

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

ГНАТИШИН АНДРІЙ ОЛЕГОВИЧ

Допускається до захисту:

завідувач кафедри біофізики і фізіології

кандидат хім. наук, доцент

_____ **Ольга ДОЦЕНКО**

« _____ » _____ 20__ р.

**ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЩІЛЬНОСТІ
ПРОДИХІВ У ЛИСТКАХ CARPINUS BETULUS L. ІЗ
ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДІВ ГЛИБОКОГО НАВЧАННЯ**

Спеціальність 101 Екологія

Кваліфікаційна (бакалаврська) робота

Науковий керівник:

Артем МІЩЕНКО,

кандидат біологічних наук,

старший викладач кафедри

біофізики і фізіології

Оцінка: _____ / _____ /

Голова ЕК: _____

Вінниця 2025

ЗМІСТ

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ	1
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1.Анатомо-фізіологічні особливості продихів листка	6
1.2.Продихові характеристики як індикатори екологічного стану	7
1.3.Вплив світла, вологи, температури і забруднення на продихову щільність	8
1.4.Методи мікроскопування та ручного аналізу продихів	9
1.5.Методи глибокого навчання у розпізнаванні об'єктів (YOLO, RetinaNet)	10
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	11
2.1. Збір зразків листя граба	11
2.2. Анотація даних за допомогою платформи Supervisely	14
2.3. Архітектура нейромережі для виявлення продихів	16
2.4. Навчання нейромережі	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	20
3.1. Збір зразків листя граба	20
3.2. Анотація продихів за допомогою платформи Supervisely	21
3.3. Навчання нейромережі	25
3.4. Виявлення продихів на нових мікрознімках	28
3.5. Покращення точності моделі.	30
ВИСНОВКИ	32
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	34

АНОТАЦІЯ

Гнатишин А. О. Виявлення та кількісне визначення щільності продихів у листках *Carpinus betulus* L. із застосуванням методів глибокого навчання. Спеціальність 101 «Екологія», Освітня програма «Екологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2025.

У бакалаврській роботі досліджується щільність продихів у листках *Carpinus betulus* L. з використанням методів глибокого навчання. Описується процес збору зразків листя, створення мікроскопічних зображень, анотації даних та навчання згорткової нейронної мережі RetinaNet з основою YOLOv8 для автоматичного виявлення продихів. Проводиться статистичний аналіз отриманих результатів для визначення щільності продихів.

Ключові слова: продихи, листки, *Carpinus betulus* L., щільність продихів, глибоке навчання, згорткові нейронні мережі, RetinaNet, YOLOv8.

37 с., 1 табл., 11 рис., 15 джерел.

ABSTRACT

Hnatyshyn A. O. Detection and Quantification of Stomatal Density in *Carpinus betulus* Leaves Using Deep Learning Techniques. Specialty 101 "Ecology", Educational program "Ecology". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2025.

This bachelor's thesis investigates the density of stomata in the leaves of *Carpinus betulus* L. using deep learning methods. The process includes collecting leaf samples, creating microscopic images, annotating the data, and training the RetinaNet convolutional neural network with a YOLOv8 backbone for automatic stomata detection. Statistical analysis of the obtained results is performed to determine the stomata density.

Keywords: stomata, leaves, *Carpinus betulus* L., stomata density, deep learning, convolutional neural networks, RetinaNet, YOLOv8.

37 p., 1 tabl., 11 Fig., 15 Bibliography items.

ВСТУП

Дослідження щільності та розподілу продихів на листках рослин є важливим аспектом екологічних та фізіологічних досліджень, оскільки продихи відіграють ключову роль у регуляції газообміну та транспірації, які залежать від екологічних факторів, таких як забруднення та кліматичні зміни. Автоматизоване визначення кількості продихів за допомогою сучасних методів обробки даних, зокрема глибокого навчання, забезпечує точний та ефективний аналіз великих наборів мікроскопічних зображень, долаючи обмеження ручного підрахунку, який є трудомістким і схильним до помилок. Останні дослідження підкреслюють важливість щільності продихів як біоіндикатора екологічного стресу. Щільність продихів у різних видів рослин корелює з рівнем атмосферного CO₂, що дає змогу оцінити реакцію рослин на зміни клімату. Аналогічно, Бірлінг Д. Дж. та ін. [1] встановили, що забруднення повітря, зокрема від викидів транспорту, може змінювати щільність і розподіл продихів, впливаючи на здоров'я рослин та динаміку екосистем [1]. Ці результати підкреслюють необхідність розробки надійних автоматизованих методів для кількісного аналізу продихів у екологічних дослідженнях.

Існуючі підходи до виявлення продихів включають традиційні методи обробки зображень, такі як порогова сегментація та виявлення контурів, а також методи на основі машинного навчання. Наприклад, Алмейда А. та ін. [2] використали згорткові нейронні мережі (CNN) для виявлення продихів на мікроскопічних зображеннях, досягнувши високої точності, але потребуючи великих анотованих наборів даних [2]. Однак застосування сучасних архітектур виявлення об'єктів, таких як RetinaNet з остовом YOLOv8, демонструє перспективи покращення точності та стійкості, особливо для складних біологічних зображень. Інтеграція таких моделей з платформами, як Supervisely, для анотації даних додатково спрощує процес, дозволяючи дослідникам ефективно створювати високоякісні набори даних.

Мотивація цього дослідження полягає в необхідності розробки надійного та автоматизованого методу для кількісного визначення щільності продихів у контексті моніторингу екологічних умов. Використовуючи глибоке навчання, це дослідження спрямоване на створення масштабованого рішення для аналізу розподілу продихів за різних екологічних умов, з фокусом на грабі звичайному (*Carpinus betulus*), виду, широко поширеному в європейських лісах і чутливому до змін навколишнього середовища.

Мета: Розробити та застосувати неймережу для автоматичної оцінки щільності продихів на мікроснімках листків *Carpinus betulus*.

Задачі:

1. Здійснити збір листя граба та створити мікроснімки продихів для формування набору даних.
2. Створити анотований набір даних для навчання неймережі та провести її навчання.
3. Провести верифікацію результатів розпізнавання продихів неймережею на тестовому наборі мікроснімків.
4. Виконати описову статистику отриманих результатів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Анатомо-фізіологічні особливості продихів листка

Продихи є ключовими структурами листків, які відіграють центральну роль у гідрологічному та вуглецевому циклах, регулюючи поглинання вуглекислого газу (CO_2) для фотосинтезу та втрату води (H_2O) через транспірацію. Як зазначається, "Продихи відіграють центральну роль у гідрологічному та вуглецевому циклах, регулюючи поглинання вуглекислого газу (CO_2) для фотосинтезу та транспіраційні втрати води (H_2O) між рослинами та атмосферою." [8]. Кожен продих складається з пари охоронних клітин, які контролюють відкриття і закриття пори залежно від тургорного тиску, який регулюється іонними потоками через іонні канали [8]. Стоматальний комплекс включає пару охоронних клітин і пору між ними, яка веде до підстоматальної камери, що є продовженням міжклітинних просторів мезофілу [8]. У багатьох рослин поруч зі стоматальними клітинами розташовані субсидіарні клітини, які морфологічно відрізняються і сприяють регуляції стоматальних рухів [8].

Розподіл продихів на листках може бути різним: амфістоматним (на обох поверхнях листка), гіпостоматним (на нижній поверхні, наприклад, у конського каштана чи липи), епістоматним (на верхній поверхні, як у деяких плаваючих рослин), гетеростоматним (переважно на абаксіальній поверхні) або ізостоматним (рівномірно на обох поверхнях) [8]. У *Carpinus betulus* спостерігається висока пластичність щільності продихів, тоді як їх розміри демонструють мінімальну пластичність, що є адаптацією до змінних середовищних умов [2]. Стоматальна провідність у *Carpinus betulus* була досліджена в дубово-грабовому лісі, де "Найвища продихова провідність була в освітлених сонцем листків у верхній частині пологу" [1]. Максимальні значення провідності спостерігалися опівдні, що вказує на активну фізіологічну роль продихів у газообміні [1]. Ця пластичність дозволяє *Carpinus betulus* ефективно адаптуватися до різних умов освітлення та інших

середовищних факторів, що є важливим для його виживання в лісах і міських середовищах.

1.2. Продихові характеристики як індикатори екологічного стану

Стоматальні характеристики, такі як щільність, розмір і розподіл, є чутливими до середовищних факторів і можуть служити біоіндикаторами екологічного стану. Дослідження показують, що "Stomatal density and stomatal index are inversely related to atmospheric CO₂ concentration" [8], що робить їх корисними для оцінки як історичних, так і сучасних змін у навколишньому середовищі. Наприклад, у дослідженні *Taraxacum officinalis* у Генті, Бельгія, було виявлено, що "Поверхня продихових пор була на 27% та 21% меншою у класах землекористування порт/промисловість та міське землекористування порівняно з пасовищами на абаксіальній та адаксіальній поверхнях, відповідно." [5]. Аналогічно, у *Plantago lanceolata* L. у Генті спостерігалось "Значне збільшення щільності та зменшення поверхні пор від приміських до міських/промислових районів" [5], що вказує на вплив забруднення на stomatal characteristics. Для *Carpinus betulus* відображення листків використовувалося для оцінки якості міського середовища, де "Зміни морфології листків *Carpinus betulus* L. пов'язані з якістю міського середовища існування" [5]. Це підтверджує потенціал stomatal characteristics як біоіндикаторів у міських умовах.

Хоча прямі дані про щільність продихів у *Carpinus betulus* у контексті забруднення обмежені, чутливість цього виду до середовищних факторів, таких як забруднення повітря, дозволяє припустити, що його stomatal characteristics можуть відображати екологічний стан. Наприклад, зменшення розміру stomatal pores у забруднених зонах, як показано для інших видів, може бути аналогічним для *Carpinus betulus*, що робить його цінним для моніторингу якості середовища в містах.

1.3. Вплив світла, вологи, температури і забруднення на продихову щільність

Інтенсивність світла є одним із ключових факторів, що впливають на щільність продохів у *Carpinus betulus*. Дослідження показало, що щільність продохів зменшувалася зі зменшенням інтенсивності світла від 100% до 25%, з $245,69 \pm 23,46$ до $180,01 \pm 16,53$ на мм². [3]. Ступінь відкритості продохів також зменшувалася, з 98,25% відкритих продохів при повному освітленні до 35,58% при 25% освітлення, що вказує на пригнічення стоматальної поведінки при низькій інтенсивності світла [3]. Це свідчить про те, що світло відіграє вирішальну роль у формуванні стоматальної морфології та функціональності.

Вплив вологи та температури на щільність продохів у *Carpinus betulus* менш вивчений, але загалом ці фактори можуть змінювати стоматальну морфологію для оптимізації газообміну. Наприклад, обмеження води не змінює щільність продохів, але зменшує їх розмір [8], що вказує на можливі адаптації до посухи. Щодо забруднення, дослідження показують, що "Кількість продохів чутлива до підвищення рівня CO₂ порівняно з доіндустріальним рівнем" [9], що свідчить про зменшення щільності продохів при підвищенні концентрації CO₂, яка є компонентом забруднення повітря. У міських і промислових зонах також спостерігається зменшення розміру стоматальних пор, що може бути пов'язано з впливом забруднення [5]. Ці дані підкреслюють складну взаємодію середовищних факторів і стоматальних характеристик, що потребує подальших досліджень для *Carpinus betulus*.

1.4. Методи мікроскопування та ручного аналізу продихів

Традиційні методи аналізу продихів включають світлову мікроскопію та скануючу електронну мікроскопію (SEM). У дослідженні *Carpinus betulus* використовувалася SEM для спостереження за поверхнею листків і оцінки щільності та розміру продихів: "Щільність продихів (кількість/мм²) і розмір продихів (довжина і ширина)." [3]. SEM забезпечує високу роздільну здатність, дозволяючи детально вивчати морфологію продихів, але є трудомістким і дорогим методом.

Інший поширений метод — техніка відбитків нігтьового лаку, яка дозволяє створювати відбитки листової поверхні для подальшого аналізу під мікроскопом: "Використання прозорого лаку для нігтів є традиційним методом вимірювання щільності продихів, оскільки виготовлення зліпка і перегляд його під мікроскопом можна виконати за один урок" [10]. Цей метод є простим і доступним, але може бути менш ефективним для листків із товстою кутикулою або нерівною поверхнею, таких як у деяких рослин.

Сучасні методи включають швидке забарвлення листків за допомогою Rhodamine 6G, що дозволяє швидко отримувати зображення і аналізувати щільність продихів без необхідності створення відбитків: "Фарбування продихів займає всього 1-2 хвилини, можна створювати знімки продихів через короткі проміжки часу" [6]. Цей метод є особливо корисним для високопродуктивного аналізу, оскільки він мінімізує маніпуляції з листком і дозволяє проводити послідовні вимірювання на одному й тому ж листку.

1.5. Методи глибокого навчання у розпізнаванні об'єктів (YOLO, RetinaNet)

Глибоке навчання революціонізувало аналіз біологічних зображень, зокрема для автоматизованого розпізнавання та вимірювання продихів. Удосконалена модель YOLO була використана для автоматичного виявлення продихів у листках кукурудзи, досягнувши точності 95,3%: "Запропоновано вдосконалену модель глибокого навчання YOLO для автоматичного розпізнавання продихів" [7]. YOLO є одностадійною моделлю, яка прогнозує локалізацію та ймовірності класів безпосередньо з повного зображення, що забезпечує швидкість і ефективність [7]. Модифікації YOLOv5, такі як оптимізовані предиктори та спрощені шари зменшення вибірки, зменшили кількість помилкових виявлень і підвищили ефективність розпізнавання [7].

RetinaNet, інша потужна модель, використовує Focal Loss для вирішення проблеми несбалансованості класів у задачах детекції об'єктів: "RetinaNet - це одноетапна модель виявлення об'єктів, яка використовує функцію фокусних втрат для усунення дисбалансу класів під час навчання" [11]. Ця модель є особливо ефективною для складних зображень із великою кількістю об'єктів, таких як мікроскопічні зображення продихів. Хоча прямі дослідження застосування RetinaNet для виявлення продихів обмежені, її архітектура, що включає Feature Pyramid Network (FPN) і ResNet, робить її перспективною для аналізу біологічних зображень [11].

Обидві моделі можуть бути адаптовані для аналізу продихів у *Carpinus betulus*, забезпечуючи швидке та точне визначення їхньої щільності та морфологічних характеристик. Застосування таких моделей може значно прискорити екологічний моніторинг і дослідження фізіології рослин, зменшуючи трудомісткість порівняно з традиційними методами.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Збір зразків листя граба

У рамках експериментального етапу дослідження зразки листя *Carpinus betulus* (грабу звичайного) були зібрані восени 2024 року на території лісопаркової зони м. Вінниця. Час проведення відбору зразків (початок осені) було обрано з урахуванням активної функціональної діяльності листкового апарату, оскільки саме в цей період продиховий апарат зберігає високу морфологічну чіткість та інформативність для ботанічного аналізу.

Відбір здійснювався з дерев приблизно однакового віку, на рівні середнього ярусу, тобто з гілок, що отримують подібний рівень освітлення. Це дало змогу зменшити варіативність результатів, зумовлену мікрокліматичними відмінностями на різних рівнях крони.

Особливістю збору було те, що зразки бралися з **двох контрастних екологічних ділянок**:

1. Перша ділянка — зона з підвищеним антропогенним навантаженням, безпосередньо біля автомобільної траси з інтенсивним рухом транспорту. Цей район характеризується підвищеним рівнем забруднення повітря, що потенційно впливає на фізіологічні процеси у рослин.
2. Друга ділянка — розташована в глибині лісопарку, далеко від магістралей та міського впливу. Вона слугувала як умовно контрольна зона з відносно чистим повітрям і стабільним мікрокліматом.

Таке зонування дозволило порівняти щільність продихів у листках, сформованих у різних умовах забруднення довкілля, що є важливим аспектом для фітоіндикаційних досліджень.

Після збору листків проводився етап підготовки епідермальних відбитків для мікроскопічного аналізу. Для цього використовувалась **методика лаково-скотчевих реплік**, яка забезпечує високоякісне відтворення рельєфу епідермального шару.

На нижню (абаксіальну) сторону кожного листка наносився тонкий шар прозорого лаку. Після висихання лакового шару до нього приклеювався прозорий канцелярський скотч, який потім різким рухом знімався разом із лаковою плівкою. Ця плівка містила рельєфне зображення поверхні епідерми, зокрема продихів. Вона приклеювалася до предметного скла, забезпечуючи прозорість і щільність прилягання до основи. У деяких випадках поверхню фіксували покривним склом, щоб уникнути спотворень фокусу під час мікроскопування.

Фотографування здійснювалося за допомогою біологічного мікроскопа зі вбудованою цифровою камерою при збільшенні $\times 400$. Кожен препарат фіксувався у кількох зонах зображення, що дозволяло врахувати локальну неоднорідність розташування продихів.

Під час роботи з мікроскопічною апаратурою виявлено низку технічних труднощів, які можуть впливати на якість цифрових мікрознімків і, відповідно, на подальшу точність нейромережевого аналізу. Основною проблемою виявилось **нерівномірне фокусування в межах одного поля зору**. При спробах навести різкість у центрі поля, зображення на периферії часто втрачало чіткість, і навпаки. Подібні викривлення глибини різкості притаманні мікроскопам із обмеженою глибиною різко зображуваної зони.

Ще одна виявлена проблема полягала у **відмінності якості зображення через окуляр та через цифрову камеру**. Через камеру фіксувалося зображення нижчої контрастності та меншої чіткості. Це можна частково вирішити за рахунок використання камери з вищою роздільною здатністю або ручного коригування експозиції, яскравості та балансу білого перед зйомкою.

Підготовка зразків для мікроскопування є одним з ключових етапів дослідження продихів, що забезпечує точність і відтворюваність результатів. У межах цього дослідження підготовка зразків моделювалася відповідно до класичної методики виготовлення епідермальних відбитків листової поверхні, які зберігають морфологічну структуру епідерми і дозволяють ідентифікувати та підраховувати продихи. Вибір методу моделювання

обґрунтований тим, що вивчення проводиться за допомогою глибокого навчання, де моделювання типових процесів може бути достатнім для формування тренувальних і тестових датасетів.



2.2. Анотація даних за допомогою платформи Supervisely

Для анотації набору даних використано платформу Supervisely (<https://supervisely.com>), яка завдяки зручному інтерфейсу та потужним інструментам для маркування зображень є оптимальним вибором для задач комп'ютерного зору. Supervisely це веб-платформа, призначена для створення, управління та анотації наборів даних для машинного навчання. У рамках дослідження було створено новий проєкт, до якого завантажено 50 мікроскопічних зображень відбитків листків. Було визначено два класи об'єктів: «продих» для чітко ідентифікованих продихів та «незрозумілий об'єкт» для структур, подібних до продихів, але з нечіткими діагностичними ознаками. Анотація проводилася за допомогою інструменту «Bounding Box (Rectangle) Tool», який дозволив точно окреслити продихи шляхом створення прямокутних рамок навколо кожної ідентифікованої структури. Кожне зображення ретельно перевірялось для забезпечення точності маркування, при цьому на кожному зображенні анотовано приблизно 60-80 продихів залежно від їхньої щільності. Анотований набір даних експортовано у форматі COCO (Common Objects in Context), який є стандартним для задач виявлення об'єктів і містить метадані зображень, координати обмежувальних рамок та мітки класів у структурі JSON.

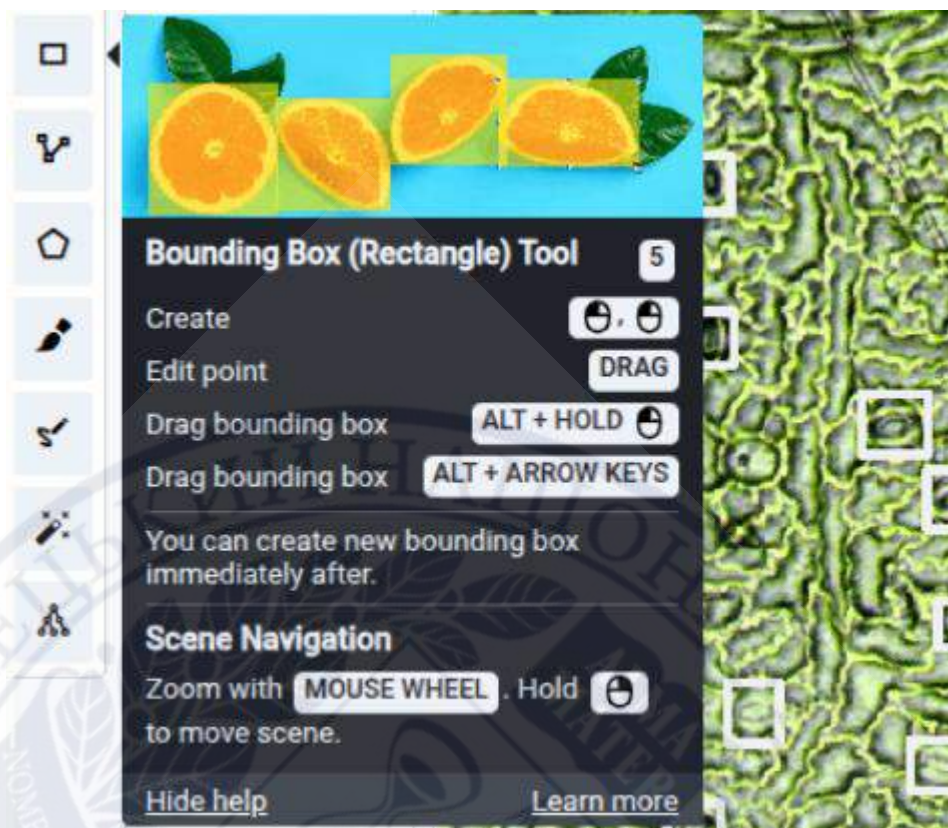


Рис. 2.1 - Приклад інтерфейсу інструменту «Bounding Box (Rectangle) Tool» у Supervisely, використаного для анотації продихів на мікроскопічних зображеннях відбитків листків *Carpinus betulus*.

2.3. Архітектура нейромережі для виявлення продихів

Для виявлення продихів використано згорткову нейронну мережу RetinaNet, яка є сучасною архітектурою для точного та ефективного виявлення об'єктів. RetinaNet вирішує проблему дисбалансу класів у задачах виявлення об'єктів шляхом використання функції втрат Focal Loss, яка приділяє більше уваги складним для класифікації прикладам. Модель реалізовано за допомогою бібліотеки KerasCV, високорівневого API на базі TensorFlow, що спрощує розробку моделей комп'ютерного зору. KerasCV надає попередньо навчені моделі та інструменти для аугментації даних і навчання моделей, що робить її придатною для аналізу біологічних зображень.

Остовом моделі RetinaNet обрано YOLOv8 (You Only Look Once, версія 8), зокрема середній варіант (yolo_v8_m_backbone). YOLOv8, розроблений компанією Ultralytics, є еволюцією сімейства моделей YOLO, відомих своєю здатністю до виявлення об'єктів у реальному часі. На відміну від традиційних двоступеневих детекторів, YOLOv8 використовує одноступеневу архітектуру, яка одночасно прогнозує обмежувальні рамки та ймовірності класів, забезпечуючи баланс між швидкістю та точністю. Остов YOLOv8 витягує карти ознак на різних масштабах, які потім обробляються мережею піраміди ознак (FPN) RetinaNet для виявлення об'єктів різного розміру. Це особливо корисно для виявлення продихів, оскільки вони варіюються за розміром і щільністю на мікроскопічних зображеннях. Поєднання функції втрат Focal Loss від RetinaNet та ефективного витягування ознак YOLOv8 робить цю архітектуру оптимальною для виявлення малих і щільно розташованих об'єктів, таких як продихи, на складних біологічних зображеннях.

Вхідні зображення стандартизовано до роздільної здатності 512x512 пікселів відповідно до вимог моделі. Для підвищення стійкості моделі застосовано техніку аугментації даних за допомогою шарів попередньої обробки KerasCV, зокрема RandomCrop для випадкового вирізання фрагментів розміром 512x512 пікселів із більших мікроскопічних зображень

і RandomFlip для введення випадкових горизонтальних і вертикальних віддзеркалень. Ці аугментації застосовувалися чотири рази до кожного зображення, розширюючи початковий набір даних із 50 зображень до 200 навчальних прикладів, які поділено на 80% тренувальних (160 зображень) і 20% валідаційних (40 зображень). Така стратегія аугментації зменшує ризик перенавчання та покращує здатність моделі до узагальнення на нових даних.

Переваги обраної архітектури:

- **Focal Loss:** Вирішує проблему дисбалансу класів, зосереджуючись на складних прикладах, що покращує виявлення малих продихів на складному тлі.
- **Остов YOLOv8:** Забезпечує ефективне витягування ознак і виявлення на різних масштабах, що критично важливо для ідентифікації продихів різного розміру.
- **Інтеграція з KerasCV:** Спрощує конфігурацію та навчання моделі, дозволяючи швидко створювати прототипи та проводити експерименти.

2.4. Навчання нейромережі

Навчання нейромережі проводилося за допомогою скрипту на мові Python, розробленого на кафедрі біофізики та фізіології з використанням бібліотек TensorFlow та KerasCV. Скрипт виконував такі основні функції:

Завантаження набору даних у форматі COCO.

Поділ набору даних на навчальний (80%) і валідаційний (20%) набори.

Ініціалізація моделі RetinaNet з основою YOLOv8.

Навчання моделі із заданими гіперпараметрами.

Навчання проводилося на хмарній платформі Google Colab, яка надає доступ до високопродуктивних графічних процесорів, усуваючи необхідність локальної конфігурації обладнання. Роздільна здатність вхідних зображень була встановлена на рівні 512x512 пікселів, а розмір партії - 4, щоб збалансувати обмеження на пам'ять та ефективність навчання. Модель було сконфігуровано з наступними параметрами:

Оптимізатор: Стохастичний градієнтний спуск (SGD) зі швидкістю навчання 0.005, імпульсом 0.9 та глобальним відсіканням градієнта на рівні 10.0 для запобігання вибухових градієнтів.

Функції втрат: Фокальні втрати для класифікації для усунення дисбалансу класів і згладжені L1 втрати для регресії в обмежувальній рамці для забезпечення точної локалізації.

Зворотні виклики: Зворотний виклик ModelCheckpoint зберіг модель з найменшими втратами при валідації, а CSVLogger записав метрики навчання для аналізу.

Модель навчалася протягом 200 епох, що зайняло приблизно 120 хвилин на графічному процесорі Google Colab. Навчальний набір даних складався з 160 доповнених зображень, а валідаційний набір даних включав 40 зображень. Використаний код наведено нижче:

```

import tensorflow as tf
import keras_cv

# Initialize RetinaNet model with YOLOv8 backbone
model = keras_cv.models.RetinaNet.from_preset(
    "yolo_v8_m_backbone",
    bounding_box_format='xywh',
    num_classes=1,
)

# Configure optimizer
base_lr = 0.005
optimizer = tf.keras.optimizers.SGD(
    learning_rate=base_lr,
    momentum=0.9,
    global_clipnorm=10.0
)

# Compile model
model.compile(
    classification_loss="focal",
    box_loss="smoothl1",
    optimizer=optimizer,
)

# Define callbacks
checkpoint_path = "model_best.keras"
csvlog_filepath = "model.log"
callbacks_list = [
    tf.keras.callbacks.ModelCheckpoint(
        filepath=checkpoint_path,
        monitor="val_loss",
        save_best_only=True,
        save_weights_only=False
    ),
    tf.keras.callbacks.CSVLogger(csvlog_filepath, separator="," , append=True),
]

# Train model
history = model.fit(
    train_dataset,
    validation_data=val_dataset,
    epochs=200,
    callbacks=callbacks_list,
)

```

Рис. 2.2 - фрагмент кода для ініціалізації моделі RetinaNet з опорною мережею YOLOv8, налаштування оптимізатора, компіляції моделі та визначення келбеків.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Збір зразків листя граба

Підготовка мікроскопічних слайдів за допомогою техніки відбитків лаком для нігтів виявила кілька проблем, пов'язаних з якістю зображення. Однією з важливих проблем була нерівномірна різкість по всьому полю зору. Фокусування мікроскопа на центрі зображення часто призводило до розмиття країв, і навпаки. Це явище, відоме як обмеження глибини різкості, є поширеним у мікроскопії при великих збільшеннях і може бути усунене за допомогою накладання фокусів - методу, коли кілька зображень, зроблених у різних фокальних площинах, об'єднуються для створення одного зображення з підвищеною різкістю по всьому полю. Фокусування успішно застосовується в ботанічній мікроскопії для покращення чіткості зображень проріхів. Однак через обмеження обладнання ця методика не була застосована в даному дослідженні, а пріоритетними були зображення з оптимальним центральним фокусом. [12]

Іншою проблемою була розбіжність між якістю зображення, що спостерігається через окуляр мікроскопа, і зображенням, зафіксованим цифровою камерою. Окуляр давав чіткіші та детальніші зображення, ймовірно, через обмежену роздільну здатність камери. Модернізація камери з вищою роздільною здатністю або використання спеціальної камери мікроскопа з більшим сенсором може вирішити цю проблему. [13]

3.2. Анотація продихів за допомогою платформи Supervisely

Процес анотації розпочався зі створення нового проєкту на платформі Supervisely, після чого було завантажено 50 мікроскопічних зображень відбитків листків *Carpinus betulus*. Визначено два класи об'єктів: «продих» для однозначно ідентифікованих продихів і «незрозумілий об'єкт» для структур, що нагадують продихи, але важко класифікуються. Для анотації використано інструмент «Bounding Box (Rectangle) Tool», який дозволив окреслити приблизно 60-80 продихів на кожному зображенні залежно від їхньої щільності. Анований набір даних, що складався з 50 зображень із координатами обмежувальних рамок і мітками класів, експортовано у форматі COCO для сумісності з фреймворком KerasCV.

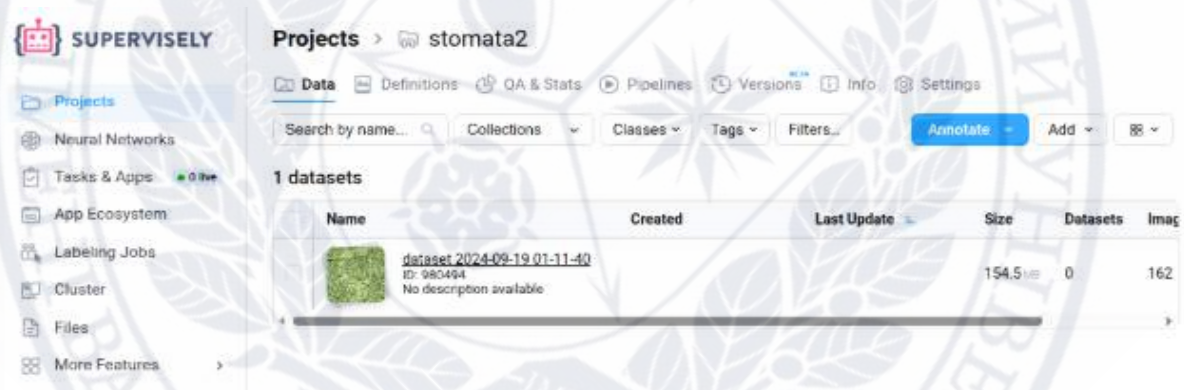


Рис. 3.1. – Інтерфейс створення нового проєкту на платформі Supervisely

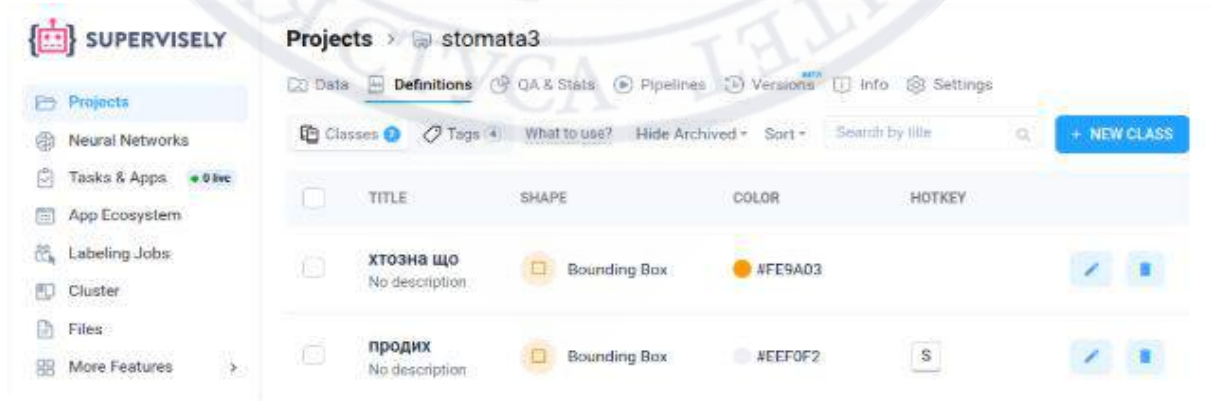


Рис. 3.2. – Визначення двох класів об'єктів («продих» та «незрозумілий об'єкт») у проєкті Supervisely.

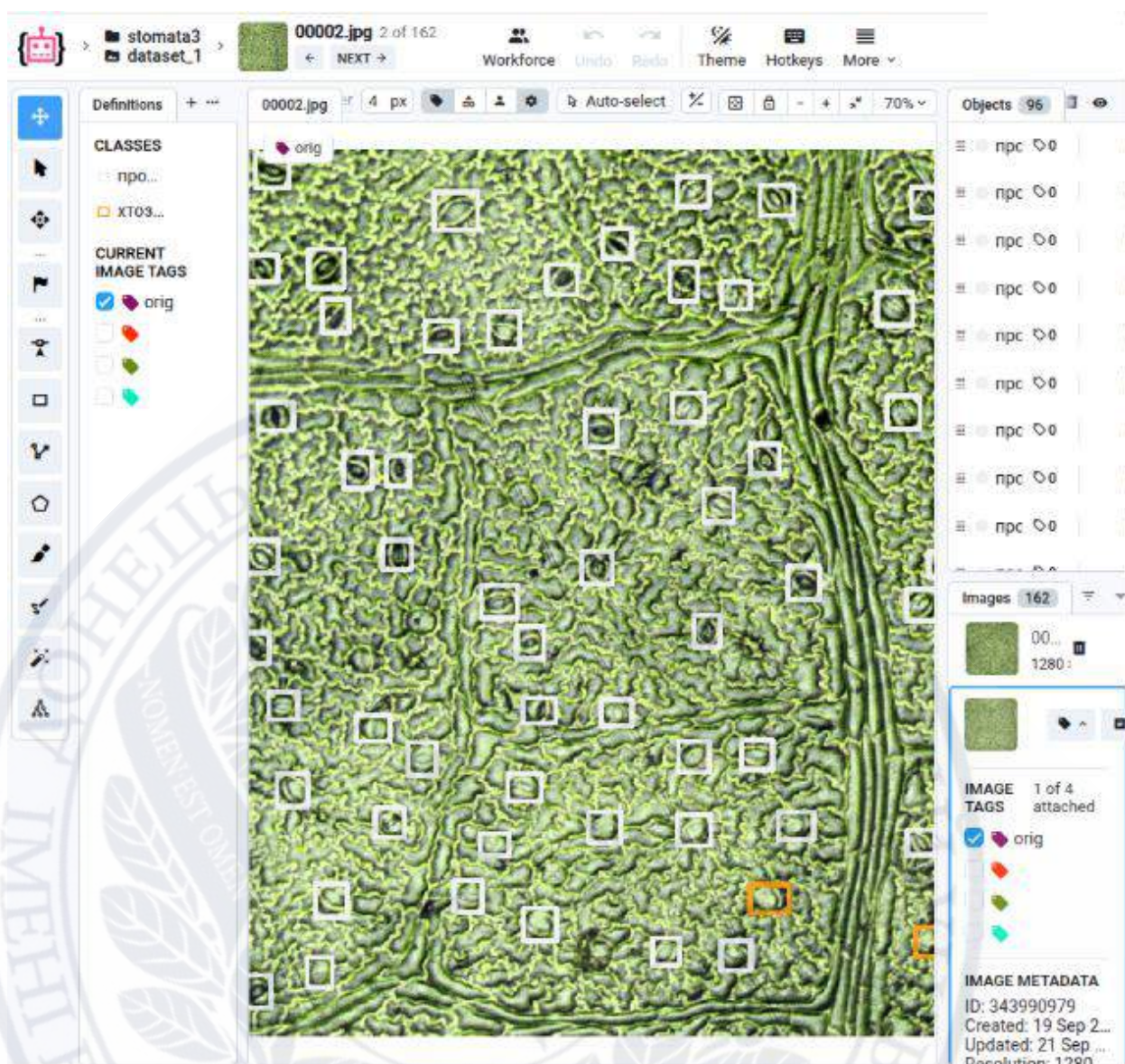


Рис. 3.3. - Приклад анотованого мікроскопічного зображення у Supervisely, на якому продиhi обведено обмежувальними рамками.

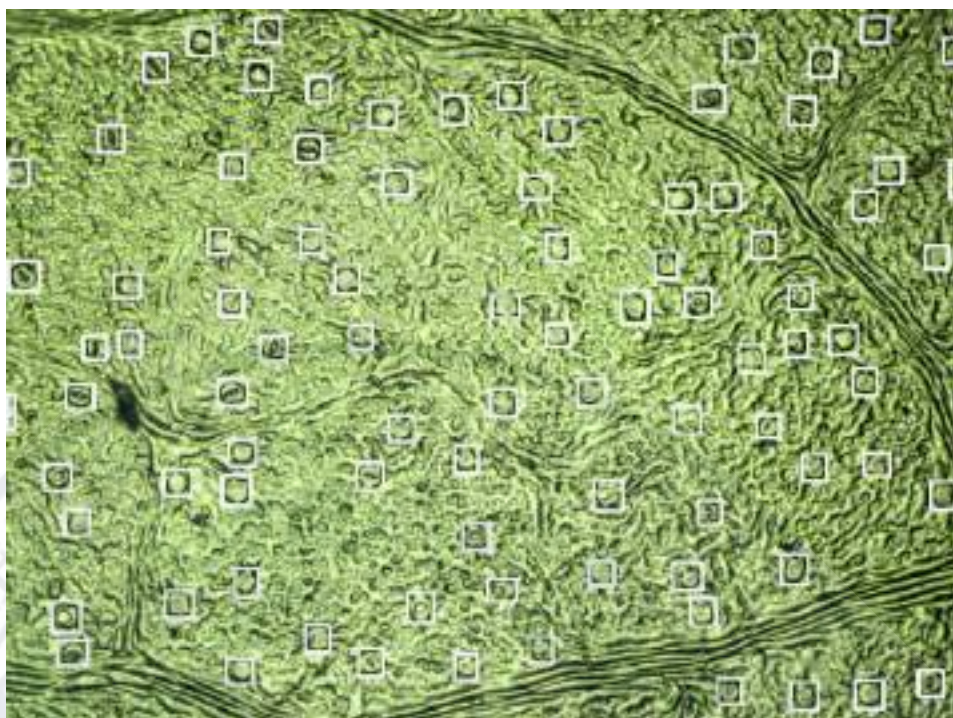


Рис. 3.4. - Приклади анотованих зображень із експортованого набору даних у форматі СОСО, що показують продихи з обмежувальними рамками.



Рис. 3.5. - Приклади анотованих зображень із експортованого набору даних у форматі СОСО, що показують продихи з обмежувальними рамками. (Продовження)

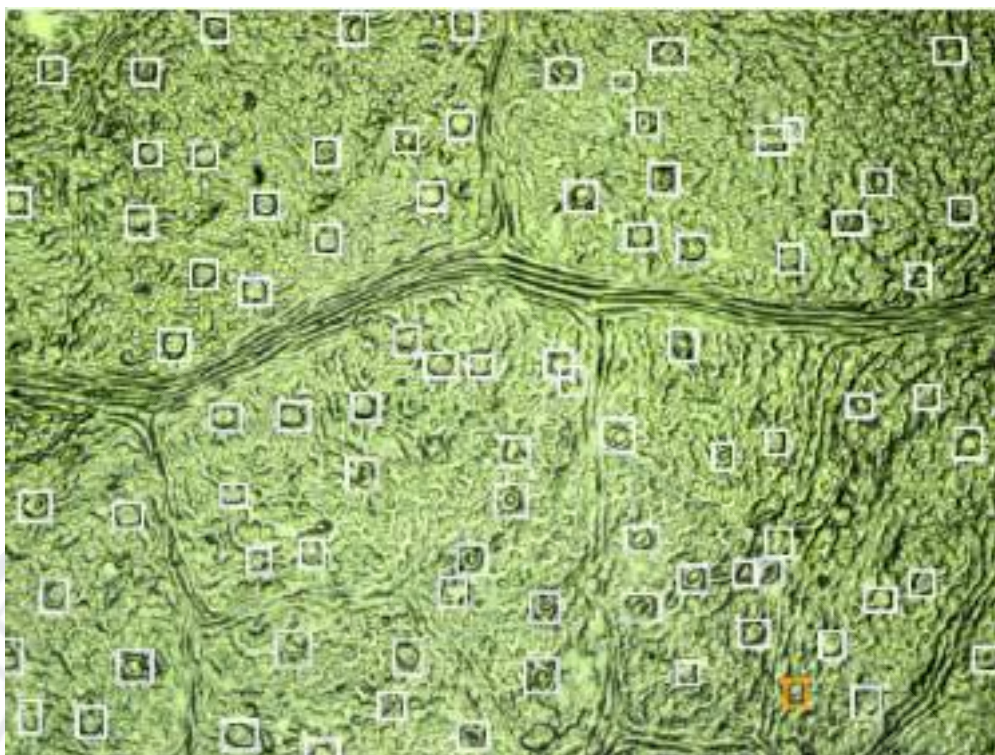


Рис. 3.6. - Приклади анотованих зображень із експортованого набору даних у форматі СОСО, що показують продиhi з обмежувальними рамками. (Продовження)

3.3. Навчання нейромережі

Навчання проводилося на платформі Google Colab, яка забезпечує доступ до потужних графічних процесорів і не потребує локального налаштування обладнання. Модель RetinaNet з остовом YOLOv8 навчалася протягом 200 епох, при цьому процес відстежувався за метриками втрат, включаючи втрату класифікації (Focal Loss), втрату обмежувальної рамки (Smooth L1) та загальну втрату. Прогрес навчання візуалізовано на наступних рисунках:

```
Epoch 1/40
45/45 _____ 46s 987ms/step - box_loss: 0.1189 -
classification_loss: 0.1167 - loss: 0.2356 - val_box_loss: 0.1648 -
val_classification_loss: 0.1643 - val_loss: 0.3291
Epoch 2/40
45/45 _____ 87s 1s/step - box_loss: 0.1170 -
classification_loss: 0.1174 - loss: 0.2344 - val_box_loss: 0.1360 -
val_classification_loss: 0.1191 - val_loss: 0.2551
Epoch 3/40
45/45 _____ 46s 989ms/step - box_loss: 0.1161 -
classification_loss: 0.1128 - loss: 0.2288 - val_box_loss: 0.1362 -
val_classification_loss: 0.1149 - val_loss: 0.2511
Epoch 4/40
45/45 _____ 81s 956ms/step - box_loss: 0.1145 -
classification_loss: 0.1171 - loss: 0.2316 - val_box_loss: 0.1434 -
val_classification_loss: 0.1248 - val_loss: 0.2682
....
Epoch 38/40
45/45 _____ 48s 1s/step - box_loss: 0.1022 -
classification_loss: 0.0938 - loss: 0.1960 - val_box_loss: 0.1277 -
val_classification_loss: 0.1124 - val_loss: 0.2401
Epoch 39/40
45/45 _____ 80s 928ms/step - box_loss: 0.0991 -
classification_loss: 0.0987 - loss: 0.1978 - val_box_loss: 0.1274 -
val_classification_loss: 0.1200 - val_loss: 0.2474
Epoch 40/40
45/45 _____ 44s 928ms/step - box_loss: 0.0992 -
classification_loss: 0.0973 - loss: 0.1966 - val_box_loss: 0.1150 -
val_classification_loss: 0.0928 - val_loss: 0.2078
```

Рис. 3.7. - Вивід команди `model.fit`, що показує прогрес навчання.

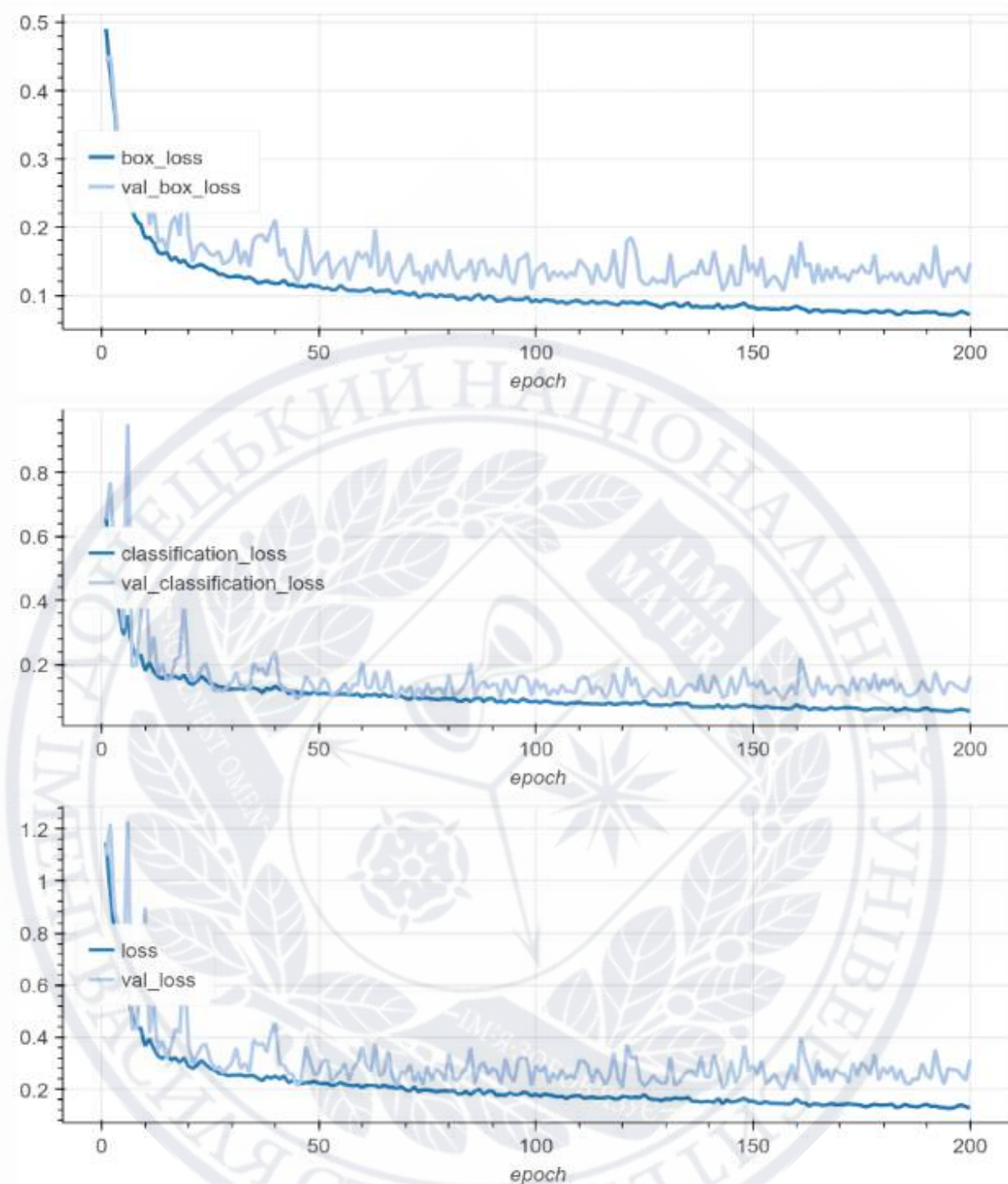


Рис. 3.8. - Графіки залежності втрат обмежувальної рамки, втрат класифікації та загальних втрат від номера епохи для тренувального та валідаційного наборів даних.

Метрики втрат продемонстрували швидке зниження протягом перших 20 епох, що свідчить про ефективне вивчення ознак прорихів. Після цього тренувальна втрата продовжувала поступово зменшуватися, тоді як валідаційна втрата стабілізувалася приблизно на 100-й епосі та почала дещо

зростати після 120-ї епохи, що вказує на перенавчання. Перенавчання виникає, коли модель запам'ятовує специфічні закономірності тренувальних даних, які не узагальнюються на нові дані. Для зменшення перенавчання використано `callback ModelCheckpoint`, який зберігав ваги моделі з найменшою валідаційною втратою, забезпечуючи збереження найкращої моделі.

Для усунення перенавчання можна застосувати такі стратегії:

- **Раннє зупинення:** Припинити навчання, коли валідаційна втрата перестає зменшуватися, наприклад, після 100--120 епох.
- **Аугментація даних:** Збільшити різноманітність тренувального набору шляхом додаткових аугментацій, таких як випадкові повороти, масштабування або корекція яскравості.
- **Регуляризація:** Застосувати методи, такі як `dropout` або затухання ваг, для запобігання запам'ятовуванню тренувальних даних.
- **Збільшення набору даних:** Хоча обмеження пам'яті обмежували розмір набору даних, включення більш різноманітних зображень могло б покращити узагальнення.

3.4. Виявлення продихів на нових мікроснімках

Навчена модель була застосована до 150 нових мікроскопічних зображень, які не входили до тренувального або валідаційного наборів. Оскільки початкові зображення були більшими за розмір вхідного зображення моделі (512x512 пікселів), кожне зображення поділялося на фрагменти, що перекриваються, з шириною перекриття, приблизно вдвічі більшою за типову ширину продихів, для забезпечення повного покриття. Прогнози з цих фрагментів об'єднувалися для реконструкції повного зображення, при цьому перекривні області зливалися, щоб уникнути дублювання виявлень. Модель успішно виявила продихи на цих зображеннях, результати узагальнено в табл. 3.1.

Табл. 3.1. – Результати верифікації моделі на незалежному тестовому наборі.

Назва зображення	Виявлені продихи	Хибнонегативні	Хибнопозитивні	Справжня кількість продихів
00001	71	47	0	118
00002	73	43	3	119
00003	68	54	4	118
00004	70	39	1	110
00005	75	39	3	111
00006	69	41	2	108
00007	84	45	1	129
00008	94	46	3	137
00009	63	58	2	119
00010	77	45	3	119

Таблиця показує, що модель виявляла приблизно 74 продихи на зображення, з 40-50 хибнонегативними (пропущеними продихами) та 0-4 хибнопозитивними

(неправильно ідентифікованими структурами). Справжня кількість продихів розраховувалася як кількість виявлених продихів мінус хибнопозитивні плюс хибнонегативні. Низький рівень хибнопозитивних результатів свідчить про високу специфічність, тоді як хибнонегативні результати вказують на можливості для покращення, можливо, через варіації в якості зображень або зовнішньому вигляді продихів.

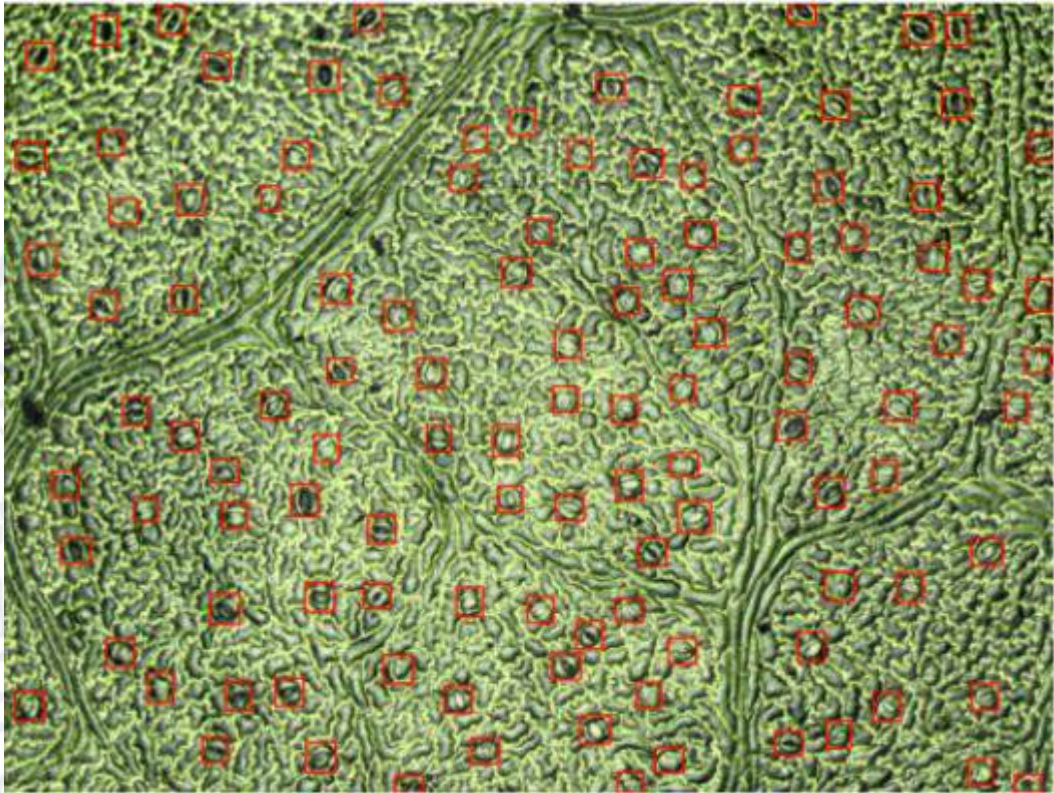


Рис. 3.9. - Приклади нових мікроскопічних зображень із продихами, обведеними обмежувальними рамками, передбаченими навченої неймережею.

3.5. Покращення точності моделі.

Ми спробували покращити точність моделі та зменшити перенавчання. Для цього ми збільшили набір даних додавши в нього мікроснімки які містили значну кількість помилок детекції. Також ми використовували алгоритм оптимізації Адама. Прогрес навчання нової моделі візуалізовано на рисунку ...

Рис. 3.5. - Графіки залежності втрат обмежувальної рамки, втрат класифікації та загальних втрат від номера епохи для тренувального та валідаційного наборів даних.

Результати виявлення продихів узагальнено в табл. 3.2.

Табл. 3.1. – Результати верифікації моделі на покращеному тестовому наборі.

Назва зображення	Виявлені продихи	Хибнонегативні	Хибнопозитивні	Справжня кількість продихів
00001	115	5	2	118
00002	115	6	2	119
00003	114	7	3	118
00004	110	4	4	110
00005	107	10	6	111
00006	107	5	4	108
00007	129	5	5	129
00008	136	7	6	137
00009	126	4	11	119
00010	119	4	4	119

Таблиця показує, що модель виявляла приблизно 117 продихів на зображення, з 4-10 хибнонегативними (пропущеними продихами) та 2-

11 хибнопозитивними (неправильно ідентифікованими структурами). Низький рівень хибнопозитивних результатів свідчить про високу специфічність, тоді як хибнонегативні результати вказують на можливості для покращення, можливо, через варіації в якості зображень або зовнішньому вигляді продихів.

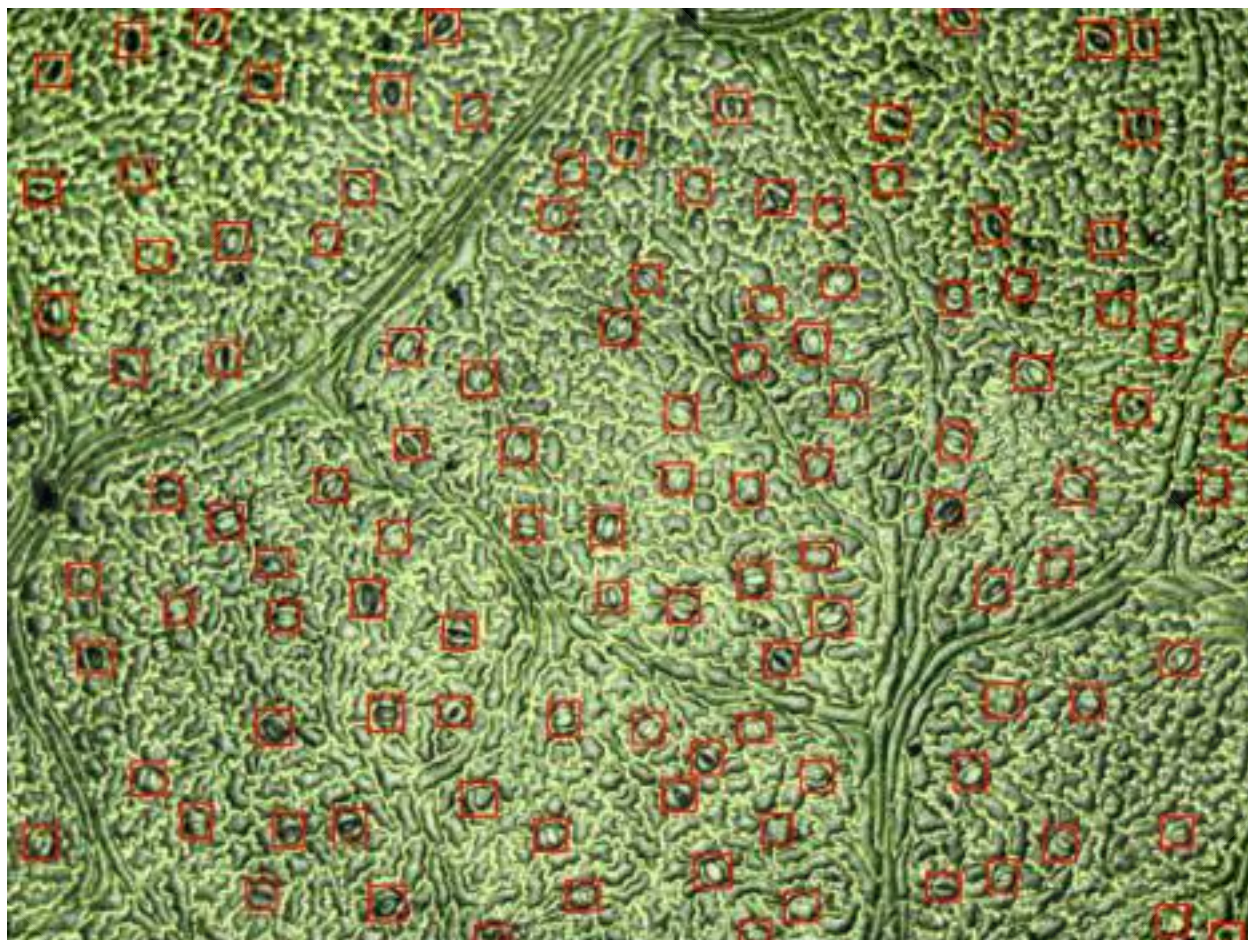


Рис. 3.10. - Приклади нових мікроскопічних зображень із продихами, обведеними обмежувальними рамками, передбаченими навченої неймерережею (00001. Jpg).

ВИСНОВКИ

Дослідження успішно вирішило поставлені задачі, що дозволило зробити наступні висновки:

1. **Збір зразків листя та створення мікрознімків:** Зразки листя *Carpinus betulus* були зібрані з двох екологічно різних ділянок у Вінниці, Україна, що дало змогу дослідити щільність продихів за різних рівнів забруднення. Техніка відбитків лаком для нігтів виявилася ефективною для підготовки мікроскопічних слайдів, хоча проблеми з неоднорідною різкістю та роздільною здатністю камери вказують на необхідність використання передових методів зображення, таких як фокусне накладання або камери з вищою роздільною здатністю.
2. **Створення та навчання набору даних для нейромережі:** Набір даних із 50 мікроскопічних зображень було анотовано за допомогою платформи Supervisely, отримавши набір даних у форматі COCO з двома класами: «продих» і «незрозумілий об'єкт». Аугментація даних розширила набір до 200 зображень, які використано для навчання моделі RetinaNet з остовом YOLOv8. Модель досягла значного прогресу в навчанні протягом 20 епох, хоча після 120 епох спостерігалось перенавчання, що було усунуто збереженням найкращих ваг моделі.
3. **Верифікація результатів розпізнавання продихів:** Навчена модель була застосована до 150 нових зображень, продемонструвавши виявлення продихів із приблизно 70 виявленнями на зображення, 40-50 хибнонегативними та мінімальними хибнопозитивними результатами. В результаті збільшення набору даних, а також використання алгоритму оптимізації Адама було покращено точність моделі до результату приблизно 117 продихів на зображення з яких лише 4-10 хибнонегативні.

В цілому ці результати демонструють можливість використання глибокого навчання для автоматизованого аналізу продихів, що має значення для екологічного моніторингу та досліджень фізіології рослин. Подальші роботи мають бути спрямовані на розширення набору даних, впровадження розширених технік аугментації та дослідження альтернативних архітектур для підвищення точності виявлення.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Марек М., Масаровикова Е., Кратохвілова І., Еліаш П., Яноуш Д. Активність продихів у кронах високих листяних дерев за лісових умов [Stomatal activity within the crowns of tall deciduous trees under forest conditions] // *Photosynthetica*. – 1989. – Т. 23. – № 3. – С. 355–363. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02902208>
2. Парідарі І. К., Джалалі С., Сонаболі А., Брускі П. Макро- та мікроморфологічна висотна мінливість листків *Carpinus betulus* у Гірканському лісі (Іран) [Leaf macro- and micro-morphological altitudinal variability of *Carpinus betulus* in the Hyrcanian forest (Iran)] // *Journal of Forestry Research*. – 2013. – Т. 24. – № 2. – С. 301–307. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11676-013-0353-x>
3. Чжоу Ц., Чжао Ф., Чжан Х., Чжу Ц. Реакція росту, фотосинтетичних характеристик, ендогенних гормонів та антиоксидантної активності саджанців *Carpinus betulus* L. на різні інтенсивності світла [Responses of the growth, photosynthetic characteristics, endogenous hormones and antioxidant activity of *Carpinus betulus* L. seedlings to different light intensities] // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Т. 13. – С. 1–15. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9751822/>
4. Чжоу Ц., Чжао Ф., Чжан Х., Чжу Ц. Зростання та фізико-хімічні зміни *Carpinus betulus* L. під впливом обробки солями [Growth and Physicochemical Changes of *Carpinus betulus* L. Influenced by Salinity Treatments] // *Forests*. – 2018. – Т. 9. – № 6. – С. 354. URL: <https://www.mdpi.com/1999-4907/9/6/354>
5. Хаванін Заде А. Р., Верустрете Ф., Вуйтс К., Кардель Ф., Самсон Р. Спектральні характеристики листків *Carpinus betulus* L. для оцінки якості міських середовищ [Leaf spectral characteristics of *Carpinus betulus* L. for assessing urban habitat quality] // *Environmental Pollution*. – 2014. – Т. 193. – С. 128–137.

URL:

https://www.researchgate.net/publication/260244182_Leaf_spectral_characteristics_of_Carpinus_betulus_L_for_assessing_urban_habitat_quality

6. Ван ден Берг А. К., Перкінс Т. Д. Швидкий і простий метод мікроскопічного аналізу продихів [A Rapid and Simple Method for Microscopy-Based Stomata Analyses] // Applications in Plant Sciences. – 2014. – Т. 2. – № 7. – С. 1400041. URL:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5061359/>
7. Лі К., Чжан Т., Ван Х. Автоматичне розпізнавання та вимірювання продихів на основі покращеної моделі глибокого навчання YOLO та алгоритму суперпиксельної ентропії [Automatic stomata recognition and measurement based on improved YOLO deep learning model and entropy rate superpixel algorithm] // Ecological Informatics. – 2021. – Т. 66. – С. 101467. URL:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1574954121003125>
8. МакЛвейн Дж. К., Рассел М. Б. Інтеграція фізіології та морфології продихів: еволюція контролю продихів і розвиток майбутніх культур [Integrating stomatal physiology and morphology: evolution of stomatal control and development of future crops] // New Phytologist. – 2021. – Т. 231. – № 4. – С. 1373–1385. URL:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8591009/>
9. Вудворд Ф. І. Чисельність продихів чутлива до підвищення рівня CO₂ від доіндустріальних рівнів [Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels] // Nature. – 1987. – Т. 327. – № 6123. – С. 617–618. URL:
<https://www.nature.com/articles/327617a0>
10. Вимірювання щільності продихів [Measuring Stomatal Density - Science & Plants for Schools] / Science & Plants for Schools. – URL:
<https://www.saps.org.uk/secondary/teaching-resources/157-measuring-stomatal-density>.

- 11.Лін Т.-І., Хе К., Гіріхар Б., Доллар П. RetinaNet: Фокальна втрата для щільного виявлення об'єктів [RetinaNet: Focal Loss for Dense Object Detection] // Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). – 2017. – С. 2980–2988.URL:
<https://arxiv.org/abs/1708.02002>
- 12.Валдекасас А. Г., Маршалл Д., Бесерра Х. М., Терреро Х. Х. Алгоритми розширеного фокусу для світлопольової мікроскопії [On the extended depth of focus algorithms for bright field microscopy] // Micron. – 2001. - Т. 32. – № 6. – С. 559–569.
- 13.Бреко Я., Матіс А., Деконінк В., Лепонс М., Ванденшпігель Д., Семал П. Фокусне накладання: Порівняння комерційних топових установок із напівавтоматичним низькобюджетним підходом [Focus stacking: Comparing commercial top-end set-ups with a semi-automatic low budget approach] // ZooKeys. – 2014. – № 464. – С. 1–23. – URL:
https://www.researchgate.net/publication/269630893_Focus_stacking_Comparing_commercial_top-end_set-ups_with_a_semi-automatic_low_budget_approach_A_possible_solution_for_mass_digitization_of_type_specimens
- 14.Бірлінг Д. Дж. та ін. Забруднення повітря та щільність продихів у міських середовищах [Air pollution and stomatal density in urban environments] // Environmental Pollution. – 2001. – Т. 114. – № 2. – С. 171–177.
15. Алмейда А. та ін. Автоматизоване виявлення продихів за допомогою згорткових нейронних мереж [Automated stomatal detection using convolutional neural networks] // Plant Methods. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 1–12.

Гнатишин Андрій Олегович

Факультет хімії, біології і біотехнологій

101 Екологія

Екологія

ДЕКЛАРАЦІЯ АКАДЕМІЧНОЇ ДОБРОЧЕСНОСТІ

Усвідомлюючи свою відповідальність за надання неправдивої інформації, стверджую, що подана кваліфікаційна (бакалаврська) робота на тему: «ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЩІЛЬНОСТІ ПРОДИХІВ У ЛИСТКАХ CARPINUS BETULUS L. ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДІВ ГЛИБОКОГО НАВЧАННЯ» є написано мною особисто.

- Одночасно заявляю, що ця робота:
- Не передавалась іншим особам і подається до захисту вперше;
- Не порушує авторських та суміжних прав, закріплених статтями 21-25 Закону України «Про авторське право та суміжні права»;
- Не отримувалась іншими особами, а також дані та інформація не отримувались у недозволений спосіб.

Я усвідомлюю, що у разі порушення цього порядку моя кваліфікаційна робота буде відхилена без права її захисту, або під час захисту за неї буде поставлена оцінка «незадовільно».

«_____» _____ 2025 р.