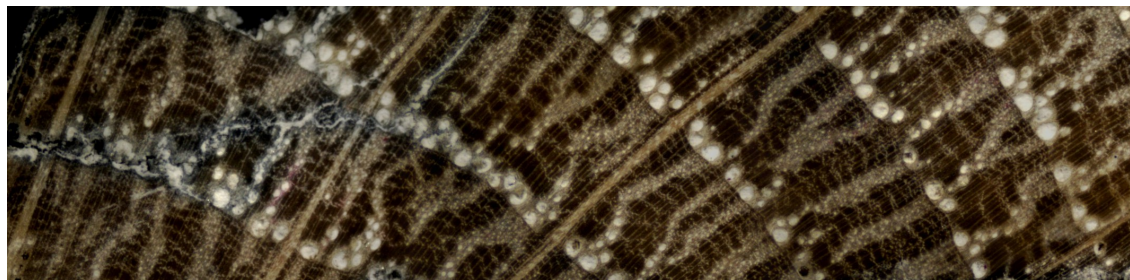


Mikroskopické techniky rostlinných |



Měření cév



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdelávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

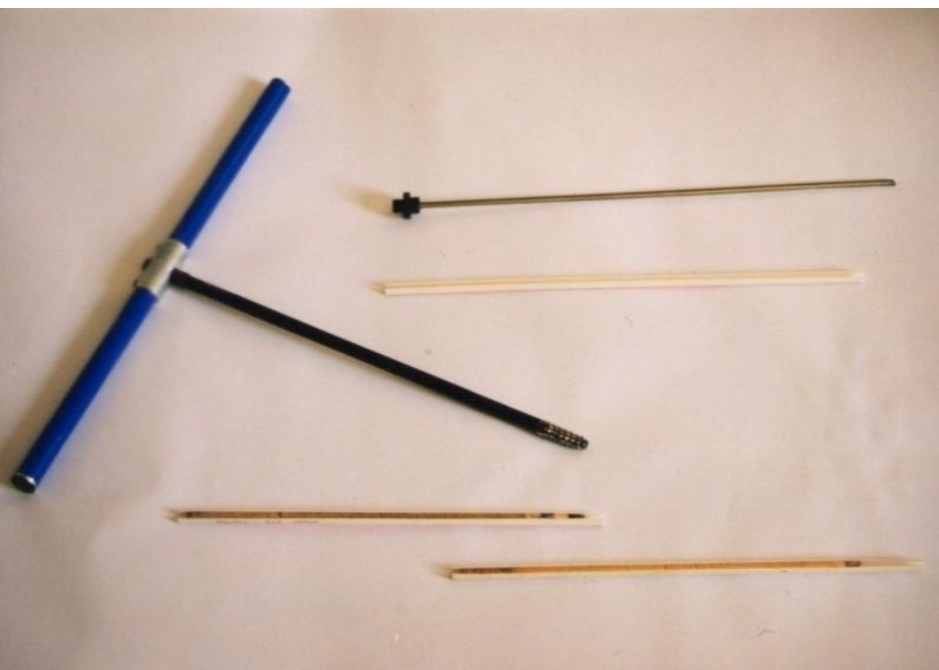
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018

- Odběr vzorků
- Zarovnání příčného řezu
- Odstranění thyl, zvýšení kontrastu lumenů
- Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků
- Měření rozměrů cév

Odběr vzorků

Odběr vzorků

Přírůstovým nebozezem



Výřez z kotouče (čela výřezu)

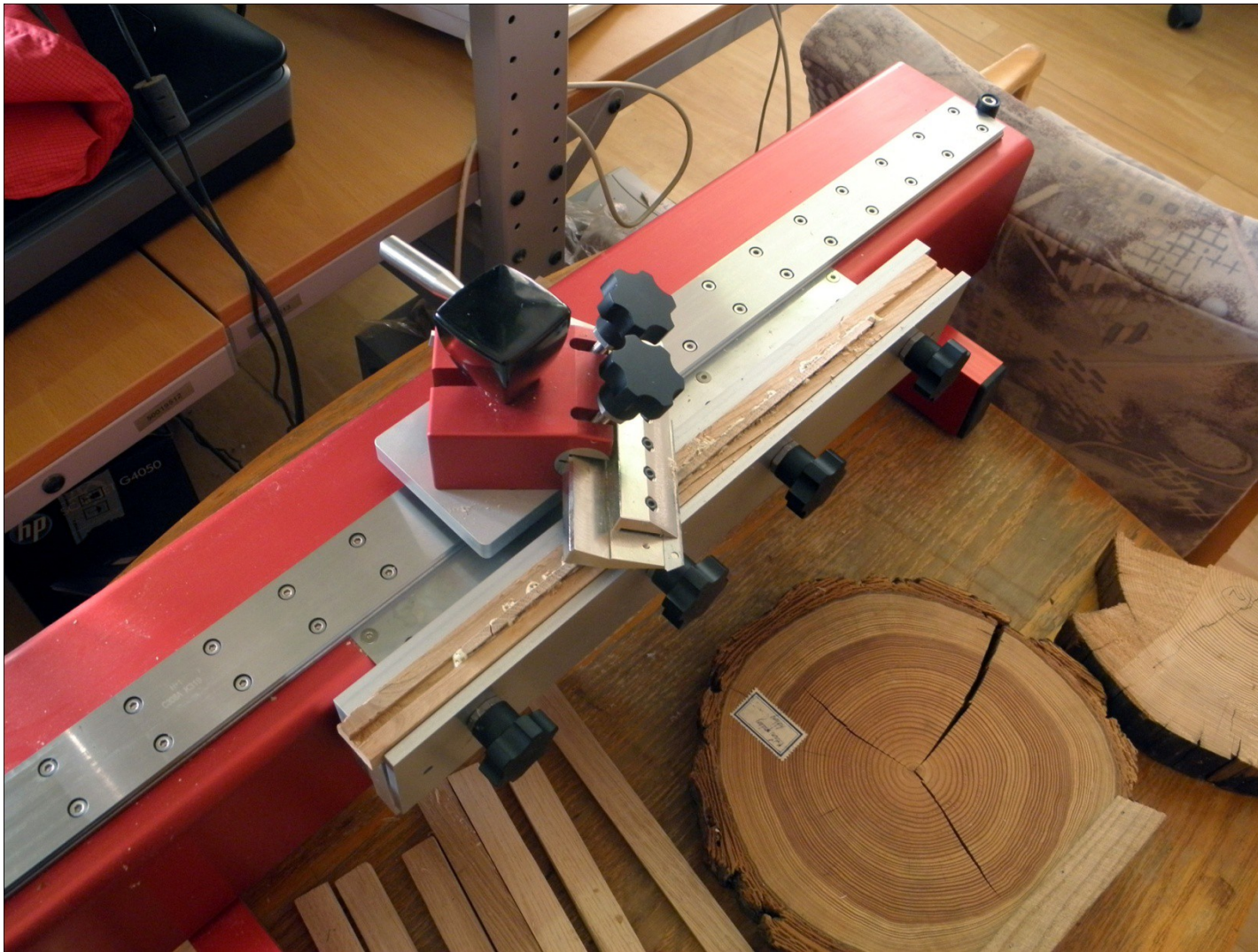


Zarovnání příčného řezu

- Sáčkový mikrotom
- Správná orientace vzorku (zejména u vývrtů)!
- Postup:
 - Umožňuje-li mikrotom řezat dlouhé vzorky, vlepí vývrt do dřevěné lišty voděodolným lepidlem
 - Nelze-li řezat najednou celý vzorek (vývrt i výřez), rozdělit vzorek na sekce řezy vedenými **šikmo** na letokruhy
 - Před řezáním namočit vzorek (vývrt 1 hodinu, výřez dle jeho rozměrů)



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018

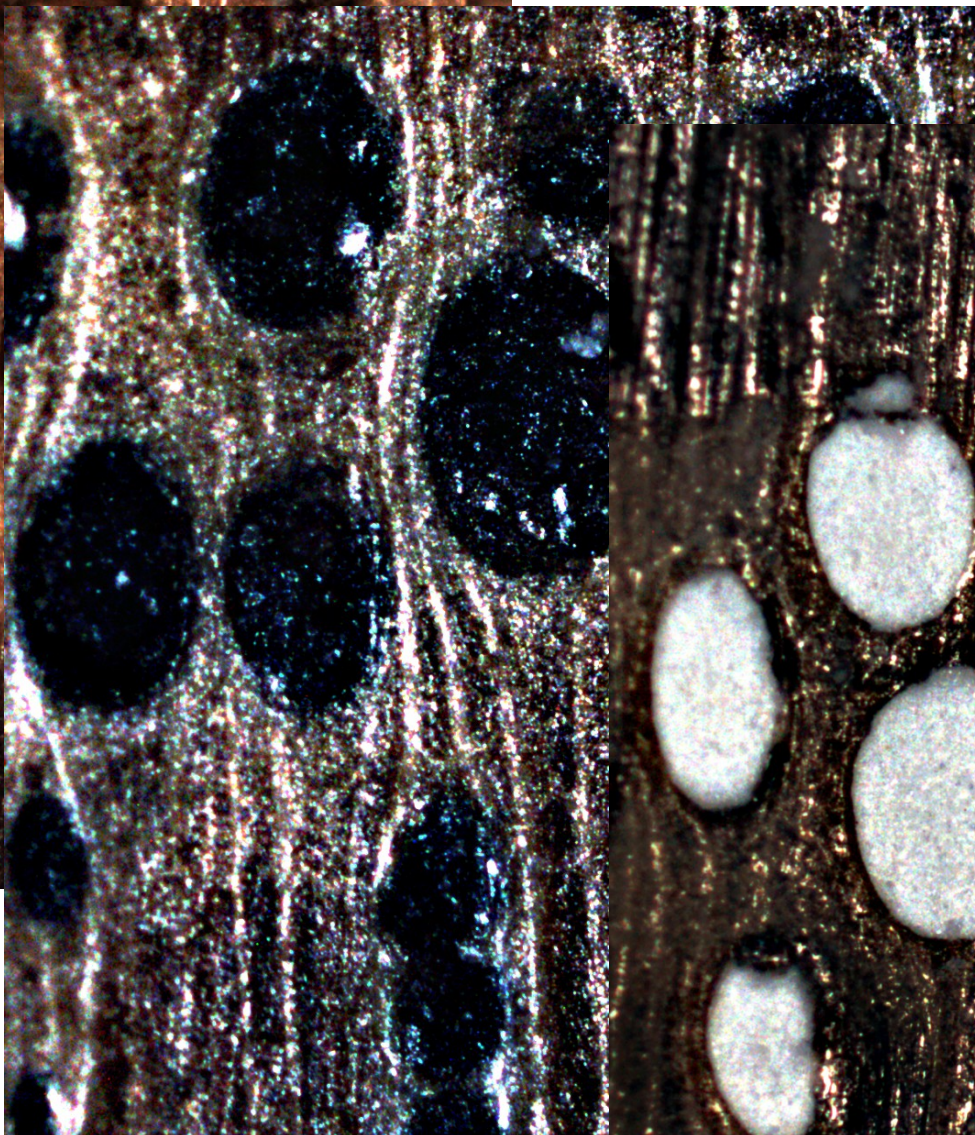
Odstranění thyl, zvýšení kontrastu lumenů

- Thyly, vyplňující lumen, znemožňují automatické měření rozměrů lumenu.
- Mohou vypadat jako hranice mezi dvěma cévami nebo cévu zmenšovat (thyla zabraňuje křídě vyplnit celý lumen, nebo tvoří předěl v lumenu).

Odstranění thyl, zvýšení kontrastu lumenů

- Thyly lze odstranit tlakem proudící kapaliny (jsou odstraněny úplně) nebo lze jejich negativní působení potlačit vyplněním lumenu vhodnou hmotou (plastelína), která je dokáže zatlačit hlouběji do cévy a rovnoměrně vyplnit lumen.
- Posledním krokem je „vizualizace“ lumenů – zvýšení kontrastu lumenu vůči okolí pomocí křídý

ní kontrastu



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem České republiky



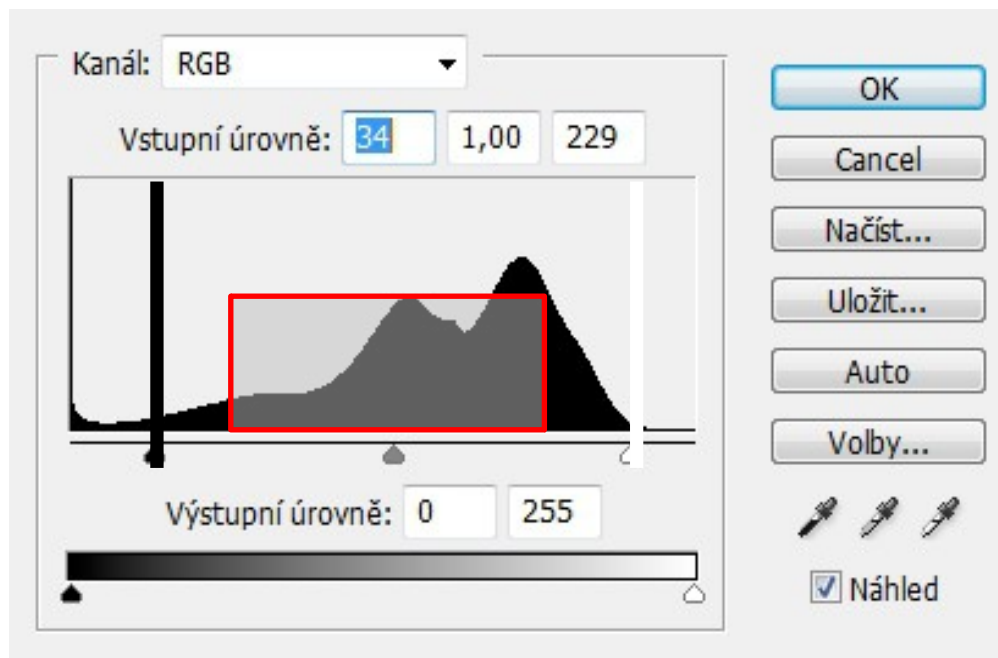
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem ČR InoBio – CZ.1.07/2.2.00/28.0018

Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků

Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků

- Upravený vzorek nasnímáme digitální kamerou přes stereolupu (větší zorné pole a hloubka ostrosti oproti mikroskopu; není třeba tak velkých detailů).
- Před samotným snímáním je třeba provést vyvážení bílé (bílý je lumen makrocévy) a nastavit černý, šedý a bílý bod podle histogramu.

Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků



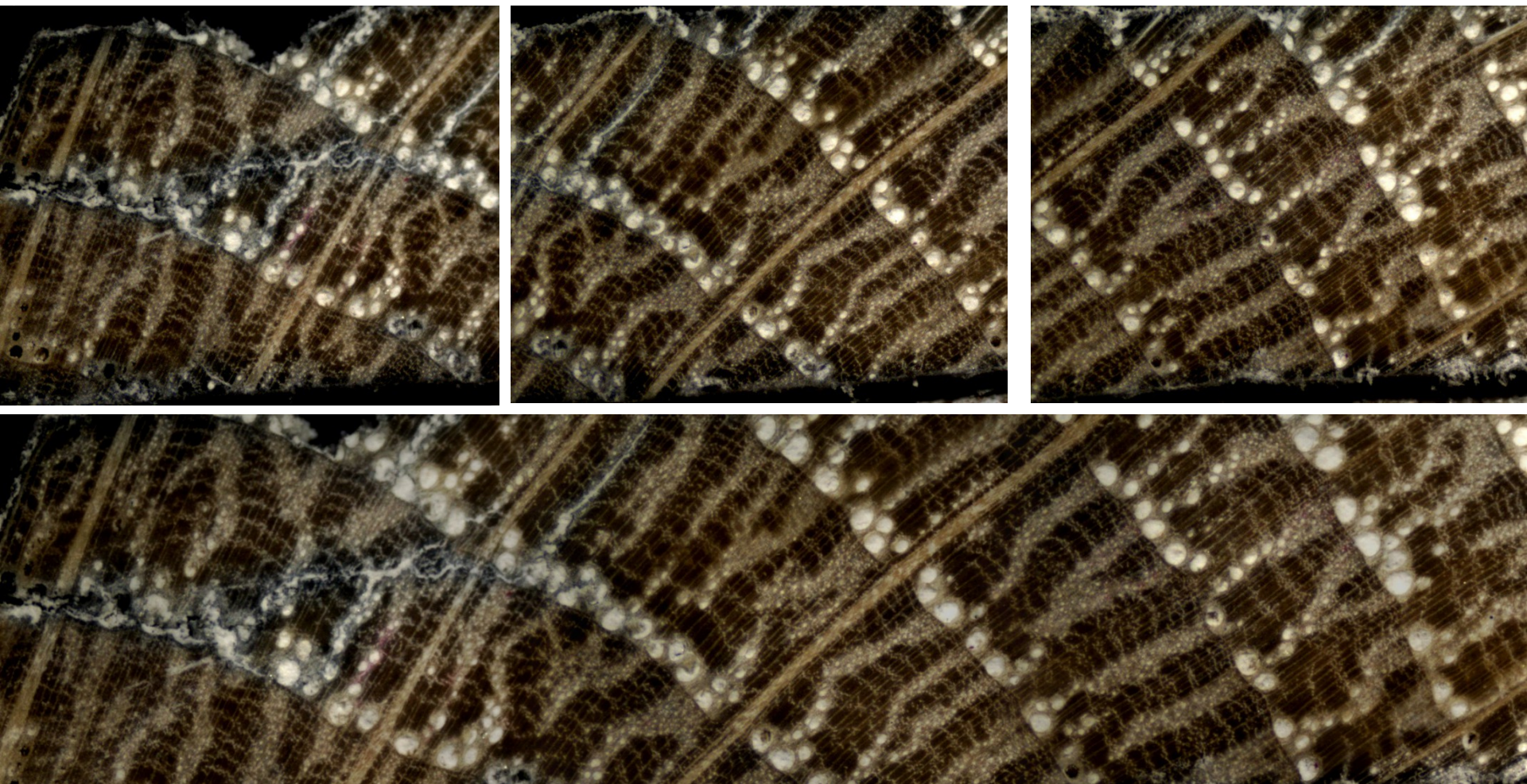
Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků

- Vzorek mezi jednotlivými snímky opatrně posouváme rovnoběžně se snímačem v kameře. Přitom dbáme na dostatečný přesah u dvou sousedních snímků (důležité pro sesazení do panoramatu)
- Současně se vzorkem nasnímáme kalibrační proužek umístěný ve stejné vzdálenosti od objektivu, jako povrch vzorku.

Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků

- K sesazení snímků je nutné použít program, který umí sesadit snímky, aniž by je deformoval (obvyklé u editorů panoramat). Došlo by totiž ke sférickému zkreslení rozměrů!
- Dále je nutné, aby program umožňoval uložit výslednou kompozici obrazů v plném (původním) rozlišení bez komprese.
- Vhodný je k tomuto účelu program Adobe Photoshop CS a vyšší řady.

Digitalizace příčného řezu, úprava a sesazení snímků



Měření rozměrů cév WinCELL

Měření rozměrů cév - WinCELL

- A) Kalibrace
- B) Nastavení barevných kanálů a parametrů
- C) Retušování
- D) Měření

A) Kalibrace

- Před měřením je nutno zadat, jakou skutečnou velikost představuje jeden obrazový bod snímku – tato operace se nazývá kalibrace.
- Ve vhodném programu (např. ImageJ) otevřeme snímek s kalibračním proužkem pro daný vzorek a ručně změříme velikost proužku v pixelech.

A) Kalibrace

- Měření několikrát opakujeme a z naměřených hodnot vypočítáme průměr.
- Výsledkem je délka proužku v pixelech. Je – li skutečná délka proužku např. 1mm (1000 μm) a délka proužku v pixelech x , pak:

- Rozlišení snímku $R = \frac{x}{1000} \text{ px} / \mu\text{m}$

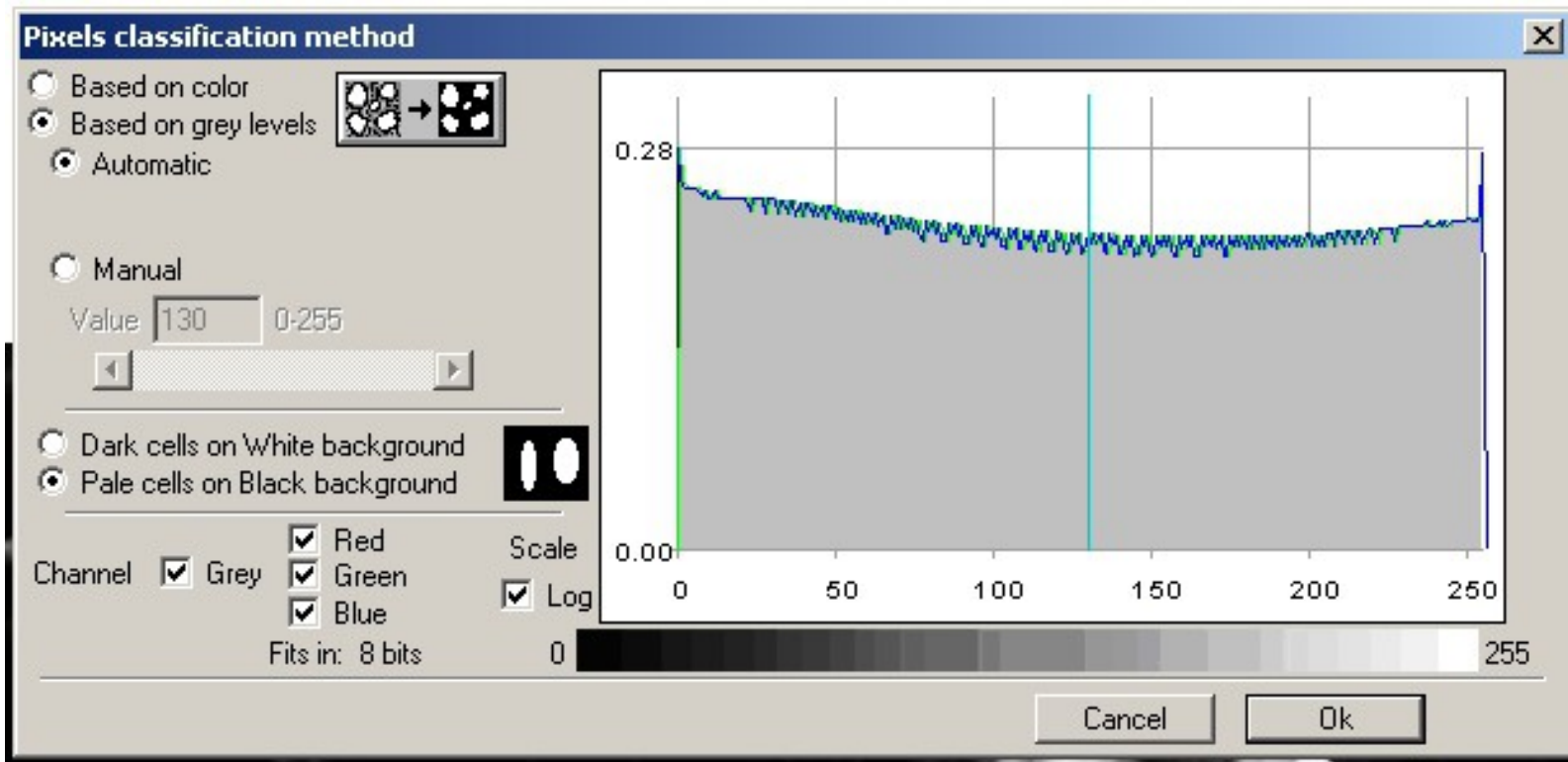
- Hodnota kalibrační konstanty = $\frac{1}{R}$

A) Kalibrace

- Kalibrační soubor buď vytvoříme, nebo upravíme jiný.
- V hlavní liště zvolíme záložku Calibration – New/Load
- Vepíšeme hodnotu do kalibračního souboru (2x) a uložíme
- Kalibraní soubor (.cal) bude uložen do složky, ve které je umístěn analyzovaný snímek.

B) Nastavení barevných kanálů a parametrů

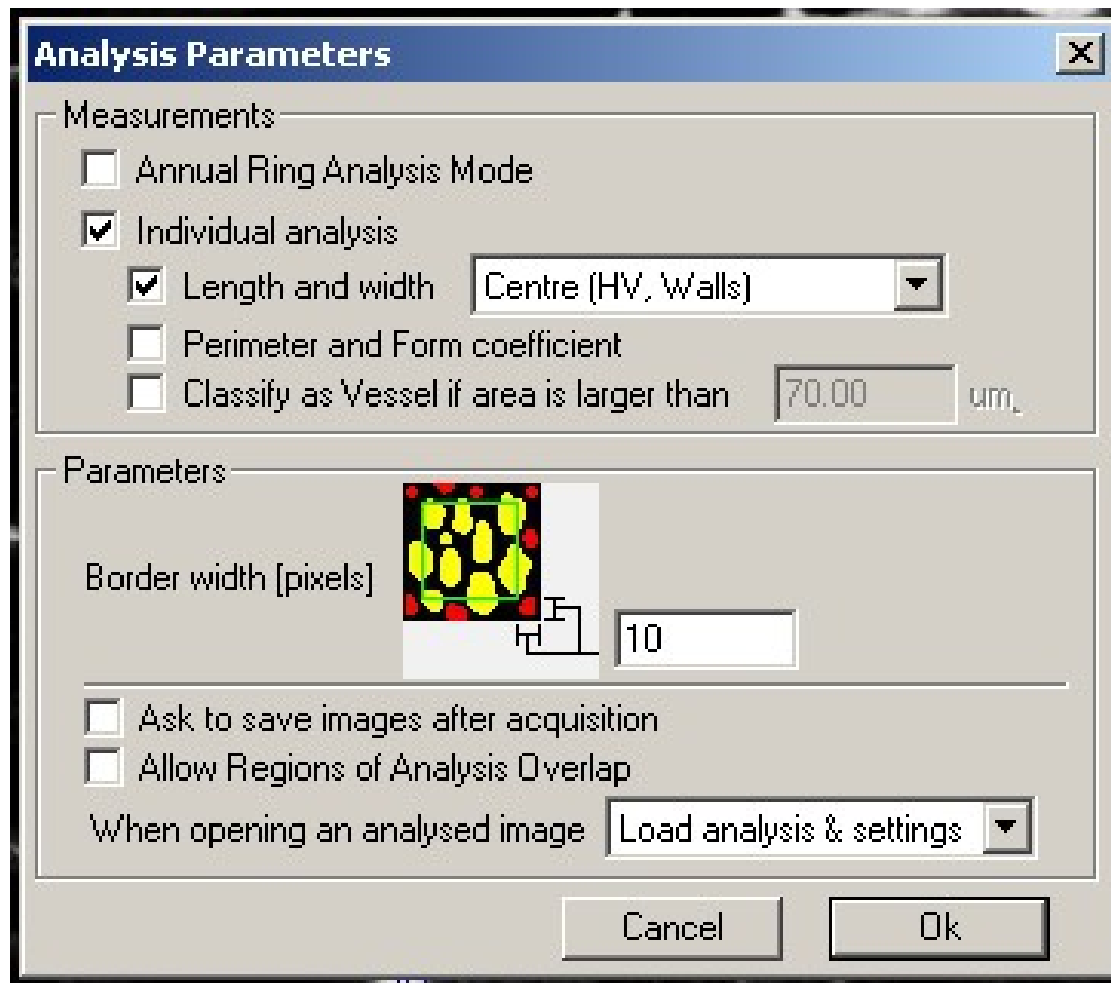
- Je třeba zadat, zda má program obraz analyzovat jako černobílý (true grey), nebo barevný (RGB).



B) Nastavení barevných kanálů a parametrů

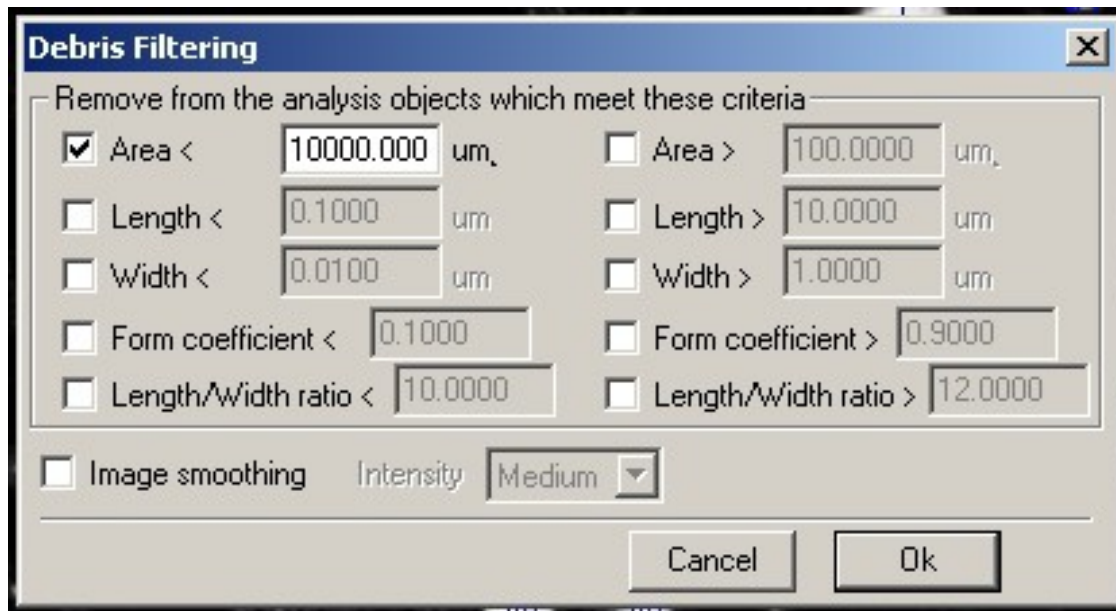
- Složitější, ale přesnější (pro některé typy obrázků) je RGB analýza, která ale vyžaduje kalibraci barevných kanálů a tvorbu barevných tříd a skupin (viz manuál str. 45 a 85)
- V záložce *Analysis – Parameters* označíme *INDIVIDUAL ANALYSIS*
- V nabídce *Parametry*, můžeme také nastavit prahovou hodnotu velikosti pro požadovaný dřevní element.

B) Nastavení barevných kanálů a parametrů



B) Nastavení barevných kanálů a parametrů

- V záložce *Analysis – Filter* nastavíme požadované hodnoty pro odfiltrování objektů na snímku, které nejsou měřeným dřevním elementem (např. minimální a maximální plochu, délku, šířku, poměr délky a šířky...)

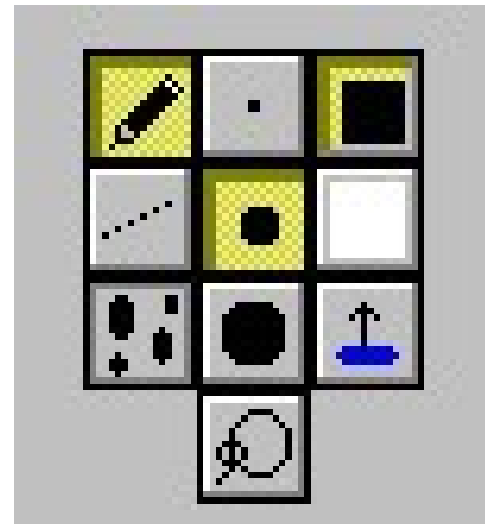


C) Retušování

- Na každém snímku se objeví nedokonalosti (vzorku, či obrazu), které mohou způsobit zkreslení výsledků měření (např. thyly v lumenech, porušené buněčné stěny či přeexponování = spojení dvou lumenů do jednoho atd.)
- Tyto nedokonalosti je možno odstranit retušováním pomocí jednoho z nástrojů programu WinCELL.

C) Retušování

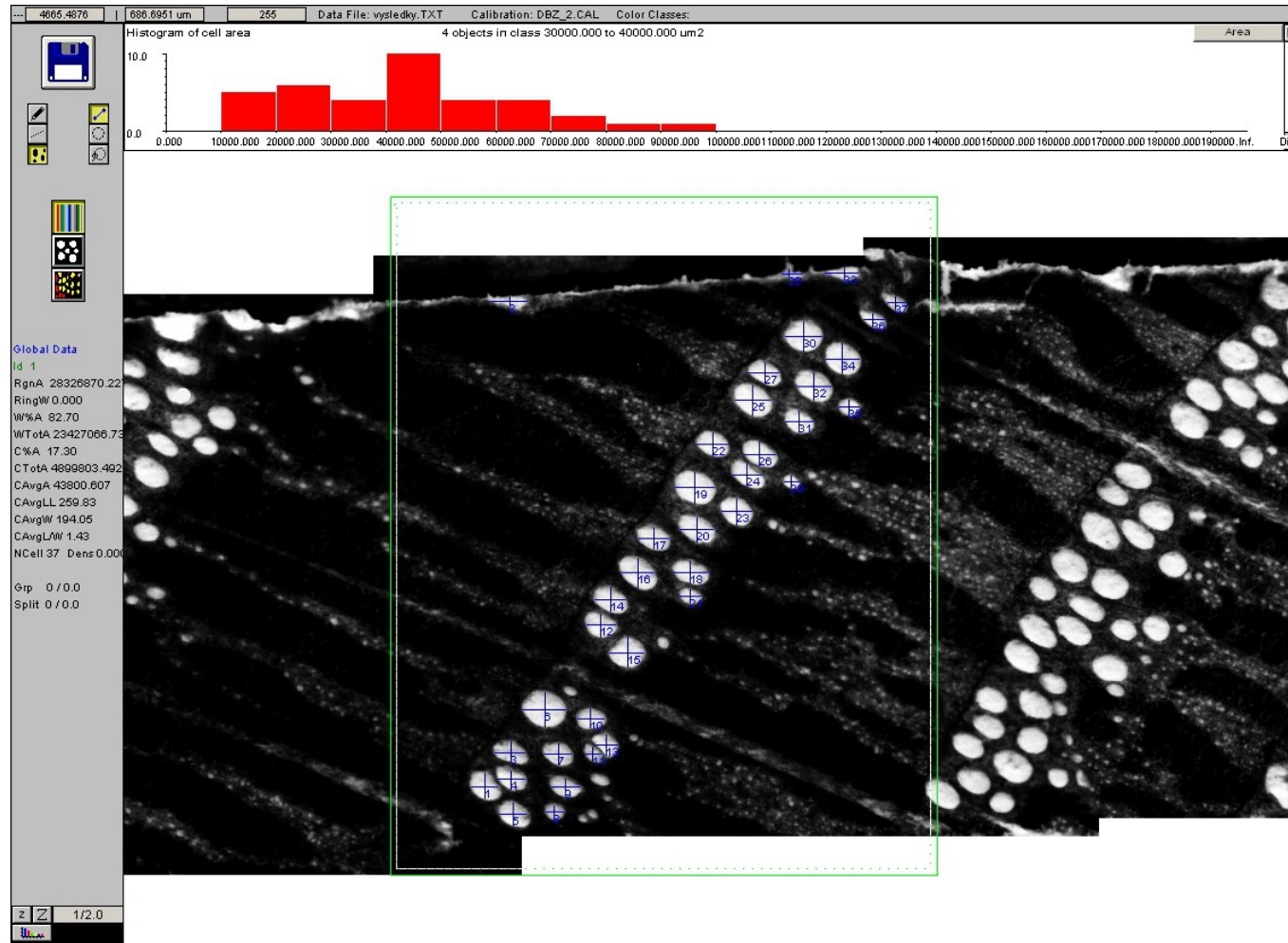
- Tyto úpravy však nejdou opravit během režimu analýzy a jsou zrušeny při vypnutí analýzy.
- Vhodnější metodou je provést retuš v jiném editoru a změny uložit. Do programu WinCELL pak načíst opravený snímek.



D) Měření

- Měřit lze různými způsoby:
 - Celý snímek kliknutím levým tlačítkem myši do obrázku
 - Vyznačením pravidelné oblasti
 - Měření oblasti s nepravidelným tvarem („laso“)

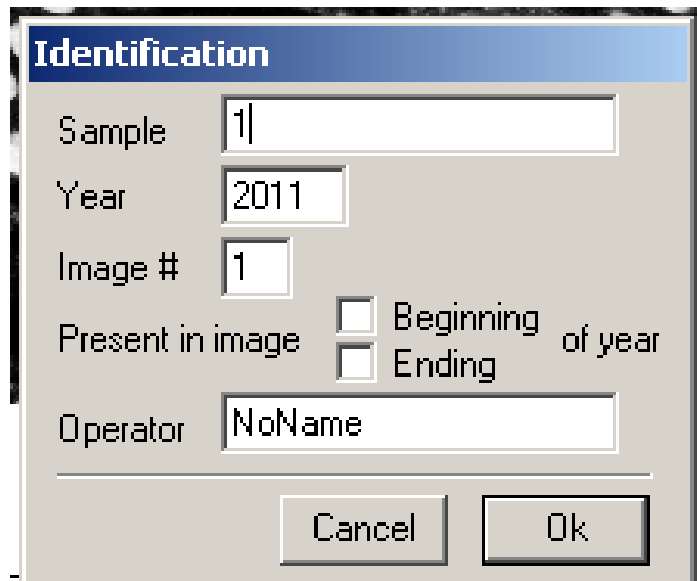
D) Měření



D) Měření

- Jakmile vyznačíme oblast/klikneme, objeví se dialogové okno pro identifikaci výsledku měření z dané oblasti (číslo, rok...), poté dialogové okno pro ukládání dat. Vybereme jednu z možností (*Create one*, *Open One*), která buď vytvoří nový soubor, nebo přepíše starý (respektive přiřadí současné měření ke starším ve vybraném souboru).

D) Měření



Identification

Sample

Year

Image #

Present in image Beginning of year
 Ending

Operator

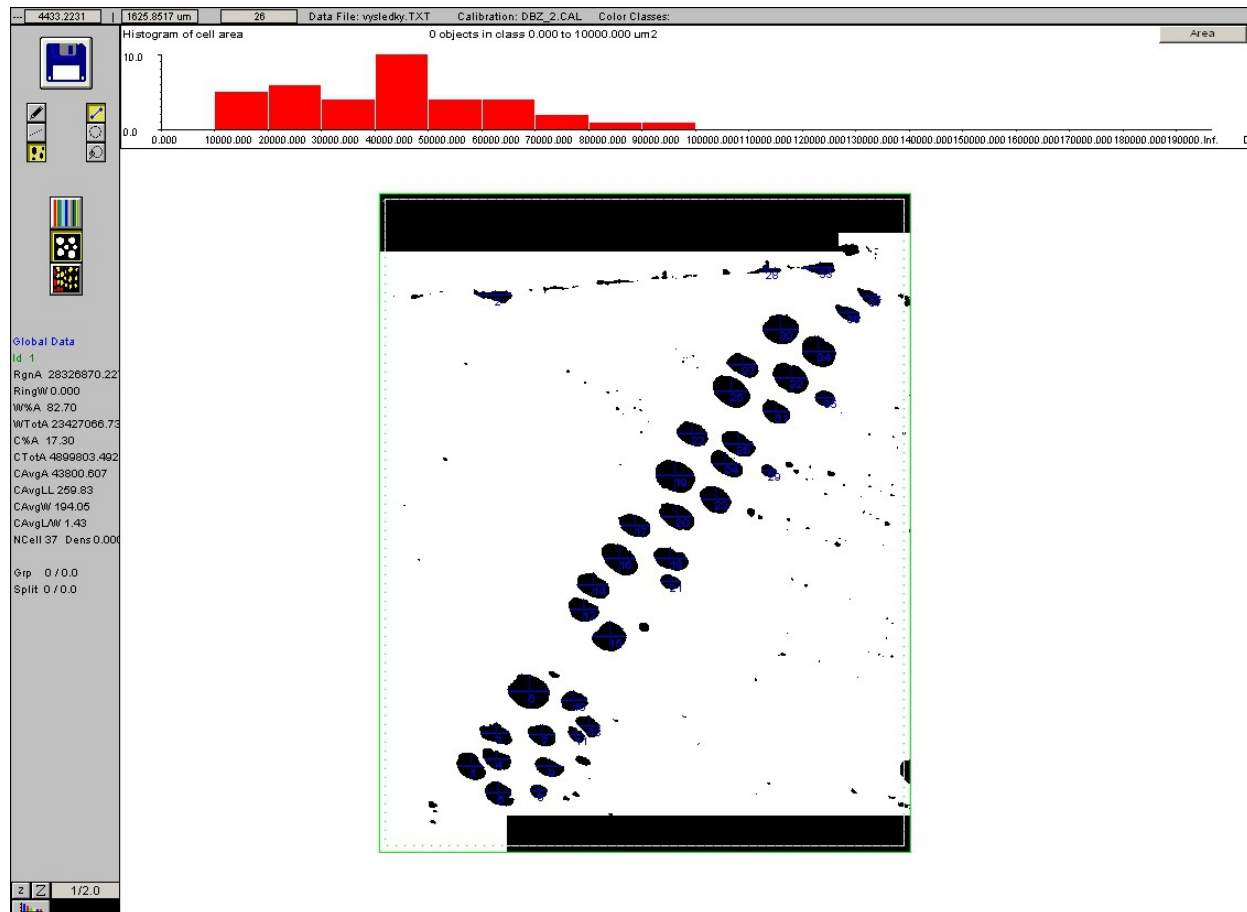


Data are ready to be saved.
No data file is open,
would you like to :

D) Měření

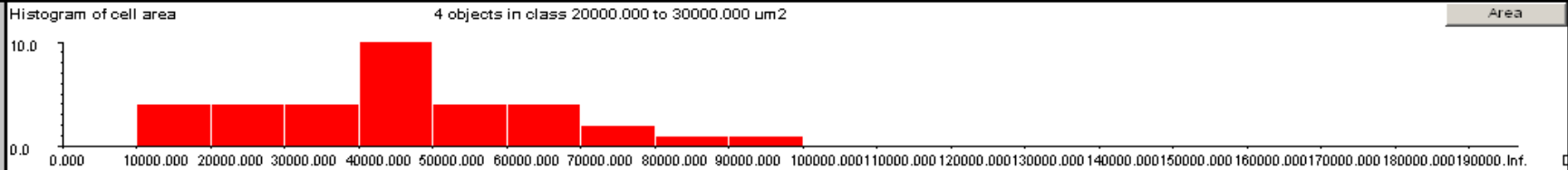
- Výsledky měření jsou ukládány do textového souboru (.txt)
- Při každé změně program automaticky přepisuje výsledky, nebo přidává výsledky z další měřené oblasti
- Během měření nelze upravovat snímek. Pokud je ve vyznačené oblasti místo, kde program nedokáže správně rozlišit lumény cév, můžeme postupovat několika způsoby

D) Měření

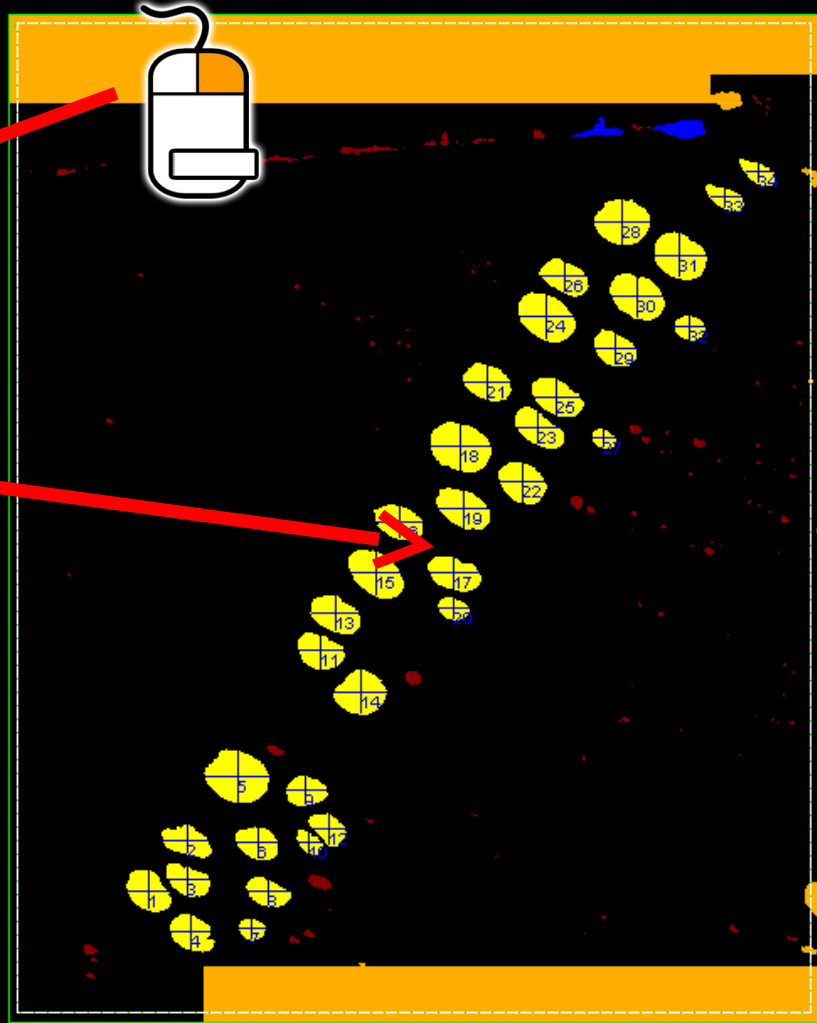


D) Měření

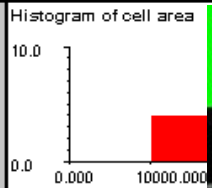
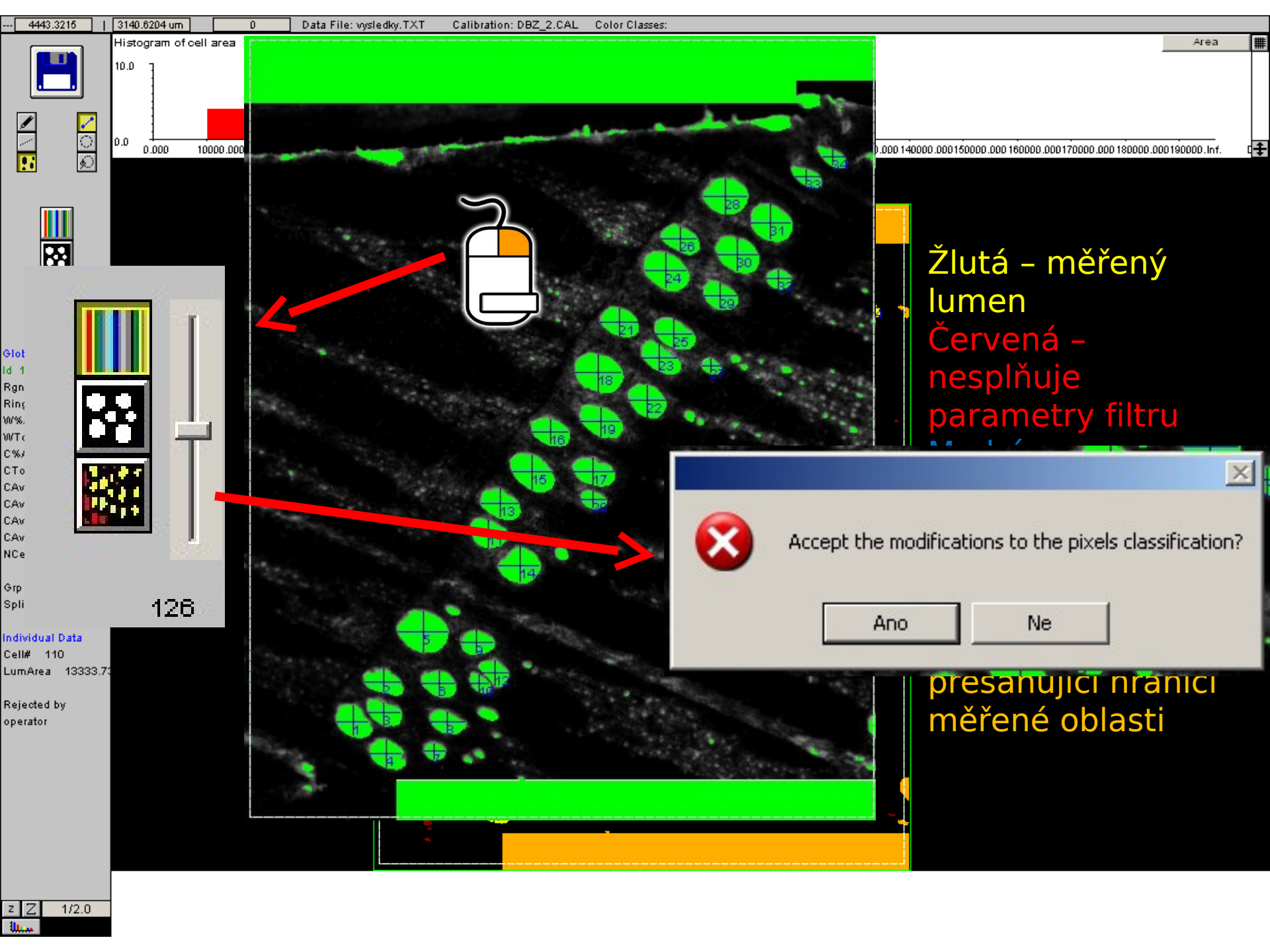
- Možnosti opravy měření:
 - Nastavení filtru (vyžaduje *cancel analysis*)
 - Odebrání měřeného objektu, který není céva, z výsledků (Ctrl+klik na objekt)
 - Nastavení prahu detekce (klik pravým tlačítkem do zvolené oblasti a nastavení rahování pomocí posuvníku vlevo)
 - Retušování (vyžaduje *cancel analysis*)



Global Data
Id 1
RgnA 28326870.22
RingW 0.000
W%A 82.93
WTotA 23490803.51
C%A 17.07
CTotA 4836066.708
CAvgA 46790.755
CAvgLL 258.25
CAvgW 203.01
CAvgLAW 1.29
NCell 34 Dens 0.000
Grp 0 / 0.0
Split 0 / 0.0
Individual Data
Cell# 110
LumArea 13333.70
Rejected by operator



Žlutá - měřený lumen
Červená - nesplňuje parametry filtru
Modrá - odstraněno z výsledků ručně (Ctrl+klik)
Oranžová - okolí snímku + objekty přesahující hranici měřené oblasti



Žlutá - měřený lumen
Červená - nesplňuje parametry filtru

Accept the modifications to the pixels classification?

Ano Ne

presahující hranici měřené oblasti

4443.3215 | 3140.6204 um | 0 | Data File: vysledky.TXT | Calibration: DBZ_2.CAL | Color Classes:

Area

0.000 140000.000 150000.000 160000.000 170000.000 180000.000 190000.000 Inf.

Glott
Id 1
Rgn
Ring
W%
WTc
C%
CTo
CAv
CAv
CAv
CAv
Nce

Grp
Spli

126

Individual Data
Cell# 110
LumArea 13333.70

Rejected by operator

z Z 1/2.0

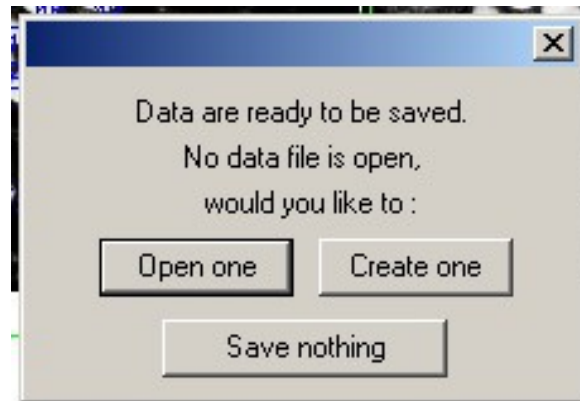
D) Měření

- Rozdělení sloučených cév (v případě, že program od sebe neodliší lumény a měří je jako jeden velký, přičemž prahování chybu nenapraví (aniž by výrazně ovlivnilo výsledky u jiných lumenů), provedeme rozdělení pomocí Ctrl+2*+klik Do výsledků je pak uložena dvakrát* polovina původního měření – označeno např. 3.1 a 3.2

*číslo dle počtu spojených lumenů.

D) Měření

- Je-li potřeba upravovat snímek v průběhu měření (např. chybu nelze napravit prahováním), není možné vypnout analýzu (*Analysis – Cancel analysis*), protože dojde k odstranění naměřených dat ze souboru. Nejprve musíme „zavřít“ datový soubor (*Data – Close file*) a teprve poté vypneme analýzu. Data zůstanou uložena a po úpravě obrazu v dalším měření zvolíme možnost *Open one* a pokračujeme.



D) Měření

- Na konci měření „zavřeme“ datový soubor a poté vypneme analýzu (případně celý program).
- Pokud daný datový soubor opět neotevřeme pomocí WinCELLu, zůstane nedotčen.

winCELL Pro 2011a	GLOBAL	ImageFileName	ImageXDpi	ImageYDpi	Operator	Date Time	ImageAcqDevi			
HistoOfClasses	HistoClasses	Boundaries	HistoData1	HistoData2...						
SampleId	CELL	Year	Image#	Cell#	Group#	Type	LumenArea	LumenLength	Lumenwidth	Hori:
SampleId	PATH	Year	Image#	PathName	CellRank	Cell#	LumenArea	LumenLength	Lumenwidth	wall:
SampleId	GROUP	Year	Image#	Group#	NObj	Type	AvgLumenArea	AvgLumenLength	AvgLumenwidth	AvgH
1	GLOBAL	DBZ_2_41_50t.jpg	72.0000	72.0000	NoName	5.12.2012 14:15:57	Adobe	Photoshop	CS	windows
1	CELL	2011	1	1	0	C	49816.6702	247.4122	237.3138	6132.0018
1	CELL	2011	1	2	0	C	41199.4570	272.6584	181.7722	6364.0064
1	CELL	2011	1	3	0	C	38089.1020	247.4122	171.6738	6369.1901
1	CELL	2011	1	4	0	C	44666.7380	242.3630	217.1168	6391.2288
1	CELL	2011	1	5	0	C	92877.2413	388.7906	313.0522	6666.8478
1	CELL	2011	1	6	0	C	39389.3323	247.4122	196.9199	6787.7782
1	CELL	2011	1	7	0	C	16342.1113	161.5753	131.2800	6754.4663
1	CELL	2011	1	8	0	C	34239.4002	257.5107	156.5261	6846.5590
1	CELL	2011	1	9	0	C	35616.1148	242.3630	181.7722	7077.6854
1	CELL	2011	1	10	0	C	16087.1642	141.3784	126.2307	7098.3358
1	CELL	2011	1	11	0	C	47063.2411	267.6091	207.0184	7161.8773
1	CELL	2011	1	12	0	C	29777.8254	196.9199	191.8707	7212.7501
1	CELL	2011	1	13	0	C	51448.3318	287.8061	227.2153	7254.2308
1	CELL	2011	1	14	0	C	62666.0058	323.1507	272.6584	7405.4030
1	CELL	2011	1	15	0	C	70033.9780	297.9045	267.6091	7498.0279
1	CELL	2011	1	16	0	C	47394.6724	277.7076	196.9199	7637.2020
1	CELL	2011	1	17	0	C	50250.0803	297.9045	201.9692	7966.9020
1	CELL	2011	1	18	0	C	84107.0598	358.4953	277.7076	8004.0320
1	CELL	2011	1	19	0	C	58484.8728	302.9537	227.2153	8021.9307
1	CELL	2011	1	20	0	C	20038.8448	191.8707	136.3292	7961.6191
1	CELL	2011	1	21	0	C	48694.9028	282.7568	212.0676	8165.3197
1	CELL	2011	1	22	0	C	54482.2027	272.6584	247.4122	8375.2249
1	CELL	2011	1	23	0	C	47445.6618	257.5107	201.9692	8471.9768
1	CELL	2011	1	24	0	C	75362.3731	328.1999	277.7076	8518.6147
1	CELL	2011	1	25	0	C	51652.2895	287.8061	217.1168	8581.9697
1	CELL	2011	1	26	0	C	44615.7486	272.6584	181.7722	8629.7671
1	CELL	2011	1	27	0	C	13308.2404	141.3784	116.1323	8863.3218
1	CELL	2011	1	28	0	C	71844.1026	338.2983	277.7076	8975.2124
1	CELL	2011	1	29	0	C	41658.3618	247.4122	201.9692	8928.6993
1	CELL	2011	1	30	0	C	68070.8850	308.0030	247.4122	9063.8332
1	CELL	2011	1	31	0	C	68988.6947	308.0030	277.7076	9320.2237
1	CELL	2011	1	32	0	C	21670.5065	191.8707	146.4276	9379.0676
1	CELL	2011	1	33	0	C	23047.2210	191.8707	126.2307	9592.3622
1	CELL	2011	1	34	0	C	20905.6651	176.7230	121.1815	9788.5831

Identification

Sample:

Year:

Image #:

Present in image: Beginning of year Ending of year

Operator:

Číslo cévy

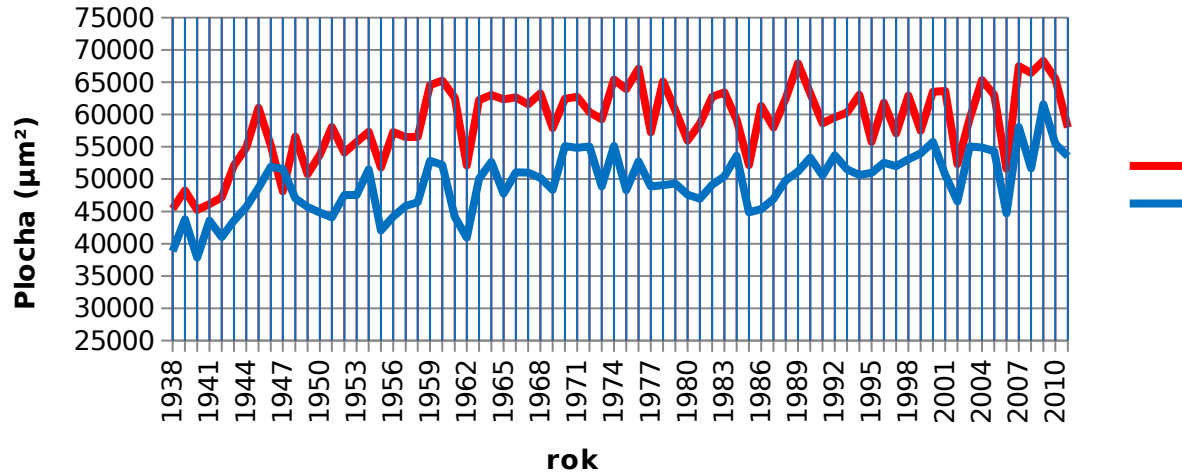
Plocha cévy

Šířka lumenu

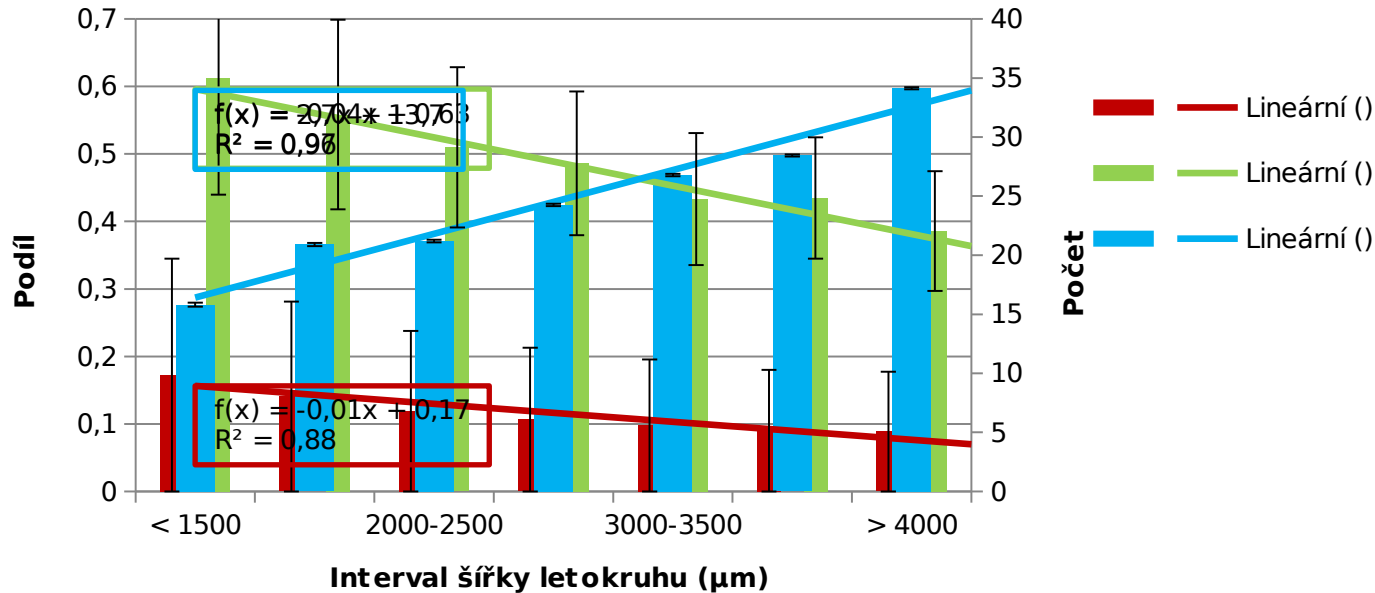
Délka lumenu

Výstupy

Porovnání průměrné velikosti cév (AVA)



Vliv šířky letokruhu na parametry makrocév (DBL) II



Děkuji za pozornost!