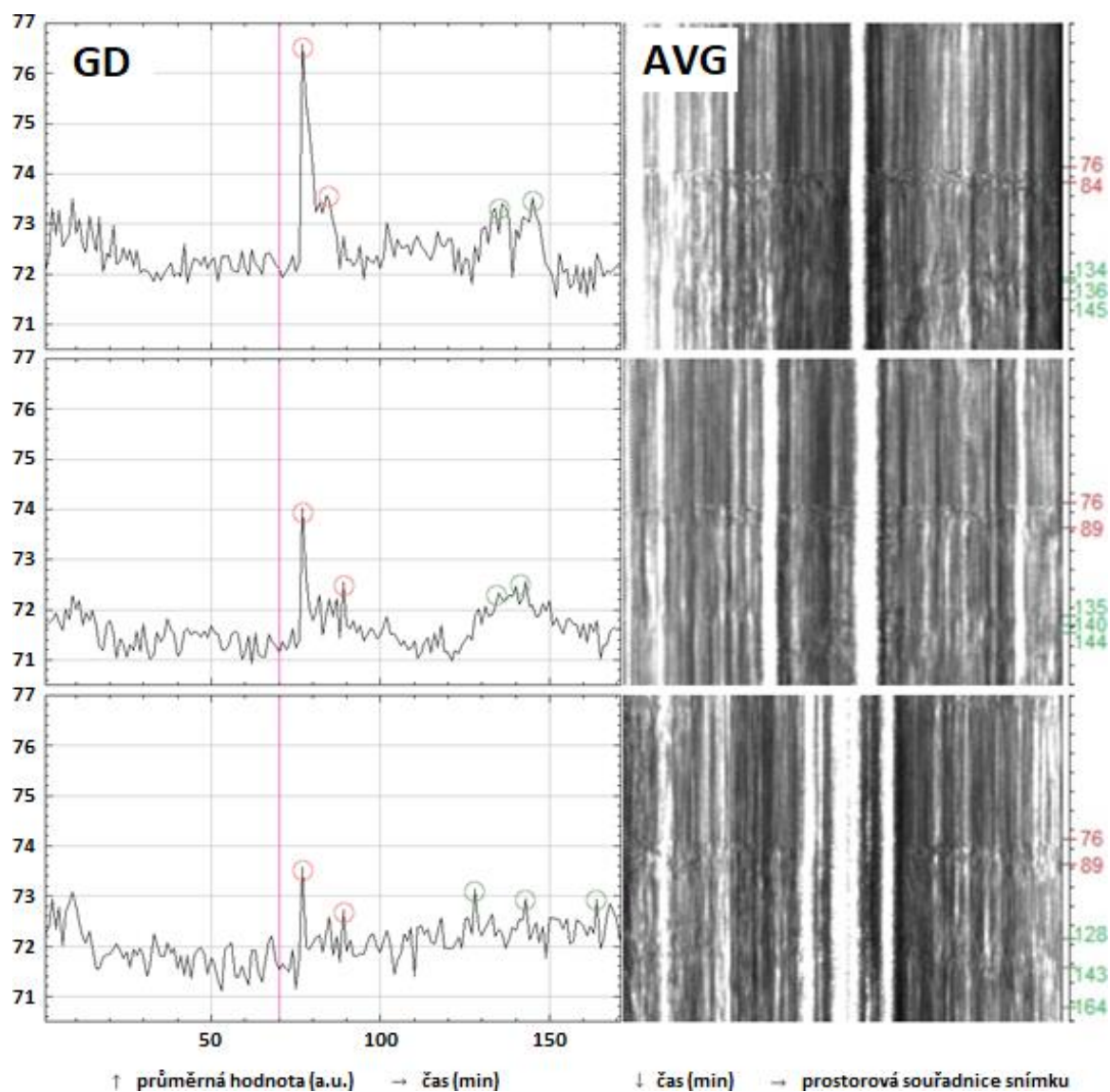


**Obr. 17** Ukázky osmi různých přístupů využitých k analýze vzorku pomocí jevu KZ (LASCA, FUJII, AVD, GD, IM, MHI, AVG, STD). Hodnoty horizontálních a vertikálních os popisují souřadnice pixelů ve snímcích. Přidružené barevné stupnice vypovídají o digitálních hodnotách, které odpovídají různým výstupním hodnotám. Výstupní hodnoty mohou reprezentovat průměrnou strukturu KZ v dané sérii (metoda AVG, v obrázku vlevo dole) nebo změny ve struktuře KZ zaznamenané během doby pořizování příslušné série (ostatní obrazové analýzy).

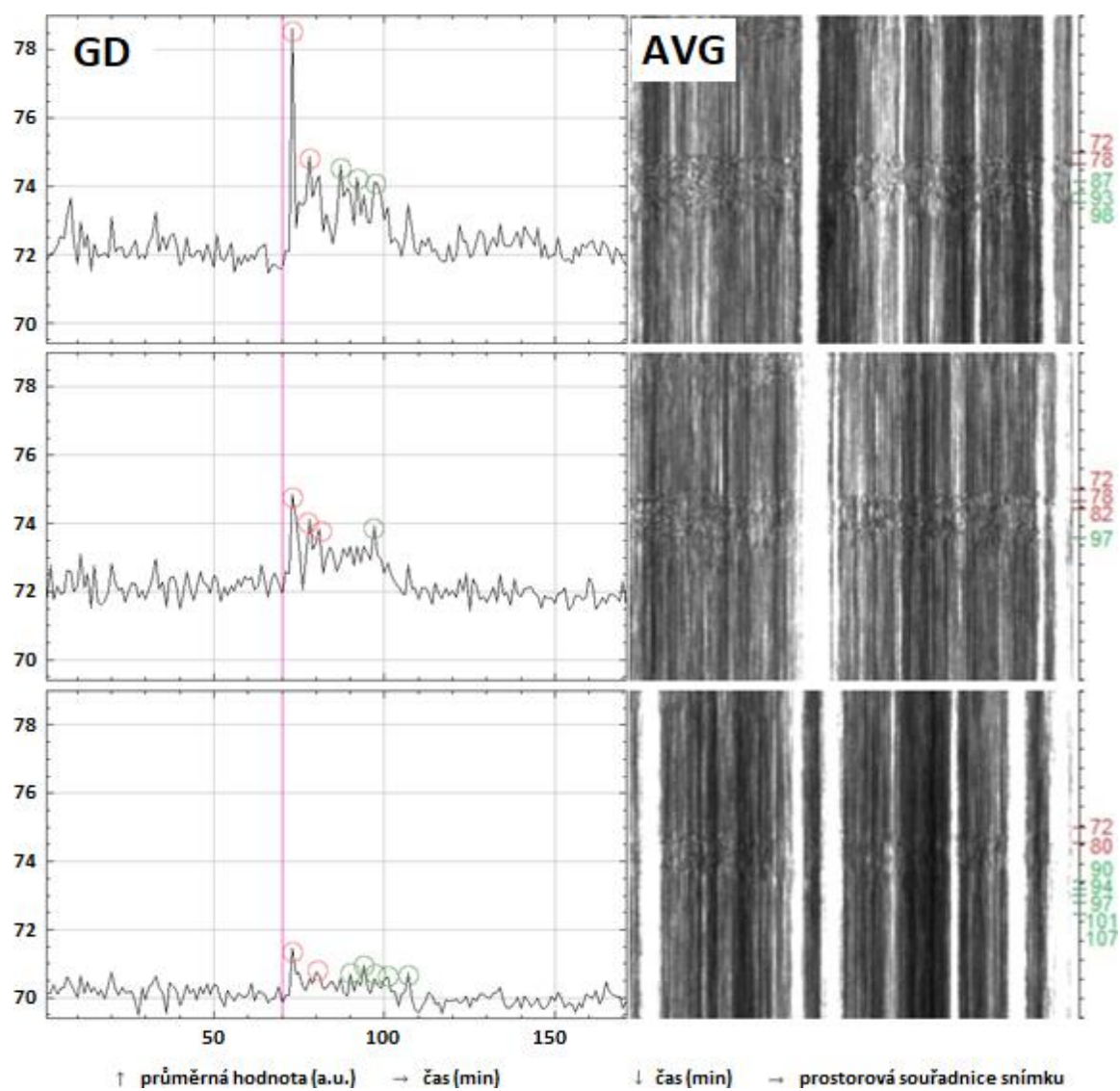
Výsledné analýzy změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku jsou prezentovány níže (viz obr. 18 – 24). K sestrojení analýz byly využity obrazové metody GD (levý sloupec A) a AVG (pravý sloupec B). Levý sloupec obrázků zahrnuje závislosti hodnot PZSKZ (viz kap. 4.2.2.2) na čase a pravý sloupec obrázků zahrnuje mapy THSP (viz kap. 2.2.1). Oba sloupce obsahují tři pod sebe umístěné panely, z nichž každý odpovídá jedné oblasti zájmu zvolené pro analýzu příslušnou metodou (viz obr. 11 a obr. 12). Shrňeme-li výsledky ze všech měření, můžeme konstatovat, že společným úkazem jsou reakce na LTS v podobě jedné až několika skokových změn ve strukturách KZ na všech zvolených oblastech zájmu. Iniciální skokové změny měřené ve strukturách vzorků bezprostředně po teplotním stresu jsou ve schématech obr. 18 – 24 zvýrazněny červenou barvou, změny zaznamenané s časovým odstupem až desítek minut jsou značeny zeleně. S rostoucí vzdáleností příslušné oblasti zájmu od místa popálení se bezprostřední skokové změny ve strukturách KZ stávaly méně výrazné. Také změny struktury vzorku detekované později po popálení byly méně významné, ale nastávaly zpravidla až do hodiny od popálení listu. Číselné hodnoty PZSKZ reprezentující změny struktury KZ v rámci jedné oblasti zájmu se pro různá měření lišily, nicméně obecné trendy byly pro všechna měření podobné. Výsledky grafické analýzy zpracované pomocí obrazové metody GD (závislosti PZSKZ na čase, sloupec A, obr. 18 – 24) přibližně odpovídaly výsledkům analýzy pomocí metody AVG (mapy THSP, sloupec B, obr. 18 – 24), neboť lokalizace vrcholů PZSKZ ve výsledcích analýzy metodou GD a zrnitostí v mapách THSP (metoda AVG) si na časové škále odpovídají. Obě použité metody analýzy (GD a AVG) lze tedy využít k získání analogické informace o změnách struktur v biologických materiálech.



**Obr. 18** Analýzy změn struktury koherenční zmitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (**levý sloupec**) a AVG (**pravý sloupec**). **Horní panel obrázku** odpovídá oblasti zájmu nejbližší místu popálení, **prostřední panel obrázku** odpovídá střední oblasti zájmu a **dolní panel obrázku** odpovídá oblasti zájmu nejdále od místa popálení (viz obr. 11 a obr. 12). Analýzy vzorku s využitím metody GD jsou prezentovány ve formě grafů závislosti hodnot PZSKZ příslušných dané oblasti zájmu (vertikální osy) na čase pořizování jednotlivých sérií snímků struktur KZ (horizontální osa). **Růžové čáry** vyznačují okamžik popálení vzorku topným tělesem. Analýzy vzorku s využitím metody AVG (pravý sloupec) jsou prezentovány ve formě map THSP, kde vertikální rozměr představuje čas pořizení příslušné série snímků struktur KZ a horizontální rozměr představuje prostorovou souřadnici vypočtených výsledných snímků v oblasti zájmu (viz obr. 12). **Červeně** jsou ve schématu vyznačeny iniciální skokové změny struktur vzorků v reakci na tepelný stres, **zeleně** jsou vyznačeny sekundární skokové změny struktur vzorků detekované s časovou prodlevou po iniciálních změnách. Skokové změny struktur vzorků se v analýze metodou GD projevují jako vrcholy, v analýze metodou AVG jako změna zmitosti v mapách THSP. Měření 1/7.

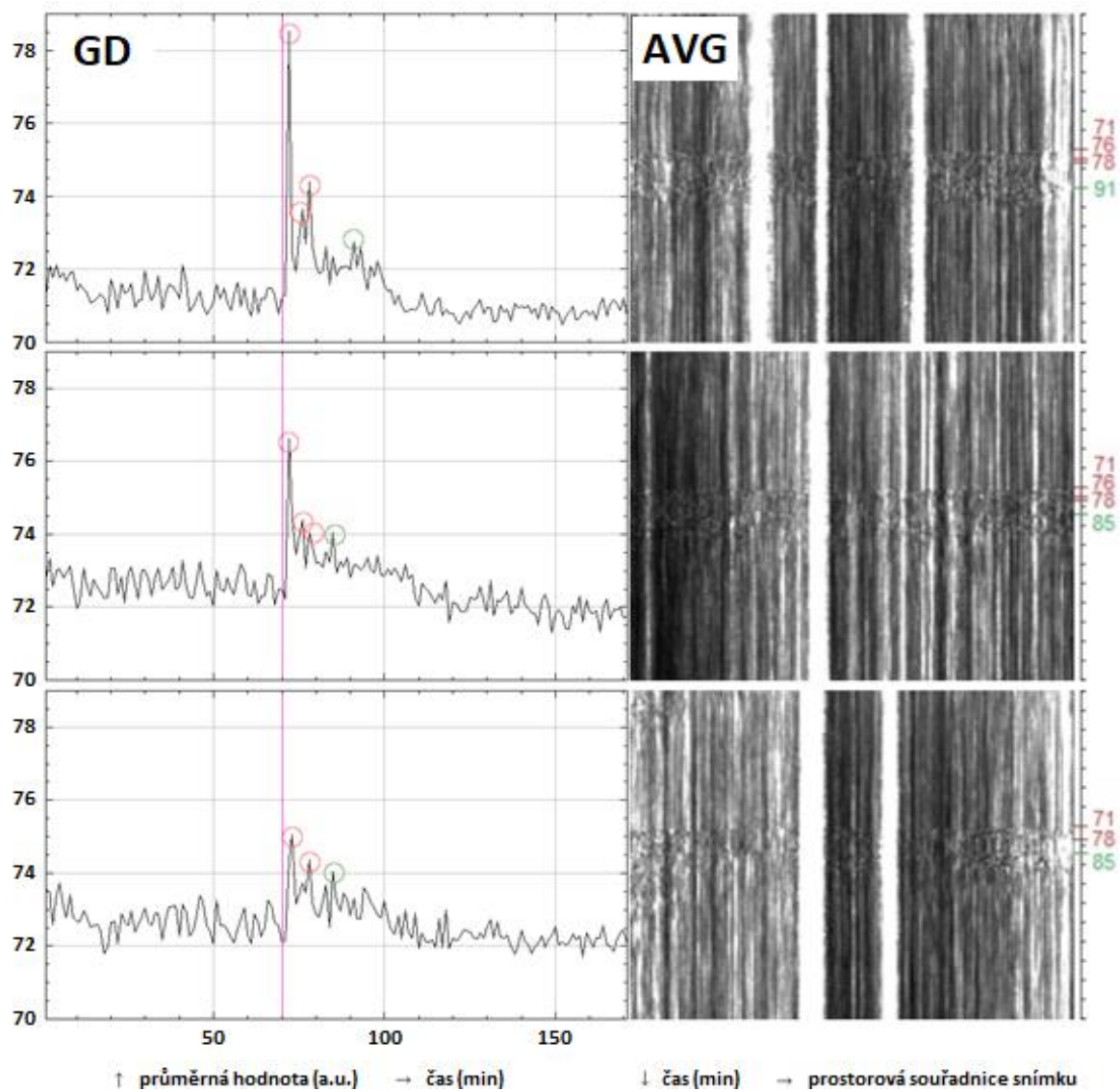


**Obr. 19** Analýzy změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (levý sloupec) a AVG (pravý sloupec). Detailní popis viz legenda obr. 18. Měření 2/7.

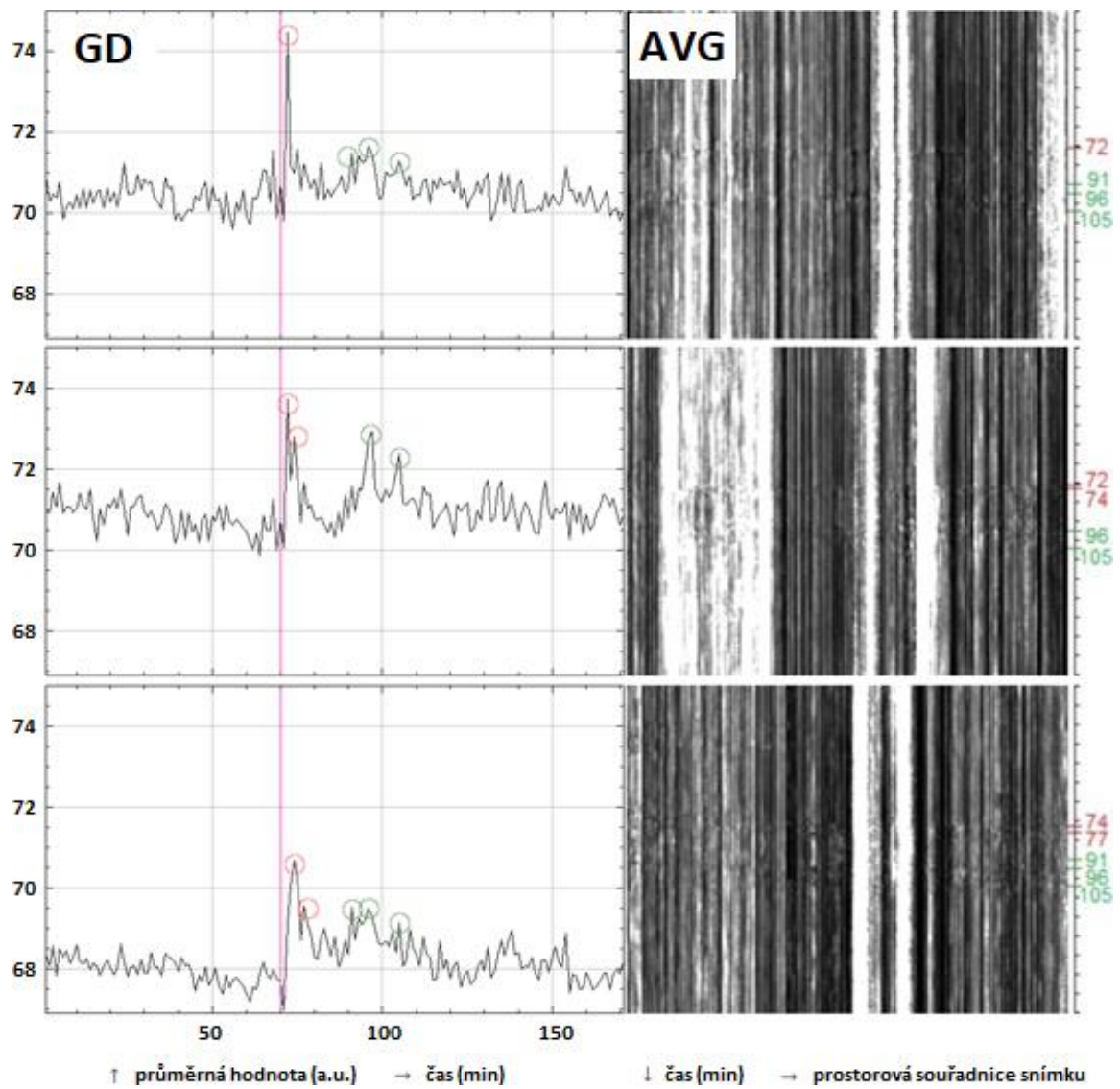


**Obr. 20** Analýzy změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (levý sloupec) a AVG (pravý sloupec). Detailní popis viz legenda obr. 18. Měření 3/7.

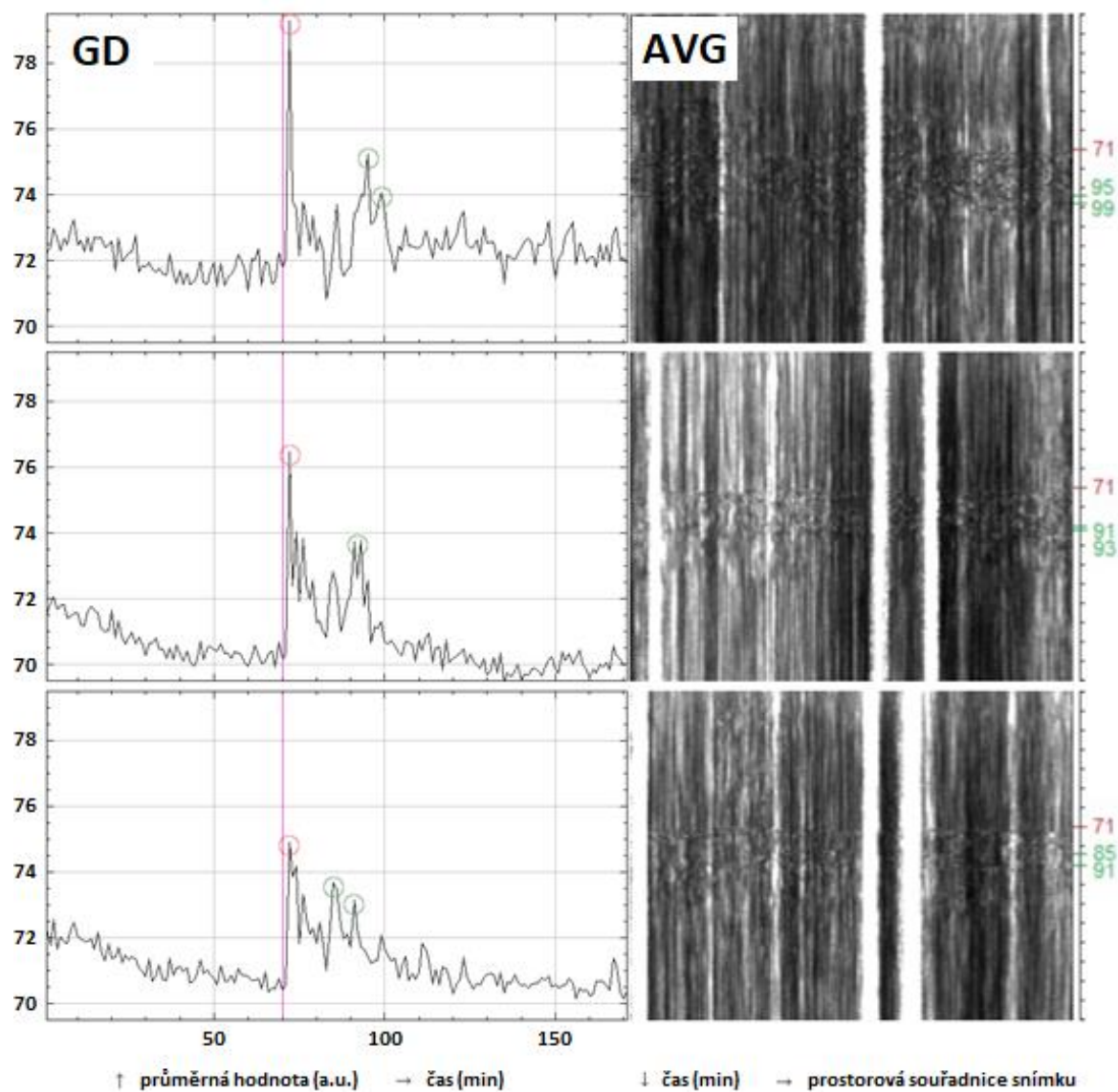




**Obr. 21** Analýzy změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (levý sloupec) a AVG (pravý sloupec). Detailní popis viz legenda obr. 18. Měření 4/7.

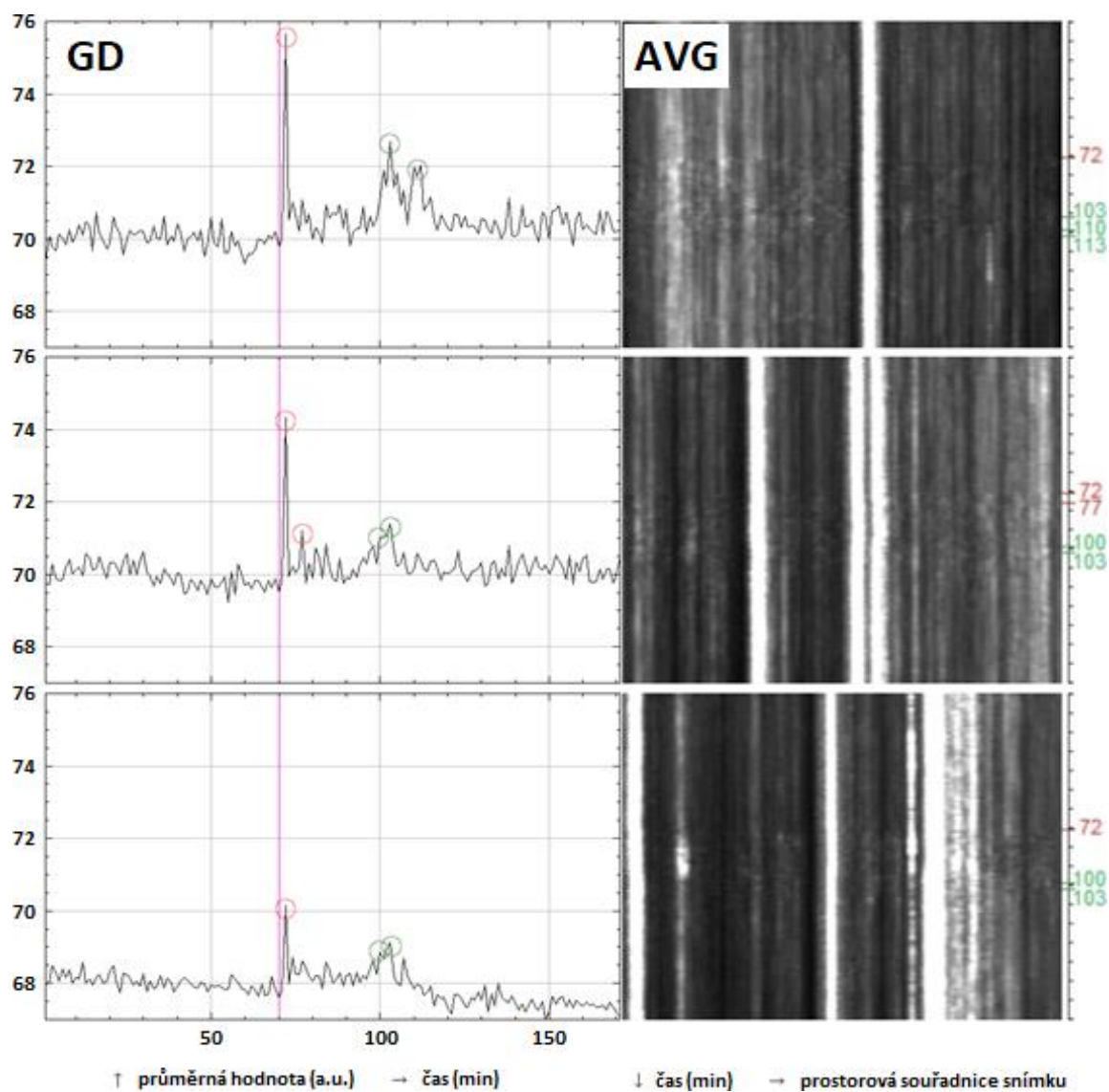


**Obr. 22** Analýzy změn struktury koherenční zmitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (levý sloupec) a AVG (pravý sloupec). Detailní popis viz legenda obr. 18. Měření 5/7.



**Obr. 23** Analýzy změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (levý sloupec) a AVG (pravý sloupec). Detailní popis viz legenda obr. 18. Měření 6/7.



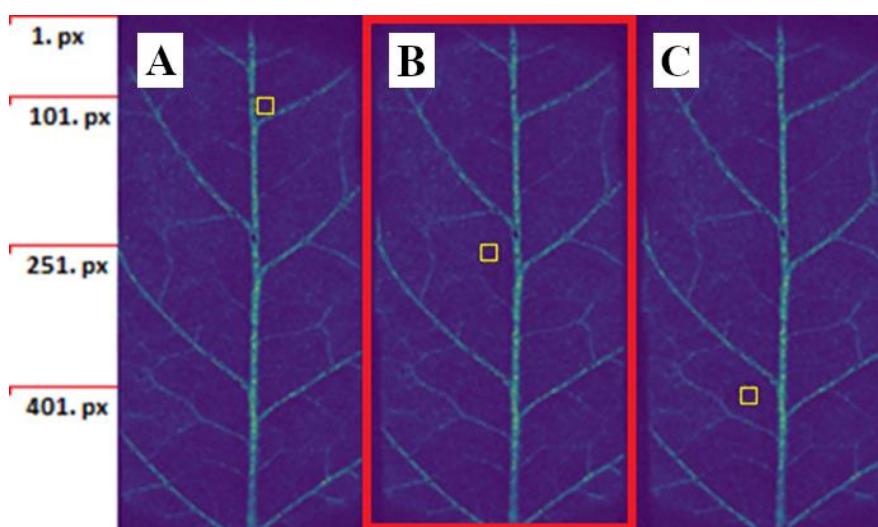


**Obr. 24** Analýzy změn struktury koherenční zrnitosti po lokálním vysokoteplotním stresu vzorku provedené s využitím obrazových metod GD (levý sloupec) a AVG (pravý sloupec). Detailní popis viz legenda obr. 18. Měření 7/7.

## 5.4 Ověření citlivosti koherenční zrnitosti v reakci na pohyby chloroplastů

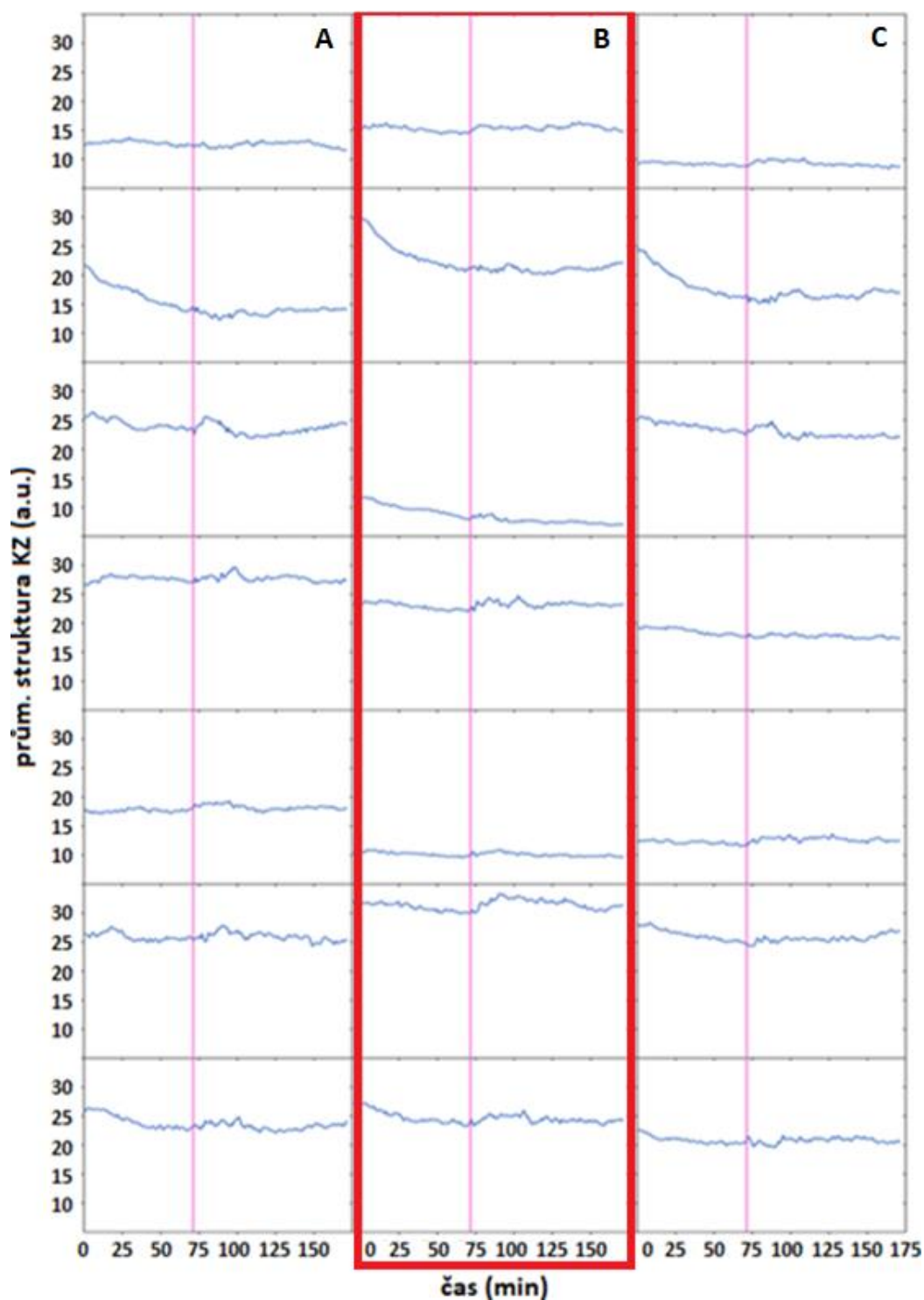
Abychom zjistili, zda naše monitorování strukturních změn vzorků vykazují citlivost specificky na pohyby chloroplastů, rozhodli jsme se porovnat výsledky našich měření během intervalů, kdy se chloroplasty hýbou, s výsledky měření z intervalů při statických chloroplastech. Intervaly měření zvolené pro toto srovnání byly čerpány z obou ostrých experimentů a byly na nich porovnávány trendy hodnot PSKZ. Hodnoty PSKZ (viz kap. 4.2.2.1), získané s využitím obrazové metody AVG na nějaké oblasti zájmu, závisí přímo na množství světla dopadajícího do snímače kamery a zjevně tedy odráží i propustnost vzorku v souvislosti s dopadajícím zářením.

Intervalem, ve kterém byly přesuny chloroplastů (z pozice boční do pozice čelní) úmyslně vyvolány, byl interval I3 prvního ostrého experimentu (viz kap. 4.2.2.1). Hodnoty PSKZ pro všech dvanáct měření prvního ostrého experimentu v intervalu I3 byly již prezentovány výše (viz kap. 5.2, Tab. 1), ve všech případech se jedná o zřetelně klesající trendy PSKZ během celých 60 min trvání etapy I3. Interval, ve kterém byly přesuny chloroplastů naopak úmyslně vyloučeny, začínal po okamžiku lokálního teplotního stresu vzorku (LTS) ve druhém ostrém experimentu (před tímto okamžikem měření byly rostliny již umístěny 70 min do úplné tmy). Pro všech sedm měření druhého ostrého experimentu byly vypočteny hodnoty PSKZ během celého měření. Příslušné oblasti zájmu (již dříve použité pro druhý ostrý experiment, viz obr. 11) jsou uvedeny níže (viz obr. 25).



**Obr. 25** Oblasti zájmu zvolené ve snímcích struktury KZ (viz **žluté čtverce, A, B, C**) pro účel analýzy trendů PSKZ ve druhém ostrém experimentu. Detailní popis viz obr. 11. Oblast zájmu označená **červeným rámečkem** je totožná s oblastí zájmu použitou pro první ostrý experiment, a byly na ní porovnávány změny PSKZ ve zvolených intervalech z obou experimentů.

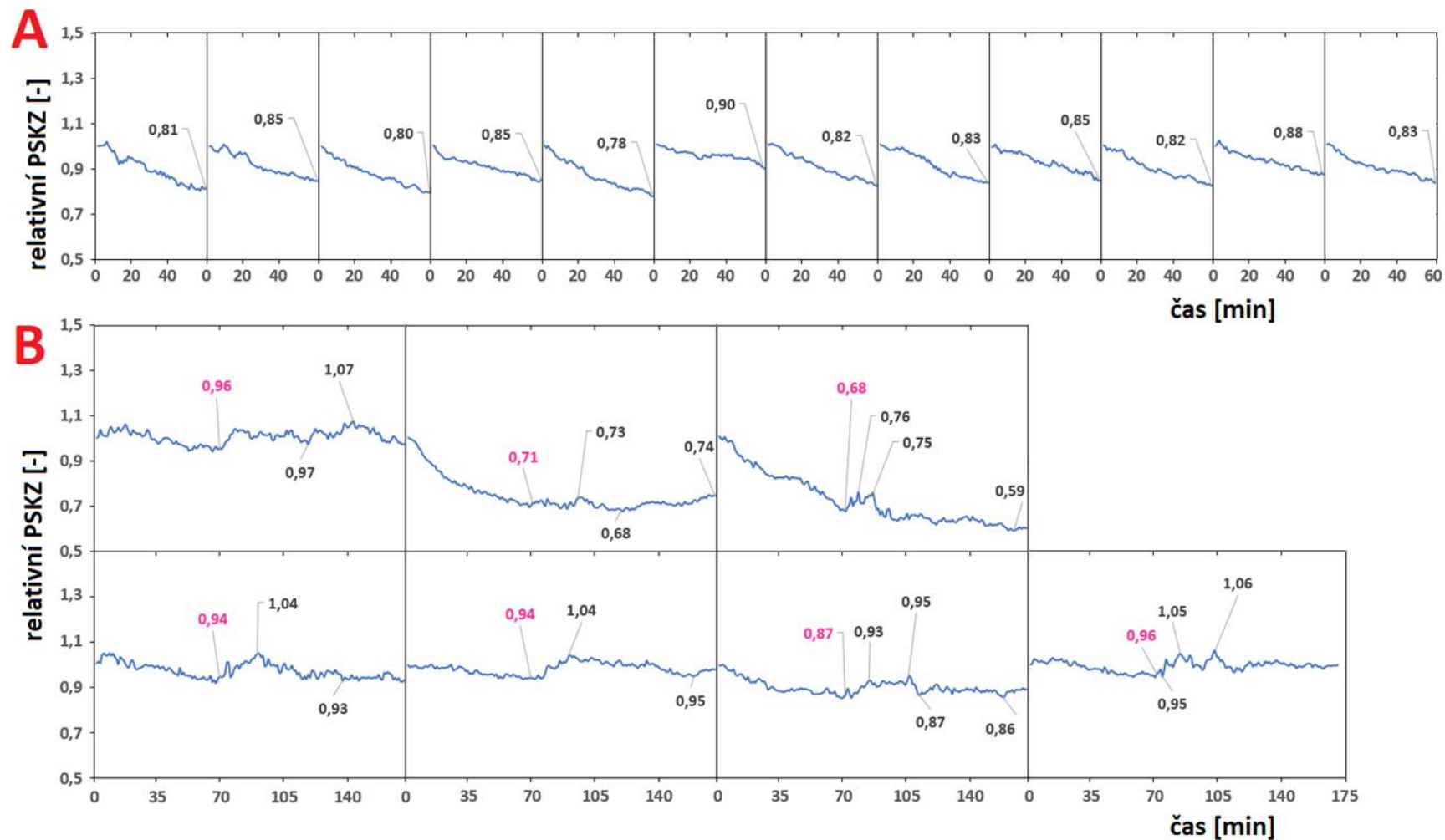
Vypočtené závislosti hodnot PSKZ na čase pro celá měření druhého ostrého experimentu jsou vidět na obr. 26.



**Obr. 26** Závislosti hodnot PSKZ na čase pro druhý ostrý experiment vypočtené metodou AVG. **Vodorovné panely** obrázku odpovídají jednotlivým měřením druhého ostrého experimentu (1 - 7), **sloupce** obrázku přísluší oblastem zájmu (viz obr. 25) zvoleným nejbližší (A), středně (B) a nejdále (C) od místa popálení. **Růžová vertikální čára** vyznačuje okamžik lokálního teplotního stresu špičky vzorku topným tělesem. Oblast zájmu označená **červeným rámečkem** je totožná s oblastí zájmu použitou pro první ostrý experiment.

Ve výsledcích prezentovaných na obr. 26 po LTS nebyly zaznamenány prudké poklesy hodnot PSKZ, což naznačuje že v této fázi experimentu byly chloroplasty skutečně již statické, na rozdíl od výše uvedených výsledků v prvním ostrém experimentu (viz. kap. 5.2, obr. 16, interval I3). Poklesy hodnot PSKZ u některých měření v obr. 26 před LTS lze vysvětlovat jako důsledek spontánního pohybu chloroplastů většinou do čelní pozice během prvních 70 min umístění rostliny do tmy (rostliny byly před měřeními umístěny na světle). Po LTS docházelo ve většině případů k nárůstům PSKZ, což koresponduje s výsledky druhého ostrého experimentu v kap. 5.3, obr. 18 – 24, kde byly rovněž zaznamenány vrcholy PSKZ už několik jednotek minut po LTS. Z obr. 26 tak přímo vyplývá, že změny PSKZ nastávají kromě pohybu chloroplastů také v důsledku jiných fyziologických či metabolických procesů.

Detailní srovnání změn relativních hodnot PSKZ během intervalu I3 prvního ostrého experimentu a během celé doby trvání druhého ostrého experimentu na stejné oblasti zájmu (viz obr. 25, červený rámeček) je prezentováno na obr. 27. Na panelu A (obr. 27) lze pozorovat poklesy hodnot PSKZ během celých 60 min intervalu I3 prvního ostrého experimentu. Na panelu B (obr. 27) lze během prvních 70 min druhého ostrého experimentu (při umístění rostliny ve tmě) pozorovat stabilizaci chloroplastů a dále změny hodnot PSKZ související s LTS. Číselné popisky v obr. 27 znázorňují relativní hodnoty PSKZ bezprostředně po LTS a extrémy relativních hodnot PSKZ po LTS. Z číselných popisek v obr. 27 vyplývá, že dominantním fyziologickým dějem z hlediska celkových změn hodnot PSKZ byl právě pohyb chloroplastů. Přibližně dvakrát menší změny hodnot PSKZ byly detekovány v důsledku LTS, ani tyto změny však zdaleka nebyly zanedbatelné, vezmeme-li v úvahu také časovou škálu jejich průběhů. Zatímco pohyby chloroplastů jsou robustní, několik desítek minut trvající procesy, v důsledku LTS nastávaly změny hodnot PSKZ daleko rychleji (během několika jednotek minut). Výsledky prezentované na obr. 27 demonstrují, že jev KZ lze využít k monitorování různých fyziologických dějů, které se v měřených hodnotách PSKZ odráží specifickými způsoby a v různých časových škálách.



**Obr. 27** Srovnání změn hodnot PSKZ během intervalu I3 prvního ostrého experimentu (**A**), během druhého ostrého experimentu ve stejné oblasti zájmu (**B**). Hodnoty PSKZ jsou vždy normovány vůči první hodnotě (grafy vždy začínají hodnotou 1). A: **číslné popisky** ukazují hodnotu, na kterou klesly relativní PSKZ během 60 min trvání I3. B: **růžově** je vždy značena první relativní hodnota PSKZ po LTS, **černě** jsou značeny extrémy relativních hodnot PSKZ po LTS.

## 6. DISKUSE

Jedinečnost předkládané práce spočívá v bezkontaktním přístupu k monitorování změn v pletivech rostlin, které není možné pozorovat a hodnotit pouhým okem. Tyto změny mohou být čistě fyziologického charakteru nebo mohou vznikat v důsledku stresu rostlin. Významným posunem od naší bakalářské práce, v rámci které jsme snímali pouze vadnoucí oddělené listy, je monitorování intaktních listů *in vivo*. K vyhodnocení experimentů prezentovaných v praktické části práce jsme se rozhodli inspirovat metodikou publikovanou autory Braga a kol. (2016a). Autoři představili způsob digitálního zpracování snímků struktur koherenční zrnitosti hned šesti běžně publikovanými metodami, z nichž každá zahrnuje svůj vlastní kvantitativní ukazatel jimi popsané tzv. biologické aktivity. Tento zavádějící termín jsme v naší práci nahradili čistě technickým termínem „změny struktury koherenční zrnitosti“. Každá z prezentovaných metod zároveň umožňuje zachytit změny nejen uvnitř pletiva, ale také na povrchu živého listu.

Zatímco většina publikací se soustředí na snímání celého listu, nebo jeho jedné konkrétní oblasti, my jsme sledovali změny ve struktuře koherenční zrnitosti vícero způsoby s cílem získat komplexní informaci o změnách struktury listu. Vyhodnocovali jsme data z celého listu, ze třech vybraných oblastí různě vzdálených od místa popálení, dále z přímky proložené oblastí zájmu na listu. Použili jsme hned několik metod pro vyhodnocení získaných dat včetně jedné, zcela nově navržené. Podstata nové metody byla analogická postupu při sestrojování matice THSP, kterou využili například Arizaga a kol. (1999) při výpočtu momentu setrvačnosti, v souvislosti s maticí společného výskytu. Na rozdíl od Arizaga a kol. (1999), kteří matice THSP tvořili ze struktur koherenční zrnitosti, jsme my myšlenku THSP využili v souvislosti s metodou obrazové analýzy AVG. Vytvořili jsme mapy, do kterých jsme dosazovali již vypočtené hodnoty PSKZ (výsledky metody AVG). Námi vytvořené mapy tak obsahují informaci o propustnosti vzorku během pořizování příslušných sérií snímků struktur koherenční zrnitosti.

Flexibilita námi navržené měřicí aparatury umožnila (1) střídání snímání struktur koherenční zrnitosti v reálném čase s měřením pohybu chloroplastů, (2) snímání struktur koherenční zrnitosti před, během i po lokálním vysokoteplotním stresu listu.

V prvním experimentu jsme se zaměřili na samovolné fyziologické procesy (pohyb chloroplastů) probíhající v rostlině, kdy se nám podařilo potvrdit přímou souvislost

změny struktury koherenční zrnitosti s pohybem chloroplastů, což dosud v literatuře prokázáno nebylo. Na možnou souvislost koherenční zrnitosti s pohyby chloroplastů poukázali Oulamara a kol. (1989) a Braga a kol. (2009), nicméně ani oni nebyli schopni oddělit jednotlivé komponenty pohybu v proměřovaném pletivu, tudíž se jednalo o pouhou spekulaci. V souvislosti s měřením propustnosti biologického materiálu byla koherenční zrnitost již v minulosti použita, nicméně se nejednalo o studium rostlinného pletiva ale živočišných tkání (Draijer a kol. 2009, Ansari a kol. 2016b, Ansari a kol. 2017). Byť se jedná o první důkaz uvedených souvislostí v rostlinném pletivu, dal se tento výsledek předpokládat. V literatuře je již dobře popsáno, že pohyb chloroplastů významně mění optické vlastnosti listů (Nauš a kol. 2010, Frolec a kol. 2010), což se z fyzikální podstaty věci (princip vzniku jevu koherenční zrnitost) musí odrazit ve změně struktury koherenční zrnitosti listu. Znaje robustnost a dominantní vliv pohybu chloroplastů na optické vlastnosti listu, vybrali jsme právě tento jev pro prvotní studium souvislosti změn koherenční zrnitosti s fyziologickými změnami v rostlinách.

Souvislost změn ve struktuře koherenční zrnitosti s fyziologickými procesy vyvolanými stresem rostliny jsme studovali v druhém experimentu. Prokázali jsme změny ve struktuře koherenční zrnitosti i při stresu nízké intenzity a navíc v pletivu vzdáleném od místa popálení. Ačkoli již byla popsána souvislost změn struktury koherenční zrnitosti s teplotou prostředí, do kterého je vzorek umístěn (Kurenda a kol. 2010), nejednalo se o přímý lokální stres ve vegetativním pletivu, pouze o změny na úrovni celého plodu jablka (cv. *Idared*). Z našich dat je dále zřejmé, že rychlost a amplituda změn struktury koherenční zrnitosti klesá se vzdáleností od místa poškození naznačující přítomnost šířícího se signálu. Jev koherenční zrnitost by se tak dal použít k neinvazivnímu studiu velmi rychlých nepatrných (běžnými metodami nezachytitelných) změn ve fyziologii listu po vystavení stresu a tím k monitoringu lokálních i systémových signálních cest v rostlinách.

Další významný závěr z naší práce vyplývá též z druhého experimentu, kde byl vyloučen pohyb chloroplastů, ale přesto jsme změny ve strukturách koherenční zrnitosti i změny v propustnosti listu po teplotním stresu detekovali. Navíc je známo, že chloroplasty se nepohybují po lokálním popálení (Nauš a kol. 2008). Z naměřených dat je zřejmé, že vedle robustního pohybu chloroplastů se na změně struktury koherenční zrnitosti mohou podílet i jiné procesy přítomné v rostlině po vystavení lokálnímu teplotnímu stresu. Během teplotního stresu jsou poškozeny buňky a popálený list ztrácí

kutikulu i epidermis, což má za následek nerovnováhu ve vodním provozu rostliny. Dochází k poklesu turgoru v přímo zasaženém a přilehlém pletivu a k okamžitému nárůstu rychlosti transpirace a ztrátě vody (Nožková a kol. 2018). V pozdějších časech (jednotky min) dochází k negativním změnám ve fotosyntetických procesech (např. pokles asimilace CO<sub>2</sub>, změna fluorescence chlorofylu a) a k uzavření průduchů a následnému snížení rychlosti transpirace (Hlaváčková a kol. 2006). Pokles turgoru, pohyb průduchů, změna absorpce listů, to vše se může odrazit v optických vlastnostech listu, potažmo ve změně struktury koherenční zrnitosti. Uvedené procesy budou předmětem našeho dalšího výzkumu.



## 7. ZÁVĚR

1. Byla vypracována rešerše na dané téma, kterou jsme se dále inspirovali při navržení vlastních experimentů a při interpretaci naměřených dat.
2. Zdokonalili jsme dříve sestavenou aparaturu (Pechník 2019) pro měření časového vývoje strukturních změn v listu rajčete pomocí jevu koherenční zrnitost. Novou aparaturu jsme využili k měření změn struktur koherenční zrnitosti v reálném čase na živém listu rostliny.
3. Zaznamenali jsme dominantní vliv pohybu chloroplastů rostliny mezi dvěma krajními pozicemi (čelní pozice a boční pozice) na jev koherenční zrnitost (vyhodnoceno metodou AVG).
4. Detekovali jsme pohyby chloroplastů a propustnost listů pomocí přístroje SpectraPen SP-100 a pomocí přístroje ThorLabs PM400 vybaveného čidlem výkonu S130C
5. Provedli jsme monitorování struktur koherenční zrnitosti po popálení špičky listu živé rostliny. Změny struktury koherenční zrnitosti byly vyhodnocovány jak v listu jako celku, tak i v definovaných oblastech zájmu vzdálených od místa poškození.
6. Strukturní změny v poškozeném listu jsme vyhodnocovali pomocí metod LASCA, FUJII, AVD, GD, IM, MHI, AVG, STD, z nichž jsme zvolili metody GD a AVG pro porovnání definovaných oblastí zájmu na listu.
7. Ze získaných dat je zřejmé, že jev koherenční zrnitost lze použít jako neinvazivní a přesný nástroj pro studium změn ve fyziologických procesech rostlin v přirozených i stresových podmínkách.

## 8. SEZNAM LITERATURY

- Ansari M.Z., Grassi H.C., Cabrera H., Velasquez A., Andrades E.D. (2016a) Online fast biospeckle monitoring of drug action in trypanosoma cruzi parasites by motion history image. *Lasers in Medical Science* **31**, 1447–1454.
- Ansari M.Z., Heurtier A.H., Offenhauser N., Dreier J.P., Nirala A.K. (2016b) Visualization of perfusion changes with laser speckle contrast imaging using the method of motion history image. *Microvascular Research* **107**, 106–109.
- Ansari M.Z., Kang E.J., Manole M.D., Dreier J.P., Heurtier A.H. (2017) Monitoring microvascular perfusion variations with laser speckle contrast imaging using a view-based temporal template method. *Microvascular Research* **111**, 49–59.
- Ansari M.Z., Mujeeb A., Nirala A.K. (2018) Assessment of biological leaf tissue using biospeckle laser imaging technique. *Laser Physics* **28**, 065608.
- Ansari M.Z., Nirala A.K. (2015) Monitoring capillary blood flow using laser speckle contrast analysis with spatial and temporal statistics. *Optik* **126**, 5224–5229.
- Arizaga R., Cap N.L., Rabal H., Trivi M. (2002) Display of the local activity using dynamical speckle patterns. *Optical Engineering* **41**, 287–294.
- Arizaga R., Trivi M., Rabal H. (1999) Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. *Optics & Laser Technology* **31**, 163–169.
- Arnold A.E., Mejia L.C., Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 26.
- Asakura T. (1988) Dynamic properties of bio-speckles and their application to blood flow measurements. *Anritsu News* **8**, 4–9.
- Augustynowicz J., Lekka M., Burda K., Gabrys H. (2001) Correlation between chloroplast mobility and elastic properties of tobacco mesophyll protoplasts. *Acta Physiologiae Plantarum* **23**, 291–302.
- Banerjee R., Batschauer A. (2005): Plant blue-light receptors. *Planta* **220**, 498–502.
- Boccaro M., Schwartz W., Guiot E., Vidal G., De Paepe R., Dubois A., Boccaro A.C. (2007) Early chloroplastic alterations analysed by optical coherence tomography during a harpin-induced hypersensitive response. *The Plant Journal* **50**, 338–346.
- Braga R.A. (2017) When noise became information: state-of-the-art in biospeckle laser. *Ciência e Agrotecnologia* **41**, 359–366.
- Braga R.A., Dal Fabbro I.M., Borem F.M., Rabelo G., Arizaga R., Rabal H.J., Trivi M. (2003) Assessment of seed viability by laser speckle techniques. *Biosystems Engineering* **86**, 287–294.
- Braga R.A., Dupuy L.X., Pasqual M., Cardoso R.R. (2009) Live biospeckle laser imaging of root tissues. *European Biophysics Journal* **38**, 679–686.
- Braga R.A., Rabelo G.F., Granato L.R., Ederson F.S., Machado J.C., Arizaga R., Rabal H.J., Trivi M. (2005) Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. *Biosystems Engineering* **91**, 465–469.
- Braga R.A., Rivera F.P., Moreira J. (2016a) A practical guide to biospeckle laser analysis: theory and software. Editora UFLA, Lavras, Brasil, 155 stran.
- Braga R.A., Rivera F.P., Moreira J. (2016b) BSLTL: Biospeckle Laser Tool Library. [www.nongnu.org/bsltl](http://www.nongnu.org/bsltl)
- Braga R.A., Viana D., González-Peña R.J., Pujaico F. (2017) Dynamic laser speckle analyzed considering inhomogenities in the biological sample. *Journal of Biomedical Optics* **22**: 4.
- Briers J.D. (1975) Wavelength dependence of intensity fluctuations in speckle patterns from biological specimens. *Optics Communications* **13**, 324–326.
- Briers J.D., Webster S. (1996) Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non scanning full field technique for monitoring capillary blood flow. *Journal of Biomedical Optics* **1**, 174–179.
- Briggs W.R., Christie J.M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant bluelight receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204–210.

- Catalano M.D., Pujaico F., Braga R.A. (2019) Viability of biospeckle laser in mobile devices. *Optik* **183**, 897–905.
- Chargot M.S., Adamiak A., Zdunek A. (2012) Pre-harvest monitoring of apple fruits development with the use of biospeckle method. *Scientia Horticulturae* **145**, 23–28.
- 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.
- Costa A.G., Pinto F.A.C., Braga R.A., Motoike S.Y., Gracia L.M.N. (2017) Determination of macaw fruit harvest period by biospeckle laser technique. *African Journal of Agricultural Research* **12**, 674–683.
- Crosson S., Moffat K. (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2995–3000.
- D’Jonsiles M.F., Galizzi G.E., Dolinko A.E., Novas M.V., Ceriani N.E., Carmarán C.C. (2020) Optical study of laser biospeckle activity in leaves of *Jatropha curcas* L.: a non-invasive and indirect assessment of foliar endophyte colonization. *Mycological Progress* **19**, 339–349.
- Draijer M.J., Hondebrink E., van Leeuwen T.G., Steenbergen W. (2009) Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. *Lasers in Medical Science* **24**, 639–651.
- Dyrseth A.A. (1996) Measurement of plant movement in young and mature plants using electronic speckle pattern interferometry. *Applied Optics* **35**, 3695–3701.
- Frolec J., Řebíček J., Lazár D., Nauš J. (2010) Impact of two different types of heat stress on chloroplast movement and fluorescence signal of tobacco leaves. *Plant Cell Reports* **29**, 705–714.
- Fujii H., Asakura T., Nohira K., Shintomi Y., Ohura T. (1985) Blood flow observed by time-varying laser speckle. *Optics letters* **10**, 104–106.
- Fujii H., Nohira K., Yamamoto Y., Ikawa H., Ohura T. (1987) Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing Part 1. *Applied Optics* **25**, 5321–5325.
- Haupt W. (1999) Chloroplast movement: from phenomenology to molecular biology. *Progress in Botany* **60**, 3–36.
- 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.
- Holzinger A., Buchner O., Lütz C., Hanson M.R. (2007) Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **230**, 23–30.
- Horváth P., Šmíd P. (2012) Koherenční zrnitost a její vybrané aplikace, Univerzita Palackého, Olomouc, Czech Republic. 57 stran.
- Hu S., Ding Y., Zhu C. (2020) Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science* **11**: 375.
- Ivanov A.G., Velitchkova M.Y., Allakhverdiev S.I., Huner N.P.A. (2017) Heat stress-induced effects of photosystem I: an overview of structural and functional responses. *Photosynthesis Research* **133**, 17–30.
- Jamshidi B., Arefi A., Minaee S. (2017) Non-destructive prediction of apple firmness during storage based on dynamic speckle patterns (in farsi). *Journal of Agricultural Machinery* **7**, 140–151.
- Katedra biofyziky UPOL (2016) PEMFR: Praktikum experimentálních metod fyziologie rostlin [www.biofyzika.upol.cz/cs/vyuka-studijni-materialy](http://www.biofyzika.upol.cz/cs/vyuka-studijni-materialy)
- Kadota A., Yamada N., Suetsugu N., Hirose M., Saito C., Shoda K., Ichikawa S., Kagawa T., Nakano A., Wada M. (2009) Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13106–13111.

- Kasahara M., Kagawa T., Sato Y., Kiyouse T., Wada M. (2004) Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **135**, 1388–1397.
- Kataoka H. (2014) Gustav Senn (1875–1945): The pioneer of chloroplast movement research. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**: 4–13.
- Kenny E., Coakley D., Boyle G. (2013) Biospeckle in the human sclera and impact on laser speckle correlation measurement of eye tremor. *Journal of Biomedical Optics* **18**: 9.
- Kodama Y., Tsuboi H., Kagawa T., Wada M. (2008) Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. *Journal of Plant Research* **121**, 441–448.
- Kondo A., Kaikawa J., Funaguma T., Ueno O. (2004) Clumping and dispersal of chloroplasts in succulent plants. *Planta* **219**, 500–506.
- Kong S., Arai Y., Suetsugu N., Yanagida T., Wada M. (2013) Rapid severing and motility of chloroplast-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 572–590.
- Kong S., Suetsugu N., Kikuchi S., Nakai M., Nagatani A., Wada M. (2012) Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant and Cell Physiology* **54**, 80–92.
- Kong S., Wada M. (2014) Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochimica et Biophysica Acta* **1837**, 522–530.
- Kurenda A., Adamiak A., Zdunek A. (2010) Temperature effect on apple biospeckle activity evaluated with different indices. *Postharvest Biology and Technology* **67**, 118–123.
- Leger D., Mathieu E., Perrin J.C. (1975) Optical surface roughness determination using speckle correlation technique. *Applied Optics* **14**, 872–877.
- Men S., Yan L., Qian H. (2015) Application of bio-speckle activity to assess seed viability. *Advance Journal of Food Science and Technology* **8**, 214–218.
- Mommer L., Pons T.L., Wolters-Arts M., Venema J.H., Visser E.J.W. (2005) Submergence-induced morphological, anatomical, and biochemical responses in a terrestrial species affect gas diffusion resistance and photosynthetic performance. *Plant Physiology* **139**, 497–508.
- Nader C.A., Tualle J.M., Tinet E., Etori D. (2019) A new insight into biospeckle activity in apple tissues. *Sensors* **19**: 497.
- Nakasako M., Zikihara K., Matsuoka D., Katsura H., Tokutomi S. (2008) Structural basis of the LOV1 dimerization of *Arabidopsis* phototropins 1 and 2. *Journal of Molecular Biology* **381**, 718–733.
- Nauš J., Prokopová J., Řebíček J., Špundová M. (2010) SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis Research* **105**, 265–271.
- Nauš J., Rolencová M., Hlaváčková V. (2008) Is chloroplast movement in tobacco plants influenced systematically after local illumination or burning stress? *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1292–1299.
- Nožková V., Šmíd P., Horváth P., Hrabovský M., Ilík P. (2018) Non-invasive monitoring of Hydraulic surge propagation in a wounded tobacco plant. *Plant Methods* **14**: 38.
- O' Callaghan F.E., Braga R.A., Neilson R., MacFarlane S.A., Dupuy L.X. (2018) New live screening of plant-nematode interactions in the rhizosphere. *Scientific Reports* **8**: 1440.
- O' Callaghan F.E., Neilson R., MacFarlane S.A., Dupuy L.X. (2019) Dynamic biospeckle analysis, a new tool for the screening of plant nematicide selectivity. *Plant Methods* **15**: 155.
- Oulamara A., Tribillon G., Duvernoy J. (1989) Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics* **36**: 2.
- Pechník J. (2019) Sledování biologické aktivity listů rajčete pomocí jevu koherenční zrnitost. Univerzita Palackého, Olomouc, Czech Republic. 40 stran.
- Rabal H.J., Braga R.A. (2009) Dynamic laser speckle and applications, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, United States, 282 stran.

- Rabelo G.F., Braga R.A., Dal Fabbro I.M. (2005) Laser speckle techniques in quality evaluation of orange fruits. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **9**, 570–575.
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T.E., Christie J.M., Briggs W.R., Wada M., Okada K. (2001) Arabidopsis *nph1* and *npl1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6969–6974.
- Sato Y., Kadota A., Wada M. (1999) Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant Physiology* **121**, 37–44.
- Sato Y., Wada M., Kadota A. (2003) Accumulation response of chloroplasts induced by mechanical stimulation in bryophyte cells. *Planta* **215**, 772–777.
- Senn G. (1908) Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren: Mit einer Beilage: Die Lichtbrechung der lebenden Pflanzenzelle. Verlag von Wilhelm Engelmann, Berlin, Germany, 397 stran.
- Silva G.K., Aguiar R.H., Oliveira R.A., Fabbro I.M. (2020) Indirect determination of moisture using biospeckle technique. *Revista Ciencia Agronomica* **51**: 1.
- Suetsugu N., Wada M. (2008) Chloroplast relocation movement. *Plant Cell Monographs* **13**, 1–32.
- Svanberg K., Wang I., Liu D.L., Andersson-Engels S., Svanberg S. (1997) Laser Doppler perfusion imaging: New technique for determination of perfusion and reperfusion of splanchnic organs and tumor tissue. *Lasers in Surgery and Medicine* **20**, 473–479.
- Tazawa M., Kurosawa S., Amino S., Tominaga Y., Sakano K., Matsumoto T. (1991) Induction of cytoplasmic streaming and movement of chloroplast induced by L-histidine and its derivatives in leaves of *Egeria densa*. *Plant and Cell Physiology* **32**, 253–260.
- Thilakarathne S., Maheswari R.U., Kadono H. (2014) An optical interferometric technique for assessing ozone induced damage recovery under cumulative exposures for a Japanese rice cultivar. *SpringerPlus* **3**: 89.
- Tlačka M., Runquist M., Fricker M. (1999) Light perception and the role of the xanthophyll cycle in blue-light-dependent chloroplast movements in *Lemna trisulca* L. *The Plant Journal* **20**, 447–459.
- Trojan A., Gabryś H. (1996) Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) depends on light conditions during growth. *Plant Physiology* **111**, 419–425.
- Van der Kooij H.M., Susa A., García S.J., Van der Zwaag S., Sprakel J. (2017) Imaging the molecular motions of autonomous repair in a self-healing polymer. *Advanced Materials* **29**: 26.
- Vieira A.S., Braga R.A. (2020) Technological development of biospeckle laser: a systematic review. *International Journal of Latest Engineering and Management Research* **5**, 29–39.
- Vincitorio F.M., Budini N., Mulone C., Spector M., Freyre C., Díaz A.J.L., Ramil A. (2013) Detection of fungi colony growth on bones by dynamic speckle. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering* **8785**, 8785D2.
- Walczak T., Gabryś H. (1980) New type of photometer for measurements of transmission changes corresponding to chloroplast movements in leaves. *Photosynthetica* **14**, 65–72.
- Yan L., Liu J., Men S. (2017) The biospeckle method for early damage detection of fruits. *Modern Physics Letters B* **31**, 19–21.
- Zdunek A., Adamiak A., Pieczywek P.M., Kurenda A. (2014) The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: a review. *Optics and Lasers in Engineering* **52**, 276–285.
- Zdunek A., Cybulska J. (2011) Relation of biospeckle activity with quality attributes of apples. *Sensors* **11**, 6317–6327.
- Zhao Y., Wang J., Wu X., Williams F.W., Schmidt R.J. (1997) Point-wise and whole-field laser speckle intensity fluctuation measurements applied to botanical specimens. *Optics and Lasers in Engineering* **28**, 443–456.
- Zurzycki J. (1980) Blue light-induced intracellular movements. In: *The Blue Light Syndrome* (Senger H. ed.) Springer, New York, 50–68.

## PŘÍLOHY

### Příloha 1 Script v software GNU Octave

V této příloze bude stručně popsán skript pro zpracování snímků struktury koherenční zrnitosti. Skript byl vypracován na základě Braga a kol. (2016a) [www.nongnu.org/bslrl/](http://www.nongnu.org/bslrl/) a je optimalizován pro software GNU Octave 5.2.0 a operační systém Microsoft Windows 10.

Celé měření tvoří série snímků pořízené kamerou v minutovém intervalu. Série snímků jsou ukládány do adresářů označených pořadovým číslem. Celá měření jsou ukládána do adresáře s názvy obsahujícími pořadové číslo, den, měsíc a rok počátku měření.

Soubory snímků struktury koherenční zrnitosti jsou v rámci každé série snímků pojmenovány XXX.bmp, kde trojice XXX představují pořadová čísla snímků v sérii. Soubory jsou číslovány od 001, takže první snímek struktury koherenční zrnitosti v každé sérii nese název 001.bmp, druhý snímek je 002.bmp...poslední snímek v každé sérii je 030.bmp. Formát souboru snímku je BMP (Bitmap Image File Format) s barevným rozlišením 8 bitů (256 úrovní šedi).

K načtení dat ze souborů pořízených snímků je použit seznam IMAGESDIR=\*adresa\* který obsahuje názvy těchto souborů. V dalším kroku se tento seznam vytvoří DATA=datapack (IMAGESDIR, ‘,‘,1,30,‘bmp‘). Následně je vždy pro každou sérii snímků struktury koherenční zrnitosti vytvořena matice o stejné dimenzi jako pořízené snímky. Do těchto matic se uloží hodnoty vypočtené z operací mezi snímky v sérii. Na závěr se matice vypočtených hodnot biologické aktivity uloží na disk počítače. K jejich archivaci se použije soubor typu TIF (Tagged Image File Format) s barevnou hloubkou 24 bitů totožnou s počtem bitů, které jsou použity pro reprezentaci hodnoty biologické aktivity. Tato barevná hloubka umožňuje archivovat hodnoty směrodatné odchylky s přesností až na sedm desetinných míst. Nedojde tak ke zkreslení vypočtených hodnot biologické aktivity během jejich uložení a dále soubor typu TIF nabízí rychlou vizualizaci vypočtených dat.

```
pkg load bs1t1
IMAGESDIR='C:\Users\Lenovo\Desktop\mereni_biospeckle\m01\01';
DATA=datapack(IMAGESDIR, '', 1, 30, 'bmp');

GIM=graphim(DATA);
print -dtif C:\Users\Lenovo\Desktop\vysledky\IM-01.tif

FUJII=fujii(DATA);
print -dtif C:\Users\Lenovo\Desktop\vysledky\FUJII-01.tif

figure('name', '');
MHI=graphmhi(DATA, 11);
print -dtif C:\Users\Lenovo\Desktop\vysledky\MHI-01.tif

Y=gendiff(DATA);
print -dtif C:\Users\Lenovo\Desktop\vysledky\GENDIFF-01.tif

GAVD=graphavd(DATA);
print -dtif C:\Users\Lenovo\Desktop\vysledky\GAVD-01.tif

[C D E]=stdcont(DATA);

THSP=thsp(DATA, 'line', 240);
COM=coom(THSP);
print -dtif C:\Users\Lenovo\Desktop\vysledky\COM-01.tif
[IM1 IM2]=inertiamoment(COM, 2)
```

## Příloha 2 Spektrum dichroického filtru FD1B

