



Středoškolská technika 2016

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Změny elektrické aktivity rostlin v průběhu haptické stimulace a mechanického poškození

Natálie Pánková

Gymnázium Nad Štolou 1, Praha 7, 170 00

Anotace

Tato práce SOČ je pilotní studie zabývající se měřením akčních potenciálů rostlin pomocí elektromyografického přístroje. První část práce zahrnuje teoretické shrnutí základních poznatků týkajících se následujícího tématu, druhá část představuje vlastní výzkumnou práci. K experimentům byly vybrány čtyři exempláře rostlin různého druhu: *Aloe vera*, *Spathiphyllum*, *Hoya carnososa* a *Scindapsus*. Rostliny byly vystaveny třem situacím. Nejprve byla měřena elektrická aktivita rostlin v klidu, v druhé části byla pozorována jejich reakce na lidský dotek a v poslední části byla studována odpověď na příchozí telefonní signál s nepříjemným vyzváněním, po jehož doznění byly exempláře mechanicky poškozeny. Následovala anestézie rostlin diethyletherem, po jejíž skončení byl následující experiment zopakován. Získaná data byla zpracována a porovnána pomocí vlnkové transformace. Z uvedených rostlin na haptický kontakt a samotné mechanické poškození nejlépe reagovala rostlina *Aloe Vera*. Naopak *Spathiphyllum* a *Hoya carnososa* zachytily příchozí telefonní signál ještě před začátkem zvonění mobilního zařízení. Všechny z uvedených rostlin v průběhu experimentů měnily svou elektrickou aktivitu, čímž je dokázáno, že na dané vnější podmínky reagovaly. Diethylether způsobil snížení rostlinné elektrické aktivity a zmenšoval jejich reakce vůči vnějším podnětům.

Klíčová slova: neurobiologie, rostlinná éterová anestézie, elektrická aktivita rostlin, elektromyografický přístroj

Annotation

This work is a pilot study focused on measuring action potentials of plants with the use of an electromyographic device. The study is separated in two main parts: the theoretical one which contains major information connected to this topic, second part represents the performed experiment. Four different plants were chosen for this experiment: *Aloe Vera*, *Spathiphyllum*, *Scindapsus* and *Hoya carnososa* and their reaction to created external stimuli was measured. At first their resting electric activity was studied. Then I analyzed the change of their electric activity caused by human touch and at last I observed their reaction to incoming telephone signal with unpleasant ringtone bonded to a mechanical damage when the ringtone ended. Next came a part of plant anesthesia by diethylether after which the whole experiment was remade. Obtained data were processed and compared with the use of wavelet transformation. Reaction to human touch and mechanical damage was clearest in data gained from *Aloe Vera* plant. On the other hand *Spathiphyllum* and *Hoya carnososa* had responded to incoming telephone signal even before the ringtone started ringing. This response wasn't found in *Aloe Vera's* record. All of those plants changed their electric activity during the experiment, so this is the proof of their reactivity to created external stimuli. Diethylether caused overall decrease in plant's electric activity and the reactions to external stimuli were visibly smaller compared to the ones in normal conditions.

Key words: neurobiology, plant's diethylether anesthesia, plants electric signalization, electromyographic device

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem lidem, kteří při mě stáli a na utváření práce mi pomáhali.

Jmenovitě děkuji vedoucí mé práce Mgr. Kamile Babické za nadšení, čas a trpělivost a otci za poskytnutí laboratoře, veškerého vědeckého vybavení a celkovou kultivaci vědeckého projevu.

Dále bych chtěla srdečně poděkovat profesorovi RNDr. Františkovi Baluškoví, DrSc. za iniciaci etherového experimentu a Mgr. Michalovi Teplanovi, PhD. za podnětné připomínky.

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V dne

podpis:

Obsah

Anotace/Annotation.....	2
Seznam zkratk.....	6
Úvod.....	7
1. Historie rostlinné neurobiologie	9
2. Rozdíl v živočišné a rostlinné elektrické komunikaci	10
3. Typy elektrických signálů u rostlin	11
3.1 Klidový potenciál.....	11
3.2 Akční potenciál (AP)	11
3.3 Variační potenciál (VP)	12
4. Metody měření elektrických signálů	12
5. Zpracování biologického signálu	14
6. Vlnková transformace.....	14
7. Poznátky z předchozích experimentů	15
8. Diethylether	18
8.1 Základní vlastnosti.....	18
8.2 Rostlinná éterová anestézie.....	18
9. Praktická část.....	19
9.1 Cíl práce.....	19
9.2 Hypotézy.....	19
9.3 Metodika	19
9.4 Výsledky	22
9.4.1 Měření na rostlině <i>Aloe vera</i>	22
Měření v klidu za normálních podmínek	22
Haptický kontakt za normálních podmínek	22
Mechanické poškození za normálních podmínek	23
Klidový potenciál po éterové anestézii	23
Haptický kontakt po éterové anestézii	23
Mechanické poškození po éterové anestézii	24
Souhrn výsledků získaných na rostlině <i>Aloe vera</i>	24
9.4.2 Měření na rostlině <i>Spathiphyllum</i>	25
Měření v klidu za normálních podmínek	25
Haptický kontakt za normálních podmínek.....	25
Mechanické poškození za normálních podmínek	26
Klidový režim po éterové anestézii	26
Haptický kontakt po éterové anestézii	27
Mechanické poškození po éterové anestézii	27

Souhrn výsledků získaných na rostlině <i>Spathiphyllum</i>	28
9.2.3 Měření na rostlině <i>Scindapsus</i>	28
Měření v klidu za normálních podmínek	28
Haptický kontakt za normálních podmínek	29
Mechanické poškození za normálních podmínek	29
Měření v klidu po éterové anestézii	30
Haptický kontakt po éterové anestézii	30
Mechanické poškození po éterové anestézii	31
Souhrn výsledků získaných na rostlině <i>Scindapsus</i>	31
Diskuze	33
Závěr	36
Seznam použité literatury	37
Přílohy	39

Seznam zkratk

AP	akční potenciál
VP	variační potenciál
SWP	slow wave potencial
WT	vlnková transformace
DWT	diskrétní vlnková transformace
CWT	spojitá vlnková transformace
D.E.	diethylether

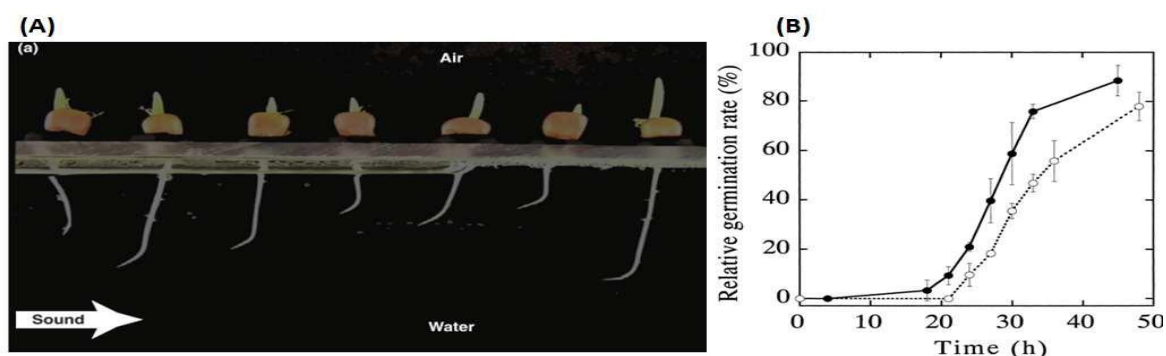
Úvod

V této práci se budu věnovat komunikaci rostlin s jejich okolím. K experimentům mě vedla touha dozvědět se více o tomto zajímavém avšak prozatím málo odborně prozkoumaném tématu. Náplní práce je provedení série pokusů, ve kterých se budu zabývat měřením elektrických signálů rostlin pomocí elektromyografického přístroje (přístroje určeného k registraci elektrické aktivity svalů).

Když je rostlina v klidu – v prostředí, kde jsou více méně konstantní podmínky - dají se u ní naměřit takzvané klidové potenciály. Tyto potenciály mají stále stejný průběh a poměrně malou amplitudu. Jakmile se však mění vnější podmínky, mění se na potenciály akční. Ráda bych pozorovala reakci rostlin na lidský dotek a mechanické poškození následované po zvukovém podnětu vysílaném z mobilního zařízení a porovnávala tyto reakce s elektrickou aktivitou rostliny v klidu. Kromě studie těchto reakcí bych ráda provedla rostlinnou anestézii diethyletherem a zjistila, jaký vliv má látka na jejich reaktivitu.

Ráda bych se přesvědčila, že rostlina není jen pasivní organismus, ale že je schopná komunikovat se svým okolím, učit se a pamatovat si. Rostliny mezi sebou komunikují akusticky (pro nás neslyšitelně), vypouštěním chemických látek do ovzduší (nejčastější forma jak rostliny varují své sousedy před hrozcím nebezpečím) a pomocí elektrických signálů (Bais, 2004).

Skutečnost, že rostliny vnímají zvukové podněty a samy pomocí nich komunikují, je teprve nedávné zjištění biologů. V šedesátých a sedmdesátých letech probíhalo mnoho experimentů, při kterých byla rostlinám přehrávána hudba různého druhu a pozorována jejich reakce. Bylo zjištěno, že rostliny rostou mnohem rychleji při klasické, jazzové a meditační hudbě a naopak rocková a metalová hudba jim velice razantně zkracuje život. Tato zjištění měla velký dopad na veřejnost. Mnoho obyvatel (převážně Ameriky, kde probíhaly experimenty tohoto typu nejvíce) začalo svým rostlinám pouštět hudbu od Bacha a Mozarta, aby jim rostlinky lépe rostly. V pozdější době byl u rostlin zjištěn něco jako fonotropismus (obrázek 1): klíčící rostlinky kukuřice vydávají při svém růstu klapavý zvuk, a když byl zvuk o stejné frekvenci (tj. 200 Hz) rostlinám pouštěn, začaly rostliny okamžitě růst ke zdroji tohoto zvuku (Gagliano et al., 2012).



Obrázek 1: zvuk a vibrace - semena kukuřice, která kořeni do trubky s vodou, kde se zleva pouští zvuk o frekvenci 220Hz zjevně rostou směrem za zvukem (A) (Gagliano et al., 2012). Semínka *Arabidopsis thaliana* vystavená vibracím (100Hz / amplituda 0,42mm, plné body) klíčí s vyšší úspěšností než kontrolní semínka (prázdné body) (B) (Uchida, 2002)

Pro příjem zvuku jsou rostliny poměrně dobře disponovány. Kořenové vlásky mohou zvukové vibrace efektivně zachycovat a kořeny rostlin jsou dobře akusticky vodivé.

I nadzemní části rostlin zvuk dobře zachycují (Price, 1988), a právě z tohoto důvodu se dají stromy dobře využít pro odstínění hluku. Fakt, že rostliny mezi sebou akusticky komunikují, však stále nebyl všemi odborníky plně přijat. Otázkou také je, co je myšleno slovem sluch, rostliny ho možná vnímají jen jako vlnění, a tak by se jednalo spíše o formu mechanorecepce.

Rostliny komunikují mezi jednotlivými buňkami a částmi jejich těla a také s dalšími příslušníky svého rodu (Dicke, Abreal, Bruin; 2003). Například když začne housenka ožvykovat list dané rostliny, okamžitě se z poraněného místa vyše signál o hrozícím nebezpečí do řídicího centra rostliny a z něj do ostatních listů. Zároveň se spustí jeden z mnoha obranných mechanismů rostliny – extrakce chemických látek pro daného parazita odpudivých a další reakce (Appell, Cocroft, 2014).

Hlavním cílem této práce je ukázat, že pomocí elektromyografu lze měřit elektrické potenciály rostlin a na základě vlnkové analýzy příslušné reakce těchto organismů studovat.

Komunikací mezi jednotlivými rostlinami a mezibuněčnou komunikací v rámci rostlinného těla se už po delší dobu biologové zabývají, avšak obor rostlinné neurobiologie je velice mladý, málo rozvinutý a aktivně se jím zabývá poměrně málo lidí. Experimenty s registrací elektrické aktivity rostlin pomocí elektromyografu a vyhodnocení dat prostřednictvím matematické metody nazývané vlnková analýza nebyly doposud publikovány. Jedná se tedy o pilotní studii.

1. Historie rostlinné neurobiologie

První kdo objevil akční potenciály (zkráceně jen AP) u rostlin, byl roku 1873 Burdon-Sanderson. Sanderson studoval akční potenciály probíhající u mucholapky podivné po mechanickém podráždění. Zjistil, že mezi podnětem a AP je 0,25 - 0,3 sekundy prodleva a jednotlivé vzruchy probíhají v intervalu po 10 až 20 sekundách. V roce 1930 byly pomocí mikroelektrod AP poprvé naměřeny - dokonce dříve než proběhlo první intracelulární měření AP ve zvířecích buňkách. Roku 1950 byly rostlinné AP porovnávány s potenciály v lidských nervech a byla mezi nimi nalezena určitá podobnost, ačkoliv iontové kanály, zásadní pro šíření akčních potenciálů, byly v rostlinách objeveny až roku 1984. První kompletnější shrnutí přináší Sibaoka (1966, 1969) a Pickard (1973), kteří potvrdili, že všechny vyšší rostliny mohou elektrické signály využívat. Poměrně nedávno byly v rostlinách objeveny neurotransmitery (glutamin, dopamin, serotonin), ačkoliv jejich funkce zatím není objasněna. V rostlinách sice nenajdeme dokonale vyvinutý nervový systém, ale najdeme u nich jednoduchou nervovou síť, zvláště mezi buňkami floému. Zmiňované buňky jsou zodpovědné za komunikaci na delší vzdálenosti.

Nejvíce aktuální otázka současnosti je, zda mají rostliny mozek. Na tuto otázku hledá odpověď mnoho vědců a většina došla k závěru, že rostliny sice mozek nemají, ale mají vědomí. Uvědomují si, kde se nachází, vnímají své okolí a jsou schopny na něj vhodně reagovat. Michael Pollan (2013) se k této otázce vyjádřil následovně: „Rostliny mají analogové struktury, mají cesty jak posbírat všechny získané informace z jejich každodenního života, vyhodnotit je a vhodně reagovat. Toto jsou schopny udělat s absencí mozku, což je z určitého pohledu neuvěřitelné, protože my automaticky předpokládáme, že k takovéto činnosti je mozek naprosto nezbytný.“

Bioložka Monica Gagliano provedla pokusy na rostlině *Mimosa pudica*, kterými dokázala, že má rostlina i paměť. Sestavila aparaturu, která stimulovala volný pád a každých 5-6 sekund pouštěla rostlinu *Mimosa pudica* bez rizika jejího poškození. Po prvních pěti až šesti pokusech *Mimosa* přestala na pád reagovat sklápěním svých listů. Aby se Gagliano přesvědčila, že *Mimosa* není jen unavená, tak rostlinou pouze zatřásla a *Mimosa* okamžitě sklopila své listy. Tento pokus byl opakován s odstupem týdne po dobu celkem 4 týdnů a následně s odstupem měsíce a ve všech případech *Mimosa* pouštění ignorovala. Dále už Gagliano s testováním nešla, ale je možné, že jsou rostliny schopny pamatovat si ještě mnohem déle. V porovnání: například včely jsou schopné pamatovat si pouze 48 hodin (Pollan, 2013).

Důvodem, proč si rostliny vytvořily cesty pro elektrickou signalizaci, je pravděpodobně potřeba rychle reagovat na vnější podněty - například na stresový faktor životního prostředí. Bylo zjištěno, že rostliny mají 15 až 20 různých odpovědí na stav prostředí (Pollan, 2013). Elektrická signalizace je pravděpodobně pro přenos informací na delší vzdálenosti výhodnější než signalizace chemická (pomocí hormonů).

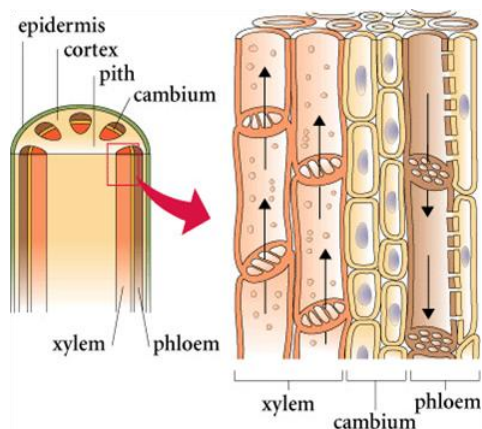
2. Rozdíl v živočišné a rostlinné elektrické komunikaci

Živočiškové na rozdíl od rostlin mají nervovou soustavu, která umožňuje přenos akčních potenciálů. Avšak absence nervových vláken rostlinám tuto formu komunikace nezumožňuje. Pro její přenos se pouze uplatňují jiné metody, fungující na stejném principu.

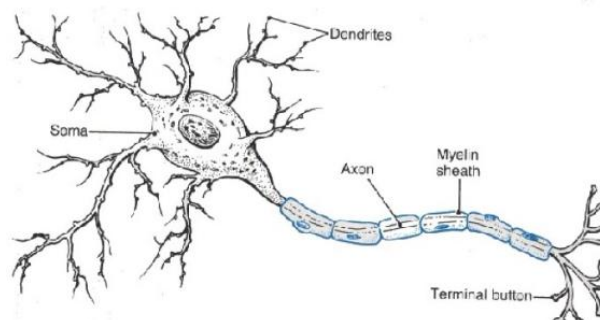
Rostlinné akční potenciály se šíří po membránách floémových buněk. Floém je lýková část cévních svazků, která se skládá z živých protáhlých buněk, které nemají jádro a jejich příčné přepážky jsou proděravělé. Proto nesou název sítkovice (obrázek 2). Funkcí floému je vedení asimilátů z listů na místa spotřeby.

U živočichů je základní funkční a histologická jednotka nervové tkáně neuron neboli nervová buňka (obrázek 3). Jsou to vysoce specializované buňky, schopné přijímat, vést, zpracovávat a odpovídat na vzruchy. Přenáší a zpracovávají informace z vnitřního i vnějšího prostředí a tím podmiňují schopnost organismu na ně reagovat. Neuron se skládá z těla a výběžků dvojího druhu. Dendrity, které jsou kratší, mají na starost vedení signálu dostředivě z jiných nervových buněk k tělu neuronu nebo ze smyslových buněk a axon (neurit) - dlouhý výběžek délky až jeden metr, který vede odstředivé impulsy - akční potenciál. Místo spoje těla neuronu s axonem se nazývá iniciální segment. Neurit je vodivou částí neuronu, je kryt myelinovou pochvou, tvořenou Schwannovými buňkami. Výjimku tvoří neurony CNS, kde je asi 40 % axonů bez obalů (holá vlákna). V myelinové pochvě jsou Ranvierovy zářezy urychlující vedení vzruchu. Synapse je místo spojení neuronů, signál elektrický se zde mění na signál chemický a v synaptické štěrbině (cca 20 nm) dochází k vyloučení neurotransmiterů, což způsobuje vznik synaptického potenciálu na dalším neuronu. Neurotransmitery se uvolňují do synaptické štěrbině, následuje dočasné otevření iontových kanálů, přestup iontů Na^+ a dochází k depolarizaci membrány (čím více neurotransmiteru se uvolní, tím větší je depolarizace). Akční potenciály jsou u živočichů výrazně rychlejší, protože jsou vedeny "přímo", po drahách vytvořených pouze k jejich šíření.

Z elektrochemického hlediska jsou struktury floému i axonu duté trubičky naplněné roztokem elektrolytu. Délka axonu i floému může být několik metrů dlouhá o průměru 1 – 100 μm .



Obrázek 2: rostlinné pletivo floém (zdroj obrázku: <https://www.slideshare.net/mobile/OtnielVictoryFA/floem>)

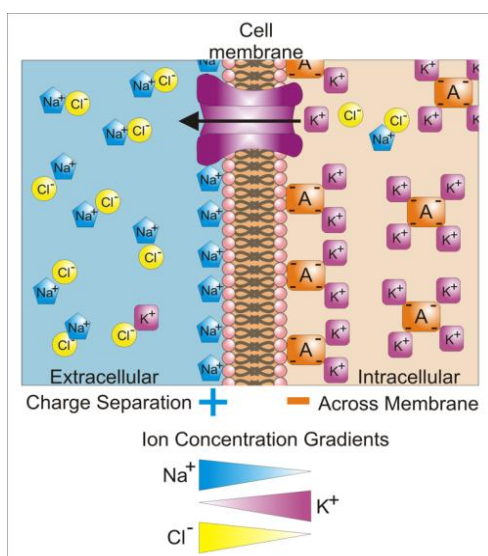


Obrázek 3: neuron (zdroj obrázku: <http://www.neuropsychologysketches.com/Neurons.html>)

3. Typy elektrických signálů u rostlin

3.1 Klidový potenciál

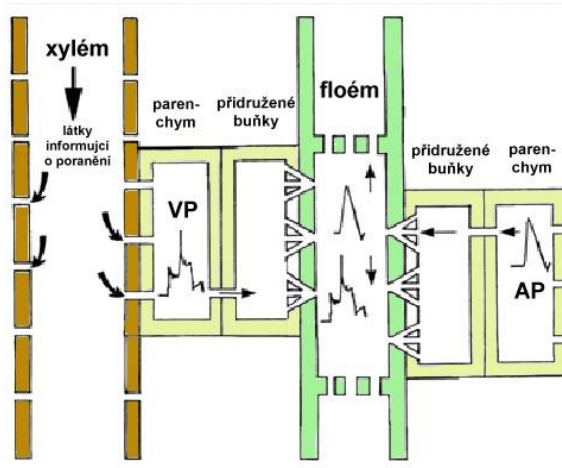
Klidový membránový potenciál vzniká v důsledku rozdělení kladných a záporných nábojů na opačných stranách buněčné membrány v podmínkách fyziologického klidu. Vzhledem k tomu, že fosfolipidová dvojvrstva je dobrý elektrický izolátor, přenos iontů je uskutečňován pomocí iontových kanálů nebo aktivním přenosem. V klidu je permeabilita membrány pro ionty Na^+ a Ca^{2+} relativně nízká - iontové kanály jsou pro ně uzavřené, avšak pro K^+ je poměrně vysoká - kanály jsou často otevřené. Proto se klidový membránový potenciál blíží rovnovážnému potenciálu pro ionty K^+ . Uvnitř buňky se tedy nalézají velké organické anionty, které se kvůli svým velkým rozměrům nemohou z buňky dostat. Hodnoty klidového potenciálu nabývají hodnot od -80 do 200 mV.



Obrázek 4: schéma membránového potenciálu (zdroj obrázku: http://en.m.wikipedia.org/wiki/Membran_e_potential)

3.2 Akční potenciál (AP)

Akční potenciály jsou rychle se šířící elektrické vzruchy dobře známé u živočichů. Jejich vznik u zvířat je způsoben tokem Na^+ dovnitř (depolarizace) a tokem K^+ ven (repolarizace), kdežto u rostlin hrají roli toky K^+ , Cl^- , Ca^{2+} (Hedrich & Becker, 1994). Vzorovými exempláři pro měření AP rostlin byly gigantické buňky zelených řas *Chara* (parožnatka) a *Nitella* (skleněnka). Měření na těchto rostlinách odhalila, že akčnímu potenciálu asi o 50 ms předchází zvýšení hladiny Ca^{2+} . Ke vzniku potenciálu dochází podle principu vše či nic. AP je generován v případě, že podnět dosáhne určité hodnoty a jeho následné zvyšování už dále neovlivní rychlost ani amplitudu akčního potenciálu. Neboli rychlost ani amplituda AP nezávisí na síle ani typu podnětu (Pyatygin et al., 2011). Akční potenciály jsou způsobeny pohybem vápenatých iontů přes membránu, což umožňuje jejich jednoduché převedení na chemickou úroveň. AP se mohou šířit z buňky do buňky a v případě, že dosáhnou floému, se mohou efektivně šířit do celé rostliny. Floém prochází celou rostlinou a najdeme v něm elementy zvané sítkovnice, které tvoří nízkoodporovou síť vhodnou pro přenos akčního potenciálu. V sítkovicích je přenos umožněn iontovými kanály (hlavně kanály K^+) v jejich plasmatických membránách. Po odeznění AP nastává perioda, ve které buňky nejsou schopné excitace. U rostlin má tato perioda výrazně delšího trvání než u zvířat (0,5 ms savčí nerv, 4-40 s Characeae; Fromm et Lautner, 2007).



Obrázek 5: schéma variačního potenciálu
(Fromm et Lautner, 2007)

3.3 Variační potenciál (VP)

Variační potenciál nebo také slow wave potenciál, takto nazývaný pro svou výrazně pomalejší repolarizaci, je dalším druhem elektrického signálu. Zásadní rozdíl od akčního je ve výrazně delší, opožděnější repolarizaci a širokém rámci variací. Variační potenciál je vyvolán mechanickým podrážděním (popálením či zraněním). Tento signál závisí na intenzitě podnětu. Souvisí se změnami hydraulického tlaku a díky tomu že je jeho šíření čistě mechanické, může procházet mrtvými pletivy - na rozdíl od akčního potenciálu se tedy šíří xylémem. Je pro něj charakteristické, že se vzrůstající vzdáleností od místa podráždění klesá amplituda a rychlost signálu.

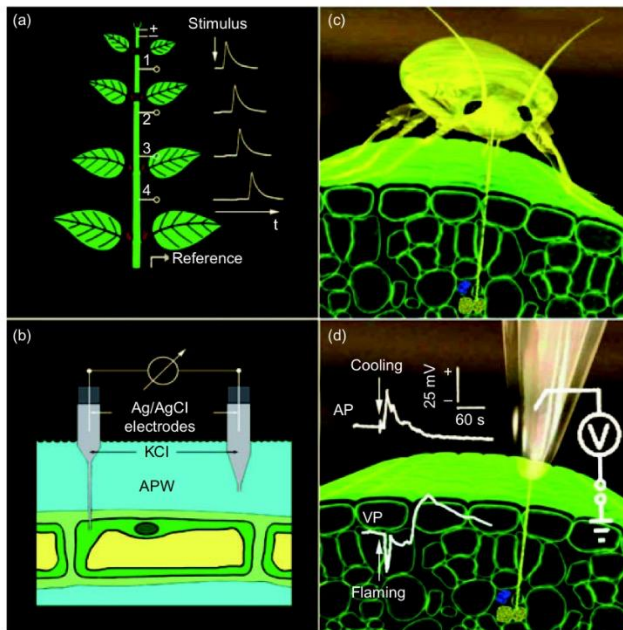
4. Metody měření elektrických signálů

Jsou dvě hlavní metody měření elektrických potenciálů: extracelulární a intracelulární. Extracelulární je mnohem častější, snáze proveditelná a její hlavní výhoda spočívá v možnosti dlouhodobého měření (i několik dnů). Tato metoda má další dvě možnosti provedení. Buď pomocí povrchových elektrod, které se aplikují na list nebo jinou část rostliny nebo pomocí jehlových elektrod, které se napíchnou do určité části rostliny. Měření s užitím jehlových elektrod je sice výrazně citlivější, ale rostlina reaguje i na samotný vpich, což může být někdy komplikací. Příkladem povrchového měření je například elektromyograf (EMG), elektrokardiograf (EKG) a elektroencefalograf (EEG), který má nedocenitelné využití v medicíně.

Intracelulární metoda je mladší a komplikovanější a měření mohou trvat pouze krátce (1-2 hodiny), protože elektrolyt po nějaké době z elektrody vyprchá, čím se mění původní bioelektrické podmínky. K měření se využívají skleněné mikroelektrody o průměru menším než 1 mm. Jedna elektroda je povětšinou pomocí micromanipulátorů vložena do cytoplasmy (nebo vakuoly), zatímco druhá setrvává v okolí buňky a slouží tak jako referenční (zemní) elektroda.

Od roku 1994 se k realizaci této metody někdy používají mšice. Na list je přenesena mšice a je ponechána přes noc. Mšice se začne krmit a zavede svůj stilet do rostliny, následně je "odstřelena" laserovým impulzem, avšak její stilet zůstane zavedený do rostliny. Na stilet se následně připojí hrot skleněné mikroelektrody. Úspěšnost této techniky značně závisí na stavu stiletu (na jeho vnitřním průměru a funkčnosti) a na vzniku dobrého solného můstku

mezi cytoplasmou buňky a mikroelektrodou. Touto technikou je možno měřit akční potenciály bez provedení přídatného mechanického poškození rostlině a slouží hlavně k zaznamenávání akčních potenciálů vyvolaných fyzikálním podrážděním listu (Fromm et Lautner, 2007).



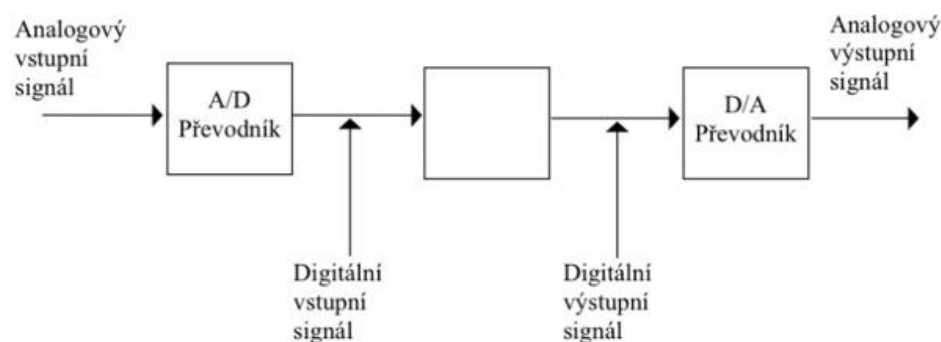
Obrázek 6: Metody měření elektrických potenciálů rostlin:

(a) extracelulární měření pomocí čtyř elektrod umístěných na rostlině a jedné referenční elektrody v půdě (b) intracelulární měření: jedna elektroda je aplikována do cytoplazmy buňky a druhá setrvává v její blízkosti (c) krmící se mšice, jejíž stilet je zaveden v rostlině (d) stilet, který zůstane v rostlině po odstřelení mšice laserovým impulzem a na který je následně napojena skleněná mikroelektroda (Fromm et Lautner, 2007)

5. Zpracování biologického signálu

Cílem zpracování signálu je extrakce požadované informace, jež může být v signálu skryta. Většina reálných signálů je analogových a jelikož je základním nástrojem zpracování signálu počítač, je nutné signál převést do digitální (číslicové) podoby. K převedení slouží analogově-digitální převodník. Výsledným produktem naší práce je většinou graf, takže je potřeba pomocí digitálně-analogového převodníku záznam opět převést do analogové podoby. Naším cílem je, aby odchylky mezi vstupním a výstupním signálem byly co nejmenší. S tím souvisí vzorkovací frekvence neboli kmitočet A/D převodníku. Je-li vzorkovací frekvence například 100 Hz znamená to, že v každé vteřině převedeme 100 vzorků signálu. Když je vzorkovací frekvence příliš nízká, nelze již z vzorků signálu zrekonstruovat původní signál. Tento jev se nazývá aliasing. Naopak pokud je vzorkovací frekvence příliš vysoká, zatěžujeme neúměrně paměť počítače.

Artefakty jsou jevy, které nemají fyziologický původ ve vyšetřovaném orgánu. Jsou způsobeny fyziologickými a vnějšími vlivy. V případě mého experimentu byly způsobeny pohyby lidské ruky při haptickém kontaktu a provedeným mechanickým poškozením. Artefakty je nutné ze záznamu odstranit.

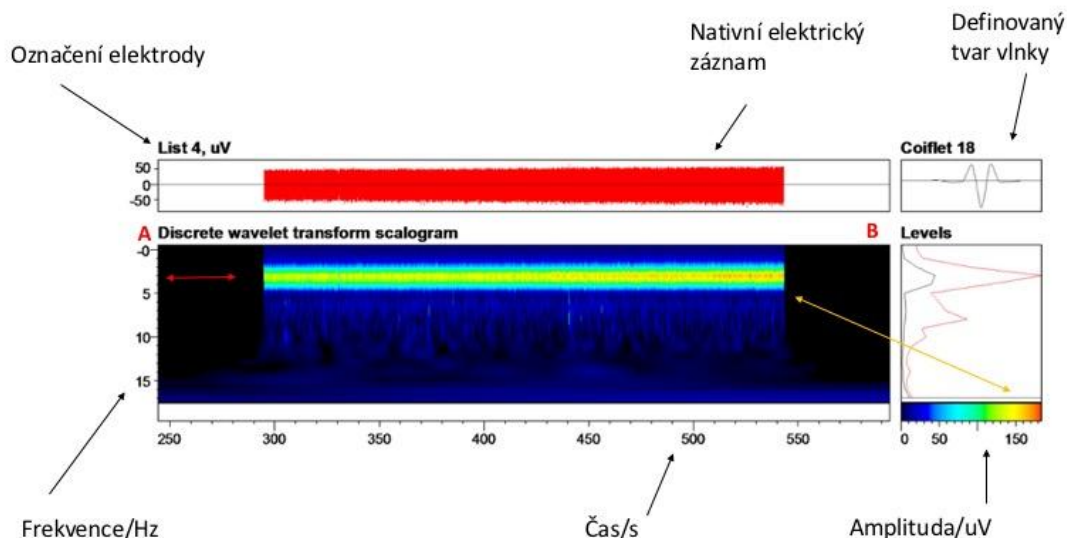


Obrázek 7: schéma zpracování signálu (Mohylová, Krajča; 2004)

6. Vlnková transformace

Vlnková transformace (WT z anglického wavelet transform) je druhem lineární transformace signálu, která umožňuje časově-frekvenční popis signálu. Na základě těchto zmíněných dvou parametrů je výsledkem transformace dvojrozměrná funkce, jejíž graf se nazývá scalogram nebo také vlnková mapa. Existují dva základní druhy WT. Spojitá vlnková transformace (CWT z anglického continuous wavelet transform), která vyžaduje větší operační paměť, avšak její zobrazení je často mnohem názornější a diskrétní vlnková transformace (DWT - discrete wavelet transform), v případě diskrétních parametrů. WT nám umožňuje, na rozdíl od jiných typů transformací detailně zkoumat signály neperiodické, přechodné a přerušované. Vlnková transformace využívá funkcí pro svůj tvar zvané vlnky. Transformace se využívá k získání odlišné reprezentace signálů, ze kterých je popis a extrakce požadovaných signálů jednodušší. Z pohledu matematiky se tedy jedná o korelaci vlnky s analyzovaným signálem. Vlnkou může být manipulováno dvěma způsoby: časovým posunutím vlnky (translace) a roztažením/stlačením vlnky (dilatace). (Vítek, 2011; Polanský, 2011)

Příklad hodnocení grafu získaného pomocí výpočtu vlnkové transformace



Obrázek 7: schématický popis škálogramu

Představený graf (obrázek 7) by byl hodnocen následovně:

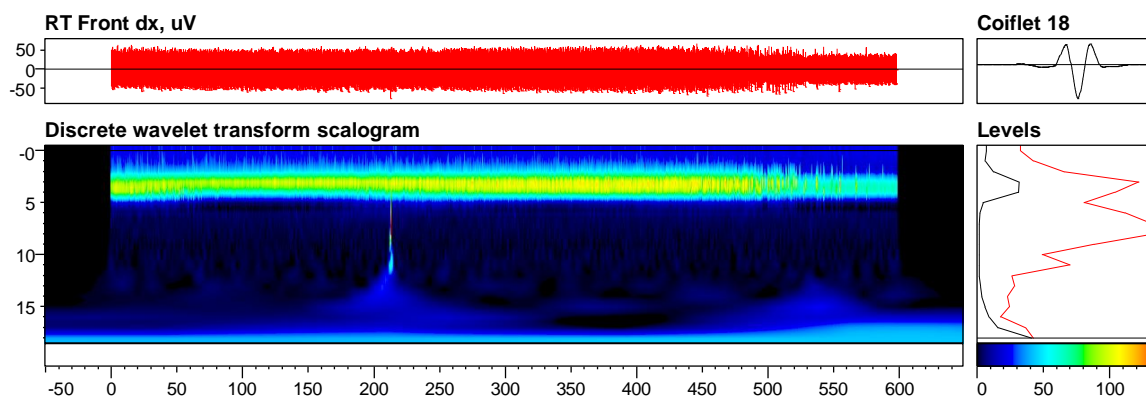
Nejprve hledáme dominantní frekvenci – kontinuální pás napříč grafem A (graf vlevo) o dané frekvenci, který dosahuje vyšších amplitud než zbytek grafu. Amplituda je vyjádřena pomocí barevné stupnice v grafu B. Tudíž v tomto případě je dominantní frekvence (osa y) 2 - 4 Hz o amplitudě cca 150 μ V. Určení dominantní frekvence znázorňuje červená šipka, určení amplitudy šipka oranžová. Osa x grafu A představuje čas v sekundách. Představený záznam je tedy pouze částí a představuje časový úsek 300 - 540 s.

Graf B je tvořen dvěma křivkami. Červenou znázorňující maximální hodnoty a černou reprezentující hodnoty průměrné. Obě dvě křivky se zároveň vztahují na frekvenci (osa y graf A) a amplitudu (osa x graf B).

Barevné spektrum se u každého grafu upravuje vůči maximálním hodnotám (měřítko se mění), proto je nezbytné sledovat u grafu B osu y a vždy si uvědomit v jakém rozmezí μ V se zrovna pohybujeme.

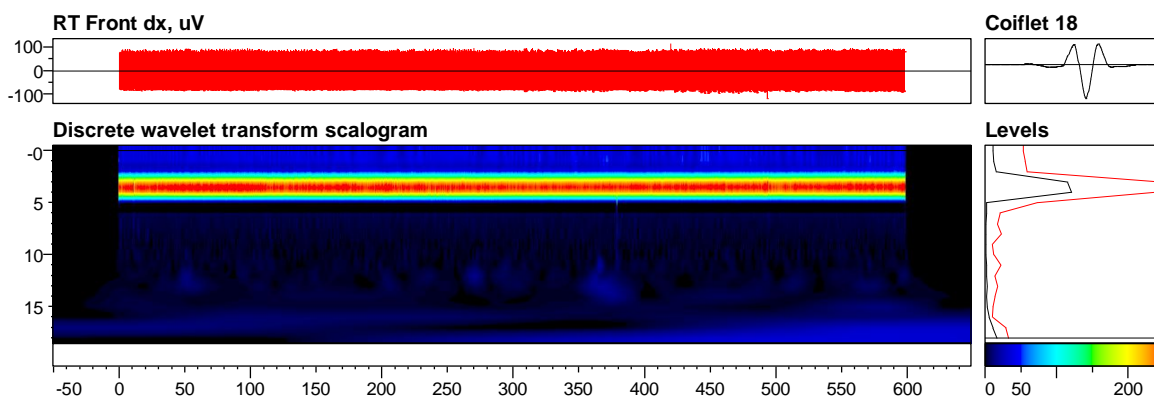
7. Poznatky z předchozích experimentů

Tato práce je rozšířením mé dřívější studie na rostlinách *Aloe Vera*, *Spathiphyllum* a *Hoya carnosa*. Jejím hlavním cílem bylo zjistit, zda lze elektromyografický přístroj využít k měření elektrické aktivity rostlin, což bylo dokázáno jako možné. Prováděla jsem pokusy, při kterých jsem zkoumala reakce rostlin na haptický kontakt a mechanické poškození následující po zvukovém podnětu vydávaném z mobilního zařízení. Příslušné reakce jsem pak porovnávala s elektrickou aktivitou rostlin v klidových podmínkách (graf 1).

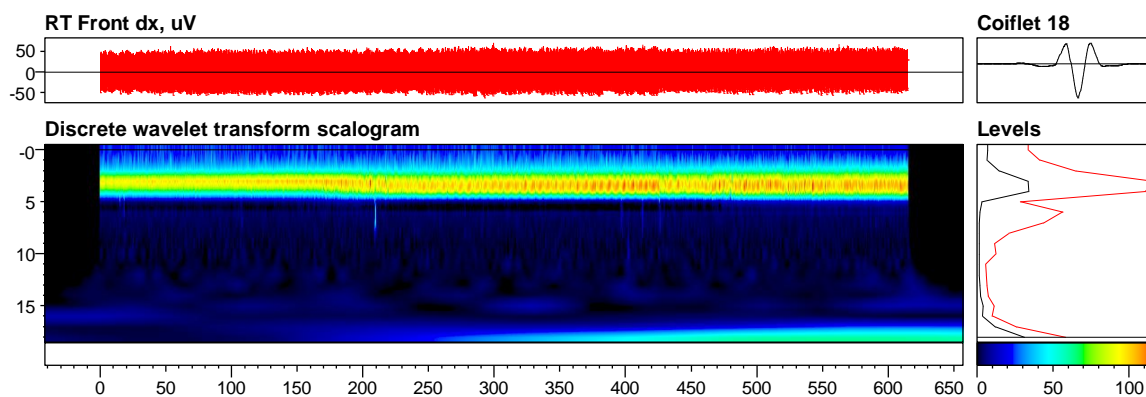


Graf 1: roztina *Spathiphilium* – první elektroda – klidový režim

Výsledky experimentu ukázaly, že rostliny reagují na haptický kontakt, ačkoliv reakce se u jednotlivých exemplářů rostlin lišily. *Aloe Vera* a *Spathiphilium* (graf 2) svou elektrickou aktivitu zvyšovaly, *Hoya carnosa* reagovala snížením elektrické aktivity. Důležité je zmínit, že *Hoya carnosa* pocházela z místnosti, kde měla minimální kontakt s lidmi na rozdíl od zbylých rostlin, které od kořenáčku vyrůstaly "ve společnosti". Můžeme tedy zvažovat i vliv historie rostlin na druh jejich reakce. Při mechanické poškození všechny rostliny snížily svou elektrickou aktivitu (graf 3).



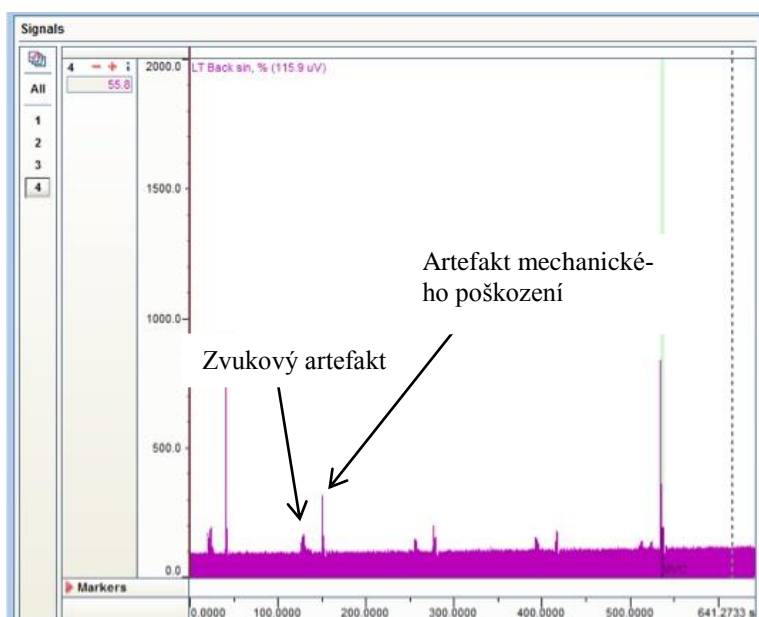
Graf 2: roztina *Spathiphilium* – první elektroda – haptický kontakt



Graf 3: roztina *Spathiphilium* – první elektroda – mechanické poškození

Rostliny *Spathiphilium* a *Hoya carnosa* reagovaly i na příchozí telefonní signál a to ještě před začátkem jeho vyzvánění (graf 4). V jejich záznamech tudíž byly dva typy artefaktů: jeden jako reakce na příchozí telefonní signál, druhý jako reakce na vyzvánění. Velikost

artefaktů se postupně snižovala, neboli na dané podmínky se rostliny postupně aklimatizovaly (Brian J. Ford, 1999).

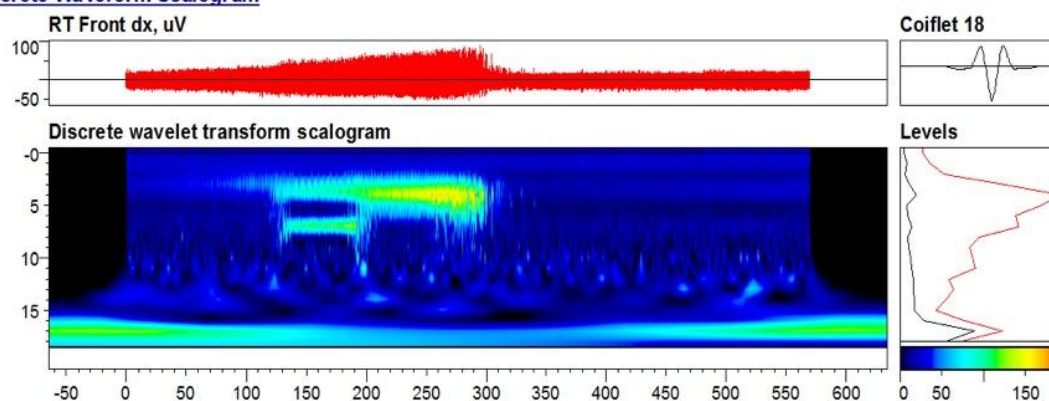


Graf 4: rostlina *Hoya carnosa* – druhá elektroda – mechanické a zvukové artefakty

V souvislosti s touto reakcí bych ráda zmínila experimenty prováděné v devadesátých letech na Imperial College London, které v rostlinném těle objevily smyslové buňky schopné vnímat elektrické jevy. Už v dávných dobách bylo konstatováno, že tráva před bouřkou zelená, což bylo tímto objevem vysvětleno. Rostlina zaznamená přicházející bouřku a spustí se vlna pochodů uvádějící vyschlé části rostliny do stavu aktivního metabolismu, aby byly schopny z přicházejícího deště profitovat (Brian J. Ford, 1999).

Další vnější stimulus, který podněcoval reakci u rostlin, byla změna slunečního svitu, kterou rostliny i přes zatažené žaluzie okamžitě zaznamenaly (graf 5).

Discrete Waveform Scalogram



Graf 5: rostlina *Hoya carnosa* – první elektroda – reakce na změnu slunečního svitu

8. Diethylether

8.1 Základní vlastnosti

Diethylether neboli éter je za běžných podmínek čirá, bezbarvá kapalina s nízkým bodem varu a nasládlou chutí. Jedná se o nejrozšířenější sloučeninu ze skupiny etherů. Je extrémně hořlavý (teplota samovznícení je už při 170°C), může tedy chytout jen od horkého povrchu a je náchylný na tvorbu peroxidů (například výbušný diethyletherperoxid). Využívá se jako běžné laboratorní rozpouštědlo a dříve jako celkové anestetikum.

8.2 Rostlinná éterová anestézie

Claude Bernard provedl rozsáhlou studii na rostlinou etherovou anestézií, díky níž mnoho osvětlil. V jedné části svého výzkumu umístil rostliny *Mimosa pudica* do skleněné nádoby s éterem pod rozptýlené světlo. Vypozoroval, že přímé světlo zvyšuje výkonnost anestézie a je schopno rostliny i usmrtit. Uspané rostliny krátkodobě ztratily schopnost pohybu (*Mimosa* přestala sklápět své listy) v reakci na dotek, ale opět ji získaly v momentě, kdy byly z prostředí vyjmuty. Naopak, Paul Bert (student C. Bernarda) dokázal, že ačkoliv byla citlivost rostlin narušena, periodické pohyby postiženy nebyly. Z následujících experimentů vyplývá, že anestézie ovlivňuje schopnost rostlin vnímat vnější podněty, ale ne jejich schopnosti pohybu. Studie Grémiaux et al (2014) také ukázala, že diethylether efektivně potlačuje fotosyntézu bez narušení procesu dýchání.

9. Praktická část

9.1 Cíl práce

Cílem této práce je porovnat pomocí povrchového elektromyografu elektrickou aktivitu rostlin ve třech základních situacích – v klidu, při haptickém kontaktu a v průběhu mechanického poškození za normálních podmínek a po provedení éterové anestézie. Elektrická aktivita rostlin bude hodnocena pomocí metody vlnkové transformace, která je součástí vyhodnocovacího programu použitého elektromyografu.

9.2 Hypotézy

- 1) Předpokládám, že je možné měřit elektrickou aktivitu rostlin pomocí elektromyografu.
- 2) Předpokládám nárůst elektrické aktivity rostlin oproti měření za klidových podmínek v reakci na haptický kontakt.
- 3) V reakci na mechanické poškození očekávám snížení rostlinné elektrické aktivity.
- 4) Předpokládám rozdíl v elektrickém chování rostlin za normálních podmínek a po éterové anestézii.

9.3 Metodika

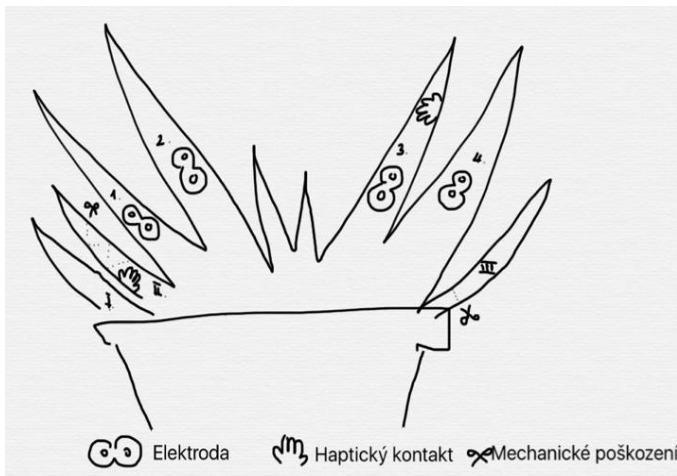
Měření probíhala v kinesiologické laboratoři FTVS UK. K registraci byl použit povrchový elektromyograf EMG Tele Myo mini firmy Neurodata. Vzorkovací frekvence byla 1500 Hz, pásmová propustnost 0-500 Hz. Získaná data byla zpracována v programu MyoResearch 3 Noraxon. K vyhodnocení dat jsme použili metodu vlnkové transformace (wavelet transformation), která umožňuje sledovat současně změny frekvenčního spektra, amplitudy a probíhajícího času. Tato metoda umožňuje zachytit drobné změny v charakteru probíhajících akčních potenciálů.

Výběr rostliny: Hlavním faktorem při výběru rostlin bylo zachycení základních typů listů, které umožňují aplikaci elektrod. Listy rostlin musely být dostatečně velké a schopné danou elektrodu unést. Z tohoto důvodu byla vybrána *Aloe vera*, *Spathiphyllum* a *Scindapsus* (obrázek 8). Všechny rostliny pocházely z jednoho květinářství a do laboratoře byly přineseny den před proběhnutím experimentu, aby se na dané prostředí aklimatizovaly. Dané exempláře rostlin se nikdy podobných experimentů neúčastnily, tudíž vliv rostlinné paměti nemusí být uvažován.



Obrázek 8: rostliny *Aloe vera*, *Spathiphyllum* a *Scindapsus*

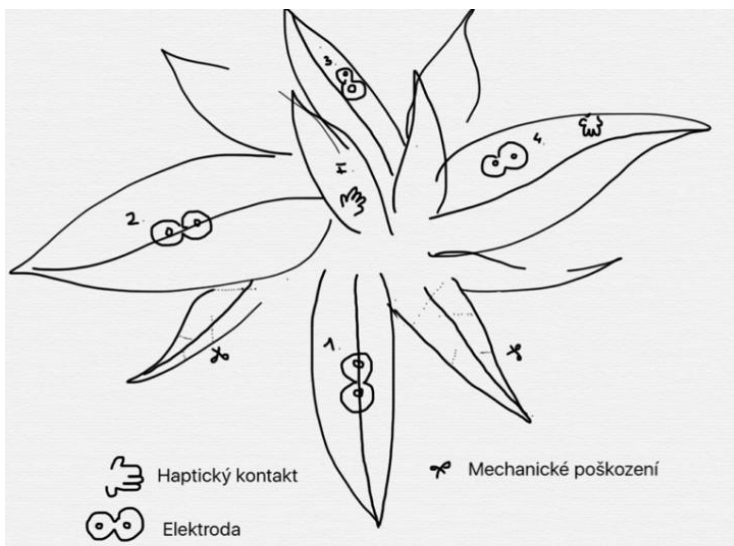
Lokalizace elektrod: Na rostlinách se vždy nalézaly čtyři bipólové elektrody s interelektrodovou vzdáleností 1 cm elektrody na čtyřech odlišných listech a jedna zemnicí elektroda na květináči. Přesné rozmístění elektrod je znázorněno na obrázcích 9-12.



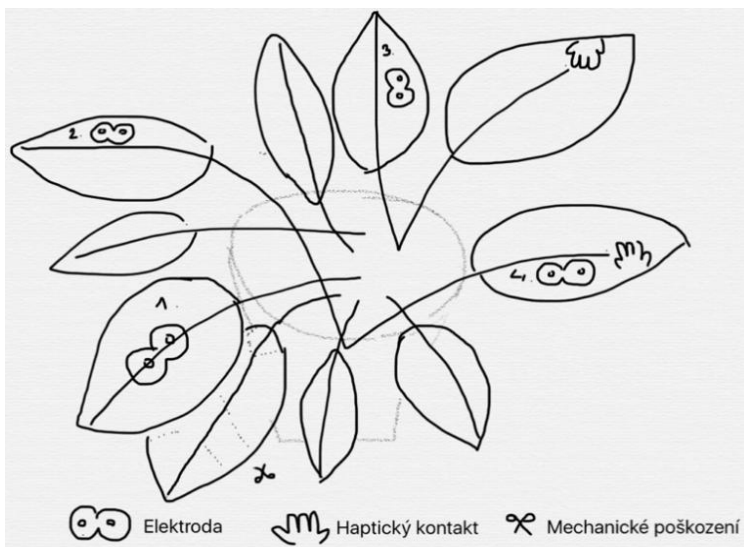
Obrázek 9: schéma rostliny Aloe vera s přesným umístěním elektrod a místy probíhajícího haptického kontaktu a mechanického poškození



Obrázek 10: rostlina Aloe vera s aplikovanými elektrodami



Obrázek 11: schéma rostliny Spathiphyllum s přesným umístěním elektrod a místy probíhajícího haptického kontaktu a mechanického poškození



Obrázek 12: schéma rostliny Spathiphyllum s přesným umístěním elektrod a místy probíhajícího haptického kontaktu a mechanického poškození

Postup měření:

Část A: 1. Klid 2. Haptický kontakt 3. Zvonení a mechanické poškození

Část B: Éterová anestézie rostlin

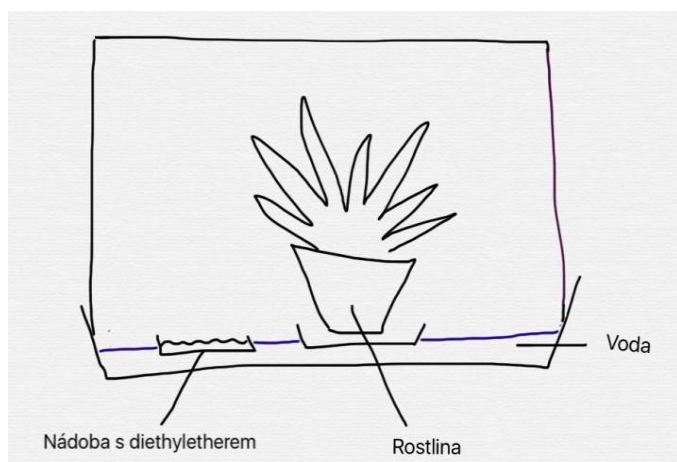
Část C: 1. Klid 2. Haptický kontakt 3. Zvonení a mechanické poškození

Část A měla tři fáze, z nichž každá trvala 10 minut. V první fázi byla rostlina ponechána o samotě - vnější podněty jsem se tak snažila minimalizovat a pokoušela jsem se o měření klidových potenciálů. V druhé části probíhal po celou dobu měření s rostlinou haptický kontakt a sledovala jsem reakci rostliny na lidský dotek. S výjimkou *Aloe vera* samotný haptický kontakt neprobíhal na listech s aplikovanými elektrodami. V posledním měření jsem na mobilním zařízení nastavila jako zvuk vyzvánění nepříjemný, velice hlasitý zvuk. V pravidelných dvouminutových intervalech bylo na daný telefon voláno, a když po 10 sekundách zvuk dozněl, byla rostlina nůžkami mechanicky poškozena. Mohla jsem tedy sledovat reakci rostliny jednak na zvuk a mechanické poškození a zároveň na vlnění vysílané mobilními telefony.

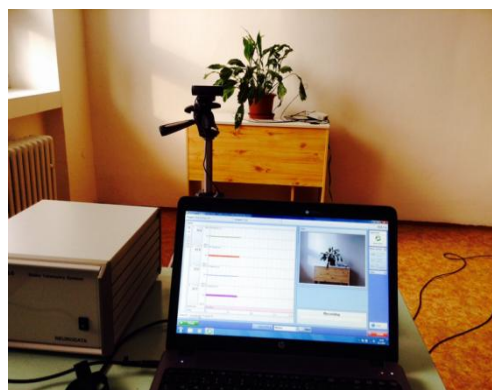
Část B představovala anestézii rostlin diethyletherem (D.E.). Pro úspěšnost měření bylo nutno v kontejneru dosáhnout 15% D.E. jinak řečeno $0,65\mu\text{L}$ kapalného D.E. se musí vypařit v objemu 1 cm^3 . V mém případě bylo použito $44,14\text{ ml}$ D.E. ($0,65\mu\text{L} \times 67914\text{ cm}^3$) pro dosažení příslušné koncentrace.

Pro měření byla sestavena aparatura (obrázek 14), v níž byly rostliny jednotlivě ponechány po dobu jedné hodiny. Po tomto časovém úseku byla rostlina z éterového prostředí vyjmuta a plynule se přešlo k měření části C, jejíž postup byl identický s částí A.

Pro větší přehlednost práce je do výsledků zahrnuta vždy jen první elektroda umístěna na rostlinách a záznam druhé elektrody je umístěn v přílohách.



Obrázek 14: schéma rostlinné anestézie diethyletherem



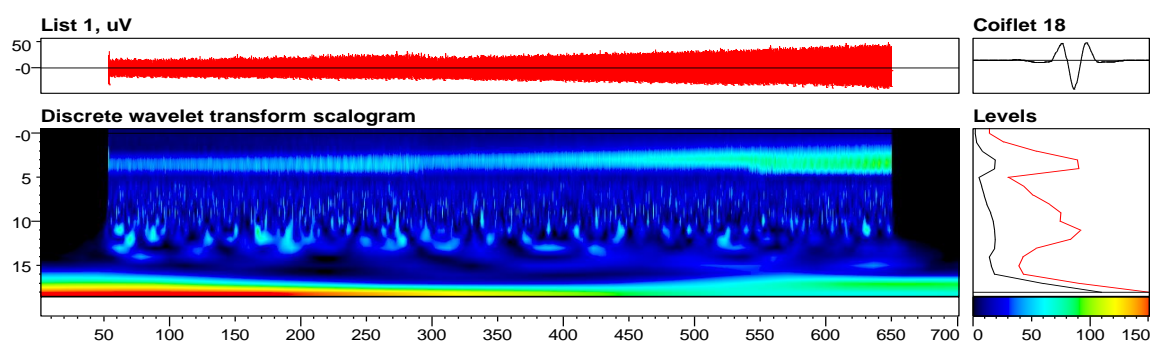
Obrázek 15: průběh měření elektrické aktivity rostliny *Spathiphyllum*

9.4 Výsledky

9.4.1 Měření na rostlině *Aloe vera*

Měření v klidu za normálních podmínek

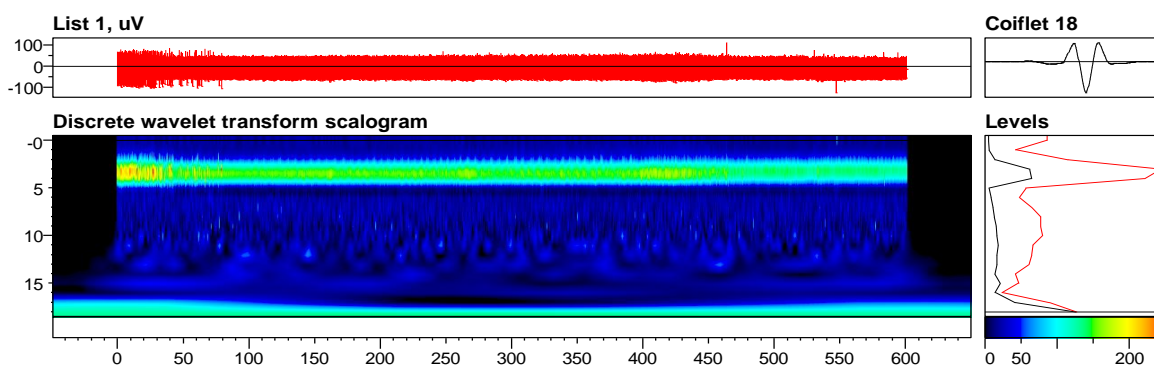
Výsledky měření v klidu za normálních podmínek (graf 6) vykazují značnou stacionaritu nálezu. Pouze od 550. sekundy dochází k mírnému rozšíření dominantního frekvenčního spektra z původních 3-4Hz na 3-5Hz a k nárůstu amplitudy z $30\mu\text{V}$ na $70\mu\text{V}$. Obdobné nálezy byly patrné i u zbylých elektrod umístěných na listech 2 až 4 (příloha 1).



Graf 6: rostlina *Aloe vera* – první elektroda – měření v klidu

Haptický kontakt za normálních podmínek

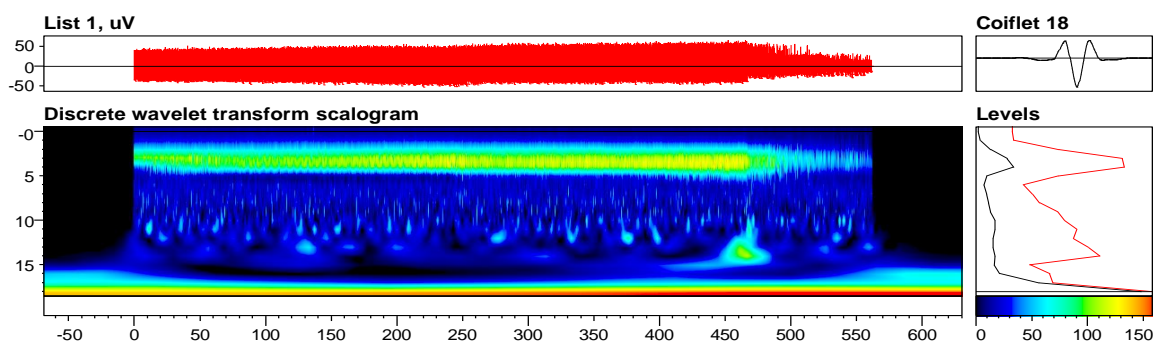
Při haptickém kontaktu (graf 7) došlo při srovnání s klidovým stavem k zvýšení amplitudy dominantní frekvence 3-4Hz na $150\text{-}200\mu\text{V}$. Kolem 450. sekundy dochází ke snížení amplitudy na $100\mu\text{V}$. Celkově v porovnání s klidovým stavem zůstává stejné aktivní frekvenční pásmo a dochází k navýšení hodnot amplitudy. U zbývajících elektrod umístěných na listech 2-4 je také patrné zvýšení amplitudy při zachování stejné dominantní frekvence (příloha 2).



Graf 7: rostlina *Aloe Vera* – první elektroda – haptický kontakt za normálních podmínek

Mechanické poškození za normálních podmínek

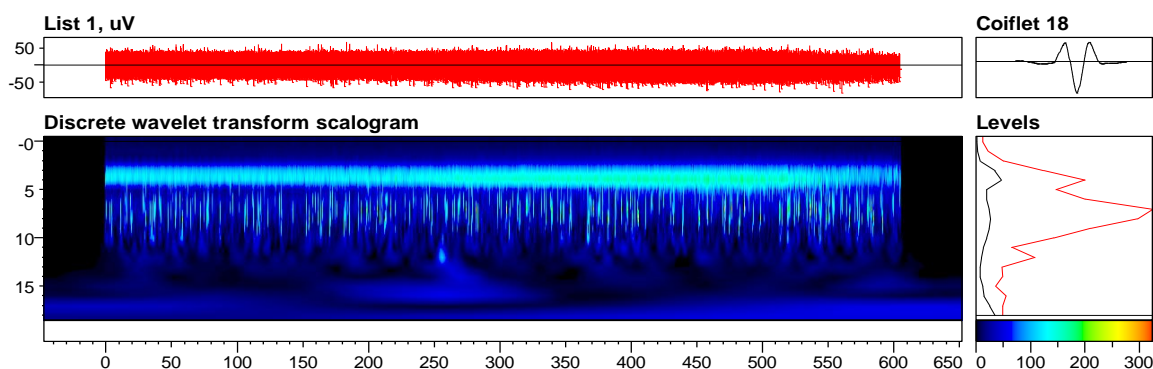
Výsledky vyhodnocení vlnkové transformace získané z elektrických signálů v průběhu mechanického poškození (graf 8) ukazují na odlišný charakter chování oproti předchozím měření. Dochází k rozšíření dominantního frekvenčního pásma na 2-4 Hz a ke snížení jeho amplitudy v průměru na 100 μV . Ve 480. vteřině (moment 4. stříhu) nastupuje útlum amplitudy na hodnoty 50 μV a méně. Snížení amplitudy dominantní frekvence s výraznou změnou chování ve 480. minutě se vyskytuje i u zbývajících elektrod (příloha 3).



Graf 8: roslina Aloe Vera – první elektroda – mechanické poškození

Klidový potenciál po éterové anestézii

Naměřený záznam klidového režimu po éterové anestézii (graf 9) byl oproti předchozím měření za přirozených vnějších podmínek stacionárnější. Nedocházelo k výrazným změnám v intenzitě elektrické aktivity a dominantní frekvence rostliny zůstala na 3 - 4 Hz s amplitudou kolem 100 μV . Objevuje se zde ovšem další aktivita ve frekvenčním pásmu 5-10 Hz s amplitudou kolem 100 μV , která ovšem není kontinuální, ale vyskytuje se pulzně. Podobný rys včetně rozšířené přídatné frekvence se vyskytuje i u dalších elektrod (příloha 4).

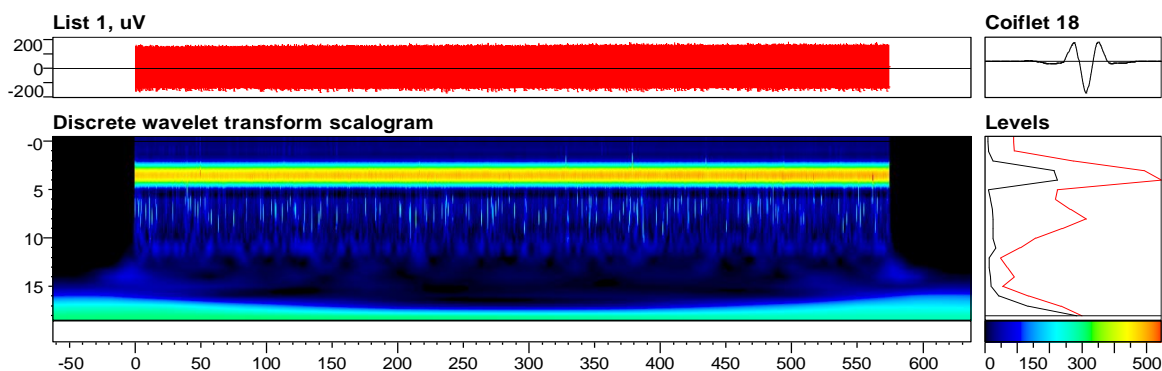


Graf 9: roslina Aloe Vera – první elektroda - měření v klidu po etherové anestézii

Haptický kontakt po éterové anestézii

Výsledky elektrické aktivity v průběhu haptického kontaktu (graf 10) po éterové anestézii ukazují výrazné navýšení amplitudy za frekvenčně stacionárního záznamu. Oproti předchozím měřením dochází ke zvýšení amplitudy dominantního frekvenčního pásma 3-5 Hz na cca 300 μV . Přetrvává zde výskyt přídatného frekvenčního pásma 5-10 Hz o amplitudě 50

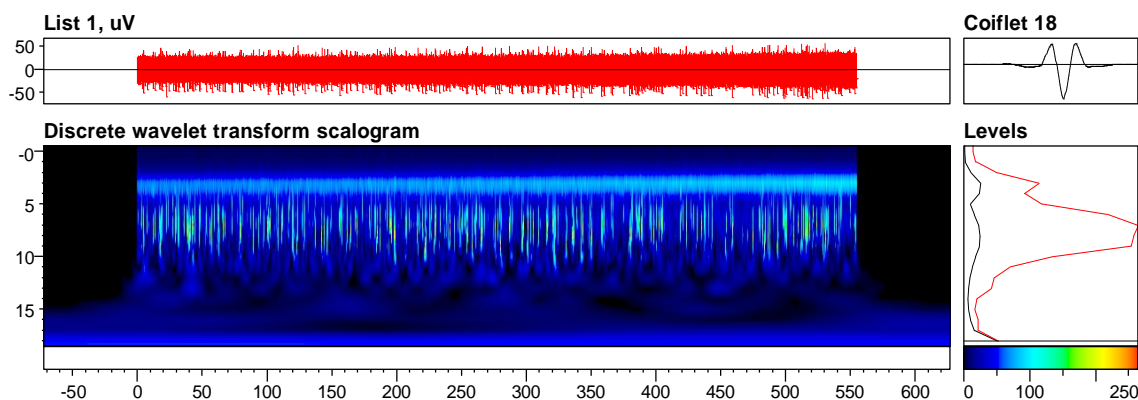
μV , frekvence výskytu ve srovnání s klidovým záznamem po anestézii je však nižší. Obdobné trendy jsou patrné v záznamech ostatních elektrod (příloha 5).



Graf 10: rostlina Aloe Vera – první elektroda – haptický kontakt po éterové anestézii

Mechanické poškození po éterové anestézii

V průběhu části měření s mechanickým poškozením (graf 11) rostliny dochází k poklesu amplitudy dominantní frekvence 3-4 Hz na cca 100 μV . Přetrvává výskyt již výše popisované aktivity ve frekvenčním pásmu 5-10 Hz. Zbylé elektrody vykazují obdobný trend (příloha 6).



Graf 11: rostlina Aloe Vera – první elektroda – mechanické poškození po éterové anestézii

Souhrn výsledků získaných na rostlině Aloe vera

V průběhu všech měření nacházíme charakteristické frekvenční pásmo 3-4 Hz, pouze při haptickém kontaktu za normálních podmínek dochází k rozšíření frekvenčního pásma na 3-5 Hz. Amplituda této dominantní frekvence se při jednotlivých částech experimentu měnila. Oproti klidovému měření za normálních podmínek se v průběhu haptického kontaktu amplituda zvýšila a naopak při mechanickém poškození došlo k jejímu snížení.

Při porovnání reakce rostliny za normálních podmínek a po éterové anestézii nacházíme rozdílné hodnoty amplitudy dominantní frekvence (tabulka 1). Po éterové anestézii dochází k jejímu zvýšení ve všech částech experimentu. Mezi částmi klidového měření a haptického kontaktu za normálních podmínek se hodnoty amplitud zvýšily ze 70 μV na 200 μV (procentuální nárůst 185%). Při porovnání hodnot amplitud mezi částmi haptického kontaktu a mechanického poškození za normálních podmínek byl zaznamenán pokles z 200 μV na 50 μV , tedy na 25%. V případě éterové anestézie dochází ve stejných situacích nejprve k ná-

růstu ze 100 μV na 300 μV (procentuální nárůst 200%) a následně k poklesu na 100 μV , tj. o 66,6%. Při mechanickém poškození po éterové anestézii byl pokles amplitud kontinuální, v 480. sekundě nedošlo k dalšímu poklesu amplitudy jako za normálních podmínek.

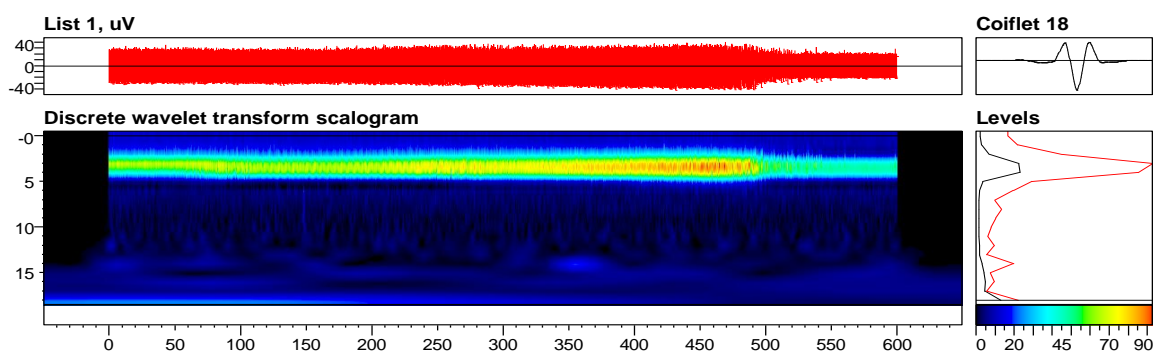
AMPLITUDA	Měření v klidu	Haptický kontakt	Mechanické poškození
Za normálních podmínek	70 μV	200 μV	50 μV
Procentuální nárůst/pokles		185%	75%
Po éterové anestézii	100 μV	300 μV	100 μV
Procentuální nárůst/pokles		200%	66,6%

Tabulka 1 : porovnání amplitud jednotlivých částí měření na rostlině *Aloe vera*

9.2.2 Měření na rostlině *Spathiphyllum*

Měření v klidu za normálních podmínek

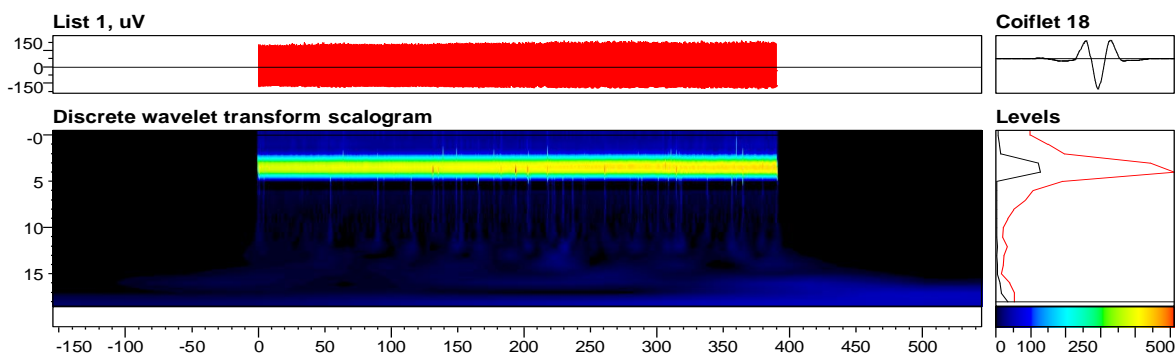
Výsledky měření v klidu za normálních podmínek (graf 12) vykazují dominantní aktivitu na 3-5 Hz za průměrných hodnot amplitud 70 μV . Záznam je stacionární pouze v 500.s je zaznamenána změna, kdy amplitudy výše zmíněného frekvenčního pásma klesají na 40 μV . Zbylé elektrody zaznamenaly obdobný trend (příloha 7).



Graf 12: rostlina *Spathiphyllum* – první elektroda - měření v klidu za normálních podmínek

Haptický kontakt za normálních podmínek

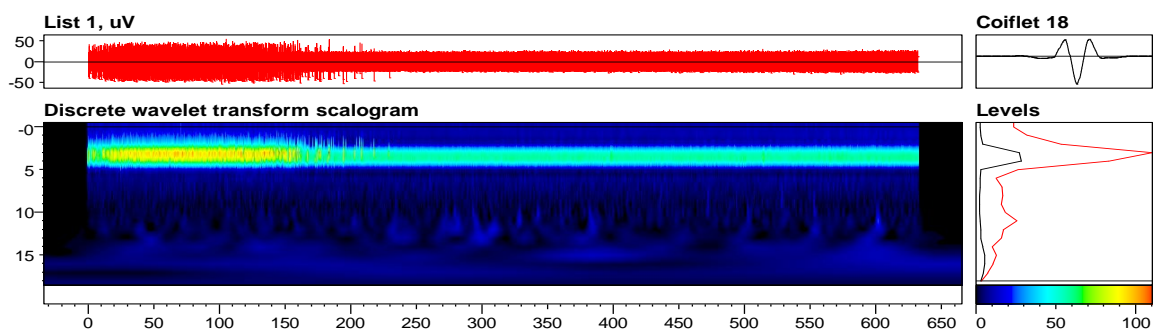
Při haptického kontaktu (graf 13) došlo ve srovnání s měřením v klidu ke zvýšení amplitud dominantní frekvence 2-4 Hz na 400 μV . Záznam je v celém časovém rozmezí experimentu stacionární. Chybou přístroje byla tato část experimentu v čase 400 s přerušena. Elektrody umístěné na listech 3-4 taktéž zaznamenaly navýšení amplitudy při zachování stejné dominantní frekvence (příloha 8).



Graf 13: rostlina *Spathiphilium* – první elektroda - haptický kontakt za normálních podmínek

Mechanické poškození za normálních podmínek

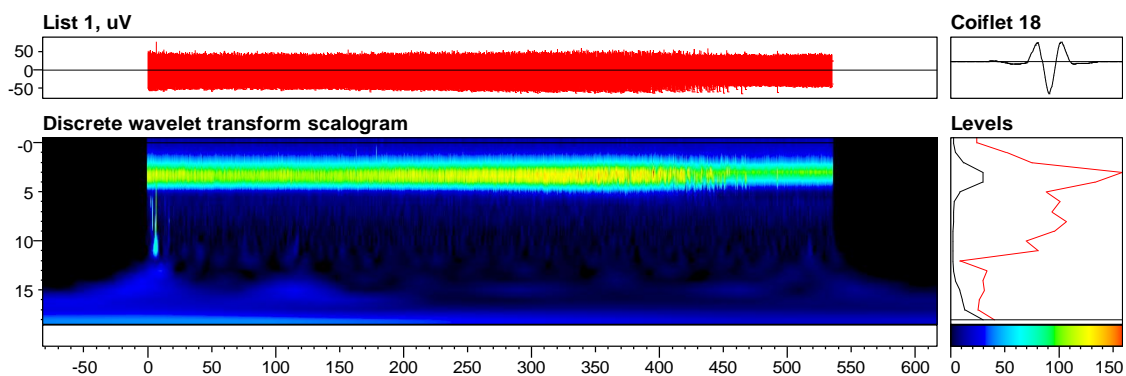
Výsledky vyhodnocené pomocí vlnkové analýzy záznamu mechanického poškození (graf 14) ukazují opačný fenomén oproti navýšení amplitudy v experimentální části haptického kontaktu (graf 13). Dominantní frekvence 2-4 Hz zůstává ve srovnání s haptickým kontaktem nezměněna, ale amplitudy se snižují. V časovém rozmezí 0-150s se jejich hodnoty pohybují zhruba na 80 μV . Ve 150.s (první stříh) dochází k dalšímu snížení amplitud na 50 μV a méně při zachování stejné dominantní frekvence. Obdobný trend je k vidění i u zbylých elektrod umístěných na rostlině (příloha 9).



Graf 14: rostlina *Spathiphilium* – první elektroda - mechanické poškození za normálních podmínek

Klidový režim po éterové anestézii

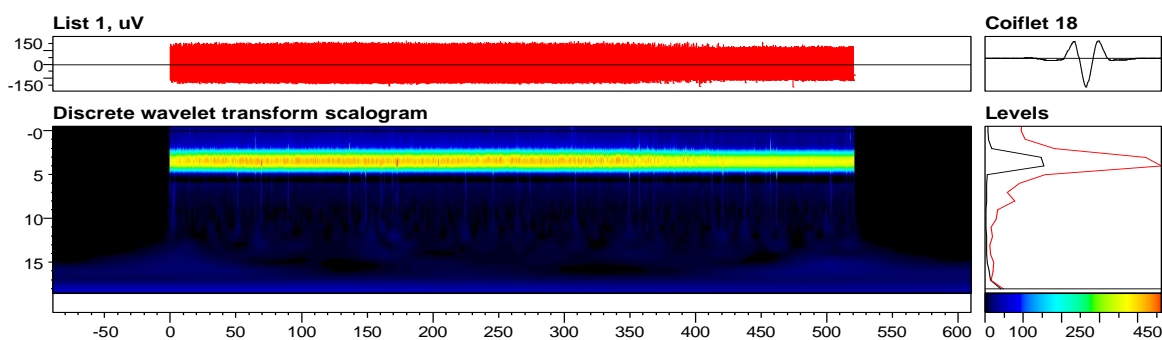
Výsledky získané z měření v klidu po éterové anestézii (graf 15) jsou průběhem velmi podobné klidovému záznamu za podmínek normálních. Záznam vykazuje značnou stacionaritu. Dominantní frekvence 2-4 Hz má amplitudu cca 100 μV . V čase 450.s dochází ke snížení amplitudy dominantní frekvence na 70 μV . Elektrody 2-4 zaznamenaly obdobný fenomén (příloha 10).



Graf 15: rostlina *Spathiphyllum* – první elektroda – měření v klidu po éterové anestézii

Haptický kontakt po éterové anestézii

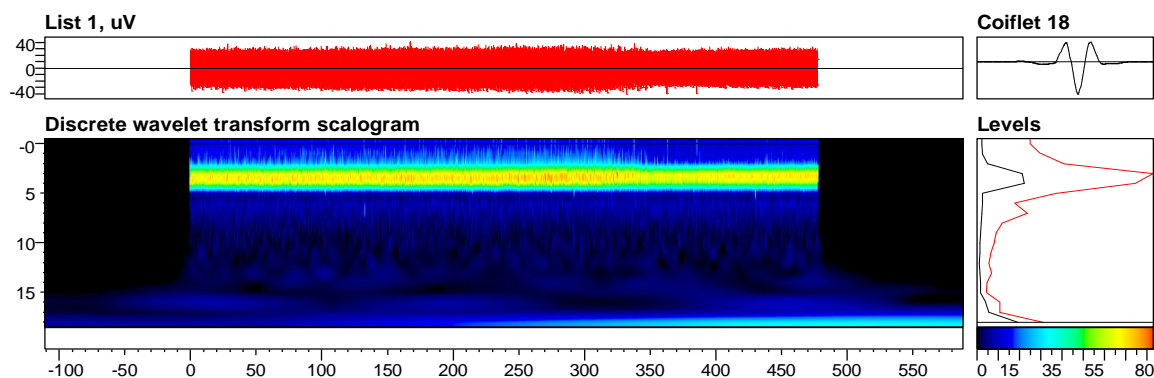
Naměřený záznam haptického kontaktu po éterové anestézii (graf 16) je stacionární. V porovnání záznamu s výsledky předcházející části (graf 15) dochází k zvýšení amplitudy dominantního frekvenčního pásma 2 - 4 Hz na 400 μ V. Obdobný trend je zachycen v ostatních elektrodách (příloha 11).



Graf 16: rostlina *Spathiphyllum* – první elektroda – měření v klidu po éterové anestézii

Mechanické poškození po éterové anestézii

V části mechanického poškození po éterové anestézii (graf 20) dochází k poklesu amplitudy dominantní frekvence 2 - 4 Hz na 60 μ V. V intervalu 0 - 350s se zároveň v záznamu objevuje přídatná aktivita na frekvenčním pásmu 0-2 Hz, jejíž výskyt není kontinuální a hodnoty amplitud se pohybují na 25 μ V. Elektrody 2 - 4 poskytují obdobný záznam (příloha 12).



Graf 17: rostlina *Spathiphyllum* – první elektroda – měření v klidu po éterové anestézii

Souhrn výsledků získaných na rostlině *Spathiphilium*

Rostlina *Spathiphilium* byla ve většině částí experimentu charakterizována dominantní frekvencí 2 - 4 μV , pouze v klidu za normálních podmínek bylo dominantní pásmo na 3-5 Hz. Amplitudy tohoto frekvenčního pásma se v jednotlivých částech měnily. Při haptickém kontaktu docházelo k navýšení amplitudy, v reakci na mechanické poškození naopak k jejímu snížení.

Rozdíly ve změně amplitud se v části za normálních podmínek a po éterové anestézii téměř shodovaly (tabulka 2). Za normálních podmínek došlo mezi částmi v klidu a za haptického kontaktu k navýšení ze 70 μV na 400 μV (procentuální nárůst 471,4%). V reakci na mechanické poškození následně došlo ke snížení amplitud na 50 μV , tedy k úbytku na 12,3%. Nárůst amplitud mezi částí klidového měření a haptického kontaktu po éterové anestézii byl ze 100 μV na 400 μV (procentuální nárůst 300%). Při mechanickém poškození se amplitudy snižují na 15% (60 μV). Hlavní rozdíl nalzáme v průběhu reakcí na mechanické poškození. Při poškození za normálních podmínek došlo v čase 150 s k přídatnému poklesu amplitudy. V měření po éterové anestézii byl pokles amplitud kontinuální.

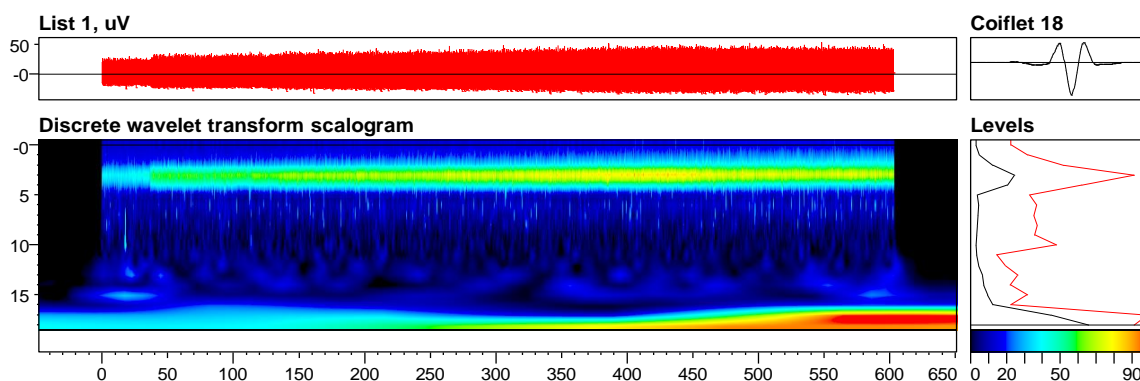
AMPLITUDA	Měření v klidu	Haptický kontakt	Mechanické poškození
Za normálních podmínek	70 μV	400 μV	50 μV
Procentuální nárůst/pokles		471%	88,7%
Po éterové anestézii	100 μV	400 μV	60 μV
Procentuální nárůst/pokles		300%	85%

Tabulka2: porovnání amplitud jednotlivých částí měření na rostlině *Spathiphilium*

9.2.3 Měření na rostlině *Scindapsus*

Měření v klidu za normálních podmínek

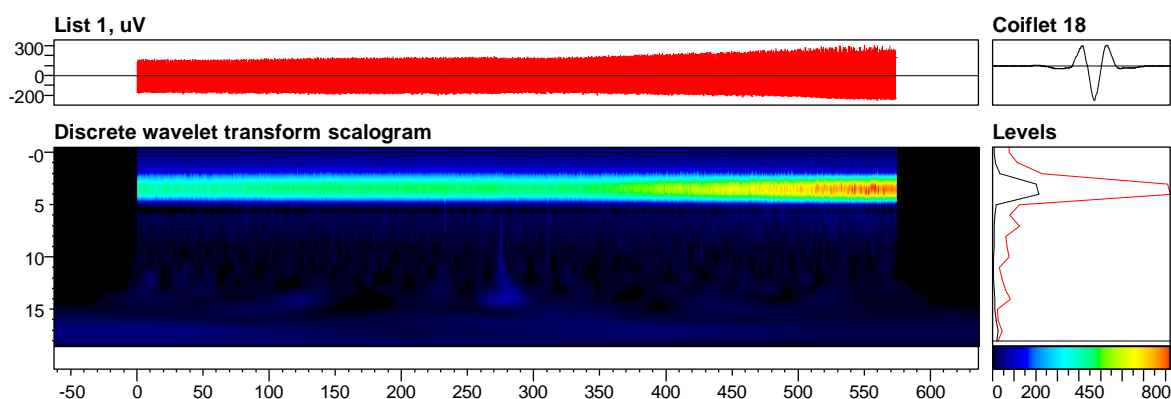
Výsledky měření za klidových podmínek (graf 18) ukazují dominantní frekvence 2-4 Hz o počáteční amplitudě 60 μV , která se okolo 300.s zvedá na 70 μV . Dále se objevuje přídatná aktivita na frekvenčním pásmu 0-2 Hz, jejíž výskyt je nekontinuální a frekvence výskytu se s přibývajícím časem zvyšuje k hodnotám kolem 40 μV . Podobný trend mírného navýšení amplitudy v čase je zaznamenán i u zbylých elektrod umístěných na rostlině (příloha 13).



Graf 18: roztina *Scindapsus* – první elektroda - měření v klidu za normálních podmínek

Haptický kontakt za normálních podmínek

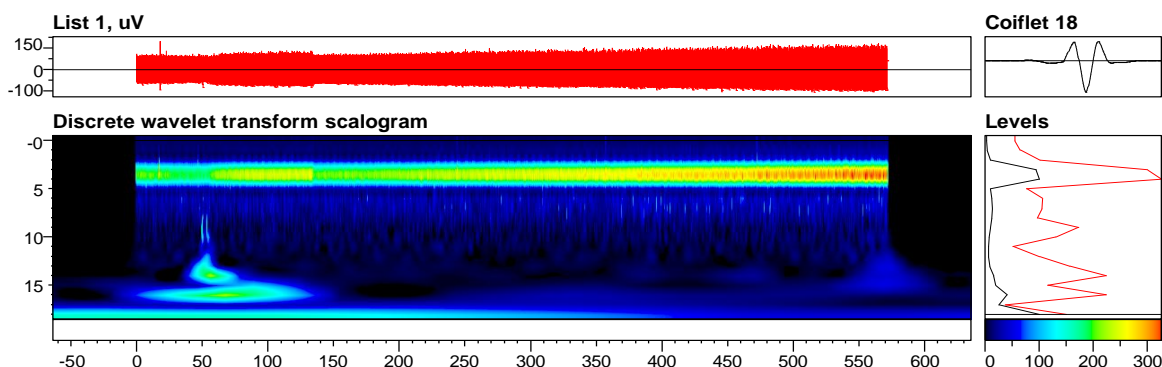
Naměřený záznam haptického kontaktu za normálních podmínek (graf 19) vykazuje při srovnání s měřením v klidu navýšení amplitudy při zachování stejné dominantní frekvence. Amplitudy frekvenčního pásma 2-4 Hz rostou s přibývajícím časem z počátečních 400 μV na koncových 800 μV . Obdobné nálezy byly získány i ze zbylých elektrod (příloha 14).



Graf 19: roztina *Scindapsus* – první elektroda – haptický kontakt za normálních podmínek

Mechanické poškození za normálních podmínek

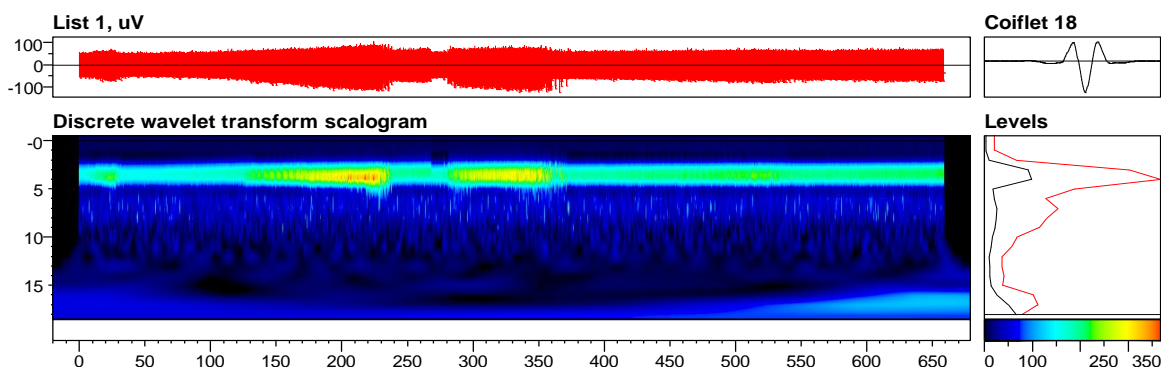
Výsledky elektrické aktivity v průběhu mechanického poškození za normálních podmínek (graf 20) ukazují navýšení amplitudy při stacionární frekvenci 2-4 Hz. Oproti měření haptického kontaktu (graf 19) však dochází ke snížení amplitudy frekvenčně dominantního pásma 2-4 Hz na průměrných 250 μV . Na frekvenci 10-15 Hz se v čase 0-140s vyskytuje přídatná aktivita o amplitudě 150 μV , jedná se pravděpodobně o druh artefaktu. Celkové snížení amplitudy dominantní frekvence oproti měření v předchozí části zaznamenaly i elektrody 2-4 (příloha 15).



Graf 20: rostlina *Scindapsus* – první elektroda – mechanické poškození za normálních podmínek

Měření v klidu po éterové anestézii

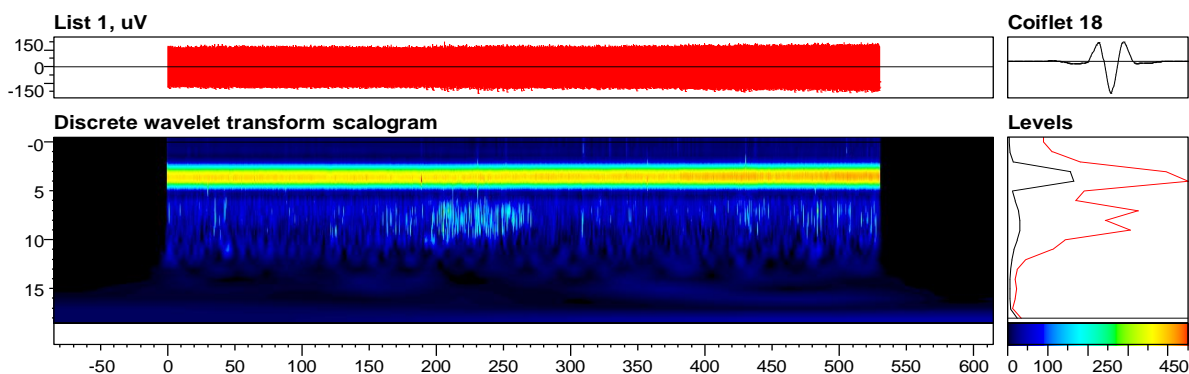
Vyhodnocením záznamů měření v klidu po éterové anestézii (graf 21) pomocí vlnkové transformace získáváme graf s nestacionárním průběhem. Pro majoritní část grafu je dominantní frekvenční pásmo 2-3 Hz s amplitudou 150 μV ale v časových intervalech 0-25s, 125-225s a 275-375s se rozšiřuje na 2-5 Hz a současně se zvyšuje amplituda na 300 μV . Tento fenomén navýšení amplitudy a rozšíření frekvenčního pásma byl spojen s objevením zvýšeného slunečního svitu v dvou krátkých časových intervalech a byl zaznamenán na všech elektrodách rostliny (příloha 16).



Graf 21: rostlina *Scindapsus* – první elektroda – měření v klidu po éterové anestézii

Haptický kontakt po éterové anestézii

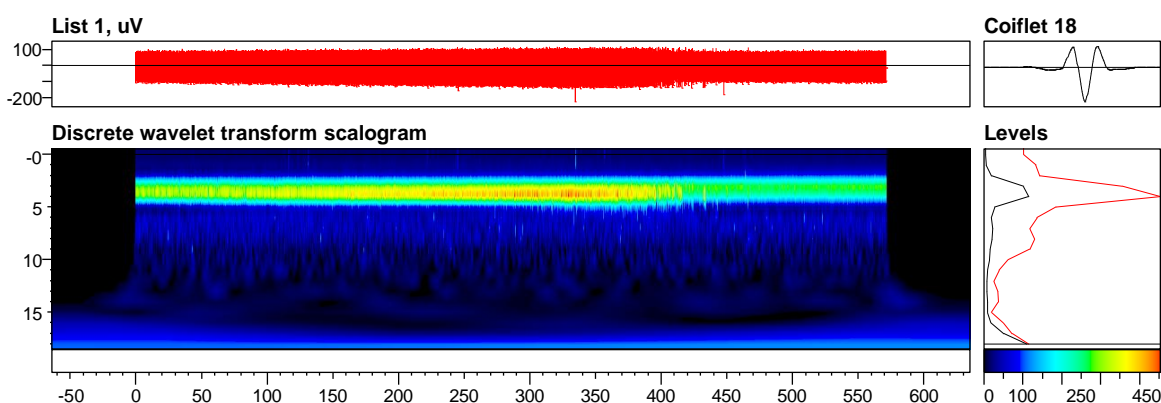
Výsledkem měření haptického kontaktu po éterové anestézii (graf 22) je stacionární záznam. Dominantní frekvenční pás 2-4 Hz vykazuje neměnné amplitudy o hodnotě 350 μV . Na frekvenčním rozpětí 5-10 Hz se objevuje přídatná elektrická aktivita s nekontinuálním výskytem, jejíž průběh lze nejlépe studovat v intervalu 150-275s. Obdobnou stacionaritu dominantní frekvenci a amplitud ukazují i elektrody 2-4 (příloha 17).



Graf 22: roztina *Scindapsus* – první elektroda – haptický kontakt po éterové anestézii

Mechanické poškození po éterové anestézii

V průběhu části mechanického poškození po éterové anestézii (graf 23) dochází k odlišnému charakteru chování, než bylo pozorováno na rostlině *Scindapsus* v předchozích částech experimentu. V intervalu 0-420s dochází k navýšení amplitud z 300 μV na 350 μV dominantního frekvenčního pásma 2-4 Hz. V čase 420s dochází (čtvrtý stříh) ke snížení amplitudy na 200 μV při zachování stejné dominantní frekvence. Obdobný charakter záznamů s výraznou změnou chování v 420. sekundě je zaznamenán i u zbylých elektrod (příloha 18).



Graf 23: roztina *Scindapsus* – první elektroda – mechanické poškození po éterové anestézii

Souhrn výsledků získaných na rostlině *Scindapsus*

Prakticky v průběhu celého měření byla pro rostlinu charakteristická dominantní frekvence 2-4 Hz pouze při měření v klidu po éterové anestézii (graf 21) se frekvenční pás rozšiřuje na 2-5 Hz. Hodnoty amplitud se v jednotlivých částech lišily, obecně však převažovala jejich rostoucí tendence s přibývajícím časem. V porovnání se záznamy získanými na rostlinách *Aloe vera* a *Spathiphyllum* vykazují výsledky získané na rostlině *Scindapsus* mnohem menší stacionaritu. Záznamy často obsahují aktivity na přídatných frekvenčních pásech či je jejich průběh nepravidelný.

Po éterové anestézii byly amplitudy dominantní frekvence kromě měření v klidu celkově nižší než při měření za normálních podmínek (tabulka 3). Za normálních podmínek vzrostly amplitudy v reakci na haptický kontakt ze 70 μV na 800 μV , tj. nárůst na 1014%. Naopak při mechanické poškození amplitudy klesly z původních 800 μV na 250 μV , tedy o 68,75%. Po éterové anestézii hodnoty mezi částmi v klidu a za haptického kontaktu stoupají

ze 150 μV na 350 μV (procentuální nárůst 133%) a při mechanickém poškození klesají na 200 μV – o 42,85%.

AMPLITUDA	Měření v klidu	Haptický kontakt	Mechanické poškození
Za normálních podmínek	70 μV	800 μV	250 μV
Procentuální nárůst/pokles		1014%	68,75%
Po éterové anestézii	150 μV	350 μV	200 μV
Procentuální nárůst/pokles		133%	42,85%

Tabulka 3: : porovnání amplitud jednotlivých částí měření na rostlině *Scindapsus*

Diskuze

Hypotéza 1: Předpokládám, že je možné měřit elektrickou aktivitu rostlin pomocí elektromyografu.

V průběhu experimentu se nám podařilo zachytit změny elektrické aktivity řádově v hodnotách 150 μV , které se pohybovali ve frekvenčním pásmu pod 5 Hz. Současně jsem však zachytila i síťový artefakt o frekvenci 50 Hz. Změny elektrické aktivity nebyly u všech zkoumaných rostlin stejné a lišily se v průběhu jednotlivých fází experimentu. V reakci na haptický kontakt vyvstává otázka, zda byla měřena elektrická aktivita rostlin či zda se jednalo o elektrickou aktivitu člověku, přestože dominantní frekvence zůstala neměnná (případně rozšířena na 2-5 Hz). Zároveň byl zachycen výrazný nárůst amplitudy při rozšíření dominantního frekvenčního pásu v okamžiku zvýšeného slunečního svitu v laboratoři a následný pokles po ukončeném svitu. Tento fenomén, dle mého názoru, opět podporuje možnost registrace elektrické aktivity rostlin pomocí humánního přístroje určeného pro registraci svalové aktivity.

Pro další experimenty bych zkusila jiné umístění zemnicí elektrody a to na místo, které je vodivě spojeno s rostlinou (např. vlhká hlína či stonek rostliny) a pro mechanické poškození využít nevodivého předmětu. Pro větší objektivitu by bylo vhodné provádět měření v prostředí s konstantními podmínkami (teplotou, vlhkostí atd.). Případně následující experiment zopakovat ve Faradayově kleci, která může zvýšit výtěžnost registrované elektrické aktivity odrušením vnějšího elektromagnetického pole.

Hypotéza 2: Předpokládám nárůst elektrické aktivity rostlin oproti měření za klidových podmínek v reakci na haptický kontakt.

Z následujícího experimentu vyplývá, že majoritní většina rostlin reaguje na haptický kontakt navýšením elektrické aktivity oproti klidovému měření. Změna chování byla zaznamenána na všech studovaných rostlinách. U rostlin *Aloe vera* (2 exempláře), *Spathiphilium* (2 exempláře), *Scindapsus* bylo zaznamenáno navýšení amplitud dominantní frekvence, pouze u rostliny *Hoya carnosa* došlo k opačnému jevu, resp. ke snížení elektrické aktivity.

Touto problematikou se zabýval již Brian J. Ford, který se své knize vyjádřil: „*Studie rostlinné elektrické aktivity ukázaly, že rostliny vnímají a reagují na dotek. Rostliny tedy jednoznačně zpracovávají data. Nedělají víc, než musí, ale jsou dokonale adaptované na potřeby jejich života (Ford, 1999).*“

Hypotéza 3: V reakci na mechanické poškození očekávám snížení rostlinné elektrické aktivity.

V experimentech bylo potvrzeno dříve zjištěné reakční schéma rostlin na mechanické poškození následované po zvukovém podnětu. V reakci na nepříjemné vnější faktory se elektrická aktivita rostlin oproti haptickému kontaktu snižuje. Následující změna byla zachycena u všech zkoumaných rostlin.

Kromě rostlinné reakce na mechanické poškození, byla zachycena i změna elektrické aktivity při zvukovém podnětu. Odpověď vůči tomuto faktoru se postupně zmenšovala, jakoby se rostlina daným podmínkám přizpůsobila a dále je nehodnotila jako nebezpečné. Následující vnímavost rostlin na zvukové stimuly popisuje mnoho odborné literatury

s komplexním experimentálním studiem, např. studie Gagliano et al. (2012).

Hypotéza 4: Předpokládám rozdíl v elektrickém chování rostlin za normálních podmínek a po éterové anestézii.

Na základě provedených experimentů jsem dokázala, že diethylether určitým způsobem ovlivňuje reaktivitu rostlin. Nelze však obecně vyvodit jakým způsobem, neboť na jednotlivé druhy rostlin působil D.E. rozdílně. Navíc i rozdíl v intenzitě elektrické aktivity jednotlivých elektrod před a po éterové anestézii nebyl plně jednotný. To může být způsobeno vlivem značně přítomné vlhkosti v D.E. prostředí, která mohla narušit kontakt elektrod s povrchem rostlin. Amplitudy v části měření klidových potenciálů jsou u všech rostlin po éterové anestézii vyšší než za podmínek normálních. *Spathiphyllum* a *Scindapsus* vykazovaly po éterové anestézii na vystavené podmínky (haptický kontakt, mechanické poškození) menší odpověď, *Aloe vera* naopak reagovala citlivěji. Důvodem větší rezistence *Aloe vera* vůči této omamné látce může být například rostlinná stavba – její silná kutikula možná propustí méně D.E. než ostatní zkoumané rostliny. Záznamy po éterové anestézii jsou obecně „čistší“ – neobsahují tolik artefaktů a záznamy jsou stacionárnější. Zdá se jako by rostliny vnímaly pouze stimuly v její bezprostřední blízkosti. Předpokládám, že při použití větší koncentrace diethyletheru by byl celkový útlum rostlin větší a mohl by způsobit až kompletní imobilitu rostlinné reaktivity (Grémiaux et al., 2014).

V záznamech napříč rostlinami se od 400. sekundy občas mění průběhy grafů - dochází k útlumu jejich elektrické aktivity. Tento jev byl zaznamenán již při dřívějších experimentech a není zatím plně objasněn. Vzhledem k tomu že můžeme tento fenomén pozorovat převážně v částech klidového měření, nabízí se hypotéza, že možná až po tomto časovém úseku se rostlina naplno uklidňuje a dochází k měření reálných klidových potenciálů.

Interpretace výsledků jednotlivých rostlin:

Měření za normálních podmínek i po éterové anestézii na rostlině *Aloe Vera* korespondovala s běžným schématem. V reakci na haptický kontakt zaznamenaly nejvyšší nárůst amplitud třetí a čtvrtá elektroda. Důvodem, proč je míra reakce nejvyšší právě u těchto elektrod, je pravděpodobně probíhající haptický kontakt přímo s listem, na kterém byla umístěna elektroda 3. Po éterové anestézii se do záznamů promítá přídatná aktivita na frekvenci 5-10 Hz. Vzhledem k jejímu nekontinuálnímu, pulznímu výskytu dedukuji, že byla zachycena elektrická síť objektu. Při haptickém kontaktu je její výskyt řidší než u zbylých částí, což vysvětlují uzemněním rostliny na základě kontaktu s bosým člověkem. Hlavním rozdílem mezi měřeními za normálních podmínek a po éterové anestézii je v části mechanického poškození. Po éterové anestézii nenastal výrazný útlum amplitud v čase stříhu, pouze kontinuální snížení amplitud dominantní frekvence. Pravděpodobným vysvětlením je ovlivnění citlivosti reakcí diethyletherem. Následující zjištění koresponduje s odbornou literaturou na toto téma: *Diethylether způsobuje útlum rostlin a značně omezuje jejich reaktivitu vůči vnějším podmínkám* (De Lucia, 2012).

Spathiphyllum měla mezi studovanými rostlinami nejcitlivější odpovědi vůči externím podnětům. V žádné části nebyla rostlina ovlivněna změnou intenzity slunečního záření, a tak získané data jsou reakcí pouze na vytvořené podmínky. *Spathiphyllum* reagovala na mechanické poškození velmi přesně. V okamžiku prvního stříhu výrazně snižuje elektrickou aktivitu na hodnoty 50 μ V, tedy o 29% z původní klidové aktivity. Po éterové anestézii nenastává pokles amplitudy v určitém čase, pouze kontinuální snížení celkových hodnot. Zbytek grafů odpovídá běžnému reakčnímu schématu.

Na všechny vystavené situace části A (měření za normálních podmínek) reaguje rostlina *Scindapsus* navyšováním amplitud. Při porovnání hodnot amplitud však zjišťujeme,

že se amplituda mění a to podle standardních postupů. Při haptickém kontaktu dochází k navýšení. V reakci na mechanické poškození naopak k poklesu elektrické aktivity. Na rostlině *Scindapsus* byl ze všech zkoumaných rostlin zaznamenán největší nárůst amplitud v reakci na haptický kontakt. Při klidovém měření po éterové anestézii měl graf netypický průběh. Příčina reakce není přesně známa, ale pravděpodobně došlo ke změně elektrické aktivity v důsledku zvýšení slunečního svitu v laboratoři, která je v těchto časových intervalech zaznamenána na kamerovém záznamu.

Vzhledem k náročnosti provedení éterové anestézii byla měření s diethyletherem provedena pouze jednou. Pro větší objektivitu by bylo vhodné zopakování následujícího experimentu a jeho rozšíření na více exemplářů rostlin.

Zároveň by bylo zajímavé porovnat rozdíl v reakcích, kdybych pro měření použila exempláře již dříve vystavené následujícímu experimentu. Práce by se pak mohla stát propojením mezi studiem elektrické signalizace a rostlinnou pamětí.

Závěr

Předkládaná práce se zabývá studiem rostlinné reaktivity. Úspěšně se podařilo najít metodu měření elektrických signálů rostlin a zpracování jejich údajů na základě vlnkové transformace signálů. Bylo dokázáno, že elektromyograf lze využít i k experimentům na rostlinách a na základě studia rostlinné elektrické aktivity se ukázalo, že rostliny vnímají své okolí.

Tato pilotní studie byla zaměřena na studium rostlinné reakce na haptický kontakt s člověkem a mechanické poškození. U většiny rostlin došlo při haptickém kontaktu k navýšení elektrické aktivity. Zdá se, že převážná většina rostlin dotyk nevyhodnocuje jako nebezpečný faktor – opačné chování bylo zaznamenáno pouze u jedné rostliny z celkových šesti exemplářů. Naopak mechanické poškození způsobilo bez jediné výjimky útlum elektrické aktivity. Reakce na samotný zvukový podnět se v průběhu měření snižovala – první zvonění způsobilo největší odpověď, poslední naopak nejmenší. Kromě těchto reakcí bylo vyzorováno, že rostliny velmi citlivě reagují na změnu slunečního svitu a to i ve zdánlivě zatemněné místnosti (při zatažených žaluziích).

Obecně se ukazuje, že na rostlinnou reaktivitu má vliv mnoho faktorů. Kromě očividných jako je druh a stáří rostliny, pravděpodobně ovlivňují experimenty i další. Na základě provedených experimentů se ukazuje i vliv historie rostlin, čímž je hlavně myšleno místo růstu a známost s aktéry experimentu. I z běžného života je známo, že se rostliny na nové prostředí potřebují aklimatizovat a na to je potřeba brát zřetel i při experimentech. Zdaleka neobjektivnější by byla varianta využití k experimentu rostlin vypěstovaných přímo v laboratoři pro eliminaci rostlinných reakcí na přídatné faktory jako je změna prostředí.

Pro obecnější závěry experimentu plánuji celkové rozšíření studie. Obor rostlinné neurobiologie je velmi zajímavý a zatím málo prozkoumaný - rozumíme pouhému zlomku z komplikované komunikační sítě rostlin a já doufám v jeho hlubší experimentální prozkoumání a pochopení.

Seznam použité literatury

APPELL, H. M. and COCROFT, R. B.. *Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing*. Plant-microbe-animal interactions, 2014, no. 4, p. 1257-1266.

BAIS, H. P. et al. *How plants communicate using the underground information superhighway*. Trends in plant science 9, 2004, no. 1, p. 26-32.

BALUŠKA, F.. MANCUSO, S.. VOLKMANN, D.. *Communication in plants: Neuronal aspects of plant life*, Berlin: Springer, 2005.

BECKER, H.. *Green circuits-the potential of plant specific ion channels*. Plant molecular biology, 1995, no. 26, p.1637–1650.

BRENNER, E. D. et al. *Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling*. Trends Plant Sci, 2006, no. 11, p. 413–419.

FORD, B.J.. *How Animals and Plants feel and communicate*. New York, 1999. ISBN: 0-88064-254-8, page 195

DE LUCIA, T. P.. *Mimosa Pudica, Dionaea Muscipula and Anesthetics*. Plant Signaling & Behavior 7.9 ,2012, p. 1163–1167. PMC. Web. 9 Jan. 2016.

DICKE, M.. AGRAWAL, A. A.. BRUIN, J.. "*Plants talk, but are they deaf?*."Trends in plant science 8, 2003, no. 9, p. 403-405.

FORD, B. *How Animals and Plants feel and communicate*. New York, 1999. ISBN: 0-88064-254-8

FROMM, J. and LAUTHER, S. *Electrical signals and their physiological significance in plants*. Plant, Cell and Environment, 2007, no. 30, p. 249-257.

GAGLIANO, M.. MANCUSO, S.. ROBERT, D.. *Towards understanding plant bioacoustics*. Trends in plant science 17, 2012, no. 6, p. 323-325.

GRÉMIAUX, A. et al. *Plant Anesthesia Supports Similarities between Animals and Plants: Claude Bernard's Forgotten Studies*. Plant Signaling & Behavior 9, 2014, e27886. PMC. Web. 10 Jan. 2016.

KINSON, S. and DAVIES, W. J.. *ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants*. Plant, cell & environment, 2002, no.25(2), p. 195-210.

KRAJČA, V.. MOHYLOVÁ, J.. *Zpracování signálu v lékařství*. Žilinská Univerzita v Žilině. Fakulta elektrotechniky. Žilina, 2004.

PRICE, M. A.. *Sound attenuation through trees: Measurements and models*. The Journal of the Acoustical Society of America, 1988, no. 84, p. 1836–1845.

POLLAN, M.. *The intelligent plant*. New Yorker, 2013, no. 93.

PYATYGIN, S.S.. OPRITOV, V.A.. VODENEEV, V.A.. *Signaling role of action potential in higher plants*. Russian Journal of Plant Physiology, 2011, no. 55, p. 285–291.

POLANSKÝ, Š.. *Zpracování elektroencefalografických signálů*. Diplomová práce. Vysoké Učení Technické. Brno, 2011.

VÍTEK, M.. *Automatické rozměření signálů EKG*. Dizertační práce. Brno, 2011.

TOMPKINS, P.. BIRD, Ch.. *The secret life of plants*. 1st Perennial Library ed. New York: Harper & Row, 1989. ISBN 9780060915872.