ISNN 3030-3907

2026/3
VOLUME 3

DEVELOPMENT OF SCIENCE

ILMIY JURNAL



Development of science

Ilmiy jurnal

2026/3 VOLUME 3

ISSN 3030 -3907

Ilmiy jurnal OAK rayosatining 2024 yil 27 sentabrdagi 361-son qaroriga asosan 02.00.00 kimyo fanlari hamda 2025 yil 12 fevral 367- son qaroriga asosan 05.00.00 texnika fanlari bo‘yicha falsafa doktori (PhD) va fan doktori (DSc) ilmiy darajasiga talabgorlarning dissertatsiya ishlari yuzasidan dissertatsiyalari asosiy ilmiy natijalarini chop etish tavsiya etilgan milliy ilmiy nashrlar ro‘yxatiga kiritilgan.

BOSH MUHARRIR:
Temirov Alisher Hoshim o‘g‘li – texnika fanlari falsafa doktori (PhD),Dotsent.
TAHRIRIYAT KENGASH RAISI:
Fozilov Sadriddin Fayzullayevich – texnika fanlari doktori, professor
TAHRIRIYAT KENGASH A’ZOLARI

TEXNIKA FANLARI/ TECHNICAL SCIENCES/ ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

Bozorov G‘ayrat Rashidovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor
Abdurahmonov Olim Rustamovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor
Adizov Bobur Zamirovich
O‘zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Umumiy va noorganik kimyo instituti, professor
Hayitov Ruslan Rustamjonovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor
Jumayev Qayum Karimovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Berdiyev Dorob Murodovich
Islom Karimov nomidagi Toshkent Davlat Texnika Universiteti, professor
Maxmudov Rafiq Amonovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Tilloyev Lochin Ismatilloyevich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Raxmonov Qahramon Sanakulovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Barakayev Nusratullo Rajabovich
Islom Karimov nomidagi Toshkent Davlat Texnika Universiteti, professor.
Jo‘rayev Xayrullo Fayziyevich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Panoyev Erali Rajabboyevich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Ataullayev Sherzod Nabiullyevich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Murodov Malik Negmurodovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Axmedova Ozoda Bahronovna
Islom Karimov nomidagi Toshkent Davlat Texnika Universiteti.
Safarov Bahri Jumayevich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Xaydarov Axtam Amonovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Safarov Jasur Alijon o‘g‘li
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Асадова Раъно Дилмуратовна
Тошкент Давлат техника университети доценти

KIMYO FANLARI/ CHEMICAL SCIENCES/ ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Axmedov Voxid Nizomovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor
Umarov Baqo Bafoyevich
Buxoro Davlat Universiteti, professor
Kodirov Abduaxad Abduraximovich
Qarshi davlat Universiteti, professor
Qurbonov Mingniqul Jumagulovich
Qarshi davlat Universiteti, dotsent
Turemuratov Sharibay Naurizbaevich
O‘zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Qoraqalpog‘iston bo‘limi Bosh ilmiy kotibi, professor
Tursunov Kaxor Shonazarovich
Qarshi davlat Universiteti, professor
Do‘stov Hamro
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor
Panoyev Nodir Shavkatovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Olimov Bobur Bahodir o‘g‘li
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Kasimov Sherzod Abduazimovich
Termiz Davlat Universiteti, professor.
Aliqulov Rustam Valiyevich
Termiz Davlat Universiteti, professor
Tropov Xamza Tursunovich
Samarqand Davlat Universiteti, professor

IQTISODIYOT FANLARI/ ECONOMICS/ ЭКОНОМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Nizamov Aslitdin Badreddinovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Boboyev Akmal Choriyevich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Ergashxojayeva Shaxnoza Djasurovna
Toshkent davlat iqtisodiyot universiteti, professor
Saidaxmedova Nodira Ilxomovna
Toshkent davlat iqtisodiyot universiteti, professor
Muxsinov Bekzod Toxirovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Shakarov Qulmat Ashirovich
Renessans ta'lim universiteti,dotsent.
Jumaeva Zulfiya Qayumovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Norova Salomat Yusupovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Avezova Shaxnoza Maxmudjonovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Jalilov Jamshid G‘anijonovich
Toshkent davlat iqtisodiyot universiteti, dotsent
Xasanova Gulruh Djumanazarovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.

PEDAGOGIKA FANLARI/ PEDAGOGICAL SCIENCES / ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Siddiqova Sadoqat G‘afforovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Zoyirov Erkin Xalilovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, DSc, professor
Gaffarov Feruz Hasanovich
Puchon Universiteti, *professor*
Ruziyev Davron Yuldashevich
Buxoro Davlat Universiteti, professor
Muradova Firuza Rashidovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Yunusova Gulandon Samiyevna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
To‘xtayeva Zebo Sharifovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, professor.
Navro‘zova Gulchixra Nigmatovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Uzoqova Laylo Polvonovna
Buxoro muhandislik – texnologiya instituti, dotsent.
To‘raqulova Marjona Qiyom qizi
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Muradova Zarina Rashidovna
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Murodov Sanjar Aslonovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent.
Shodiyev Jahongir Jo‘raqulovich
Buxoro Davlat Texnika Universiteti, dotsent
Gaffarov Laziz Hasanovich
Buxoro muhandislik – texnologiya instituti, dotsent.

Tahririyat a’zolarning to‘liq ro‘yxati jurnalning www.devos.uz saytida keltirilgan.

Tahririyat hay’ati a’zolarining tarkibini o‘zgartirish hamda qo‘shimcha kiritish yoki tahririyat a’zoligidan chiqarish bosh muharrir tomonidan amalga oshiriladi.

ISSN 3030-3907

Development of science ilmiy jurnali 2024 yil 15 aprel kuni №256445 sonli guvohnoma bilan Davlat ro‘yxatidan o‘tgan.

To‘plam elektron ko‘rinishda (pdf formatida) mualliflarga taqdim etiladi. To‘plamga kiritiladigan maqolalarning mazmuni, ulardagi statistik ma’lumotlar va me’yoriy hujjatlarning to‘g‘riligiga hamda har qanday fikr - mulohazalarga mualliflarning o‘zlari mas’ul hisoblanadilar. Talablarga javob bermaydigan maqolalar to‘plamga kiritilmaydi. Tashkiliy qo‘mita maqola matnini qisqartirish, qisman tuzatish kiritish, seksiyalarga joylashtirish huquqiga ega.

ISSN 3030-3907

ДИАГНОСТИКА СТАТУСА ПИТАНИЯ ПШЕНИЦЫ ПО ФОТОПИГМЕНТАМ: ИНТЕГРАЦИЯ УФ–VIS, РЕФРАКТОМЕТРИИ И РАМАН-СПЕКТРОСКОПИИ

Курбанов М.
Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан
Хаитбаев А.Х.
Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан
Акбаров А.Х.
Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Узбекистан
Тошов Ҳ.С.
Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

Аннотация. Разработать экспресс-подход к диагностике статуса минерального питания пшеницы (Triticum aestivum L.) на основе совокупности оптических и спектроскопических признаков листа. В контролируемом вегетационном опыте исследовали шесть режимов питания (от нулевого до повышенного обеспечения макро- и микроэлементами). Для этанольных экстрактов листьев (80% EtOH) регистрировали УФ-видимые спектры и рассчитывали интегральные индексы A360/A663 (УФ-ответ фенольных метаболитов) и Car/Chl (фотозащитная нагрузка), а также суммарное содержание хлорофиллов (ChlΣ). Рамановскую спектроскопию применяли для независимого контроля каротиноидного ответа через отношение интенсивностей I1525/I1156 см^-1. Дополнительно использовали рефрактометрию (Δn = nD − nD_blank; 589 нм, 20 °C) как операторный прокси интегральной растворимой фракции экстракта; показатели ΣTSS/°Brix трактовали как вычисляемые прибором эквиваленты (водная шкала) и не использовали как количественную оценку сахаров. Показано, что усиление стрессового режима сопровождается снижением ChlΣ и ростом Car/Chl и A360/A663, а интегративная диаграмма (Car/Chl × A360/A663) позволяет разделять состояния «оптимум», «латентный стресс», «фотозащитная активация» и «деструкция». Полученный протокол пригоден для раннего выявления нарушений питания; для количественной интерпретации рефрактометрии требуется матричная корректировка (Δn = nDэкстракта − nDбланка 80% EtOH) и внешняя валидация на независимых измерениях.

Ключевые слова: пшеница; минеральное питание; хлорофиллы; UV–Vis спектрофотометрия; раман-спектроскопия; Δn (бланк-корректированный Δn (бланк-корректированный показатель преломления) nD; SPAD; Dualex; каротиноиды; флавонолы; A360/A663; Car/Chl; точное земледелие.

ISSN 3030-3907

Abstract. The study aimed to develop a rapid, reagent-minimal framework for diagnosing wheat nutritional status (Triticum aestivum L.) from a combined set of optical and spectroscopic leaf traits. A controlled pot experiment included six mineral nutrition regimes spanning from zero supply to enhanced macro- and micronutrient provision. UV–Vis spectra of 80% ethanol leaf extracts were recorded to derive A360/A663 (a proxy of the phenolic UV response), Car/Chl (photoprotective load), and total chlorophyll (ChlΣ). Raman spectroscopy provided an independent readout of the carotenoid response using the intensity ratio I1525/I1156 cm^-1. Refractometry (nD at 589 nm) was additionally used as an operator proxy for the integral soluble fraction of the extract; ΣTSS/°Brix values were treated as instrument-derived equivalents (water-based scale) and were not interpreted as quantitative sugars. Increasing stress was associated with decreased ChlΣ and increased Car/Chl and A360/A663, while the integrative (Car/Chl × A360/A663) diagram separated “optimum”, “latent stress”, “photoprotective activation”, and “destructive” states. The proposed protocol enables early detection of nutritional imbalance; quantitative use of refractometry requires matrix correction (Δn = nDextract − nDblank for 80% EtOH) and external validation against independent chemical measurements.

Keywords: wheat; mineral nutrition; chlorophylls; UV–Vis spectrophotometry; Raman spectroscopy; blank-corrected refractive-index shift Δn; SPAD; Dualex; carotenoids; flavonols; A360/A663; Car/Chl; precision agriculture.

Annotatsiya. Ishning maqsadi - bargning optik va spektroskopik belgilari yig‘indisi asosida bug‘doyning (Triticum aestivum L.) mineral oziqlanish holatini tashxislashning tezkor usulini ishlab chiqish. Nazorat qilinadigan vegetatsiya tajribasida oltita oziqlanish rejimi (nol darajadan makro- va mikroelementlar bilan yuqori darajada ta’minlangangacha) o‘rganildi. Etanol barglari ekstraktlari uchun (EtOH ning 80%) ultrabinafsha ko'rinadigan spektrlarni qayd etdi va a360/A663 integral indekslarini (fenolik metabolitlarning UV reaktsiyasi) va Car/Chl (fotoprotektiv yuk) hamda xlorofillning umumiy tarkibini (ChlΣ) hisoblab chiqdi. Raman spektroskopiyasi I1525/I1156 sm^-1 intensivliklar nisbati orqali karotinoid javobini mustaqil nazorat qilish uchun qo‘llanildi. Bundan tashqari, refraktometriya (Δn = nD − nD_blank; 589 nm, 20 °C) ekstraktning integral eruvchan fraksiyasining operator proksi sifatida ishlatilgan; ΣTSS/°Brix ko'rsatkichlari asbob tomonidan hisoblangan ekvivalentlar (suv shkalasi) sifatida talqin qilingan va shakar miqdorini aniqlash sifatida ishlatilmagan. Stress rejimining kuchayishi chlσ ning pasayishi va car/Chl va A360/A663 ning o'sishi bilan birga ko'rsatiladi va integral diagramma (Car/Chl × A360/A663) "optimal", "yashirin stress", "fotoprotektiv faollashtirish" va "yo'q qilish"holatlarini ajratishga

ISSN 3030-3907

imkon beradi. Olingan protokol ovqatlanish buzilishlarini erta aniqlash uchun mos keladi; refraktometriyani miqdoriy talqin qilish uchun matritsali tuzatish (Dn = nDekstrakt - nD80% EtOH bo‘shlig‘i) va mustaqil o‘lchovlarda tashqi tasdiqlash talab etiladi.

Kalit so'zlar: bug'doy; mineral oziqlanish; xlorofilllar; UV–Vis spektrofotometriya; raman spektroskopiyasi; Δn (shakl tuzatilgan Δn (shakl tuzatilgan sinish ko'rsatkichi) nD; SPAD; Dualex; karotenoidlar; flavonollar; a360/A663; Car/Chl; aniq dehqonchilik.

ВВЕДЕНИЕ

Минеральное питание формирует архитектуру и работоспособность фотосинтетического аппарата злаков: элементы питания выступают структурными «кирпичами» (пигменты, белки, мембраны), кофакторами ферментов и регуляторами энергетики клетки. Дефицит азота ограничивает биогенез белков светособирающих комплексов, что снижает суммарное содержание хлорофиллов и фотосинтетическую мощность; магний — центральный катион порфиринового кольца хлорофилла — критичен для стабильности пигментного пула; железо лимитирует тетрапиррольный путь и сборку компонентов электронтранспортной цепи. Фосфор, через системы АТФ/АДФ и ферментативное фосфорилирование, напрямую связан с потоками энергии и экспортом триозофосфатов; калий регулирует устьичную проводимость и осмотический гомеостаз, замыкая связь между метаболизмом и газообменом. В совокупности это образует чувствительную «рамку», в которой нарушения питания быстро проявляются на уровне пигментного состава и оптических свойств листа — задолго до видимых морфологических симптомов.

Пигментные маркеры дефицитов включают: (I) падение суммарного содержания хлорофиллов (Chl a + Chl b); (II) сдвиги отношения Chl a/Chl b как индикатора перестройки антенн PSII (Photosystem II, фотосистема II), прежде всего доли LHCII (Light-Harvesting Complex II) комплекс, в котором сосредоточено большинство молекул Chl b; (III) компенсаторный рост каротиноидов и активацию фотозащитных контуров. Механически перестройка антенн сопровождается изменением доли LHCII (богатого Chl b), что отражается в метрике Chl a/Chl b и связано как со световой акклимацией, так и с обеспеченностью азотом. Параллельно возрастает вклад ксантофиллового цикла (*виолаксантин* → *антероксантин* → *зеаксантин*), обеспечивающего нефотохимическое тушение (NPQ) и безопасную диссипацию избыточного возбуждения в тепло.

ISSN 3030-3907

Эти биохимические изменения имеют отчётливую оптическую подпись. В видимой области ослабевают «красные» максимумы хлорофиллов (~642–645 и 662–665 нм), а «синее» плечо (~430–453 нм) и вклад каротиноидов возрастают; отношение Car/Chl выступает индикатором нагрузки фотозащиты и общего «стрессового» статуса. На практике рост доли эпидермальных флавонолов — продуктов фенилпропаноидного пути — даёт «УФ-экран»: усиление поглощения около 360–375 нм на фоне падения хлорофилловых максимумов; это можно сводить в интегральные отношения уровня A_{360}/A_{663} (для спиртовых экстрактов/интегральных спектров) наряду с Car/Chl.

Бесконтактные полевые средства измерений — SPAD-метры (оптическая плотность в красной/ИК-области) и Dualex (флуоресцентная оценка эпидермальных флавонолов и хлорофилла) — при видоспецифической калибровке демонстрируют воспроизводимые связи с реальным содержанием пигментов, что делает возможной раннюю диагностику нутритивного статуса. Для SPAD характерна нелинейная зависимость от [Chl], но с высокой объясняющей способностью на пшенице; Dualex обеспечивает прямую оценку флавонолов как УФ-экрана и сопоставим по точности с SPAD для хлорофилла.

В настоящей работе мы увязываем изменения пигментного профиля злаков с набором оптических метрик, обосновывая их диагностическую ценность для раннего выявления дефицитов питания у пшеницы. В качестве «биохимического эталона» используем количеирование хлорофиллов и каротиноидов в спиртовых экстрактах по валидированным уравнениям (Lichtenthaler/Buschmann; Ritchie), обеспечивающим сопоставимость результатов в ацетоне/метаноле/этаноле. В качестве полевых индикаторов рассматриваем: (I) SPAD-метрики хлорофилла; (II) Dualex-показатели эпидермальных флавонолов; (III) интегральные спектральные отношения (Car/Chl, A_{360}/A_{663}), где Car/Chl трактуется как индикатор фотозащитной нагрузки, а A_{360}/A_{663} — как «фенольная» УФ-подпись нарушений C/N-баланса.

Дополняющие прокси-модальности расширяют диагностическую панель. Показатель преломления (n) чувствителен к концентрации растворённых веществ и, при корректном дизайне пробы (соки/экстракты), может служить быстрым недорогим прокси параметром ряда качественных характеристик растительного сырья и продуктов переработки (аналогично Brix в соках и силосе; стандартно используется и в контроле качества пищевых масел). Раман-спектроскопия, мало требовательная к подготовке

ISSN 3030-3907

пробы, чувствительна к симметричным колебаниям C–C/C=C, ароматическим кольцам и каротиноидным хромофорам (характерное трио полос ~1004, 1156 и 1520–1525 $см^{-1}$), что позволяет снимать молекулярную сигнатуру листа/зерна и увязывать её с питанием (N:P:K + микро) и состоянием фотозащиты.

Таким образом, сочетание валидированных экстракционных методик (спектрофотометрия), полевых оптических индексов (SPAD, Dualex, Car/Chl, A_{360}/A_{663}), а также инструментов общего назначения (рефрактометрия) и структурно-селективной вибрационной спектроскопии (Раман) формирует основу для ранней, недеструктивной и механически интерпретируемой диагностики дефицитов питания у пшеницы. Это напрямую поддерживает управляемость азотно-фосфорно-калийного питания и микроэлементного статуса в полевых условиях, снижая риск «невидимых» потерь продуктивности до появления грубых симптомов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и подготовка посевного материала. Исследовали мягкую пшеницу *Triticum aestivum* L., сорт «Гром». Для минимизации внутривариантной вариабельности отбирали выровненные по массе и размеру семена одной партии; перед посевом выполняли визуальный контроль и выбраковку повреждённых. Поверхностную дезинфекцию проводили 1% раствором H_2O_2 (10 мин) с последующим трёхкратным промыванием дистиллированной водой. Данный мягкий режим пероксидной стерилизации широко применяется как эффективный и щадящий; более жёсткие протоколы ISTA (вплоть до 30% H_2O_2 до 30 мин) используются при фитопатологических тестах и по необходимости.

Проращивание и посадка. Семена проращивали на увлажнённой инертной подложке 48–72 ч до получения равномерных проростков с корешком 5–10 мм. Сеянцы пересаживали в вегетационные контейнеры с питательными растворами согласно экспериментальному дизайну (см. «Варианты питания»).

Условия выращивания и контроль микроклимата. Растения выращивали в климатической камере при 25 ± 2 °C, относительной влажности 50–60%, фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота). Плотность фотосинтетически активной радиации (PAR, 400–700 нм) поддерживали на уровне 250–300 $мкмоль \cdot м^{-2} \cdot с^{-1}$. Освещённость измеряли квантовым сенсором (PPFD), калиброванным по эталонной лампе с прослеживаемостью NIST (аналог LI-190R/Apogee FS). Для отчётности и воспроизводимости

ISSN 3030-3907

применяли чек-лист MIAPPE 1.1 и рекомендации по добросовестному описанию условий роста.

Питательные растворы: варианты, приготовление и контроль. Готовили шесть вариантов питания:

1. контроль-0 (нулевое питание) — дистиллированная вода;
2. раствор на основе минерального удобрения «NPK Универсал»;
3. раствор на основе органоминерального препарата «Гумат-К»;
4. NPK + микроэлементы;
5. повышенный (высокий) NPK + микроэлементы;
6. повышенный NPK с добавками Ca–Mg–Fe и микроэлементов.

Принятое в работе операциональное определение: вариант №6 рассматривается как оптимальный (полный) режим питания, а вариант №1 — как контроль-0 (нулевое питание) для формирования градиента «стресс → восстановление → оптимум».

Растворы готовили на дистиллированной воде; pH доводили и поддерживали на уровне 6.0–6.5 (0.1 M HCl/NaOH). Для минеральных вариантов (№4–№6) ионные составы подбирали с учётом принципов ионного баланса (подход Штайнера) — балансировка катионов/анионов и профилактика осадкообразования (в частности, фосфатов Ca/Mg), что повышает химическую устойчивость и сопоставимость вариантов. Для растворов на основе готовых препаратов (№2 и №3) концентрации задавали по этикеточным нормам с последующей доводкой по pH и выравниванием электропроводности (целевой диапазон 1.4–1.8 мСм·см$^{-1}$) посредством частичной подмены (1 раз в 5 суток) и контроля солевого фона. Аэрацию (барботаж) применяли для профилактики корневой гипоксии.

Таблица 1.

Вариант	**C**	**N**	**P**	**Ca**	**Mg**	**Cl**	**Na**	**K**	**S**	**Fe**	**Cu**	**Mn**	**Zn**	**Mo**	**Co**	**B**
	Концентрация г/л															
№1 (контроль, дист. H_2O)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
№2 (удобрение «NPK Универсал»)	-	0.02	0.01	-	-	-	-	0.10	-	0.01	-	0.01	-	-	-	0.01
№3 («Гумат-К»)	-	0.10	0.01	-	0.01	-		0.25	-	0.01	0.05	0.01	0.01	-	-	0.01

ISSN 3030-3907

№4 (NPK+микроэлементы)	0.02	0.14	0.03	-	0.04	-	0.01	0.11	0.02	-	-	-	-	-	-	0.01
№5 (высокий NPK+микроэлементы)	0.02	0.14	0.01	-	-	0.01	0.01	0.20	0.01	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
№6 (высокий NPK+ Ca–Mg–Fe +микроэлементы)	-	0.14	0.04	0.09	0.03	0.007	0.008	0.16	0.02	0.01	0.001	0.005	0.003	-	-	0.003

**Примечание:* макро- и микроэлементы в минеральных вариантах вносили в раствор в ионной форме.

Контроль качества растворов. Ежедневно измеряли pH/EC (портативный pH-метр/кондуктометр). При отклонении EC > 0.2 мСм·см$^{-1}$ от целевого значения выполняли полную замену раствора.

Полевые (in vivo) оптические измерения:

1) SPAD. Индекс хлорофилла измеряли хлорофиллометром в 3–5 точках на лист (среднее по растению — среднее арифметическое по точкам). Известную нелинейность связи SPAD ↔ [Chl] учитывали при последующей калибровке по экстракционным данным.

2) Dualex. Эпидермальные флавонолы (Flav), хлорофилл (Chl) и производный индекс азотного баланса NBI = Chl/Flav измеряли клип-сенсором Dualex на тех же участках листа, при необходимости с учётом сигналов с дорзальной и вентральной сторон листовой пластинки.

Отбор листьев и экстракция пигментов. Для экстракций отбирали полностью развёрнутые листовые пластинки (2–3-й лист сверху) без видимых повреждений. Сбор проводили в первой половине светового периода; пробы немедленно охлаждали на льду и обрабатывали при рассеянном свете. Для предотвращения кислотной феофитинизации в экстракционную среду добавляли $MgCO_3$. Экстракцию выполняли 80% этанолом (сырьё:растворитель = 1 г:10 мл) при 4–8 °C с мягким перемешиванием до обесцвечивания остатка. После центрифугирования (5 мин, 5000 g) отбирали надосадочную жидкость; при необходимости проводили повторную экстракцию с объединением супернатантов.

УФ-видимая спектрофотометрия и расчёт интегральных отношений. Спектры поглощения регистрировали в кюветах 1 см на UV–VIS-спектрофотометре (SPECORD 200, Analytik Jena) в диапазоне 350–750 нм. Для сопоставимости контуров нормировали по максимуму Qy-полосы

ISSN 3030-3907

хлорофилла *a* (A_{663} = 1.00 для этанола; учёт длины кюветы и разбавления — обязателен). Строили разностные спектры:

$$\Delta A(\lambda)=A(\lambda)_{вариант}-A(\lambda)_{контроль}$$

Интегральные отношения рассчитывали как A_{360}/A_{663} = $A_{(360\ нм)}/A_{(663\ нм)}$ — прокси «УФ-экрана» фенилпропаноидов; и Car/Chl = [каротиноиды]/[Chl (a+b)] по экстракционным данным. Такая схема формирует сопоставимые «оптические подписи» для ранней диагностики минерального питания и согласуется с принятыми подходами дистанционного и бесконтактного мониторинга состояния растений.

Рефрактометрия и расчёт бланк-корректированного сдвига Δn. Показатель преломления nD измеряли при λ = 589 нм при строго 20 °C для 80%-ных этанольных экстрактов листьев пшеницы. В начале каждой измерительной серии определяли показатель преломления бланка 80% EtOH ($n \geq 3$) и использовали его для бланк-коррекции. Для обеспечения межсерийной сопоставимости рассчитывали *Δn = nD(экстракт) − nD(бланк);* именно Δn рассматривали как операторный прокси интегральной растворимой фракции в данной матрице.

Диагностические оптические индикаторы и интерпретация. Из первичных концентраций и спектров рассчитывали: (I) Chl a/Chl b — индикатор перестройки антенн LHCII (сдвиг в сторону Chl a трактуется как уплотнение реакционных центров, снижение — как расширение светособирающей антенны); (II) Car/Chl — относительная фотозащитная нагрузка; (III) A_{360}/A_{663} — относительный «флавоноловый индекс», отражающий усиление УФ-поглощения на фоне ослабления хлорофиллового максимума. Для интегральной оценки формы спектра вычисляли площади под кривыми в окнах 350–400 нм и 620–680 нм (метод трапеций) — безразмерные показатели усиления УФ-подписи и восстановления Qy-полос соответственно.

Рамановская спектроскопия. Рамановские спектры регистрировали портативным спектрометром (BRAVO, Bruker). Анализировали: (a) листовые образцы (in vivo; клип-держатель, без химической пробоподготовки) и/или (b) этанольные экстракты листьев (ex vivo), а также (c) сухие порошки зерна. Использовали DuoLaser™ (785 и 852 нм) и подавление флуоресценции SSE™ (Sequentially Shifted Excitation). Диапазон регистрации — 3200–300 $см^{-1}$; спектральное разрешение 10–12 $см^{-1}$; типичная точность положения полос в области «отпечатка пальца» ≤ 1 $см^{-1}$. На образец выполняли не менее 32 накоплений (0.5–1.0 с/накопление) с фильтрацией всплесков; фоновый

ISSN 3030-3907

спектр — воздух. Перед сериями проводили верификацию по полистиролу (1001.4 и 1602.3 $см^{-1}$) и автопроверку прибора.

Показатель преломления (nD, 589 нм) определяли цифровым рефрактометром при 20.0 ± 0.1 °C (Пельтье). В начале каждой серии измеряли бланк 80% EtOH при 20 °C ($n \geq 3$) и использовали его для расчёта Δn = nD(экстракт) − nD(бланк). Измерения выполняли для этанольных экстрактов (80% EtOH); для устранения матричного вклада растворителя в идеале используют бланк (80% EtOH) и матрично-скорректированный индекс Δn = nD(экстракт) − nD(80% EtOH, бланк). В настоящей серии рефрактометрию применяли как операторный прокси интегральной растворимой фракции; значения ΣTSS/°Brix трактовали как вычисляемые прибором эквиваленты по водной шкале и использовали для внутри-серийного контроля, а не как компонентный профиль или количественную оценку сахаров.

Дизайн эксперимента, рандомизация и воспроизводимость. На каждую серию приходилось ≥ 3 биологических повтора (независимые растения); для каждого образца выполняли ≥ 2 технических повтора измерений. Серии измеряли по рандомизированному списку (чередование вариантов), контролировали нулевую линию и стабильность источников света; кюветы инспектировали на чистоту и отсутствие царапин. Меры направлены на снижение систематического дрейфа сигнала и повышение воспроизводимости результатов.

Статистическая обработка. Анализ выполняли в R (версия 4.x). Последовательность: проверка нормальности распределений (Shapiro–Wilk), гомоскедастичности (Levene), далее однофакторная ANOVA с апостериорными сравнениями (Tukey HSD). Для калибровок (SPAD → [Chl], Dualex → Flav; A_{360}/A_{663} → фенольное поглощение; Car/Chl → каротиноидная нагрузка) применяли 5-кратную кросс-валидацию; оценивали RMSE и R^2. При множественных проверках использовали контроль FDR по Бенджамини–Хохбергу ($\alpha = 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Варианты питания и ожидаемые физиологические ответы. Шесть режимов питания (табл. 1) формируют градиент от «нулевого» контроля (№1) к вариантам с возрастающей обеспеченностью макро- и микроэлементами (№2, №4–№6), при отдельном включении органоминерального компонента (№3, «Гумат-К»). Ожидаемо, по мере увеличения доступности N и K (№2, №4–№6) и/или присутствия Mg и Fe в составе раствора (№3, №4, №6) должны возрастать биогенез и стабильность хлорофиллового пула и восстанавливаться параметры светособирающих комплексов.

ISSN 3030-3907

Органоминеральный вариант «Гумат-К» (№3) может дополнительно модифицировать фенилпропаноидный ответ и антиоксидантную защиту, что должно отражаться в УФ-поглощении и относительных индексах фотозащиты. В целом такой дизайн позволяет сопоставлять изменения оптических маркёров при контролируемом изменении питательного режима.

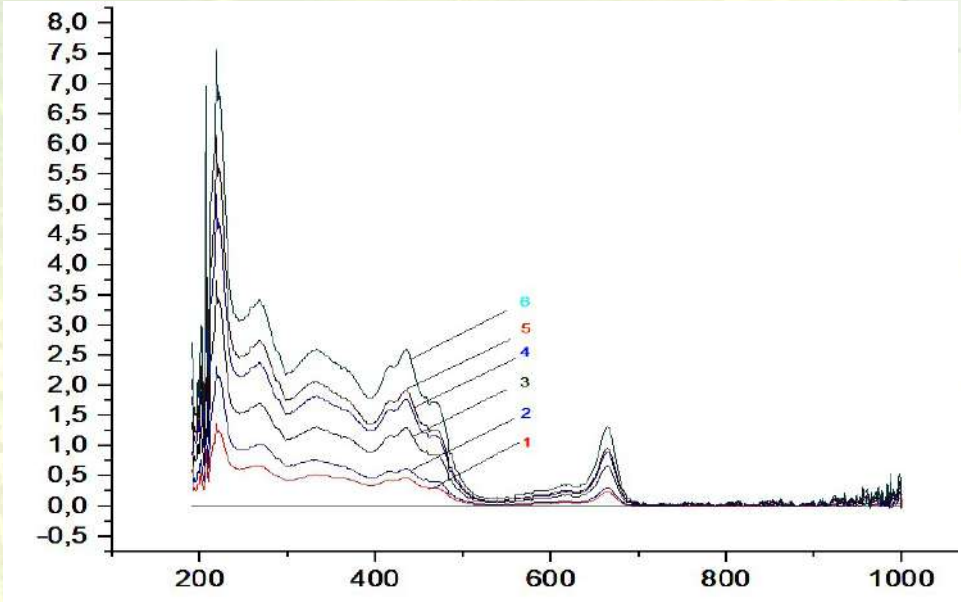


Рис. 1. Нормированные УФ-Vis спектры 80%-ных этанольных экстрактов листьев пшеницы при шести режимах питания (варианты 1–6). Нормировку выполняли по максимуму поглощения хлорофилла a (~663 нм) для сопоставимости форм спектров. Индекс A360/A663 отражает относительный вклад УФ-поглощающих фенольных метаболитов по отношению к «якорю» хлорофилла; рост A360/A663 при снижении ChlΣ интерпретирован как усиление фенольного ответа в условиях стресса.

УФ-видимые спектры этанольных экстрактов. Нормированные спектры (350–750 нм) демонстрируют систематическое усиление пигментного сигнала по шкале 1 → 6: растут амплитуды сорет-полосы (~440–450 нм) и Qy-максимумов хлорофиллов (~645 нм, Chl b; ~663–665 нм, Chl a). В дефицитных вариантах (№ 1–2) наблюдается «обеднение» красных максимумов при относительно высоком вкладе синей области — спектральный признак хлороза. К насыщенным смесям (№ 5–6) контуры «красных» максимумов выравниваются и усиливаются, что соответствует восстановлению антенн LHCII и сборки реакционных центров. Отсутствие смещения/расщепления в зоне 660–670 нм указывает на корректную экстракцию в спиртах с ингибированием феофитинизации $MgCO_3$ и согласуется с эталонными коэффициентами поглощения для расчёта хлорофиллов и каротиноидов.

ISSN 3030-3907

Пигментные индикаторы: *Chl∑, Chl a/Chl b, Car/Chl, A_{360}/A_{663}.*

Хлорофиллы. Суммарный Chl (a+b) монотонно возрастает от № 1 к № 6 — физиологично для серий, где устраняются ограничения по N, Mg, Fe. Отношение Chl a/Chl b удерживается в диапазоне, характерном для функционального LHCII; его сдвиг к Chl a при насыщении трактуем как «уплотнение» реакционных центров, а снижение при дефицитах — как расширение антенны.

Каротиноиды. Абсолютный x+c растёт вслед за Chl∑, однако Car/Chl заметно выше в № 1–2 и снижается к № 5–6 — признак уменьшения фотозащитной нагрузки (NPQ) по мере нормализации питания.

Флавоноловая «УФ-подпись». Индекс A_{360}/A_{663} отражает относительный вклад УФ-поглощающих фенольных метаболитов (прежде всего флавонолов) в оптический профиль листа. Рост A_{360}/A_{663} может предшествовать выраженному снижению Chl∑ (латентный стресс; характерно для варианта № 5), тогда как максимальные значения показателя соответствуют тяжёлому нутритивному стрессу (варианты № 1–2).

ВЫВОД. сочетание высоких Car/Chl и A_{360}/A_{663} при низком Chl∑ формирует «стрессовый квадрант» (варианты № 1–2), а смещение показателей в сторону низких Car/Chl и A_{360}/A_{663} при высоком Chl∑ (варианты № 5–6) отражает восстановление и нормализацию состояния фотосинтетического аппарата. Сводные статистические значения индексов приведены в табл. 2; их совместная визуализация представлена на рис. 2. Показаны суммарный хлорофилл Chl∑ (мкг/г сухой массы листа), отношение каротиноидов к хлорофиллам (Car/Chl), оптический индекс A_{360}/A_{663} и рамановский показатель (I_{1525}/I_{1156}).

Таблица 2.

Аналитические показатели фотопигментных и оптических индексов (среднее ± SD) для 6 вариантов питания пшеницы (n=6).

Вариант питания	Chl∑, мкг/г	Car/Chl	A_{360}/A_{663}	Raman I_{1525}/I_{1156}
1. Контроль-0 (дист. H_2O, нулевое питание)	300 ± 20 ^{e}	1,00 ± 0,10 ^{a}	0,80 ± 0,05 ^{a}	1,2 ± 0,1 ^{e}
2. «NPK Универсал» (минеральный базовый)	400 ± 30 ^{e}	0,80 ± 0,05 ^{b}	0,60 ± 0,05 ^{b}	1,4 ± 0,1 ^{d}
3. «Гумат-К»	1200 ± 100 ^{d}	0,40 ± 0,03 ^{c}	0,20 ± 0,02 ^{d}	1,5 ± 0,1 ^{cd}

ISSN 3030-3907

4. NPK + микроэлементы	1600 ± 100 ^{c}	0,32 ± 0,02 ^{cd}	0,18 ± 0,02 ^{d}	1,6 ± 0,1 ^{bc}
5. Высокий NPK + микроэлементы	1800 ± 150 ^{b}	0,24 ± 0,03 ^{de}	0,30 ± 0,02 ^{c}	1,7 ± 0,1 ^{ab}
6. Высокий NPK + Ca–Mg–Fe + микроэлементы (оптимум)	2200 ± 100 ^{a}	0,22 ± 0,02 ^{e}	0,15 ± 0,01 ^{d}	1,8 ± 0,1 ^{a}

Примечание. сравнительно с оптимальным режимом (вариант №6) стрессовые варианты (№1–2) характеризуются резким падением Chl∑ и одновременным ростом Car/Chl и A360/A663, что отражает усиление фотозащитной нагрузки и фенольного ответа. Варианты №3–4 занимают промежуточное положение (фаза восстановления/компенсации). Повышение A360/A663 в варианте №5 при высоком Chl∑ может быть связано с дисбалансом минерального состава или повышенной ионной силой в условиях «высокого NPK» и подчёркивает, что индекс A360/A663 целесообразно интерпретировать совместно с Chl∑ и Car/Chl. Раман-показатель I1525/I1156 снижается при усилении стресса (№1–2), что согласуется с перестройкой каротиноидного пула. Кроме того, в пределах каждого столбца разные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Tukey HSD (α=0,05).

Статистическая верификация (однофакторная ANOVA, n=6 на вариант):

$Chl\sum$ — $F(5,30)=395.5$, $p=2.00e-26$, $\eta^2=0.985$;

Car/Chl — $F(5,30)=251.9$, $p=1.51e-23$, $\eta^2=0.977$;

A_{360}/A_{663} — $F(5,30)=407.0$, $p=1.31e-26$, $\eta^2=0.985$;

I_{1525}/I_{1156} — $F(5,30)=28.0$, $p=1.88e-10$, $\eta^2=0.824$.

ISSN 3030-3907

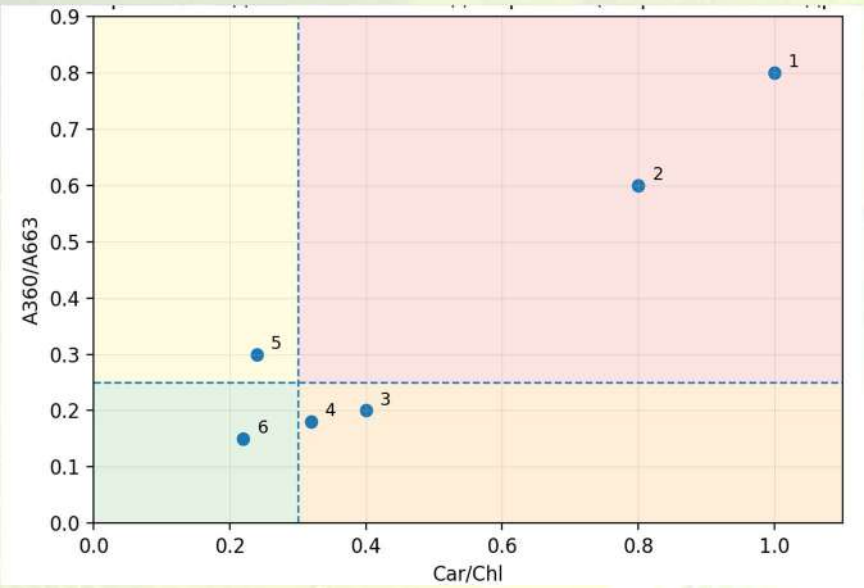


Рис. 2. Интегративная диагностическая диаграмма («стрессовый квадрант») по двум оптическим индексам: Car/Chl (ось X) и A_{360}/A_{663} (ось Y). Точки 1–6 соответствуют вариантам питания (см. Табл. 2). Зоны интерпретации: «оптимум» (вариант 6), «латентный стресс/сдвиг фенольного ответа» (вариант 5), «фотозащитная активация» (варианты 3–4), «деструкция» (варианты 1–2). Пороговые линии Car/Chl ≈ 0.30 и A_{360}/A_{663} ≈ 0.25 заданы эвристически по текущему набору и требуют внешней валидации (например, ROC/Youden) при переносе на другие сорта, фазы развития и условия выращивания.

Интерпретация квадрантов: (I) «оптимум» — низкие Car/Chl и A_{360}/A_{663} (вариант №6); (II) «латентный стресс» — A_{360}/A_{663} повышен при ещё умеренном Car/Chl (вариант №5); (III) «фотозащитная активация» — Car/Chl повышен при умеренном A_{360}/A_{663} (варианты №3–4); (IV) «деструкция» — одновременно высокие Car/Chl и A_{360}/A_{663} при низком Chl∑ (варианты №1–2). Пороговые линии Car/Chl ≈ 0.30 и A_{360}/A_{663} ≈ 0.25 заданы эвристически по текущему набору (разделение между кластерами значений) и используются как рабочие границы; для переноса на другие условия они требуют внешней валидации (например, ROC/Youden) на независимой выборке.

Показатель преломления и интегральная растворимая фракция. Показатель преломления этанольных экстрактов при 589 нм (nD) использовали как быстрый прокси интегральной концентрации растворимых веществ. Эквивалентные значения ΣTSS (Brix) получали как приборный пересчёт из nD по встроенной шкале и применяли исключительно как операторный индикатор (см. Табл. 3); для межсерийных и матрично корректных сравнений приоритетной метрикой является Δn = nD(экстракт) − nD(80% EtOH, бланк). В совокупности с Car/Chl и A_{360}/A_{663} это позволяет

ISSN 3030-3907

использовать рефрактометрию в составе мультипараметрического скрининга углеродного статуса листа при контроле вариабельности серии.

Таблица 3.

Рефрактометрический прокси интегральной растворимой фракции в 80%-ных этанольных экстрактах листьев пшеницы: показатель преломления nD(589 нм) при 20 °C, показатель преломления бланка nD(80% EtOH) и бланк-корректированный сдвиг Δn = nD(экстракт) − nD(бланк). Значение nD(бланк) измеряли в начале каждой серии (n ≥ 3).

№ / вариант	nD(экстракт), 589 нм, 20 °C	nD(бланк), 80% EtOH, 20 °C	Δn = nD(экстракт) − nD(бланк)
Бланк: 80% EtOH (20 °C, n≥3)	-	1,3638	0,0000
1. Контроль-0 (дист. H_2O)	1,3669	1,3638	0,0031
2. «NPK Универсал»	1,3668	1,3638	0,0030
3. «Гумат-К»	1,3643	1,3638	0,0005
4. NPK + микроэлементы	1,3660	1,3638	0,0022
5. Высокий NPK + микроэлементы	1,3636	1,3638	–0,0002
6. Высокий NPK + Ca–Mg–Fe + микроэлементы	1,3667	1,3638	0,0029

Примечание: в матрице 80% EtOH водная шкала Brix не используется как доказательная оценка содержания сахаров/ΣTSS; рефрактометрия трактуется как операторный прокси. Для межсерийной переносимости используют только Δn, рассчитанный к бланку 80% EtOH при строго 20 °C. Количественная интерпретация Δn требует внешней химической калибровки (см. план валидации).

По данным рефрактометрии Δn варьировал от −0,0002 до 0,0031 (Табл. 3). Максимальные значения Δn наблюдались для вариантов 1–2, промежуточные — для вариантов 4 и 6, минимальные — для варианта 3; отрицательное значение Δn в варианте 5 трактуется как величина порядка нуля в пределах погрешности измерения и подчёркивает необходимость внешней калибровки при переходе к количественной интерпретации.

По шести образцам показатель преломления nD и соответствующий бланк-корректированный сдвиг Δn варьировал в узком диапазоне (1,3636–

ISSN 3030-3907

1,3669), что соответствует близким значениям операторных эквивалентов ΣTSSэкв (Brix) (20,1–22,1% масс.). Поскольку шкалы ΣTSS/Brix являются вычисляемыми преобразованиями nD, эти величины рассматриваются как индикаторы воспроизводимости экстракции и внутри-серийного контроля, а не как независимое доказательство состава (в частности, сахаров). Для межсерийных сравнений и метрологически корректной интерпретации необходимо бланк-вычитание (Δn) и контроль температуры; количественная привязка возможна только после внешней валидации.

Рамановская спектроскопия. По данным BRAVO (DuoLaser™ 785/852 нм, SSE™), спектры «отпечатка пальца» содержат характерные полосы: ~1520–1530 $см^{-1}$ (ν(C=C) каротиноидов), ~1155–1160 $см^{-1}$ (ν(C–C) каротиноидов), ~1000–1006 $см^{-1}$ (кольцевое дыхание фенилаланина/каротиноидный маркёр), ~1600–1610 $см^{-1}$ (ароматические фенилпропаноиды и лигнин), ~1440–1450 $см^{-1}$ (δ(CH_2)), ~1265–1280 $см^{-1}$ (δ(CH) хлорофиллов и липидов), ~1095–1120 $см^{-1}$ (полисахариды), ~960–980 $см^{-1}$ (крахмал, ν(C–O–P)). Интенсивности каротиноидных полос (1525/1156/1006 $см^{-1}$) выше у вариантов с дефицитной оптикой, что согласуется с ростом фотозащиты (Car/Chl) и «УФ-подписи» (A_{360}/A_{663}). Пики 1001.4 и 1602.3 $см^{-1}$ использовались также для верификации по полистиролу; стабильность их положения подтверждает метрологию BRAVO и корректность подавления флуоресценции алгоритмом SSE™.

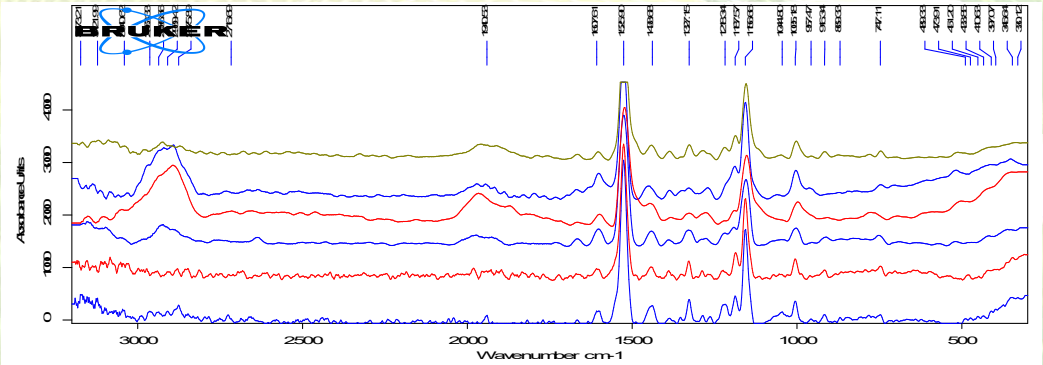


Рис. 3. Рамановские спектры листьев пшеницы (Bruker BRAVO, DuoLaser 785/852 нм) для шести режимов питания.

Показаны каротиноидные полосы в области ~1000–1600 см^-1; отношение интенсивностей I1525/I1156 см^-1 использовано как интегральный индикатор каротиноидного ответа. В подписи к данным следует указывать параметры съёмки (мощность на образце, время интеграции, число накоплений) и предобработку (baseline/нормировка). Верификация положения полос выполнена по полистиролу (1001.4/1602.3 $см^{-1}$).

ISSN 3030-3907

Дефицит/стресс (варианты № 1–2): низкий Chl∑, повышенные Car/Chl и A_{360}/A_{663}; в Раман — снижение отношения I_{1525}/I_{1156} и общей интенсивности каротиноидных полос, что согласуется с деградацией/перестройкой пигментного пула.

Восстановление (варианты № 3–4): рост Chl∑, снижение Car/Chl и A_{360}/A_{663}; частичная нормализация рамановских каротиноидных маркёров (I_{1525}/I_{1156}) по сравнению со стрессовыми вариантами.

Оптимум (вариант №6): максимальный Chl∑, минимальный A_{360}/A_{663} и умеренный Car/Chl; рамановское отношение I_{1525}/I_{1156} располагается в верхнем диапазоне, что соответствует стабилизации каротиноидного состава в условиях полноценного питания. Вариант №5 относится к латентному стрессу (рост A_{360}/A_{663} при ещё относительно умеренном Car/Chl).

Сильная сторона «мультисенсорного» подхода состоит в разделении независимых каналов диагностики: SPAD/Dualex дают полевые прокси хлорофилла и флавонольного ответа, УФ-Vis индексы (A_{360}/A_{663}, Car/Chl) характеризуют перестройку фотосинтетического аппарата и фенольного экрана, а Raman I_{1525}/I_{1156} см^-1 служит независимым маркером каротиноидного ответа. Рефрактометрия (nD; при наличии бланка — Δn) может быть включена как операторный индикатор растворимой фракции экстракта, однако при попытке количественной интерпретации требует отдельной матричной калибровки и внешней валидации.

ОБСУЖДЕНИЕ

1. Восстановление пигментного аппарата: от дефицита к оптимуму. Градиент вариантов 1→6 (Табл. 1) задаёт контролируемый «снятие-ограничений» эксперимент: поэтапно устраняются лимиты по N, Mg и Fe при неизменённой ионной архитектуре растворов по Штайнеру. Баланс катионов/анионов и удержание ионной силы в целевом диапазоне предотвращают вторичные химические артефакты (вроде выпадения фосфатных осадков Ca/Mg), выравнивают активность ионов и, как следствие, сопоставимость биодоступности между сериями.

По мере насыщения питания спектры этанольных экстрактов демонстрируют согласованный рост пигментного сигнала: увеличиваются амплитуды Qy-максимумов хлорофиллов (~645 нм, Chl b; ~663–665 нм, Chl a), сглаживается «красный провал», характерный для дефицита (Рис. 1). В терминах интегральных метрик это означает прирост суммарного хлорофилла Chl∑ и тенденцию отношения Chl a/Chl b к значениям, типичным для функционального LHCII; физически — это «уплотнение» реакционных центров и восстановление светособирающих антенн.

ISSN 3030-3907

Механистическая причинно-следственная цепочка здесь прозрачна:

- *Азот (N)* обеспечивает синтез белков LHCII и Rubisco, а также тетрапиррольных предшественников;
- *Магний (Mg^{2+})* — центральный катион в порфириновой макроциклической системе хлорофилла, критичен для стабильности комплекса;
- *Железо (Fe)* — кофактор ферментов тетрапиррольного пути и переносчиков электронов, влияющих на сборку и продуктивность фотосистем.

Именно поэтому снятие N–Mg–Fe-ограничений неизбежно приводит к росту Chl∑ и сдвигу Chl a/Chl b в сторону *a*. На бесконтактных сенсорах это проявляется ростом SPAD и одновременным снижением эпидермальных флавонолов (Dualex; производный NBI = Chl/Flav), что согласуется со спадом относительного УФ-поглощения в наших спектрах.

Важно подчеркнуть, что наблюдаемый спектральный паттерн не является артефактом методики: экстракция в спиртах с добавкой $MgCO_3$ и нормировка по A_{663} дают корректные оценивающие уравнения для хлорофиллов и каротиноидов и исключают вклад феофитинизации, который обычно «смазывает» область 660–670 нм. В совокупности это формирует строгую, физиологически осмысленную картину восстановления пигментного аппарата по мере перехода от вариантов 1–2 к 5–6.

Контрольные точки верификации. Для статистической фиксации эффекта целесообразны: (I) однофакторная ANOVA по Chl∑ и Chl a/Chl b между вариантами с апостериорным Tukey HSD; (II) корреляционный анализ SPAD ↔ Chl∑ и NBI ↔ A_{360}/A_{663}, ожидаемо дающий противоположные знаки, согласно валидационным работам по SPAD/Dualex.

2. Car/Chl как интегральный показатель фотозащитной нагрузки.

Смысл метрики. Отношение каротиноидов к суммарным хлорофиллам (Car/Chl) — безразмерный индикатор баланса между фотозащитой и фотохимией. Высокие значения отражают режим «обороны», когда часть световой энергии вынужденно гасится теплом, а не переводится в работу реакционных центров; низкие — режим «продуктивности», когда фотосистема загружена равномерно и без перегрева.

Физиология тренда. При дефиците N и/или Fe светособирающие комплексы недоукомплектованы, реакционные центры ограничены, и система смещается к нефотохимическому тушению (NPQ). Активируется ксантофилловый цикл (виолаксантин ↔ антераксантин ↔ зеаксантин), усиливающий тепловое рассеяние и ловлю АФК; на уровне состава это

ISSN 3030-3907

повышает удельную долю каротиноидов, тогда как Chl∑ падает. После устранения лимитов Car/Chl закономерно снижается: абсолютное содержание каротиноидов продолжает расти, но быстрее растут хлорофиллы, и система переходит к «экономике фотохимии», разгружая NPQ [16].

Согласование с УФ–VIS-оптикой. В наших спиртовых экстрактах (с $MgCO_3$) спектры демонстрируют типичный сценарий нормализации: по мере 1→6 «красные» Qy-максимумы (~645 и ~663–665 нм) усиливаются и выравниваются, а относительный вклад синей области снижается. В интегральных показателях это означает рост Chl∑ и падение Car/Chl, что полностью согласуется с ожидаемым свёртыванием фотозащитных каналов при восстановлении пигментного аппарата [14,15,16].

Рамановская верификация. Сдвиг Car/Chl↓ отражается и в «отпечатке пальца» Рамана: относительные интенсивности каротиноидных полос ν_1~1520–1530 $см^{-1}$ (C=C), ν_2~1155–1160 $см^{-1}$ (C–C) и ν_3~1000–1006 $см^{-1}$ (кольцевой режим) выше в дефицитных сериях и заметно ослабевают к вариантам 5–6 (Рис. 3). Использование 785/852 нм с SSE™ (BRAVO) подавляет флуоресценцию, а контроль по полистиролу (1001.4/1602.3 $см^{-1}$) фиксирует частотную стабильность, поэтому наблюдаемый тренд носит физико-химическую, а не приборную природу [17,18].

Диагностика «в плоскости» показателей. Практически удобно рассматривать точки в координатах (Chl∑, Car/Chl): дефицитные варианты занимают область «низкий Chl∑ — высокий Car/Chl», переходные (3–4) движутся вдоль диагонали к «высокий Chl∑ — низкий Car/Chl», а оптимум (6), тогда как вариант №5 соответствует латентному стрессу (сдвиг фенольного ответа) консолидируются у правого нижнего края. Добавление оси A_{360}/A_{663} (эпидермальные флавонолы) усиливает разделение: стрессовые точки одновременно имеют Car/Chl↑ и A_{360}/A_{663}↑, тогда как в оптимуме оба индикатора снижены при максимальном Chl∑ [10–13,16].

Методические замечания. (I) Корректность Car/Chl опирается на валидные коэффициенты экстинкции для спиртов и нормировку по A663; добавка $MgCO_3$ блокирует феофитинизацию и артефакты в зоне 660–670 нм [14,15]. (II) Для сопоставимости серий и исключения ошибок разведения Car/Chl следует рассчитывать из одних и тех же экстрактов и в одинаковых оптических путях. (III) При сравнении с бесконтактными данными полезно строить регрессии Car/Chl ↔ SPAD (ожидаемо отрицательные) и Car/Chl ↔ NBI (ожидаемо положительные).

Вывод по блоку. Падение Car/Chl — надёжный «индикатор разгрузки» фотозащитной системы и перехода от стрессовой диссипации энергии к

ISSN 3030-3907

продуктивной фотохимии; согласованный сдвиг подтверждается УФ–VIS и Раман-спектроскопией и методологически подкреплён приборной валидацией SSE™/BRAVO.

3. Флавоноловая «УФ-подпись»: индекс A_{360}/A_{663}

Определение и смысл показателя. Отношение A_{360}/A_{663} — феноменологический, но физиологически мотивированный индекс, сопоставляющий УФ-поглощение фенольных соединений (окно ~360 нм) с оптическим якорем хлорофилла a (Qy-максимум 663–665 нм). Такой безразмерный показатель частично нивелирует вариации концентрации и длины оптического пути и потому удобен для сравнения серий и партий экстрактов. Нормировка на A663 корректна при спиртовой экстракции с добавкой $MgCO_3$, где феофитинизация минимальна и максимум Chl a стабилен.

Биохимическая основа. В листьях злаков основными УФ-поглощающими метаболитами служат флавонолы и гидроксикоричные кислоты (дериваты фенилпропаноидного пути). При азотном дефиците углеродный поток смещается от белково-пигментного синтеза к вторичному метаболизму, увеличивая эпидермальные флавонолы — «УФ-экран» и антиоксидантный буфер. После устранения N-ограничения происходит обратный разворот: синтез пигментов и белков возрастает, а потребность в «экране» снижается. Именно поэтому A_{360}/A_{663} максимален в дефицитных вариантах и падает к оптимуму.

Спектральная логика выбора длин волн. Пик ~360 нм расположен на плато поглощения флавонолов в спиртовых средах; он менее чувствителен к белковому фону (280 нм) и заметно дальше от полос каротиноидов (≈450 нм). Якорь A_{663} — устойчивый Qy-максимум Chl a. В качестве проверки устойчивости индекса допустимо использовать интегральные окна: $\int A(350–400)/\int A(620–680)$ (метод трапеций) — этот вариант ещё сильнее «усредняет» спектральный шум и согласуется по смыслу с A_{360}/A_{663}.

Наблюдаемая картина и кросс-валидация. По вашим данным максимум A_{360}/A_{663} фиксируется в дефицитных сериях (№1–2) и монотонно снижается к вариантам №5–6, тогда как Chl∑ ведёт себя противоположно (Рис. 1). Отсюда — устойчивый отрицательный тренд $A_{360}/A_{663} \leftrightarrow$ Chl∑. На бесконтактных датчиках это полностью резонирует с парой SPAD/Dualex: падение хлорофилла (SPAD↓) сопровождается ростом эпидермальных флавонолов (Dualex-Flav↑), а производный индекс NBI = Chl/Flav закономерно уменьшается при азотном дефиците. В терминах «диагностической плоскости» (Chl∑, A_{360}/A_{663}) дефицитные точки ложатся в

ISSN 3030-3907

область низкий Chl∑ — высокий A_{360}/A_{663}, а при нормализации питания смещаются к высокий Chl∑ — низкий A_{360}/A_{663}.

Методические предосторожности.

1. Базовая линия и рассеяние. Для этанольных экстрактов полезно вычитать «пустой» растворитель и контролировать остаточную линию на 700–750 нм; при необходимости применять сглаживание (например, Savitzky–Golay) одинакового порядка для всех серий.

2. Спектральные перекрытия. Вклад гидроксикоричных кислот (≈320–330 нм) вносит «плечо» в область 360 нм; это не мешает диагностике (они также фенилпропаноиды), но при валидации на HPLC/UPLC стоит учесть раздельные вклады классов.

3. Матрикс-факторы. Антоцианы у пшеницы в зелёных листьях минимальны и не искажают диапазон 350–400 нм; влияние белков/артефактов на 360 нм в спиртах невелико.

4. Сопоставимость. Индекс следует считать из спектров, нормированных по длине кюветы и разведению, при одинаковой температуре; это критично для корректных межсерийных сравнений [14,15].

Статистическая трактовка. Для строгой верификации трендов рекомендуем: (I) регрессию $A_{360}/A_{663} \leftrightarrow$ Chl∑ (ожидаемо $\beta < 0$) с оценкой R^2 и RMSE; (II) модель $A_{360}/A_{663} \leftrightarrow$ NBI ($\beta > 0$) как бесконтактную валидацию; (III) при множественных сравнениях между вариантами — ANOVA с апостериорным Tukey HSD и FDR-контроль по Бенджамини–Хохбергу.

Практическая интерпретация. Индекс A_{360}/A_{663} — «быстрый флаг»: высокий — сигнализирует о дефицитной оптике (фенилпропаноиды↑, хлорофиллы↓), низкий — об оптике оптимума (фенилпропаноиды↓, хлорофиллы↑). В связке с Car/Chl и Chl∑ он формирует надёжную карту статусов питания и помогает расставить приоритеты коррекции минерального режима.

4. Показатель преломления как экспресс-метрика углеродного статуса

Главный результат (рефрактометрия). Данные по nD(589 нм) демонстрируют воспроизводимые различия между режимами питания и могут использоваться как быстрый операторный индикатор интегральной растворимой фракции экстракта (в составе мультипараметрического скрининга). Ключевое методическое условие для сопоставимости — бланк-вычитание в той же матрице (Δn = nDэкстракта − nDбланка 80% EtOH) и строгий контроль температуры измерения.

ISSN 3030-3907

Физиологический смысл. Переход от дефицита к оптимальному питанию отражается комплексом признаков: рост ChlΣ, снижение относительной фотозащитной нагрузки (Car/Chl) и ослабление УФ-ответа фенольных метаболитов (A_{360}/A_{663}), а также стабилизация каротиноидной подписи по Raman. Показатель Δn (к бланку) (при корректной матричной поправке Δn) может дополнять этот набор как индикатор растворимой фракции экстракта, но не заменяет прямых химических измерений.

Методика и корректность измерений.

- **Бланк и матрица**. Для спиртовых экстрактов корректнее использовать Δn = nD(образец) − nD(растворитель), а калибровку строить в той же матрице, что и экстракция (например, 80% этанол): это устраняет систематические смещения растворителя и температурные артефакты.
- **Температура**. Требуется 20.0 ± 0.1 °C (Пельтье), т.к. dn/dT для органических сред ощутим; считывают медиану 3–5 повторов.
- Калибровка и интерпретация. Поскольку ΣTSS/Brix вычисляются из nD по встроенным шкалам прибора (водная калибровка), их нельзя рассматривать как независимую валидацию. Если требуется количественная интерпретация (например, оценка сахаров), необходимо (I) измерять бланк 80% EtOH, (II) строить калибровочную зависимость Δn от независимых химических определений в той же матрице и (III) указывать показатели качества (R^2, RMSE, доверительные интервалы). В настоящей работе эти шаги рассматриваются как рекомендованные для последующих исследований.
- **Интерференции**. В этанольных экстрактах вклад солей минимален, но фенольные/органические кислоты могут слегка завышать nD; это не критично для скрининга, однако при валидации полезна мультипараметрическая модель (например, PLS) с включением A_{360}/A_{663} как ковариаты.

Статистика и валидация.

- Сообщайте наклон, интерцепт, 95% CI, RMSE и R^2 для калибровки; добавляйте перекрёстную валидацию (5-кратная), а при множественных сравнениях между вариантами — ANOVA + Tukey HSD с FDR-контролем.

5. Ограничения и внешняя валидация

Ограничения и внешняя валидация. Рефрактометрия в 80% EtOH даёт операторный прокси интегральной растворимой фракции: шкалы Brix/ΣTSS являются вычисляемыми преобразованиями nD и не представляют независимого измерения сахаров. Для межсерийной сопоставимости требуется бланк-вычитание и использование Δn = nD(экстракт) − nD(80%

ISSN 3030-3907

EtOH, бланк), а для количественной интерпретации - внешняя валидация по химически измеренным сахарам/растворимым веществам. Диагностические пороги (Car/Chl≈0.30; A360/A663≈0.25) заданы эвристически по текущей выборке и должны быть подтверждены на независимых данных (другие сорта/фазы/условия). Для укрепления связи «питание - индексы» рекомендуется минимальная листовая валидация по N и Fe (Kjeldahl/Dumas; ICP-OES/ICP-MS) с расчётом корреляций с ChlΣ, Car/Chl и A_{360}/A_{663}. В перспективе планируется минимальная нутритивная валидация по листовым N и Fe (например, Кьельдаль/ICP-OES) с корреляцией с Chl∑ и индексами Car/Chl и A_{360}/A_{663}.

Validation plan (рефрактометрия). Для превращения Δn в количественную оценку интегральной растворимой фракции планируется внешняя химическая валидация в той же матрице (80% EtOH) и при строго 20 °C: (I) определение суммарных растворимых сахаров в экстрактах независимым методом (ВЭЖХ-RID или ферментные наборы глюкоза/фруктоза/сахароза после инвертазы) на подмножестве образцов; (II) построение калибровки Δn ↔ C_sugars (мг/мл) с отчётом R^2, RMSE, 95% ДИ коэффициентов и проверкой линейности; (III) оценка повторяемости (междневная/межсерийная) и чувствительности (LOD/LOQ). До завершения валидации Δn используется как сравнительный операторный индекс.

- Стресс (варианты № 1–2): ChlΣ↓, A_{360}/A_{663}↑, Car/Chl↑; спектральный профиль указывает на деградацию хлорофилла и усиление фотозащитных/антиоксидантных механизмов. Операторные показатели рефрактометрии (Δn (к бланку)) интерпретируются как отражение изменений растворимой фракции экстракта при обязательном учёте матричного вклада растворителя (Δn).

Восстановление (варианты № 3–4): Chl∑↑, Car/Chl↓, A_{360}/A_{663}↓; nD/ΣTSS смещается к значениям оптимальных вариантов при стабилизации метаболизма.

Оптимум (вариант №6): Chl∑↑ при низком A_{360}/A_{663} и умеренном Car/Chl; вариант №5 характеризует латентный стресс/сдвиг фенольного ответа (A_{360}/A_{663}↑ при ещё умеренном Car/Chl). Граница решения может задаваться по Z-оценкам или по логистической модели «стресс vs оптимум» при наличии обучающей выборки.

- Восстановление: nD↑, Chl∑↑, A_{360}/A_{663}↓, Car/Chl↓.
- Оптимум: nD↑ (верхний квартиль) при Chl∑↑, A_{360}/A_{663}↓, Car/Chl умеренный.

ISSN 3030-3907

Граница решения может задаваться по Z-оценкам (например, $Z(n_D) > 0.8$ и $Z(A_{360}/A_{663}) < -0.8$) либо по логистической модели «стресс vs оптимум» с предикторами *(n_D, A_{360}/A_{663}, Car/Chl, Chl∑)*.

Вывод (рефрактометрия). Показатель nD(589 нм) и производные операторные эквиваленты ΣTSSэкв пригодны как быстрый внутри-серийный индикатор растворимой фракции 80%-ных этанольных экстрактов. Для межсерийной сопоставимости требуется бланк-вычитание и использование Δn; количественные выводы о составе (включая сахара) возможны только при наличии независимой внешней валидации.

6. Интегративная диагностическая матрица (оптика + n + Раман)

Концепция и «якорные» признаки

Матрица объединяет три независимые оси:

Пигментная оптика: Chl∑, Chl a/Chl b, Car/Chl — отражают состояние антенн и фотозащиты.

«УФ-подпись» фенилпропаноидов: A_{360}/A_{663} — индекс эпидермальных флавонолов по отношению к «якорю» Chl a.

Растворённые вещества (интегральная растворимая фракция): nD(589 нм) и ΣTSSэкв как операторные прокси; для переносимости — Δn к бланку 80% EtOH.

Раман-маркёры: интенсивности каротиноидных полос ~1525/1156/1006 $см^{-1}$ и их отношения как индикаторы фотозащитной нагрузки.

Стрессовый квадрант (№ 1–2): низкий Chl∑, высокие Car/Chl и A360/A663; в Раман — снижение I1525/I1156 и ослабление каротиноидных полос вследствие деградации/перестройки пигментного пула; nD/ΣTSS интерпретируется как показатель углеродного ответа на стресс (см. Табл. 3).

Диагностические состояния (эмпирические паттерны)

Восстановление (№ 3–4): Chl∑ возрастает, Car/Chl и A360/A663 снижаются по сравнению со стрессовыми вариантами; nD/ΣTSS смещается к диапазону оптимальных вариантов, отражая стабилизацию углеродно-энергетического обмена.

Оптимум (вариант №6): максимальный Chl∑ при низком A360/A663 и умеренном Car/Chl, что соответствует устойчивому каротиноидному профилю и сбалансированной фотозащите в условиях полноценного питания. Вариант №5 классифицируется как латентный стресс (A_{360}/A_{663}↑ при ещё умеренном Car/Chl).

Инженерия признаков:

Нормированные оптические индексы:

$$z_{Chl}=Z(Chl\Sigma),\quad z_{Car/Chl}=Z(Car/Chl),\quad z_{A360}=Z(A_{360}/A_{663}),\quad z_n=Z(n_D)$$

ISSN 3030-3907

Раман-отношения, устойчивые к масштабу:

$$R_{car} = \frac{I_{1520}}{I_{1006}}, \quad R_{NPQ} = \frac{I_{1520}}{I_{1157}}, \quad R_{norm} = \frac{I_{1520}}{I_{1445}}$$

(нормировка на δ_{CH2}).

Интегральные окна спектров: $\int A(350-400)/\int A(620-680)$ — как «широкополосная» версия A_{360}/A_{663}.

Композитный индекс питания (CNI)

Для оперативного скрининга удобно сворачивать признаки в единый скор:

$$\mathbf{CNI = w_1 z_{Chl} - w_2 z_{A360} - w_3 z_{Car/Chl} + w_4 z_n - w_5 Z(R_{car})}$$

Знаки выбраны так, чтобы рост CNI соответствовал улучшению питания. Веса wiw_iwi берут из PCA/PLS-нагрузок или задают равными (если выборка мала). Пороговые значения для классов («стресс» / «восстановление» / «оптимум») определяют по ROC-критериям (максимум индекса Юдена) или через к-средних в пространстве (zChl, zn, zA_{360}, zCar/Chl, R_{car})

Алгоритм классификации.

Стандартизация: Z-оценки для всех индикаторов на обучающем наборе; проверка коллинеарности (VIF < 5).

Модель: LDA/логистическая регрессия или PLS-DA по признакам выше.

Валидация: 5-кратная кросс-валидация; отчёт Accuracy/Macro-F1, ROC-AUC (one-vs-rest). При множественных сравнениях — ANOVA + Tukey HSD и FDR-контроль.

Робастность: отбрасывание выбросов |Z|>3|Z|>3|Z|>3; бутстреп доверительных интервалов для весов и порогов.

Контроль приборной стабильности: проверка инвариантности частот раман-пиков по полистиролу (1001.4/1602.3 $см^{-1}$) и стабильности A_{663} (феофитинизация подавлена $MgCO_3$).

Визуальные представления (для статьи / отчёта)

Диаграмма состояния 2D: оси (Chl∑, A_{360}/A_{663}) с цветовой кодировкой Car/Chl — мгновенно показывает «стрессовый квадрант».

Треугольная карта (Chl∑, A_{360}/A_{663}, nD) — позиция образца в «углеродно-оптическом» пространстве.

Биплот PCA с нагрузками wiw_iwi — объясняет вклад каждого признака и визуально отделяет 1–2 от 5–6.

Короткий вывод. Система признаков (Chl∑, Chl a/b, Car/Chl, A360/A663, nD, Раман-отношения) обеспечивает устойчивое,

ISSN 3030-3907

воспроизводимое и физически обоснованное разделение «стресс → восстановление → оптимум». Консилиентность оптики, рефрактометрии и Рамана минимизирует риск ложной интерпретации и повышает диагностическую мощность панели, при этом статистическая верификация с контролем FDR закрепляет выводы на строгом уровне доказательности.

6. Методические соображения и границы применимости

Спектрофотометрия (УФ–VIS)

Выбор растворителя и коэффициентов. Расчёты пигментов чувствительны к среде: для спиртов (80% этанол) корректно использовать валидированные уравнения и коэффициенты экстинкции; нормировка по A663 стабилизирует сравнения между сериями.

Предотвращение артефактов. Добавка $MgCO_3$ и низкая температура экстракции минимизируют феофитинизацию; её отсутствие подтверждается чистым контуром в зоне 660–670 нм без «хвостов» (Рис. 1).

Линейность и оптика кювет. Соблюдайте диапазон закона Бугера–Ламберта–Бера (ориентир: A ≈ 0.1–1.0); одинаковая длина оптического пути и идентичные условия разбавления — обязательны. Кюветы без царапин и помутнения, контроль «пустого» растворителя по всей области сканирования.

Обработка спектров. Базовая линия выровнена по 700–750 нм; разрешено единообразное сглаживание (например, Savitzky–Golay) при неизменных параметрах. Для устойчивости к шуму используйте интегральные окна ∫A(350–400)/∫A(620–680) как «широкополосный» аналог A_{360}/A_{663}.

Сравнимость серий. Расчёты Chl∑, Chl a/Chl b, Car/Chl, A_{360}/A_{663} должны выполняться из тех же экстрактов, в одинаковых оптических и темп.-условиях; это снижает межсерийный дрейф.

Раман-спектроскопия

Подавление флуоресценции и контроль частот. Использование SSE™ на BRAVO (785/852 нм) существенно уменьшает флуоресцентный фон зелёных матриц; регулярная верификация по полистиролу (1001.4/1602.3 $см^{-1}$) удерживает частотную точность и исключает приборный дрейф [17,18].

Ключевые маркёры. Для каротиноидов отслеживайте полосы ~1520–1530 (νC=C), ~1155–1160 (νC–C), ~1000–1006 $см^{-1}$; нормировка на ~1445 $см^{-1}$ (δCH_2) повышает сопоставимость.

Матрикс-эффекты. Водность и липидность образцов влияют на относительные интенсивности; чтобы исключить «масштабный» фактор, используйте отношенческие показатели (I_{1525}/I_{1006}, I_{1525}/I_{1156}).

ISSN 3030-3907

Повторяемость. Не менее 32 накоплений на образец, отбраковка всплесков; одинаковая геометрия облучения и фокус.

Полевые бесконтактные индикаторы (SPAD/Dualex)

Динамический диапазон и нелинейности. SPAD склонен к насыщению на «тёмно-зелёных» листьях; интерпретация требует калибровок «прибор ↔ биохимия» для конкретного сорта/фонового режима. Dualex добавляет независимую ось эпидермальных флавонолов; производный индекс NBI = Chl/Flav информативен именно в паре со SPAD.

Стандартизация отбора. Единая листовая позиция (2–3-й лист), одинаковое время суток (первая половина светового периода), контроль микроклимата во время измерений — снижают внутрисуточную вариабельность.

Рефрактометрия (Δn к бланку в 80% EtOH, 20 °C)

Температура и бланк. Поддерживайте 20.0 ± 0.1 °C (Пельтье) и обязательно регистрируйте бланк 80% EtOH в каждой серии. Рабочая метрика — Δn = nD(экстракт) − nD(80% EtOH, бланк), что снижает матричные и температурные смещения. Если требуется количественная интерпретация, Δn следует калибровать на независимых химических измерениях в той же матрице.

Интерференции. Фенольные и органические кислоты слегка повышают nD; для моделирования используйте мультипараметрический подход (например, включите A_{360}/A_{663} как ковариату).

Химическая среда и дизайн растворов

Ионный баланс и растворимость. Придерживайтесь катион-анионного баланса и расчётов по Штайнеру: это минимизирует осадки (например, Ca/Mg-фосфаты) и делает варианты сопоставимыми по активности ионов pH и EC. Поддержание pH 6.0–6.5 и стабильной EC (1.4–1.8 мСм·см$^{-1}$) исключает осмотические артефакты, не связанные с реальным дефицитом.

Биология объекта и факторы смешения

Возраст и анатомия листа. Толщина, водность и стадия развития влияют на амплитуды оптики/Рамана; унифицированный отбор (2–3-й лист, одинаковое время суток) и рандомизация серий снижают систематический сдвиг.

Абиотические факторы. Высокая освещённость/низкие температуры могут повышать Car/Chl и A_{360}/A_{663} даже без нутритивного дефицита; интерпретируйте маркёры в совокупности (добавляйте nD и «якорные» раман-отношения).

ISSN 3030-3907

Гено- и фенотипические различия. Сортовые различия в базовом уровне флавонолов/каротиноидов требуют собственных калибровок.

Границы применимости. Предложенные индикаторы валидны для молодых функционирующих листьев, стандартных спиртовых экстрактов и ионно сбалансированных сред. В условиях экстремального стресса (холод/жара, острый водный дефицит) и при резкой смене онтогенетической стадии приоритетно переснимать калибровки и усиливать панель газообменом/флуоресценцией, чтобы избежать ложной атрибуции причинно-следственных связей.

7. Импликации и следующий виток работ

Оперативная диагностика «в полях»

Цель: быстрое определение статуса питания без реактивов, на основе минимального набора измерений.

Минимальная панель: Chl∑, Car/Chl, A360/A663, nD(589 нм) + раман-маркёры каротиноидов (пики ~1525/1156/1006 $см^{-1}$).

Алгоритм triage (пошагово):

SPAD/Dualex на листе (2–3-й лист, первая половина светового периода) → ориентировочный статус Chl/Flav.

Быстрый УФ–VIS экстракта (80% этанол + $MgCO_3$) → Chl∑, Car/Chl, $A360/A_{663}$.

Рефрактометрия экстракта → nD и Δn (к бланку 80% EtOH) (приоритетно Δn к растворителю в той же матрице).

Раман (BRAVO, 785/852 нм, SSE™) → интенсивности I_{1525}, I_{1156}, I_{1006}; расчёт отношений I1520/I1006 и I1525/I1156 как устойчивых индикаторов фотозащитной нагрузки.

Быстрая интерпретация (матрица состояний):

Стресс (№1–2): ChlΣ↓, Car/Chl↑, A360/A663↑, Δn (к бланку) (операторно) нестабилен; каротиноидная подпись по Raman отражает напряжение фотозащиты.

Восстановление (№3–4): ChlΣ↑, Car/Chl↓, A360/A663↓, Δn (к бланку) (операторно) выравнивается; каротиноидные полосы по Raman ослабевают.

Латентный стресс (№5): A360/A663↑ при умеренном Car/Chl; фенольный ответ выражен, при этом изменения Δn (к бланку) трактуются осторожно и требуют Δn.

Интегральный индекс питания (CNI) и пороговая классификация

Для оперативного скрининга сворачиваем оси в единый скор:

$$\mathbf{CNI = w_1\,Z(Chl\Sigma) - w_2\,Z(A_{360}/A_{663}) - w_3\,Z(Car/Chl) + w_4\,Z(n_D) - w_5\,Z(I_{1520}/I_{1006}).}$$

ISSN 3030-3907

Знаки выбраны так, чтобы рост CNI соответствовал улучшению питания. Веса wiw_iwi берём из PCA/PLS-нагрузок или ставим равными при малой выборке. Пороговые зоны («стресс/восстановление/оптимум») определяем по ROC (индекс Юдена) или кластеризацией (k-means) в пространстве признаков.

Калибровочные и прогностические модели

Задача: связать полевые индикаторы (SPAD, Dualex, nD/Δn) с лабораторными концентрациями пигментов и растворимых веществ на независимой выборке.

Модели: множественная регрессия/PLS; для классификации — логистическая регрессия/LDA/PLS-DA.

Валидация: 5-кратная кросс-валидация; отчёт R^2, RMSE (регрессия) и ROC-AUC, Macro-F1 (классификация).

Гипотезы/тесты: однофакторная ANOVA по вариантам с апостериорным Tukey HSD; при множественных сравнениях — контроль FDR по Бенджамини–Хохбергу.

Стабильность: проверка коллинеарности (VIF < 5), межсерийная ре-калибровка (drift корректируется по контрольным образцам).

Расширение панели показателей (следующий виток)

P-дефицит и энергетика: добавить флуоресцентные параметры ΔF/Fm′, qP, NPQ — ранняя индикация «триозфосфатного ограничения» и дисбаланса световых/тёмных стадий.

K-чувствительные состояния: устьичная проводимость/водный статус в паре с n_D (углеродный пул) — замыкаем контур «оптика → углерод → газообмен».

Для повышения устойчивости оценки вместо точечного отношения A_{360}/A_{663} использовали широкополосный индекс:

$$I_{\mathrm{UV/Red}} = \frac{\int_{350}^{400} A(\lambda)\, d\lambda}{\int_{620}^{680} A(\lambda)\, d\lambda},$$

который служит робастной альтернативой одиночному значению A при 360 нм.

Раман-отношения: нормировка каротиноидных пиков на δCH_2 ~1445 $см^{-1}$ для межсерийной сопоставимости.

Дизайн следующей серии опытов

Схема: рандомизированный полный блок (RCBD), факторы: питание (3 уровня в пределах шкалы 1–6) × время отбора (2–3 точки).

Повторы: ≥3 биологических × ≥2 технических на показатель (минимум).

ISSN 3030-3907

Контроль качества: полистирол 1001.4/1602.3 $см^{-1}$ (Раман), «пустой» растворитель и температурный контроль (УФ–VIS, nD).

Эндпойнты: CNI, Chl∑, Car/Chl, A_{360}/A_{663}, nD, I_{1520}/I_{1006} ; вторично — ΔF/Fm′, NPQ.

Критерии успеха: разделимость «стресс/оптимум» по CNI (AUC ≥ 0.90), согласованность знаков эффектов с теоретическими ожиданиями.

Маршрут внедрения (SOP и QA/QC)

SOP-уровень: стандартизировать позиции листьев, время суток, экстракцию (80% этанол + $MgCO_3$), длину пути, температуру.

QA/QC: ежедневная проверка приборов, контрольные образцы, «слепые» повторы; еженедельно — межсерийная калибровка.

Отчётность: протокол ANOVA/Tukey, таблицы калибровок (наклон/сдвиг/CI), отчёты по FDR.

Короткий вывод

УФ–VIS, рефрактометрия и Раман консилиентно фиксируют переход листа от «защитной» стратегии (фенолы↑, фотозащита↑, Chl↓) к «продуктивной» (Chl↑, фенолы↓, фотозащита↓, сахара↑) при корректном ионном дизайне растворов по Штайнеру. Предложенная матрица признаков и интегральный индекс CNI дают практичный безреагентный инструмент диагностики, а статистический каркас (ANOVA/Tukey + FDR) обеспечивает строгую верификацию результатов.

ВЫВОДЫ

Оптимум питания — максимум фотохимии без перегрузки защитных контуров: при росте Chl∑ снижаются Car/Chl и A_{360}/A_{663}, а отношение I_{1525}/I_{1156} смещается к более высоким значениям, что согласуется с восстановлением каротиноидного профиля в условиях полноценного минерального питания.

Комплементарная тройка оптических маркёров — ChlΣ, Car/Chl, A_{360}/A_{663} — надёжно разделяет статусы питания. Рост ChlΣ фиксирует восстановление пигментного аппарата; снижение Car/Chl при переходе к оптимуму отражает разгрузку NPQ; падение A_{360}/A_{663} — сворачивание «УФ-экрана» эпидермальных флавонолов. Тройка воспроизводимо дифференцирует дефицитные и оптимальные режимы и методологически стыкуется с парами бесконтактных индикаторов SPAD/Dualex (и производным NBI).

Оптимум питания — максимум фотохимии без перегрузки защитных контуров. В режиме «нормы» одновременно наблюдаются: высокий ChlΣ, пониженные A_{360}/A_{663} и умеренный Car/Chl — то есть усиление

ISSN 3030-3907

продуктивной фотохимии при минимально необходимой фотозащите. Этот переход подтверждён и «отпечатками» Рамана: относительные интенсивности каротиноидных полос ~1525/1156/1006 $см^{-1}$ ослабевают по мере нормализации питания.

Показатель преломления nD(589 нм) и операторные эквиваленты ΣTSSэкв отражают изменения интегральной растворимой фракции 80%-ных этанольных экстрактов и могут использоваться как дополнительный признак «углеродного сдвига» в условиях стресса. В спиртовой матрице методологически корректной метрикой является Δn к бланку 80% EtOH; без бланк-вычитания и внешней калибровки количественная интерпретация этих показателей ограничена.

Интегративная матрица (оптика + nD/Δn + Raman) повышает устойчивость диагностики к частным источникам вариабельности и снижает риск ложной интерпретации: оптические индексы отражают состояние пигментного аппарата и фенольного ответа, Raman — каротиноидную подпись, а рефрактометрия (nD/Δn, ΣTSSэкв) — изменения растворимой фракции экстракта. Комбинирование каналов особенно полезно при неоднородности листа, фоновой флуоресценции и вариациях процедуры экстракции.

Практическая пригодность для точного земледелия. Комбинация полевых прокси (SPAD/Dualex) и лабораторной УФ–VIS/рефрактометрии обеспечивает быстрый, безреагентный скрининг статуса питания до появления визуальных симптомов и легко калибруется под сорт и агрофон. Раман-подписи каротиноидов добавляют независимую ось верификации фотозащитной нагрузки.

Статистическая верификация и воспроизводимость. Эффекты по вариантам питания следует оценивать с учётом дисперсии и множественных сравнений (ANOVA/GLM + Tukey HSD либо контрастные тесты), а для каждого канала диагностики (SPAD→Chl, Dualex→Flav, nD/Δn→ΣTSSэкв, Raman→I_{1525}/I_{1156}) сообщать величины эффекта, p-значения и доверительные интервалы. При построении прогностических моделей уместно приводить R^2/RMSE и проводить кросс-валидацию (≥5-кратную).

В сумме: консилиентность УФ–VIS, рефрактометрии и Раман-спектроскопии подтверждает физиологически ожидаемый переход листа от «защитной» стратегии (фенолы↑, фотозащита↑, Chl↓) к «продуктивной» (Chl↑, фенолы↓, фотозащита↓, сахара↑) при корректном ионном дизайне растворов по Штайнеру. Статистический каркас с FDR-контролем закрепляет выводы на строгом уровне доказательности.

ISSN 3030-3907

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agati G, Tattini M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. Plant Cell Environ. 2010;33(2):286-301. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x.
2. AOAC International. Official Method 921.08: Refractive Index of Edible Oils and Fats. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg (MD): AOAC International; 2005.
3. AOAC International. Official Method 932.12: Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products—Refractometer Method. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersburg (MD): AOAC International; 2000.
4. Barański R, Barańska M, Schulz H. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. Planta. 2005;222(6):977-986.
5. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc Series B Stat Methodol. 1995;57(1):289-300.
6. Brown LA, Lemaire G, Smith CL, et al. Calibration and characterisation of four chlorophyll meters and transmittance spectroscopy for non-destructive estimation of forest leaf chlorophyll concentration. Agric For Meteorol. 2022;323:109059. doi:10.1016/j.agrformet.2022.109059.
7. Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, et al. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (Triticum aestivum L.). Field Crops Res. 2005;91:35-49. doi:10.1016/j.fcr.2004.05.002.
8. Cetner MD, Karcz D, Serca M, et al. Effects of nitrogen deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. Plant Physiol Biochem. 2017;118:400-413.
9. Cerovic ZG, Ounis A, Cartelat A, et al. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive assessment of UV-screening by epidermal phenolics in leaves. Plant Cell Environ. 2002;25(12):1663-1676.
10. Cerovic ZG, Masdoumier G, Ben Ghozlen N, Latouche G. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. Physiol Plant. 2012;146(3):251-260.
11. Cooper JB, Abdelkader M, Wise KL. Sequentially shifted excitation Raman spectroscopy: algorithm and instrumentation for fluorescence-free Raman in spectral space. Appl Spectrosc. 2013;67(8):973-984.
12. Demmig-Adams B, Adams WW 3rd. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation in the light-harvesting antenna. New Phytol. 2006;172(1):11-21.

ISSN 3030-3907

13. Dhanani T, Subramanian RB, Kurouski D. Raman spectroscopy detects changes in carotenoids on the surface of photosynthetic organisms during stress exposure. Front Plant Sci. 2022;13:832522. doi:10.3389/fpls.2022.832522.
14. Gitelson AA. Towards a generic approach to non-invasive quantification of chlorophyll and other pigments in leaves. J Plant Physiol. 2020;252:153227. doi:10.1016/j.jplph.2020.153227.
15. Goulas Y, Cerovic ZG, Prodanovic S, et al. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal UV-absorbance by flavonoids. Appl Opt. 2004;43(28):4488-4496.
16. Goulas Y, Cerovic ZG, Cartelat A, Moya I. Dualex: a new instrument for non-destructive assessment of chlorophyll and epidermal flavonoids. New Phytol. 2004;160(3):677-684. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.00989.x.
17. International Seed Testing Association (ISTA). International Rules for Seed Testing. Bassersdorf (Switzerland): ISTA; 2025.
18. Kitajima K, Hogan KP. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to sun and shade. Plant Cell Environ. 2003;26(6):857-865.
19. Mu X, Chen Y. Within-leaf nitrogen allocation in adaptation to low nitrogen supply in Arabidopsis thaliana. Front Plant Sci. 2016;7:699.
20. Papoutsoglou EA, Faria D, Arend D, et al. Enabling reusability of plant phenomic datasets with MIAPPE 1.1. New Phytol. 2020;227(1):260-273. doi:10.1111/nph.16544.
21. Papoutsoglou EA, Athanasiadis IN, Visser RGF, Finkers R. The case of reusing plant phenotyping data—improving FAIRness with MIAPPE. Sci Data. 2023;10(1):457. doi:10.1038/s41597-023-02364-z.
22. Payne WZ, Farber C, Kurouski D. Raman-based diagnostics of biotic and abiotic stresses in plants: a review. Front Plant Sci. 2021;11:616672.
23. Pescador-Dionisio S, Gamon JA, Serrano L, et al. In vivo detection of spectral reflectance changes associated with regulated heat dissipation mechanisms complements fluorescence quantum efficiency in early stress diagnosis. New Phytol. 2025;245(2):559-576. doi:10.1111/nph.20253.
24. Poorter H, Fiorani F, Stitt M, et al. The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. Funct Plant Biol. 2012;39(11):821-838. doi:10.1071/FP12028.
25. Poorter H, Jagodzinski AM, Ruiz-Peinado R, et al. Pampered inside, pestered outside? Differences and similarities between plants growing in controlled conditions and in the field. New Phytol. 2016;212(4):838-855. doi:10.1111/nph.14243.

ISSN 3030-3907

26. Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents. Biochim Biophys Acta. 1989;975(3):384-394. doi:10.1016/S0005-2728(89)80347-0.
27. Ritchie RJ. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynth Res. 2006;89(1):27-41. doi:10.1007/s11120-006-9065-9.
28. Ruban AV. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQ): mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. Annu Rev Plant Biol. 2016;67:501-528.
29. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika. 1965;52(3-4):591-611.
30. Stawoska I, Gołębiowska-Paluch G, Wesełucha-Birczyńska A, et al. Temperature-caused changes in Raman pattern and protein profiles of winter triticale field-grown seedlings. Molecules. 2024;29(9):1933.
31. Steiner AA. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant Soil. 1961;15(2):134-154.
32. Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. Photosynth Res. 2007;91(1):37-46. doi:10.1007/s11120-006-9077-5.
33. Walters RG. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. J Exp Bot. 2005;56(411):435-447.
34. Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents. J Plant Physiol. 1994;144(3):307-313.
35. Wong CYS, D'Odorico P, Arain MA, Ensminger I. Tracking the phenology of photosynthesis using carotenoid-based vegetation indices. New Phytol. 2020;226(6):1729-1741.
36. Živčák M, Brestič M, Balatová Z, et al. Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light. Photosynth Res. 2014;119(1-3):339-354.

ISSN 3030-3907