

# PRIMERJAVA DVEH METOD ZA MERJENJE LISTNIH REŽ PRI DOBU IN GRADNU

## COMPARISON OF TWO METHODS FOR MEASUREMENT OF STOMATA IN PEDUNCULATE AND SESSILE OAK

Tanja MRAK<sup>1</sup>, Jožica GRIČAR<sup>1</sup>

<https://doi.org/10.3986/fbg0119>

### IZVLEČEK

Lastnosti listnih rež, kot sta gostota in velikost, pomembno vplivajo na izmenjavo plinov, zato je njihova analiza ključna za razumevanje fiziologije rastlin, njihove prilagodljivosti na okoljske razmere ter odzivov na podnebne spremembe. Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, ali ročne meritve listnih rež pri drevesnih sadikah lahko nadomestimo z avtomatiziranimi meritvami, kar bi zaradi prihranka časa močno povečalo število vzorcev, ki jih lahko analiziramo. Pripravili smo odtise spodnje povrhnjice z listnimi režami pri sadikah doba in gradna z istega rastišča. Na desetih naključno izbranih posnetkih preparatov pod 200 x in 400 x povečavo mikroskopa za vsako vrsto smo merili število režnih kompleksov ter dolžino in širino celic zapiralk ter porusa z ročnimi meritvami v programu Image J ter z avtomatiziranimi meritvami v programu StoManager1. Rezultate smo statistično ovrednotili. Pri meritvah števila režnih kompleksov nismo zasledili statistično značilnih razlik med obema metodama. Bland-Altmanova analiza je pokazala dobro ujemanje med ročnimi in avtomatiziranimi meritvami. Avtomatizirane meritve so sicer rahlo precenile število režnih kompleksov, vendar je bila napaka majhna. Pri meritvah velikosti so bile razlike med obema metodama meritev statistično značilne, Bland-Altmanova analiza pa je pokazala odstopanja med obema metodama pri večjih razponih velikosti merjenih struktur. Z regresijsko analizo smo ugotovili, da je ujemanje med ročnimi in avtomatiziranimi meritvami v velikostnem razredu 20–25  $\mu\text{m}$  (večjih struktur nismo merili) dokaj zanesljivo, z manjšanjem velikosti struktur pa upade, najverjetneje zaradi segmentacije slike pri avtomatizirani metodi, pri kateri je zaznavanje robov manj natančno. Pri majhnih strukturah že majhne razlike v segmentaciji privedejo do večjih napak. Po drugi strani pa lahko tudi ročne meritve na mikroskopskih slikah postanejo vse bolj subjektivne, ko se velikost struktur zmanjšuje. Naši rezultati nakazujejo, da so avtomatizirane meritve s programom StoManager1 ustrezna nadomestitev

### ABSTRACT

Stomatal traits, such as density and size, significantly influence gas exchange; therefore, their analysis is essential for understanding plant physiology, their adaptation to environmental conditions, and their responses to climate change. The aim of this study was to determine whether manual measurements of stomata in tree seedlings could be replaced by automated measurements, which would substantially increase the number of samples that can be analysed due to time savings. Epidermal imprints of stomata were prepared from seedlings of pedunculate oak and sessile oak growing at the same site. Ten randomly selected micrographs of the preparations at 200  $\times$  and 400  $\times$  magnification per species were used to analyse the number of stomata as well as the length and width of guard cells and stomatal pore, using both manual measurements in ImageJ and automated measurements in StoManager1. The results were statistically evaluated. No statistically significant differences between the two methods were found for measurements of stomatal number. Bland–Altman analysis showed good agreement between manual and automated measurements. Although the automated method slightly overestimated the number of stomata, the error was small. For size measurements, statistically significant differences between the two methods were observed, and Bland–Altman analysis revealed deviations between the methods at larger size ranges of the measured structures. Regression analysis indicated that agreement between manual and automated measurements was reasonably reliable within the size range of 20–25  $\mu\text{m}$  (larger structures were not measured), but decreased with decreasing structure size, most likely due to image segmentation in the automated method and the associated less precise edge detection. In small structures, even minor segmentation differences can lead to larger errors. On the other hand, manual measurements in microscopy images can also become increasingly subjective as the size of structures decreases. Our results suggest that automated measurements using StoManager1 represent a

<sup>1</sup> Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenija, tanja.mrak@gozdis.si

ročnih meritev števila oz. gostote režnih kompleksov ter velikosti večjih struktur znotraj režnega kompleksa za izbrane drevesne vrste.

*Ključne besede:* število listnih rež, oblika listnih rež, orodja za analizo slike, avtomatizirane meritve, sadike, hrasti, *Quercus robur*, *Quercus petraea*

suitable alternative to manual measurements of stomatal number/ density and dimensions of larger structures within the stomatal complex for the selected tree species.

*Key words:* number of leaf stomata, leaf stomata shape, image analysis tools, automated measurements, seedlings, oaks, *Quercus robur*, *Quercus petraea*

## 1 UVOD

Stomatarni aparat oz. režni kompleks so strukture v povrhnjici listov in iz njih nastalih struktur, zgrajene navadno iz dveh celic zapiralk in različnega števila celic spremljevalk. Med celicama zapiralkama je shizogena intercelularna stomatarna odprtina ali porus (listna reža v ožjem pomenu besede) (BATIČ et al. 2011). Listne reže predstavljajo ključno mesto izmenjave plinov med rastlino in ozračjem. Skozi listne reže v list vstopa ogljikov dioksid, potreben za fotosintezo, medtem ko prek njih s transpiracijo izhaja vodna para (YAN et al. 2017). Velikost odprtine listne reže, porusa, določajo spremembe turgorja celic zapiralk, s čimer rastlina uravnava difuzijo plinov in vzdržuje stabilno notranje okolje lista (LAWSON 2009). Regulacija listnih rež je bistvena za prilagoditev rastlin na okoljske razmere. Vključuje kratkoročne spremembe odprtosti rež, ki omogočajo odzive na razpoložljivost vode, svetlobo, temperaturo, hitrost vetra in koncentracijo ogljikovega dioksida ter dolgoročne prilagoditve, kot so spremembe v gostoti listnih rež (HETHERINGTON & WOODWARD 2003, GONG et al. 2025). Te prilagoditve določajo največjo prevodnost listnih rež ter s tem omejujejo izmenjavo plinov glede na razmere v okolju ter signale med koreninami in nadzemnimi deli rastline (GONG et al. 2025). Prevodnost listnih rež neposredno vpliva na fotosintezo, rast in učinkovitost izrabe vode (BERTOLINO et al. 2019). Omejitve v prevodnosti listnih rež lahko zmanjšajo fotosintetsko aktivnost tudi za več kot 50 %, hkrati pa predstavljajo prvo linijo obrambe pred izsušitvijo (JEZEK & BLATT 2017). S pripiranjem oz. z zapiranjem listnih rež rastline zmanjšujejo tveganje za nastanek embolije v ksilemu in poškodbe zaradi sušnega stresa (JONES & SUTHERLAND 1991). Poleg tega listne reže vplivajo na temperaturo lista, odpornost na temperaturne ekstreme (URBAN et al. 2017) in vstop patogenih organizmov (MELOTTO et al. 2006). Na ravni ekosistema imajo listne reže ključno vlogo pri kroženju ogljika in vode, saj uravnavajo privzem CO<sub>2</sub>, t.j. bruto primarno proizvodnjo (GPP), in evapotranspiracijo (HAWORTH et al. 2021). Njihove morfološke in funkcionalne značilnosti odražajo evolucijske prilagoditve na pretekle okoljske razmere in koncentracije CO<sub>2</sub> v ozračju, zato se pogosto uporabljajo tudi pri rekonstrukciji preteklih okoljskih razmer (HAWORTH et al. 2021).

Preučevanje lastnosti listnih rež, kot so velikost, gostota in razporeditev, pomembno prispeva k razumevanju fiziologije rastlin, njihovega prilagajanja okoljskim razmeram ter odzivov na podnebne spremembe (YAN et al. 2017, THAI et al. 2025). Večinoma analize teh lastnosti temeljijo na mikroskopskih metodah oz. njihovih izpeljankah (npr. prenosni mikroskopi, 3D zajem intaktnih listov) (EISELE et al. 2016, MATTHAEUS et al. 2020, LIANG et al. 2022, PATHOUMTHONG et al. 2023). Klasične mikroskopske metode temeljijo na izdelavi odtisa listnih rež (WU & ZHAO 2017) oz. preiskavi vzorca povrhnjice (IBATA et al. 2013). Temu sledi ročno ali polavtomatizirano vrednotenje s pomočjo programske opreme, kot je npr. Image J (JAYAKODY et al. 2017), kar pa je zamudno delo. Poleg tega metoda ročnega štetja ni povsem ponovljiva, saj se je vedno potrebno subjektivno odločiti, kako šteti reže na robu, ki niso v celoti zajete na posnetku (FETTER et al. 2019). Z metodami strojnega učenja, kot je globoko učenje, v zadnjem času prihaja do velikega napredka v pospešitvi procesa vrednotenja z avtomatiziranim zaznavanjem in meritvami, kar je še posebej dobrodošlo pri fenotipizaciji (GIBBS & BURGESS 2024, THAI et al. 2025). Modeli globokega učenja delujejo na treh ravneh. Prva raven je zaznavanje struktur, pri kateri program zazna listne reže in jih obkroži z okvirjem. Ta raven omogoča ugotavljanje števila oz. gostote listnih rež. Druga raven je semantična segmentacija, kjer pride do klasifikacije posameznih slikovnih točk, kar omogoča določitev robov režnega kompleksa, celic zapiralk, porusa, ..., ter meritve dimenzij. Tretja raven je instančna segmentacija, kjer pride do identifikacije posameznega režnega kompleksa in struktur povezanih z njim ter izvajanje meritev, povezanih s točno določeno strukturo (GIBBS & BURGESS 2024). Avtomatizirano zaznavanje ima prednost pred ročnim štetjem tudi v ponovljivosti, saj imajo algoritmi točno določena vnaprej postavljena pravila, na podlagi katerih določeno strukturo opredelijo kot listno režo, vključno s štetjem rež ob robovih (FETTER et al. 2019). Razvoj novih aplikacij je pogosto usmerjen v določeno taksonomsko skupino (npr. koruza (ZHANG et al. 2022, YANG et al. 2025), soja (SULTANA et al. 2021)) in za točno določen namen, tako da ta orodja večinoma niso ovrednotena za širšo rabo oz. bi potrebovala ustrezne

prilagoditve (GIBBS & BURGESS 2024). Poleg tega je napredek omejen s pomanjkanjem oz. prostim dostopom do ročno označenih posnetkov (GIBBS et al. 2021, GIBBS & BURGESS 2024), ki se uporabljajo za strojno učenje ter z nestandardiziranimi postopki v različnih fazah priprave slike (GIBBS & BURGESS 2024). Večina modelov je še vedno omejenih zgolj na zaznavanje struktur, se pravi meritve gostote in števila listnih rež (GIBBS & BURGESS 2024).

Za vrednotenje listnih rež v ekologiji oz. ekofiziologiji gozdnega drevja je obetaven program StoManager1, saj je bil v procesu razvoja validiran na obsežnem številu listavcev (WANG et al. 2024a). StoManager1 je program, ki so ga razvili WANG et al. (2024a, b) in je prosto dostopen v repozitoriju Zenodo na povezavi <https://doi.org/10.5281/zenodo.17856516> (WANG et al. 2023). StoManager1 deluje po načelu segmentacije slike, s pomočjo katere pridobi koordinate robov strukture, te pa zabeleži v pravilnem vrstnem redu v smeri urinega kazalca oz. v njegovi nasprotni smeri. Okrog oblike nariše ustrezno zasukan okvir z najmanjšo možno površino, čemur sledi določitev kota, pod katerim je okvir zasukan. Potem program poišče centroida režnega kompleksa in porusa ter ju uskladi. Porus je v tem primeru definiran kot območje znotraj notranjih sten celic zapiralk (WANG et al. 2023). Iz dolžine večjega okvira izračuna dolžino celic zapiralk, iz dolžine manjšega okvirja dolžino poru-

sa, iz najkrajše dolžine med robom večjega okvirja in robom manjšega okvirja širino celic zapiralk, iz razdalje med obema daljšima robovoma manjšega okvirja pa širino porusa. Program StoManager1 podpira formate slik 'jpg', 'png', 'tif', in 'jpeg' (WANG et al. 2023).

Z našo raziskavo smo želeli ovrednotiti program StoManager1 (WANG et al. 2023, WANG et al. 2024a, b) za uporabo pri avtomatiziranih meritvah listnih rež drevesnih sadik doba in gradna in primerjati pridobljene rezultate z ročnimi meritvami v programu Image J (SCHNEIDER et al. 2012). Vrednotenje programa za avtomatizirane meritve listnih rež je bilo del širše raziskave v okviru temeljnega projekta ARIS J4-4541, kjer smo analizirali funkcionalno-strukturni odziv sadik doba in gradna na identične naravne okoljske razmere v nižinskem hrastovem sestoji v Krakovskem gozdu med obnavljanjem, tj. kritično fazo vzpostavljanja novega gozda. Čeprav je Krakovski gozd tipično rastišče doba, v zadnjih letih tam redno prihaja do propadanja in odmiranja te vrste hrasta (GRIČAR et al. 2013, 2014), zato sta vrednotenje in primerjava uspevanja doba in gradna na tem rastišču ključna za napovedi ravnega potenciala in razširjenosti obeh vrst hrasta v prihodnosti. V projektu smo primerjali višino, priraščanje, anatomske lastnosti lesa in skorje ter lastnosti listnih rež sadik doba in gradna na istem rastišču (GRIČAR et al., v pripravi).

## 2 MATERIAL IN METODE

V začetku decembra 2023 smo v nižinskem Krakovskem gozdu (45°54'N, 15°25'E, 150 m n.m) posadili sto dvo oz. triletnih sadik doba (*Quercus robur* L.) in gradna (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). Od stotih sadik posamezne vrste smo za boljše analize naključno izbrali po deset sadik.

### Vzorčenje listov in priprava preparatov

V juniju 2025, ko so bili listi popolnoma razviti, smo z desetih sadik, pri katerih smo podrobneje spremljali višinsko in debelinsko priraščanje (GRIČAR et al., v pripravi), odvzeli pet listov in jih shranili v 70 % etanolu. Za pripravo odtisa spodnje povrhnjice z listnimi režami (MEISTER & BOLHAR NORDENKAMPF 2001) smo liste vzeli iz etanola in njihovo površino osušili s papirnato brisačo. Na spodnjo povrhnjico smo nanесли tanko plast prozornega laka za nohte na sredinskem delu vsakega lista med glavnimi listnimi žilami. Ko se je lak posušil, smo nanj nalepili prozoren lepilni trak (Scotch) ter trak z odtisom nalepili na objektno steklo. Odtise smo foto-

grafirali pri 200 x in 400 x povečavi mikroskopa Leica DM 4000 (Leica Microsystems) pod presežno svetlobo. Posnetke pod 200 x povečavo smo uporabili za vrednotenje števila listnih rež, posnetke pod 400 x povečavo pa za natančnejše meritve režnega kompleksa.

### Vrednotenje listnih rež ter primerjava rezultatov

Izmed vseh posnetkov smo s pomočjo "rand" funkcije v programu Excel naključno izbrali po deset posnetkov spodnje povrhnjice za obe vrsti hrastov pod 200 x povečavo. Na teh posnetkih smo prešteli število režnih kompleksov z orodjem "Multi-point tool" v programu Image J (SCHNEIDER et al. 2012). Šteli smo samo režne komplekse, ki so bili v celoti na posnetku.

V naslednji fazi smo po enakem postopku naključno izbrali po deset fotografij spodnje povrhnjice doba in gradna pod 400 x povečavo. Na teh posnetkih smo izvedli ročne meritve dolžine celic zapiralk, širine celic zapiralk ter dolžino in širino porusa v programu ImageJ (SCHNEIDER et al. 2012). Širino celic zapiralk smo merili

od zunanjega roba do pričetka odebeljene notranje celične stene, saj smo ocenili, da bi bil ta način najbolj primerljiv s StoManager1.

Iste fotografije smo ovrednotili tudi s programom StoManager1 v različici za namestitev na sistem Windows. Pri posnetkih, narejenih pod 200 x povečavo, ki so bili namenjeni meritvam števila oz. gostote listnih rež, nismo obkljukali možnosti »Segment model using trained YOLOv8-seg-x«, ki se uporablja samo v primeru, če potrebujemo podrobne meritve velikosti struktur režnega kompleksa. Pri obeh meritvah smo uporabili privzeto nastavitve praga zaznavanja (angl. *confidence threshold for detection*), ki znaša 0,25. Pri nižjem pragu zaznavanja program zazna več listnih rež, pri višjem pragu zaznavanja pa manj rež, saj se izločijo zaznave z manjšo stopnjo zaupanja (WANG et al. 2024b).

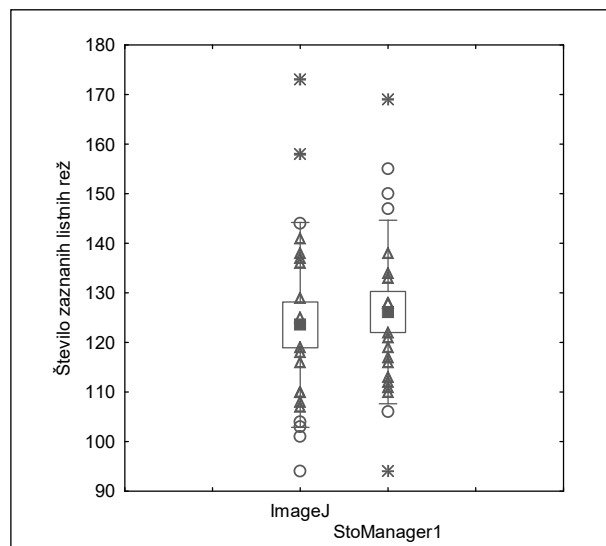
## Statistika

Statistične analize smo opravili v programu Statistica (1984-2023, Cloud Software Group, Inc.). Najprej smo preverili, ali med vrstama obstajajo statistično značilne razlike v številu rež pri obeh metodah. Za to smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA). Enakost varianc smo preverili z Levenovim testom ( $p > 0.05$ ). Normalnost porazdelitve razlik med obema metodama meritve smo testirali s Shapiro-Wilkovim testom. Naredili smo t-test za odvisne vzorce, s katerim smo preverili, ali so rezultati obeh metod primerljivi. Za natančnejše ovrednotenje, ali lahko ročno štetje oz. meritve režnega kompleksa nadomestimo z avtomatiziranim zaznavanjem, pa smo naredili Bland-Altmanovo analizo (BLAND & ALTMAN 1986).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### Število zaznanih režnih kompleksov

Med vrstama ni bilo statistično značilnih razlik v številu zaznanih režnih kompleksov, ne z ročnim štetjem ( $F = 0,4815$ ,  $p = 0,496616$ ) in ne s programom StoManager1 ( $F = 0,7247$ ,  $p = 0,405794$ ), zato smo za primerjavo med obema metodama uporabili cel podatkovni niz. Shapiro-Wilkov test je pokazal, da vrednosti razlik med obema metodama statistično značilno ne odstopajo od normalne porazdelitve ( $W = 0,97015$ ,  $p = 0,75801$ ). T-test za odvisne vzorce je pokazal, da med obema metodama meritev števila režnih kompleksov ni bilo statistično značilnih razlik ( $t = -1,22537$ ,  $p = 0,235411$ ) (Slika 1).



Bland-Altmanova analiza (Slika 2) je pokazala povprečno razliko med obema metodama 2,60 režnih kompleksov v korist StoManager1, kar kaže na manjše sistemsko odstopanje med obema metodama. Večina vrednosti razlik med obema metodama (19 od 20 vrednosti) se je nahajala med obema mejama strinjanja (angl. *limits of agreement*), vrednosti pa so bile enakomerno razpršene.

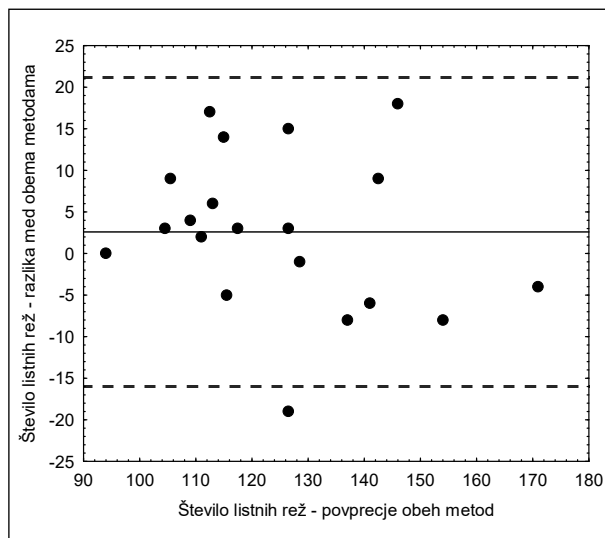
StoManager1 je v povprečju zaznal večje število celih režnih kompleksov na posnetkih ( $126 \pm 19$ ) v primerjavi z ročnim štetjem v ImageJ ( $124 \pm 21$ ), Slika 1. Pregled posnetkov z označenimi režnimi kompleksi v StoManager1 je pokazal, da StoManager1 kot režni kom-

Slika 1: Primerjava ročnih meritev števila režnih kompleksov v programu ImageJ z avtomatiziranimi meritvami v StoManager1 pri dobu in gradnu. Statistično značilnih razlik med obema metodama ni bilo ( $t$ -test,  $p > 0,05$ ). Povprečje je prikazano s polnim kvadratom, okvir prikazuje standardno napako, ročaji standardno deviacijo, krogi pa osamelce, križci pa ekstreme. Posamezne meritve so prikazane s trikotniki.

Figure 1: Comparison of manual measurements of stomatal number in ImageJ with automated measurements in StoManager1 for pedunculate and sessile oak. No statistically significant differences were found between the two methods ( $t$ -test,  $p > 0.05$ ). The mean is shown by a filled square, the box represents the standard error, the whiskers indicate the standard deviation, circles denote outliers, and crosses indicate extreme values. Individual measurements are shown as triangles.

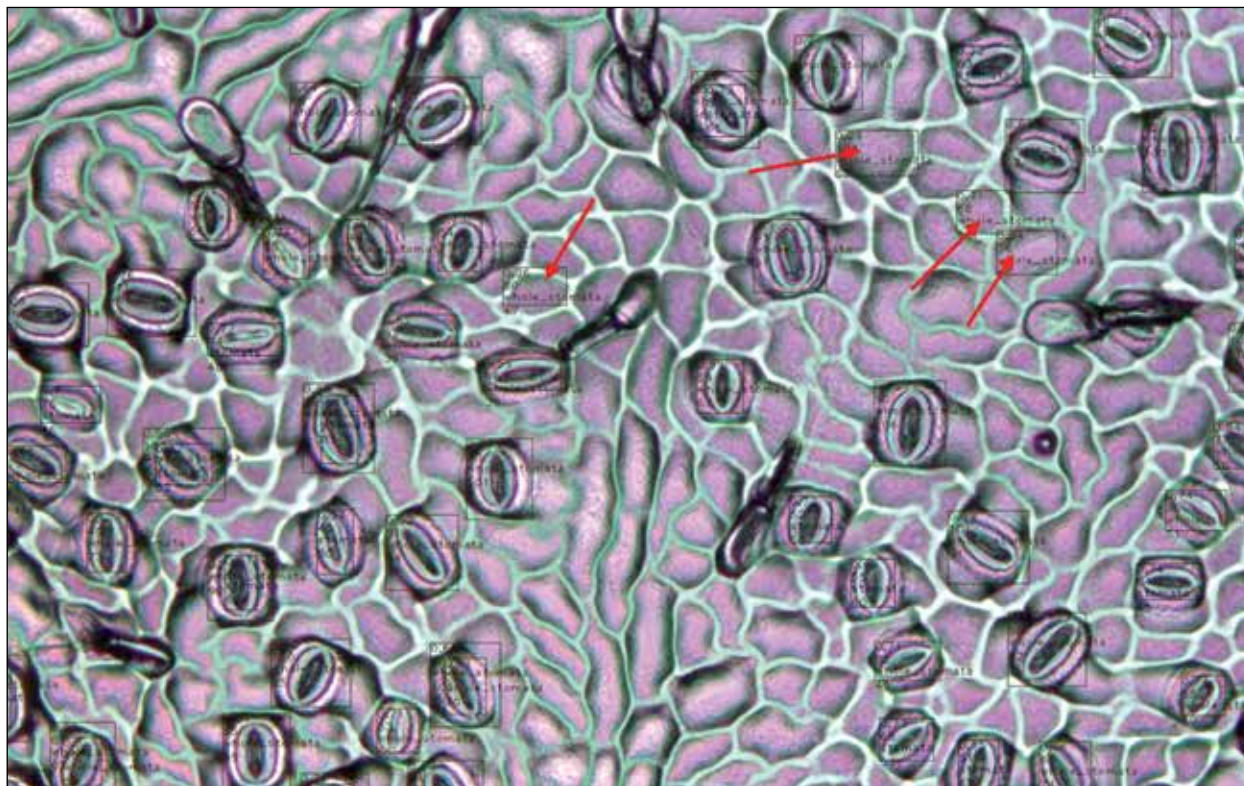
pleks zana tudi nekatere celice povrhnjice, ki so ovalne oblike, na robovih posnetkov pa označi več režnih kompleksov kot celih, čeprav so na posnetku samo deloma,

kar razloži manjše sistemsko odstopanje te metode od ročnih meritev v programu ImageJ (Slika 3). Posamezni trihomi niso bili moteči za avtomatizirano analizo.



Slika 2: Bland-Altmanov diagram za ovrednotenje primerljivosti metod zaznavanja režnih kompleksov pri dobu in gradnu. Sredinska referenčna črta predstavlja povprečje razlik med obema metodama, spodnja in zgornja črtkana črta pa predstavljata meji strinjanja (angl. limits of agreement) in sta izračunani kot povprečje razlik med obema metodama  $\pm 1,96 \times SD$ .

Figure 2: Bland-Altman plot for evaluating the agreement between methods for stomatal detection in pedunculate and sessile oak. The central reference line represents the mean difference between the two methods, while the lower and upper dashed lines indicate the limits of agreement, calculated as the mean difference  $\pm 1.96 \times SD$ .



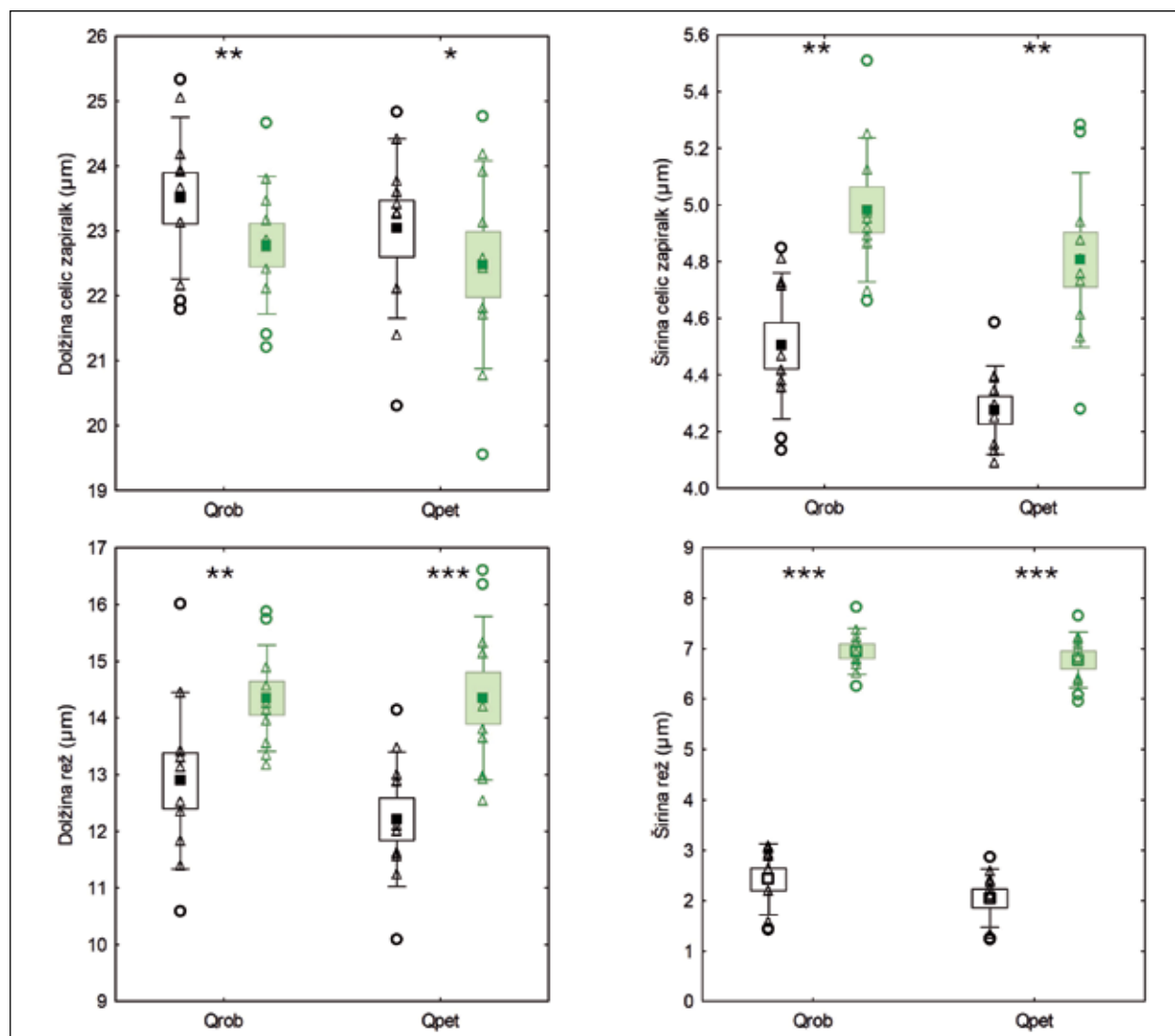
Slika 3: Detajl iz posnetka odtisa povrhnjice hrasta z označenimi režnimi kompleksi pri dobu v programu StoManager1 pod 200 x povečavo mikroskopa. Napačno identificirane celice so označene z rdečo puščico.

Figure 3: Detail from an image of an epidermal imprint of pedunculate oak under 200 x magnification with stomata marked in the StoManager1 software. Incorrectly identified cells are indicated by a red arrow.

Glede na povprečno število prešteti reznih kompleksov v programu ImageJ predstavlja navedeno odstopanje v programu StoManager1 zgolj 2,1 % napako, kar pomeni, da lahko ročno štetje pri dobu in gradnu nadomestimo z avtomatiziranim zaznavanjem v programu StoManager1. To manjše odstopanje bi najverjetneje lahko odpravili s povišanjem nastavitve praga zaznavanja, ki je bil v našem primeru nastavljen na privzeto vrednost 0,25.

## Velikost celic zapiralk in porusa

Najprej smo preverili, ali med vrstama obstajajo statistično značilne razlike v dolžini in širini celic zapiralk ter v dolžini in širini porusa pri obeh metodah. ANOVA je pokazala statistično značilno razliko med vrstama samo za širino celic zapiralk merjeno v Image J ( $F = 5,684, p = 0,0283$ ). Zaradi tega smo vse spremenljiv-



Slika 4: Primerjava ročnih meritev celic zapiralk in porusa v programu ImageJ (črna barva) z avtomatiziranimi meritvami v StoManager1 (zelena barva) pri dobu in gradnu. Statistično značilne razlike (t-test za odvisne vzorce) med obema metodama so označene z \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ . Povprečje je prikazano s polnim kvadratom, okvir prikazuje standardno napako, ročaji standardno deviacijo, krogi pa osamelce. Posamezne meritve so prikazane s trikotniki.

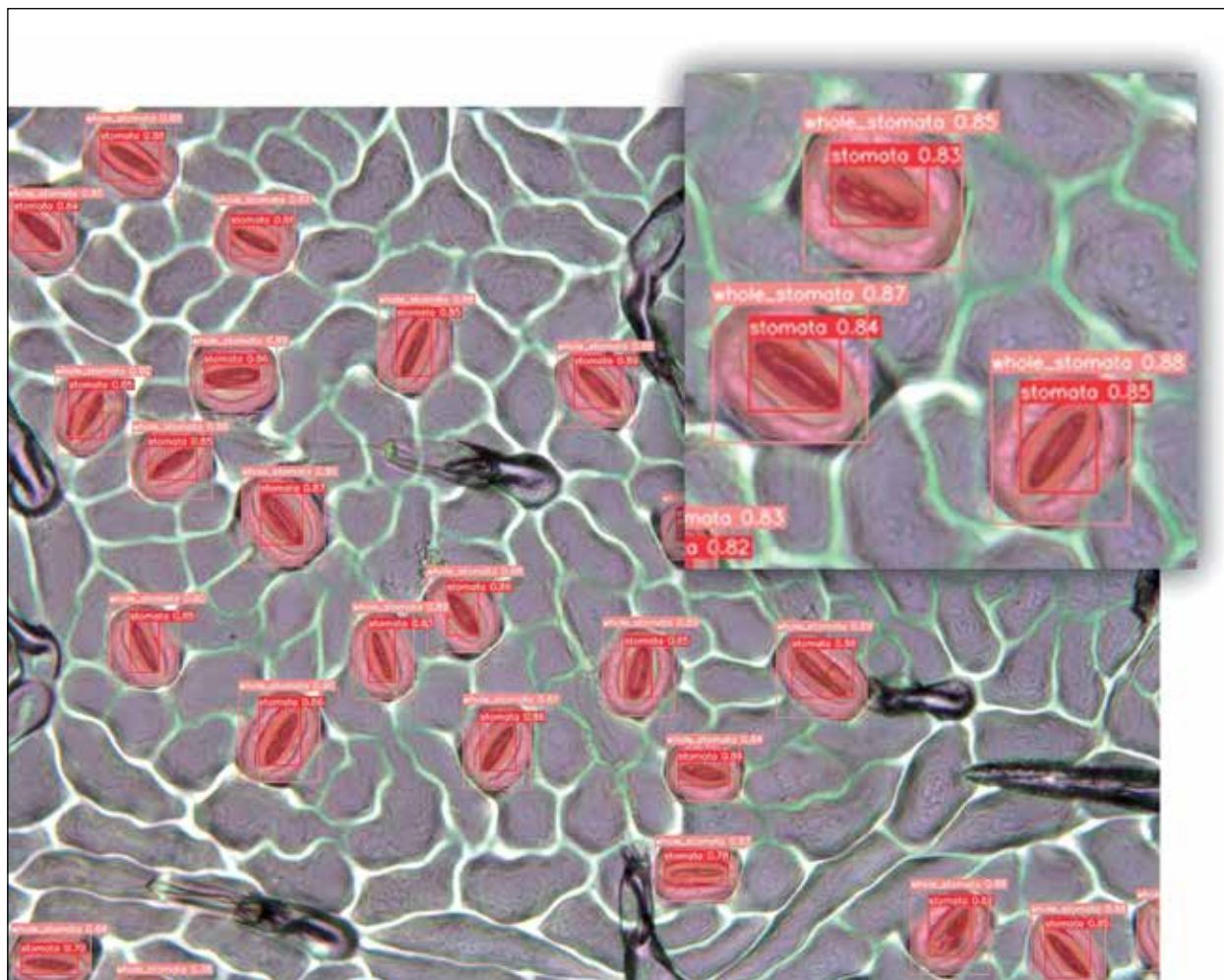
Figure 4: Comparison of manual measurements of guard cells and stomatal pore in the ImageJ program (black) with automated measurements in StoManager1 (green) for pedunculate and sessile oak. Statistically significant differences (paired t-test) between the two methods are indicated as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . The mean is shown by a filled square, the box represents the standard error, the whiskers indicate the standard deviation, and circles denote outliers. Individual measurements are shown as triangles.

ke za nadaljnje analize ohranili ločene po vrstah. T-testi za odvisne vzorce so pokazali, da so rezultati obeh metod statistično značilno različni za vse spremenljivke in obe vrsti (Slika 4).

Največji razkorak med rezultati obeh meritev smo ugotovili za širino porusa (Slika 4), kar je bilo povezano s tem, da je program StoManager1 v širino porusa vštél tudi notranje odebeljene stene celic zapiralk (Slika 5). Na to težavo pri izračunu površine porusa opozarjajo tudi GIBBS et al. (2021).

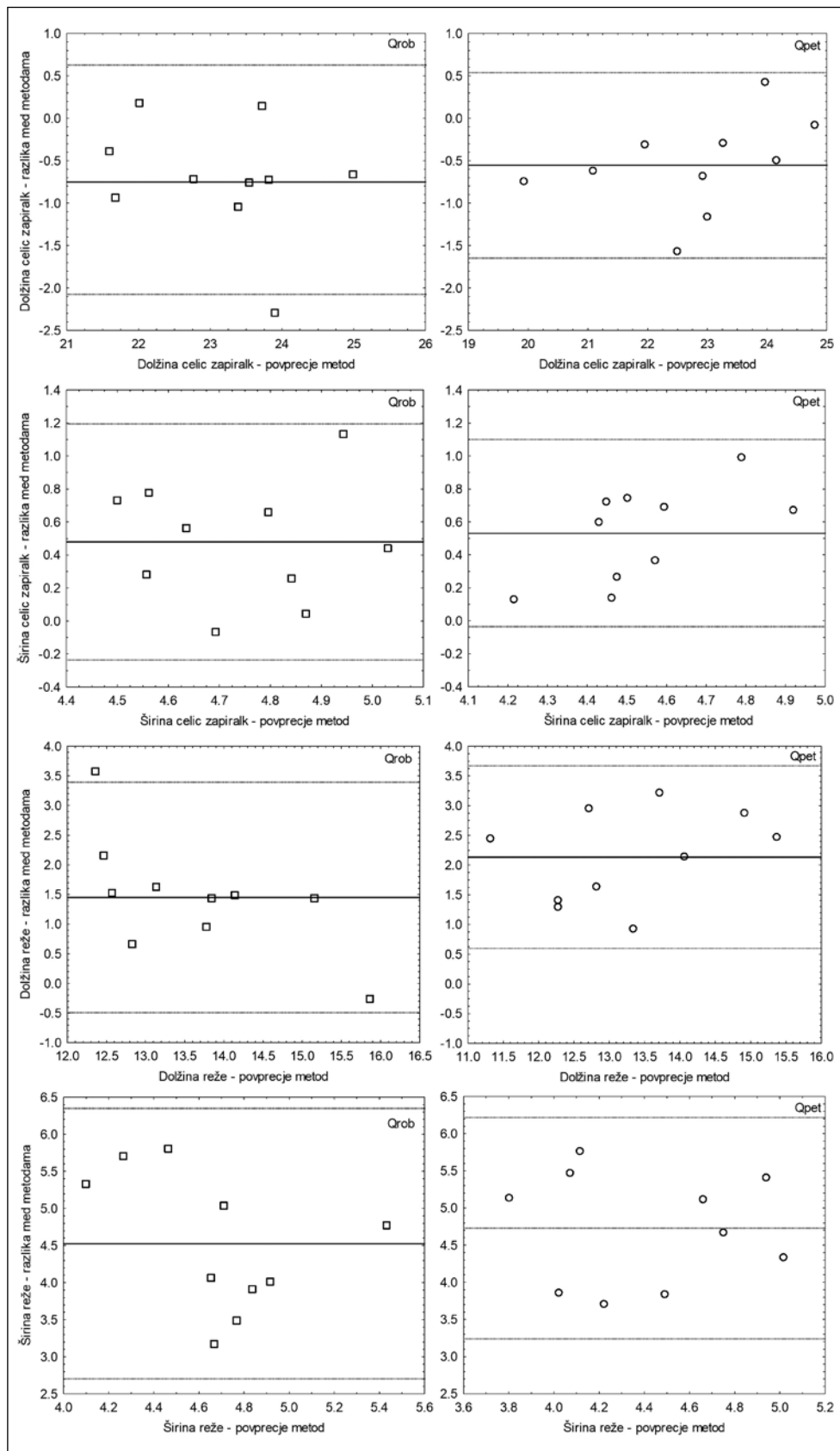
Čeprav so bile absolutne vrednosti med obema metodama različne, so avtomatizirane meritve večinoma ohranjale razmerja med vrstama, pri čemer pa je potrebno poudariti, da je avtomatizirana metoda zmanjševala razlike med vrstama (Slika 4). Iz Slike 4 je razvidno tudi,

zakaj smo z ročnimi meritvami zasledili statistično značilno razliko v širini celic zapiralk, z avtomatiziranimi meritvami pa ne. Raztros avtomatiziranih meritev je bil v primeru gradna večji, kar je verjetno povezano s tem, da je širina celic zapiralk relativno majhna. V takih primerih lahko pride do tega, da je zaznavanje robov struktur manj natančno, že majhne razlike v segmentaciji pa privedejo do večjih napak. To nakazuje na to, da bi lahko bila avtomatizirana metoda manj natančna za manjše strukture. Bland-Altmanov diagram (Slika 6) je v tem primeru pokazal, da so bile majhne strukture z avtomatizirano metodo nekoliko podcenjene, večje pa nekoliko precenjene. Ta trend se je pri gradnu pokazal tudi pri meritvah dolžine celic zapiralk (Slika 6), kjer je bil razpon izmerjenih vrednosti večji kot pri dobu, kar nakazuje na



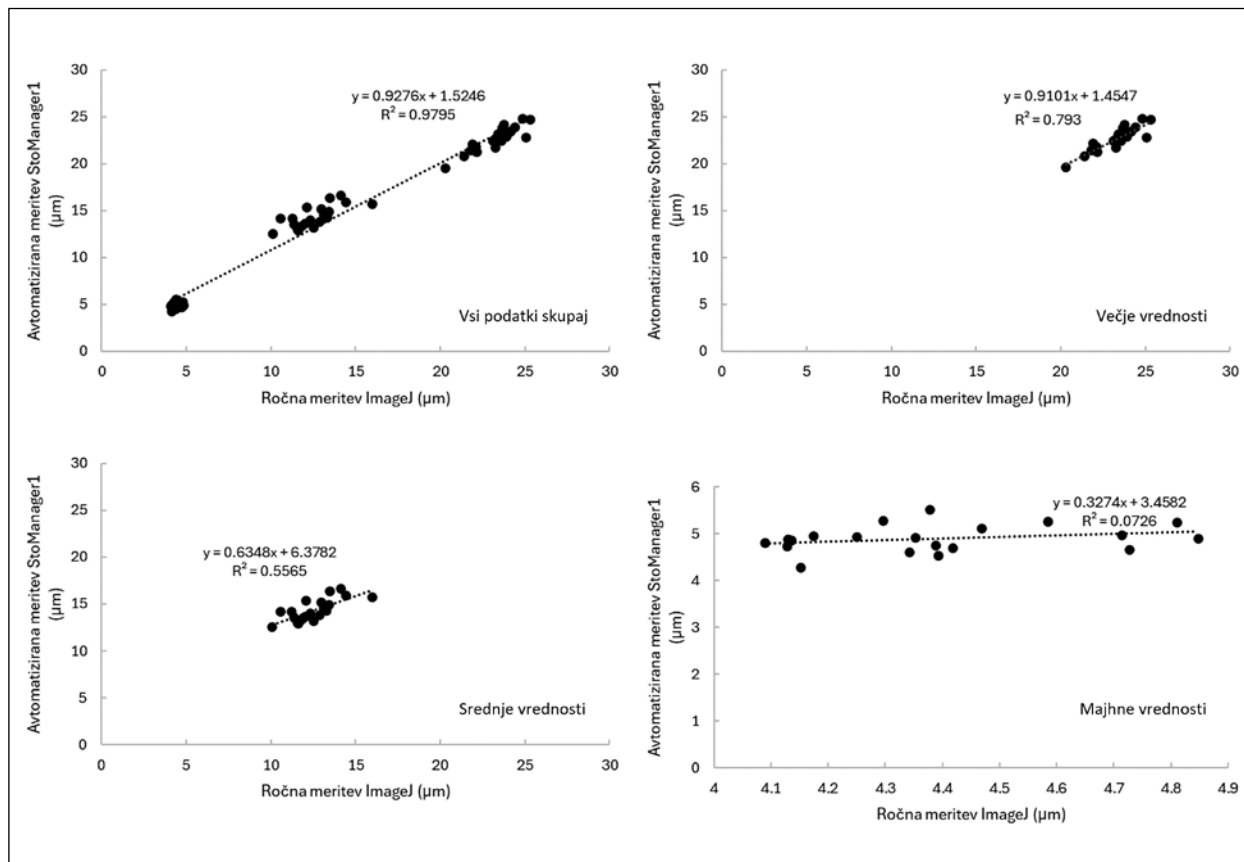
Slika 5: Primer posnetka odtisa povrhnjice gradna z označenimi porusi in celicami zapiralkami v programu StoManager1 pod 400 x povečavo mikroskopa. Podrobnejši izsek iz slike prikazuje način segmentacije, ki ga uporablja StoManager1.

Figure 5: Example image of an epidermal imprint of sessile oak with stomatal pores and guard cells marked in the StoManager1 program at 400× microscope magnification. A detailed inset from the image shows the segmentation method used by StoManager1.



Slika 6: Bland-Altmanovi diagrami za ovrednotenje primerljivosti metod merjenja dimenzij režnega kompleksa pri dobu in gradnu. Sredinska referenčna črta predstavlja povprečje razlik med obema metodama, spodnja in zgornja črtkana črta pa predstavljata meji strinjanja (angl. limits of agreement) in sta izračunani kot povprečje razlik med obema metodama  $\pm 1,96 \times SD$ .

Figure 6: Bland-Altman plots for evaluating the agreement between methods for stomatal measurements in pedunculate and sessile oak. The central reference line represents the mean difference between the two methods, while the lower and upper dashed lines indicate the limits of agreement, calculated as the mean difference  $\pm 1.96 \times SD$ .



Slika 7: Primerjava med ročnimi meritvami v ImageJ in avtomatiziranimi meritvami v StoManager1. Za prikaz so bili uporabljeni podatki za obe vrsti hrasta skupaj, izločili pa smo podatke, za katere smo ugotovili, da merjena struktura ni primerljiva (širina porusa izmerjena z avtomatizirano meritvijo zajema precej večje območje – med obema celicama zapiralkama – kot pa ročna meritev).

Figure 7: Comparison between manual measurements in ImageJ and automated measurements in StoManager1. Data from both oak species were combined for the analysis, while measurements in which the evaluated structures were not comparable were excluded (i.e., the stomatal pore width measured automatically covered a substantially larger area—between the two guard cells—than the manual measurement).

to, da bi lahko bila ta merilna napaka prisotna na celotnem merilnem območju, vendar pa se razkrije le, kadar zajamemo zadostno variabilnost v velikosti struktur.

Da bi lažje ugotovili, ali je natančnost zaznavanja struktur z avtomatizirano metodo enaka po celotnem merilnem razponu, smo naredili regresijsko analizo (Slika 7) med podatki, pridobljenimi z ročnimi meritvami in podatki, pridobljenimi z avtomatiziranimi meritvami za različne dimenzijske parametre. Regresijska premica, ki je upoštevala vse podatke za meritve istih struktur, je pokazala dokaj dobro ujemanje med ročnimi in avtomatiziranimi meritvami. Pri ločeni obravnavi posameznih merilnih območij se je izkazalo, da je bilo ujemanje med obema metodama v velikostnem razredu struktur 20–25  $\mu\text{m}$  razmeroma dobro, vendar so se pri večjih vrednostih znotraj tega območja pojavljale večje absolutne in

relativne napake. V velikostnem razredu 10–15  $\mu\text{m}$  sta metodi močno odstopali od razmerja 1:1, pri majhnih strukturah pa korelacije med ročnimi meritvami in meritvami, pridobljenimi z avtomatizirano metodo, sploh ni bilo več (Slika 7). To je lahko posledica tako razlik v zaznavanju robov majhnih struktur pri avtomatizirani metodi kot tudi dejstva, da je pri ročnih meritvah teh struktur težko objektivno določiti skrajni točki, med katerima želimo izvesti meritev zaradi omejitev v ločljivosti slike.

Vsi ti rezultati nakazujejo, da je bila merilna napaka pri avtomatizirani metodi odvisna od velikosti merjene strukture. Zaradi tega ocenjujemo, da je metoda primerna nadomestitev ročnih meritev pri večjih strukturah (20–25  $\mu\text{m}$ , kar je razpon dolžine celic zapiralk pri obeh vrstah hrastov), kjer lahko reproducira trende, ki jih opazimo s pomočjo ročnih meritev. Ker so naše meritve zajele samo

območje do 25  $\mu\text{m}$ , bi bilo potrebno za večje strukture uje-manje med obema načinoma meritev dodatno preveriti.

Iz naših rezultatov lahko povzamemo, da je StoManager1 ustrezna nadomestitev ročnih meritev števila oz. gostote režnih kompleksov ter večjih struktur znotraj režnega kompleksa, kot je npr. dolžina celic zapiralk za izbrane drevesne vrste. Kot opozarjajo avtorji tega orodja, ima StoManager1 omejitve in potencialne vire napak, zato priporočajo njegovo testiranje in primerjavo z roč-

nimi meritvami (WANG et al. 2024). Poleg tega lahko viri napak izhajajo tudi iz postopkov zajema posnetkov, npr. različnih jakosti osvetlitve, neostrih območij na sliki ter prisotnosti artefaktov (GIBBS et al. 2021, WANG et al. 2024, GIBBS & BURGESS 2024). Četudi modeli na slikah natančno zaznajo in izmerijo listne reže, je potrebno rezultate biološko ovrednotiti ter preveriti, ali dejansko odražajo fiziološko delovanje rastline (GIBBS & BURGESS 2024).

## 4 SUMMARY

Analyses of stomatal traits, such as density and size, are essential for understanding plant physiology, their adaptability to environmental conditions, and their responses to climate change. Such analyses are predominantly based on microscopy techniques and their derivatives, which can be very time consuming. The aim of this study was to determine whether manual measurements of stomata in tree seedlings can be replaced by automated measurements, which would substantially increase the number of samples that can be analysed due to time savings. Leaves of pedunculate and sessile oaks growing at the same site were preserved in 70 % ethanol. Imprints of lower epidermis were prepared by nail polish method and imaged under 200 x and 400 x magnification of the microscope. Ten randomly selected micrographs per each species were used to analyse the number of stomata as well as the length and width of guard cells and stomata, using both manual measurements in ImageJ (Schneider et al. 2012) and automated measurements in StoManager1 (WANG ET AL. 2023, WANG et al. 2024a, b). The results were statistically evaluated by paired t-tests and Bland-Altman analysis, a statistical method to compare two quantitative measurement methods. No statistically significant differences between the two methods were found for the measurements of stomatal number. Bland-Altman analysis showed good agreement between manual and automated measurements. Although the automated method slightly overestimated the number of stomata, the error

was small (2.1 %) and could be possibly reduced by decreasing of sensitivity of the automated method. For size measurements, statistically significant differences were observed between the two methods. Mean guard cell lengths were lower when measured using the automated method compared to manual measurements, whereas guard cell widths, as well as stomatal widths and lengths, were higher with the automated method. Bland-Altman analysis revealed deviations between the methods at larger size ranges of the measured structures. Regression analysis indicated that agreement between manual and automated measurements was reasonably reliable within the size range of 20–25  $\mu\text{m}$  (larger structures were not measured), but decreased with decreasing structure size, most likely due to image segmentation in the automated method and the associated less precise edge detection. In small structures, even minor segmentation differences can lead to larger errors. On the other hand, manual measurements in microscopy images can also become increasingly subjective as the size of structures decreases, due to the difficulty of consistently identifying precise boundaries at or near the resolution limit. Our results thus indicate that StoManager1 is a suitable alternative to manual measurements of stomatal density and larger stomatal traits in the selected tree species, although its outputs should still be validated against manual measurements and biological function due to potential methodological and image-acquisition related sources of error.

## ZAHVALA - ACKNOWLEDGEMENTS

Delo je financirala Agencija RS za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost (ARIS), v okviru raziskovalnih programov št. P4-0107 in P4-0430 ter projekta J4-4541. Avtorici se zahvaljujeta Nataliji Dovč, Saši Ogorevc in Gregorju Skobernetu za pomoč

na terenu ter Saši Ogorevc za pripravo preparatov v Laboratoriju za lesno anatomijo na Gozdarskem inštitutu Slovenije. Hvala tudi recenzentoma za konstruktivne pripombe, ki so prispevale k izboljšanju prispevka.

## LITERATURA - REFERENCES

- BATIČ, F., B. LEVAČIČ, A. MARTINČIČ, A. CIMERMAN, B. TURK, N. GOGALA, A. SELIŠKAR, A. ŠERCELJ, & G. KOSI, 2011: *Botanični terminološki slovar*. Založba ZRC, ZRC SAZU, Ljubljana. 10.3986/978-961-254-463-8.
- BERTOLINO, L.T., R.S. CAINE & J.E. GRAY, 2019: *Impact of Stomatal Density and Morphology on Water-Use Efficiency in a Changing World*. *Frontiers in Plant Science* Volume 10 - 2019: 10.3389/fpls.2019.00225
- BLAND, J.M. & D.G. ALTMAN, 1986: *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. *Lancet* 1: 307-310.
- EISELE, J.F., F. FÄSSLER, P.F. BÜRCEL & C. CHABAN, 2016: *A Rapid and Simple Method for Microscopy-Based Stomata Analyses*. *PLoS ONE* 11: e0164576. 10.1371/journal.pone.0164576
- FETTER, K.C., S. EBERHARDT, R.S. BARCLAY, S. WING & S.R. KELLER, 2019: *StomataCounter: a neural network for automatic stomata identification and counting*. *New Phytologist* 223: 1671-1681. <https://doi.org/10.1111/nph.15892>
- GIBBS J.A. & A.J. BURGESS, 2024. *Application of deep learning for the analysis of stomata: a review of current methods and future directions*. *Journal of Experimental Botany* 75(21): 6704–6718. 10.1093/jxb/erae207
- GIBBS, J.A., L. MCAUSLAND, C.A. ROBLES-ZAZUETA, E.H. MURCHIE & A.J. BURGESS, 2021: *A Deep Learning Method for Fully Automatic Stomatal Morphometry and Maximal Conductance Estimation*. *Frontiers in Plant Science* 12: 780180. 10.3389/fpls.2021.780180
- GONG, L., Y. HAZZAZI, T. ALFAIFI, N.M. ALABDALLAH, T.S. ALNUSAIRE, F.A. ALTIHANI, F. DHAWI, B.M. ALHARBI & M.M. HASAN, 2025: *Root-to-Shoot Hormonal and Hydraulic Signals in Stomatal Regulation During Drought*. *Journal of Plant Growth Regulation* 44: 4917-4930. 10.1007/s00344-025-11733-4
- GRIČAR, J., M. DE LUIS, P. HAFNER & T. LEVANIČ, 2013: *Anatomical characteristics and hydrologic signals in tree-rings of oaks (*Quercus robur* L.)*. *Trees* 27: 1669-1680. 10.1007/s00468-013-0914-9
- GRIČAR, J., Š. JAGODIČ, B. ŠEFC, J. TRAJKOVIĆ & K. ELER, 2014: *Can the structure of dormant cambium and the widths of phloem and xylem increments be used as indicators for tree vitality?* *European Journal of Forest Research* 133: 551-562. 10.1007/s10342-014-0784-8
- HAWORTH, M., G. MARINO, F. LORETO & M. CENTRITTO, 2021: *Integrating stomatal physiology and morphology: evolution of stomatal control and development of future crops*. *Oecologia* 197: 867-883. 10.1007/s00442-021-04857-3
- HETHERINGTON, A.M. & F.I. WOODWARD, 2003: *The role of stomata in sensing and driving environmental change*. *Nature* 424: 901-908. 10.1038/nature01843
- IBATA, H., A. NAGATANI & N. MOCHIZUKI, 2013: *Perforated-tape Epidermal Detachment (PED): A simple and rapid method for isolating epidermal peels from specific areas of *Arabidopsis* leaves*. *Plant Biotechnology* 30: 497-502. 10.5511/plantbiotechnology.13.0903b
- JAYAKODY, H., S. LIU, M. WHITTY & P. PETRIE, 2017: *Microscope image based fully automated stomata detection and pore measurement method for grapevines*. *Plant Methods* 13: 94. 10.1186/s13007-017-0244-9
- JEZEK, M. & M.R. BLATT, 2017: *The Membrane Transport System of the Guard Cell and Its Integration for Stomatal Dynamics* *Plant Physiology* 174: 487-519. 10.1104/pp.16.01949
- JONES, H.G. & R.A. SUTHERLAND, 1991: *Stomatal control of xylem embolism*. *Plant, Cell & Environment* 14: 607-612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01532.x>
- LAWSON, T., 2009: *Guard cell photosynthesis and stomatal function*. *New Phytologist* 181: 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02685.x>
- LIANG, X., X. XU, Z. WANG, L. HE, K. ZHANG, B. LIANG, J. YE, J. SHI, X. WU, M. DAI & W. YANG, 2022: *StomataScorer: a portable and high-throughput leaf stomata trait scorer combined with deep learning and an improved CV model*. *Plant Biotechnology Journal* 20: 577-591. <https://doi.org/10.1111/pbi.13741>
- MATTHAEUS, W.J., J. SCHMIDT, J.D. WHITE & B. ZECHMANN, 2020: *Novel perspectives on stomatal impressions: Rapid and non-invasive surface characterization of plant leaves by scanning electron microscopy*. *PLoS ONE* 15: e0238589. 10.1371/journal.pone.0238589
- MEISTER, M.H. & H.R. BOLHÄR NORDENKAMPF, 2001: *Stomata Imprints: A New and Quick Method to Count Stomata and Epidermis Cells*. In: Reigosa Roger, M.J. (eds) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer, Dordrecht. 10.1007/0-306-48057-3\_17
- MELOTTO, M., W. UNDERWOOD, J. KOCZAN, K. NOMURA & S.Y. HE, 2006: *Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion*. *Cell* 126: 969-980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>
- PATHOUMTHONG, P., Z. ZHANG, S.J. ROY & A. EL HABTI, 2023: *Rapid non-destructive method to phenotype stomatal traits*. *Plant Methods* 19: 36. 10.1186/s13007-023-01016-y

- SCHNEIDER, C.A., W.S. RASBAND & K.W. ELICEIRI, 2012: *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods* 9: 671-675. 10.1038/nmeth.2089
- SULTANA, S.N., H. PARK, S.H. CHOI, H. JO, J.T. SONG, J.-D. LEE & Y.J. KANG, 2021: *Optimizing the Experimental Method for Stomata-Profiling Automation of Soybean Leaves Based on Deep Learning*. *Plants* 10: 2714.
- THAI, T.T., S. MANSOOR, H.T. VAN, V.G. VU, E.M.B.M. KARUNATHILAKE, A.T. LE, F.S. BALOCH, Y.S. CHUNG & J. KIM, 2025: *Advanced phenotyping features utilizing deep learning techniques for automated analysis of stomatal guard cell orientation*. *Scientific Reports* 15: 38578. 10.1038/s41598-025-22412-5
- URBAN, J., M.W. INGWERS, M.A. MCGUIRE & R.O. TESKEY, 2017: *Increase in leaf temperature opens stomata and decouples net photosynthesis from stomatal conductance in Pinus taeda and Populus deltoides x nigra*. *Journal of Experimental Botany* 68: 1757-1767. 10.1093/jxb/erx052
- WANG, J., H.J. RENNINGER & Q. MA, 2024a: *Labeled temperate hardwood tree stomatal image datasets from seven taxa of Populus and 17 hardwood species*. *Scientific Data* 11: 1. 10.1038/s41597-023-02657-3
- WANG, J., H.J. RENNINGER, Q. MA & S. JIN, 2024b: *Measuring stomatal and guard cell metrics for plant physiology and growth using StoManager1*. *Plant Physiology* 195: 378-394. 10.1093/plphys/kiae049
- WANG, J., H. RENNINGER, & Q. MA (2023). *StoManager1: Automated, High-throughput Tool to Measure Leaf Stomata Using Convolutional Neural Networks (v.1.0.0)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7686022>
- WU, S. & B. ZHAO, 2017: *Using Clear Nail Polish to Make Arabidopsis Epidermal Impressions for Measuring the Change of Stomatal Aperture Size in Immune Response*. *Methods Mol Biol* 1578: 243-248. 10.1007/978-1-4939-6859-6\_20
- YAN, W., Y. ZHONG & Z. SHANGGUAN, 2017: *Contrasting responses of leaf stomatal characteristics to climate change: a considerable challenge to predict carbon and water cycles*. *Global Change Biology* 23: 3781-3793. <https://doi.org/10.1111/gcb.13654>
- YANG, Z., Y. LIAO, Z. CHEN, Z. LIN, W. HUANG, Y. LIU, Y. LIU, Y. FAN, J. XU, L. XU & J. MU, 2025: *StomaYOLO: A Lightweight Maize Phenotypic Stomatal Cell Detector Based on Multi-Task Training*. *Plants* 14: 2070.
- ZHANG, F., F. REN, J. LI & X. ZHANG, 2022: *Automatic stomata recognition and measurement based on improved YOLO deep learning model and entropy rate superpixel algorithm*. *Ecological Informatics* 68: 101521. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2021.101521>