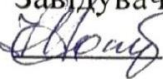


**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

«На правах рукопису»
УДК 604.6

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
 Наталія ГОЛУБ

“06” червня 2022 р.

Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра
за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»
зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
на тему: «Вивчення особливостей біогенезу проростків пшениці *Triticum
aestivum*»

Виконав:

студент II курсу, групи БМ-01мн
Тимошенко Дмитро Олександрович

Науковий керівник:

д-р. біол. наук, доцент кафедри біоенергетики,
біоінформатики та екобіотехнології
Моргун Богдан Володимирович

Консультант з старт-апу:

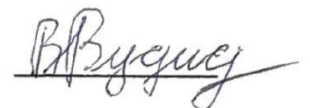
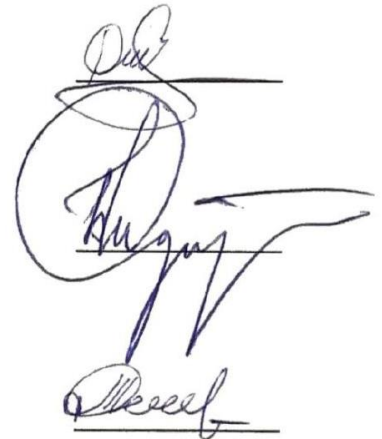
к.е.н., доцент кафедри економіки і підприємництва
Ткаченко Тетяна Петрівна

Рецензент:

к.б.н., старший науковий співробітник
відділу генетичної інженерії Інституту
клітинної біології та генетичної інженерії

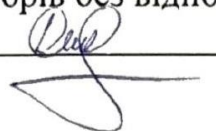
НАН України

Рудас Володимир Андрійович



Засвідчую, що у цій магістерській
дисертації немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних посилань.

Студент

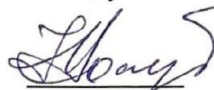


Київ – 2022 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Рівень вищої освіти другий (магістерський)
Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія
Освітньо-наукова програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри


(підпис)

Наталія Голуб
(ініціали, прізвище)

«10» 10 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту
Тимошенку Дмитру Олександровичу

1. Тема дисертації «Вивчення особливостей біогенезу продохів пшениці *Triticum aestivum*», науковий керівник дисертації Моргун Богдан Володимирович, д-р. біол. наук, доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, затверджені наказом університету від «03» 05 2022р. № НС/170/2022
2. Термін подання студентом дисертації «Р» 06 2022р. № _____.
3. Об'єкт дослідження: біогенез продохів пшениці м'якої озимої.
4. Вихідні дані:

Мета – дослідити ключові параметри продохів пшениці м'якої озимої *Triticum aestivum* L. у сортів Подолянка, Астарта, Одеська 267, Наталка, Поліська 90, Дарунок Поділля та селекційних ліній 3155-3164.

Об'єкт – біогенез продохів *Triticum aestivum*.

Предмет – ключові параметри продохів *Triticum aestivum* сортів Подолянка, Астарта, Одеська 267, Наталка, Поліська 90, Дарунок Поділля

та чистих ліній 3155, 3156, 3157, 3158, 3159, 3160, 3161, 3162, 3163 і 3164, вирощених на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.



5. Перелік завдань, які потрібно розробити:

- провести аналіз сучасних літературних джерел стосовно досягнень у розумінні процесів формування продохів у *Triticum aestivum* та інших культурних рослин;
- визначити ключові параметри при аналізі посухостійкості;
- розробити програмні рішення для комплексного аналізу ключових параметрів продохів на етапах процесінгу, презентації та прогнозування даних на підставі існуючих даних про сорти Подолянка, Астарта, Одеська 267, Наталка, Поліська 90, Дарунок Поділля;
- розширити пул статистичних даних експериментально отриманими даними із селекційних ліній 3155-3164 та на підставі розробленого ПЗ спрогнозувати посухостійкість зазначених генотипів;
- розробити стартап-проект з виведення нового сорту пшениці м'якої озимої з підвищеною на 30% посухотолерантністю.

6. Основний перелік ілюстративного матеріалу: презентація (21 слайд).

7. Орієнтовний перелік публікацій: відсутні.

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Старт-ап	к.е.н., доц. Ткаченко Т.П.		

9. Дата видачі завдання

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів	Примітка
1	Первинний огляд літературних джерел, структурування матеріалу	01.02.2022 – 28.02.2022	Виконано
2	Переддипломна практика	01.03.2022 – 10.04.2022	Виконано
3	Підготовка оглядової та експериментальної частин магістерської дисертації	11.04.2022 – 25.05.2022	Виконано
4	Оформлення магістерської дисертації та підготовка презентації		Виконано
5	Перевірка на плагіат готової дисертації	30.05.2022	Виконано
6	Попередній захист дипломної роботи	31.05.2022	Виконано
7	Внесення корективів до тексту, презентації магістерської дисертації	01.06.2022 – 08.06.2022	Виконано
8	Захист магістерської дисертації	14.06.2022	

Студент

Науковий керівник

Дмитро Тимошенко

Богдан Моргун

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 120 с., 18 рис., 26 табл., 94 посилань.

Сільське господарство має швидко адаптуватися для збереження продовольчої безпеки у світі, де спостерігається зростання попиту на харчові культури. При цьому проблема є актуальною і зі сторони небажаних кліматичних змін у майбутньому, коли в атмосфері буде підвищений вміст діоксиду вуглецю.

У магістерській дисертації виявлені та уточнені особливості біогенезу продихів пшениці м'якої озимої *Triticum aestivum* L., а саме особливості експресії генів EPF1, EPF2, MUTE та їх ортологічних структур інших стратегічно важливих зернових культур, які відповідають за регулювання таких фізіологічних параметрів як чисельність продихів, щільність продихів та розмір листя рослин. Додатково проаналізовано ключові особливості біогенезу продихів *Triticum aestivum*.

У магістерській дисертації застосовуючи програмний аналіз визначено ключові параметри посухостійкості та розроблено програмні рішення для комплексної оцінки основних показників продихів на етапах процесінгу, презентації та прогнозування даних на підставі існуючих даних про сорти Подолянка, Астарта, Одеська 267 (посухостійкі) та Наталка, Поліська 90, Дарунок Поділля (посухонестійкі).

Розширено пул статистичних даних експериментально отриманими даними селекційних ліній 3155-3164 та спрогнозована посухостійкість зазначених генотипів, серед яких два є потенційно посухостійкими – 3155 і 3163.

На основі магістерської дисертації розроблено стартап-проект з виведення нового мутантного сорту *Triticum aestivum* з підвищеною посухостійкістю.

TRITIUM AESTIVUM, ВНЛН, MUTE, SPEECHLESS, EPF, FAMA,
WUE, MRMR, PCA, БІОГЕНЕЗ ПРОДИХІВ, ЧИСЕЛЬНІСТЬ, РОЗМІР ПОР,
ЩІЛЬНІСТЬ ПРОДИХІВ.

ABSTRACT

Explanatory note: 120 p., 18 fig., 26 tab., 94 references.

Agriculture must adapt quickly to maintain food security in a world of increasing food crop consumption. At the same time, the problem is also relevant from the side of undesirable climatic changes in the future, when the carbon dioxide content in the atmosphere will be increased.

In the master's thesis the peculiarities of stomata biogenesis in wheat *Triticum aestivum* L., namely, the peculiarities of EPF1, EPF2, MUTE gene expression and their orthologous structures were revealed and clarified. Additionally, the key features of *Triticum aestivum* stomata biogenesis were analyzed.

In the master's thesis, using software analysis, the key parameters of drought resistance were determined and software solutions were developed for a comprehensive assessment of the main indicators of stomata at the stages of processing, presentation and forecasting data based on existing data on the varieties Podolyanka, Astarta, Odessa 267 Podolia (drought tolerated) and Natalka, Polesskaya 90, Darunok Podolia (not drought tolerated).

The pool of statistical data was expanded by experimentally obtained lines 3155-3164 and predicted drought tolerance of these genotypes, among which two are potentially drought tolerant - 3155 and 3163.

Based on the master's thesis, a start-up project to breed a new mutant variety of *Triticum aestivum* with increased drought tolerance was developed.

TRITIMUM AESTIVUM, BHLH, MUTE, SPEECHLESS, EPF, FAMA, WUE, MRMR, PCA, STOMATAL BIOGENESIS, NUMBER, PORE SIZE, DENSITY OF STOMATA.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ.....	10
ВСТУП	12
РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	14
1.1 Глобальний виклик до сільського господарства.....	14
1.1.1 Кліматичні зміни та стійкість рослин.....	14
1.1.2 Посуха як основний абіотичний екологічний стрес.....	15
1.1.3 Штучне підвищення показників WUE та зменшення GW	17
1.1.4 <i>T. aestivum</i> як перспективний об'єкт генетичних досліджень	18
1.2 Особливості формування і функціонування продохів.....	20
1.2.1 Загальні відомості про продохи	20
1.2.2 Роль продохів у посухостійкості.....	22
1.2.3 Ключові фенотипічні ознаки для модифікації.....	23
1.2.4 Метаболітичні основи механізму керування продохами	26
1.2.5 Формування продохів у <i>T. Aestivum</i>	28
1.2.6 Особливості генів bHLH у ортологічних білків	29
1.2.7 Особливості генів EPF у ортологічних білків.....	36
1.3 Досягнення у генетичній модифікації продохів <i>T. Aestivum</i> та їх ортологів	38
1.3.1 Гени групи bHLH	38
1.3.2 Гени EPF	40
1.3.3 Допоміжні системи	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
2.1 Опис рослинного матеріалу	49

2.2	Методика визначення вихідних параметрів продихового апарату.....	50
2.3	Методика розрахунку ключових параметрів	51
РОЗДІЛ 3. ОДЕРЖАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ		58
3.1	Аналіз ключових параметрів продохів	58
3.2	Аналіз існуючих даних за допомогою ПЗ на основі РСА	60
3.3	Прогнозування на підставі експериментальних даних	61
РОЗДІЛ 4. СТАРТАП ПРОЄКТ.....		64
4.1	Резюме	64
4.2	Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу	67
4.3	Визначення ключових факторів успіху проєкту.....	73
4.4	Визначення потенційних споживачів	75
4.5	Ціна інноваційної пропозиції на ринку	79
4.6	Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів реалізації проєкту	88
4.7	Ризики розробки та методи управління ними	92
ВИСНОВКИ.....		97
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		99
Додаток А.....		110
Додаток Б		111
Додаток В.....		117

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

WUE, A/E – ефективність використання води, співвідношення швидкостей асиміляції (A) вуглекислого газу до транспірації (E);

GW – дифузійна провідність до водяної пари;

ROS – реактивні види кисню;

ABA – абсцизова кислота;

D13C – обмеження руху ізотопів вуглецю;

gs – провідність продихів;

SI – індекс продихів, відношення продихів до епідермальних клітин плюс продихи, помножене на 100;

bHLH – група генів basic helix-loop-helix, що включає SPCH, MUTE та FAMA;

TMM – TOO MANY MOUTHS, рецептор на поверхні клітин;

EPF – епідермальний структуруючий фактор;

PP2A – протеїн фосфатаза 2A;

IDD16 – фактор транскрипції C2H2;

SNRK – кіназа, пов'язана з неферментуючою SNF сахарозою;

MMC (материнська меристемоїдна клітина) – попередник протодермальної клітини, яка формує лінію продихів, виробляючи меристемоїдну клітину шляхом асиметричного поділу;

Меристемоїд – стовбурова клітина продихів, що утворюється в результаті асиметричного поділу меристемоїдної материнської клітини (MMC);

SLGC (клітина лінії продихів) – більша дочірня клітина утворюється при асиметричному поділі GMC або меристемоїду; диференціюється в клітину основи або генерує новий меристемоїд шляхом асиметричного поділу;

GMC (захисна материнська клітина) – кінцевий попередник проросту, диференційований з меристемоїду; ділиться симетрично, щоб зробити пару захисних клітин (GC);

GC (захисна клітина) – кінцева диференційована клітина проростів, що зазвичай утворюється в результаті симетричного поділу GMC;

SMC (дочірні материнська клітина) – клітини-попередники фланкуючого шару, що утворюють периметр із захисних клітин у комплексі проростів трав, ділиться асиметрично;

SK (допоміжна клітина) – зрілі дрібні фланкуючі клітини пари проростів.

Первинний поділ – асиметричний поділ клітин GMC, у результаті якого утворюються меристемоїди.

Ампліфікуючий поділ – асиметричний поділ клітин меристемоїдів, який регенерує меристемоїд та більшу дочірню клітину (SLGC).

Розбіжний поділ – асиметричний поділ клітин SLGC, що створює нові меристемоїди, які не примикають до існуючих меристемоїдів (відоме як "правило відстані між клітинами").

ВСТУП

Метою літературного огляду магістерської дисертації є виявлення та уточнення особливостей біогенезу продихів у *Triticum aestivum* та інших стратегічно важливих зернових культур, акцентуючи увагу на досягненнях у генетичному керуванні процесом біогенезу продихів з метою підвищення посухостійкості (а саме генів EPF1, EPF2, MUTE та їх ортологічних структур), які відповідають за регулювання таких фізіологічних параметрів як чисельність продихів, щільність продихів та розмір листя генетично модифікованих рослин.

Внаслідок еволюційної траєкторії морфологія продихів, розподіл, орієнтація та розвиток продихів сильно варіюють у різних видів [1,2], але для більшості рослин епідермальні клапани відіграють центральну роль у газообміні та втрати води в рослин, уніфікованим показником чого вважають WUE, ефективність використання води, підвищення якого може збільшити продуктивність і зменшити водний стрес у більш сухих умовах навколишнього середовища [3].

Підвищення WUE сільськогосподарських культур є найважливішим пріоритетом для регіонів, що стикаються з проблемою посилення посухи або зменшенням доступності підземних вод. Незважаючи на нові інструменти для генетичного маніпулювання, інженерія рослин із високою WUE залишається складним завданням. При цьому проблема є актуальною і зі сторони атмосфери майбутнього, коли в ній буде підвищений вміст діоксиду вуглецю [3].

На сьогодні практично відсутні дані про структуру і функціонування генів біогенезу продихів, при цьому вказані фізіологічні параметри напряму впливають на WUE та GW. Саме тому вивчення даних особливостей відкриває нові можливості для подальшої генетичної модифікації продихів *T. aestivum* шляхом впливу на регулювання асиметричного поділу, координацію клітин у шарах та кодування секреторних поліпептидів з

метою поліпшення врожайності в умовах водного дефіциту за рахунок підвищеної толерантності до посухи.

При цьому велике значення має і чітка ідентифікація досліджуваних параметрів із системами попереднього аналізу, що може дати змогу швидше та ефективніше будувати прогностичні моделі для пріорітезації потенційно корисних досліджень, підвищуючи загальну ефективність досліджень як у сучасному, так і у майбутньому. Так як сфера досліджень відносно нова, то для даного завдання розширення існуючого пулу статистичних даних є одним із найважливіших завдань.

РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1 Глобальний виклик до сільського господарства

1.1.1 Кліматичні зміни та стійкість рослин

В даний час у світі спостерігаються значні зміни клімату та температури, спричинені глобальним потеплінням, що значною мірою вплинуло на сільськогосподарський сектор через зміни в гідрологічних циклах, що загалом призводять до збільшення посушливості та частоти посух. За оцінками, до 2025 року близько 1,8 мільярда людей зіштовхнуться з абсолютною нестачею води, тим самим позбавивши 65% населення планети достатньої кількості врожаю.

Сільське господарство має швидко адаптуватися, щоб забезпечити більш ефективне використання води, зберігаючи при цьому продовольчу безпеку у світі, де населення швидко зростає. Для досягнення цих цілей важливе значення матиме стійке та кліматично розумне управління водними та земельними ресурсами, а також біорізноманіттям. Але використання тільки наведених заходів малоімовірно вирішить проблеми сьогодення та майбутнього, тому посухостійкі високоврожайні культури є перспективним шляхом вирішення зазначеної проблеми [4].

У наш час також спостерігається зростання попиту на харчові культури, при цьому навіть зараз попит перевищує наявну пропозицію, тому існує гостра необхідність у високоврожайних стресостійких культурах для підтримки балансу між виробництвом сільськогосподарських культур і споживанням [5].

Фокус досліджень спрямований на посуху та пов'язані із нею параметри, оскільки вона вважається найнесприятливішим абіотичним стресором, який обмежує глобальну продуктивність сільськогосподарських

культур, надаючи гігантський вплив на загальне зростання та розвиток рослин [6].

Посуха при цьому має складну природу, тому і механізмів протидії існує багато, включаючи природні. Наприклад, один із добре вивчених механізмів полягає у тому, що стрес від посухи може спричинити збільшення кількості реактивних видів кисню (ROS), у результаті окислювальний баланс клітини може змінюватись. Збільшення генерації ROS є загальним сигналом, що запускається в умовах посухи, і цей процес регулюється експресією антиоксидантних генів, активацією супероксиддисмутази і каталази. Зрештою, транспірація значно знижується при стресі посухи, що призводить до повільної втрати тепла з листя, що спричиняє підвищення температури листя. В результаті підвищується концентрація вуглекислого газу (CO_2), що дає змогу впливати на інтенсивність процесу фотосинтезу.

Результатом цих процесів є підвищення WUE рослин. Крім того, альтернативна оксидаза (АОХ), термінальна оксидаза дихальних шляхів, відіграє істотну роль у захисті хлоропластів та оптимізації процесу фотосинтезу при посухах [7]. Також вважається, що вона відіграє ключову роль у підтримці мітохондріального дихання у рослинах в умовах посухи.

Приклад вище лише один із цілого каскаду можливих природніх засобів протидії посухам, рослини демонструють різноманітні реакції, які включають морфологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярні адаптації [8]. Але у сучасних реаліях, зокрема через діяльність та потреби людства, цього природного комплексу недостатньо.

1.1.2 Посуха як основний абіотичний екологічний стрес

Посуха є одним із основних абіотичних екологічних стресів, що впливають на продуктивність сільськогосподарських культур у всьому світі [9]. Близько 60% суші на земній кулі відноситься до посушливих або

напівзасушливих зон. Важливість виведення посухостійких видів зростає через нерівномірний розподіл опадів та дефіцит води [10]. Мінімізація впливу даного фактору може бути досягнута при повному розумінні генетичної та молекулярної основи посухостійкості. Близько третини потенційно життєздатних земель у світі страждає від дефіциту води чи посухи, що періодично знижує врожайність сільськогосподарських культур. Метеорологічне явище, яке полягає у відсутності опадів протягом періоду, досить тривалого для того, щоб викликати виснаження вологи в ґрунті і, як наслідок, зниження водного потенціалу тканин рослин називається посухою. Наслідком низької врожайності є обмеження повного вираження генетичного потенціалу рослини, що є серйозним обмежуючим фактором в сільськогосподарському виробництві, оскільки не дозволяє рослині досягти генетично певного теоретичного максимуму врожаю. Висока температура та висушування або водний стрес є ключовими факторами, що впливають на врожайність сільськогосподарських культур [11]. Що ж до пшениці, вона вирощується як у зрошуваних, так і на богарних землях, де основними чинниками, обмежують її продуктивність і стійкість, є посуха і засоленість.

Більше того, стрес від посухи є основним обмеженням продуктивності хлібної пшениці та стабільності її врожаю [12]. Фізіологічні реакції на посуху включають закриття продихів, значне зниження активності фотосинтезу, виражений окисний стрес, зміну цілісності клітинної стінки та вироблення токсичних та смертельних метаболітів. Все це супроводжується втратою тургорного тиску зі зниженням водного потенціалу листа, провідності продихів до CO_2 , внутрішньої концентрації CO_2 та швидкості зростання. В умовах водного дефіциту в листі пшениці підвищується вміст цистеїну та активність його протеолізу. Зростання є одним із фізіологічних процесів, чутливих до посухи, на який впливає зниження тургорного тиску. Низький тургорний тиск в умовах водного стресу пригнічує розширення та зростання клітин. Тургорний тиск, що перевищує вихід клітинної стінки,

спричиняє розширення клітин. Рослина реагує на дефіцит води осмотичною розбудовою своєї фізіології [13].

1.1.3 Штучне підвищення показників WUE та зменшення GW

Щоб подолати великі втрати врожаю сільськогосподарських культур через посуху, стає обов'язковим вивчення та використання багатокomпонентних стратегій, пов'язаних із виведенням стійких сортів сільськогосподарських культур, у деяких дослідженнях зауважується, що в умовах прогнозованого майбутнього клімату це матиме вирішальне значення [14,15].

WUE можна оцінити у різних масштабах; на агрономічному рівні показник описується як відношення води, яка використовується в рослинництві, до біомаси або врожаю. З погляду фізіології рослин, і як це розглядатиметься в першу чергу тут, WUE – це кількість CO_2 , зафіксованого в процесі фотосинтезу (A), стосовно кількості водяної пари, втраченої в атмосферу. Оскільки продиhi відіграють фундаментальну роль у регулюванні водоспоживання рослин (пункт 1.2.2) і надходження вуглецю, вони є ключовою метою для поліпшення WUE [16].

Зусилля підвищення WUE часто призводили до зниження врожайності [15]. Спроби змінити ознаки продиhiв для покращення показників збереження води можуть призвести до зниження g_s , що потенційно може призвести до згубного впливу на швидкість асиміляції, випарне охолодження та родючість рослин. Однак останні дані свідчать про те, що принаймні в деяких тепличних та контрольованих умовах вирощування зміна ознак продиhiв може покращити WUE без таких небажаних втрат урожаю [17,18]. Хоча ці дослідження оптимістичні, вони дають лише загальне уявлення у тому, як можуть поводитися рослини зі зміненими властивостями продиhiв, тому потрібне подальше вивчення можливостей генетичної модифікації.

1.1.4 *T. aestivum* як перспективний об'єкт генетичних досліджень

Сорти рослин з високою посухостійкістю вважаються найбільш підходящими для досліджень, пов'язаних із посухою. У зв'язку з цим добре відомою моделлю для досліджень у цьому напрямку є пшениця. *Triticum aestivum* є однією з основних зернових культур у світі, що вирощується на величезних площах у різних умовах, займаючи 17% всіх оброблюваних земель [19]. Серед усіх зернових культур пшениця є одним із кращих джерел білка. Вона широко споживається у кількох частинах світу, що робить її важливою складовою звичайного раціону харчування. Пшениця забезпечує 20% від загальної кількості калорій для харчування 30% населення світу [20]. Такий екологічний фактор, як посуха, є основним обмежуючим фактором для виробництва сільськогосподарських культур і завдає серйозних збитків на всіх стадіях зростання, репродуктивних фазах, цвітінні, розвитку зерна та врожайності пшениці, що навіть призвело до щорічних втрат у середньому 5,5% [21].

Існує все більше доказів прямого впливу посухи на масу зерна, продуктивність пшениці та якість білка. Природні попередники культурних рослин, які мають характеристики посухостійкості, втрачені при культивуванні сучасних ліній, є найкращим варіантом для використання в поліпшенні новітніх сортів сільськогосподарських культур. Аналогічний попередник сучасної пшениці *Aegilops tauschii* вважається більш посухостійким, ніж види *Triticum* та дика емерська пшениця (*T. dicoccoides*), і тому є найперспективнішим джерелом генів та генних регіонів, пов'язаних із посухою, які можна використовувати для створення стійких сортів пшениці. Сучасні зусилля спрямовано виведення високоврожайних видів *Triticum* за умов водного стресу. Останнім часом використання посухостійких диких видів, застосування функціональної геноміки, трансгенних технологій та швидкий прогрес у молекулярно-біологічних методах полегшили дослідження, пов'язані із посухою [22]. Це призвело до

значного прогресу в ідентифікації пов'язаних із посухою генів та пов'язаних із ними ділянок, що дозволило класифікувати деякі молекулярні аспекти. Стійкість до посухи у пшениці шляхом генетичного покращення можлива за допомогою традиційної та мутаційної селекції [23].

Рівень плоїдності – ще одна характеристика, що допомагає оцінити коректний вибір об'єкту генетичної модифікації. Порівняння між *T. monosocum* (диплоїд), *T. durum* (тетраплоїд) та *T. aestivum* (гексаплоїд) було проведено для щільності та розміру продихів, і результати показали значну генетичну варіацію для щільності продихів. Вища успадкованість цієї ознаки допомагає у препаруванні на молекулярному рівні [24], що тільки підтверджує вибір *T. Aestivum* як об'єкту генетичної модифікації.

1.2 Особливості формування і функціонування продихів

1.2.1 Загальні відомості про продихи

Продихи – це мікроскопічні структури, які складаються найчастіше з пари спеціалізованих захисних клітин, які оточують центральну пору. Вони знаходяться на нижній стороні листка у більшості рослин, забезпечуючи доступ до клітин мезофілу [25]. Активно регулюючи тургорний тиск захисних клітин, рослини можуть змінювати отвір пори продиху, регулюючи інтенсивність газообміну між внутрішнім простором листа і атмосферою [26]. Збільшення тургорного тиску захисних клітин призводить до збільшення отвору пори продиху, що підвищує швидкість поглинання CO_2 і втрати води через процес, який називається *gs*. З іншого боку, зниження тургорного тиску в захисних клітинах призводить до зменшення апертури продиху та зниження *gs*. Сигнали, що регулюють потоки CO_2 і води в мезофіл рослини і з нього, дуже скоординовані, що дозволяє рослинам тонко балансувати між потребою у вуглеці і необхідністю помірної втрати води [27].

На цей внутрішній перехресний баланс впливають багато факторів навколишнього середовища, включаючи зміни температури, інтенсивності світла, концентрації CO_2 в атмосфері, вологості повітря та вмісту вологи в ґрунті [28]. Наприклад, коли вода стає обмеженою, виникають такі сигнали, як зниження гідравлічної провідності та збільшення АВА, що викликають зниження тургорного тиску захисних клітин, що призводить до зменшення апертури продихів та *gs* [29,30]. Ці зміни призводять до більш ефективного збереження води. І навпаки, коли води в ґрунті чи повітрі багато, тургор захисних клітин збільшується, що призводить до збільшення розміру отвору пори продихів та *gs*. Протягом більш тривалих періодів часу зовнішні сигнали, що сприймаються зрілим листям, можуть також

призводити до системних реакцій, які помірно впливають на розвиток продихів на епідермісі нового листа, що призводить до зміни малюнка продихів [31]. Наприклад, відомо, що вплив на зріле листя високим рівнем CO_2 або низьким рівнем світла призводить до зниження щільності продихів та індексу продихів (SI) нових листків. І навпаки, низький рівень CO_2 і висока освітленість зазвичай мають протилежний ефект. Вплив доступності води на розвиток продихів менш вивчений, повідомляється про неоднозначну реакцію та відмінності між видами [32].

Керування числом продихів та розміру продихів дозволяють рослинам регулювати площу пор залежно від навколишнього середовища, що в кінцевому підсумку впливає на максимальний та мінімальний газообмін. У різних видів рослин продихи мають різноманітні форми, розміри та кількість (рисунок 1.1).

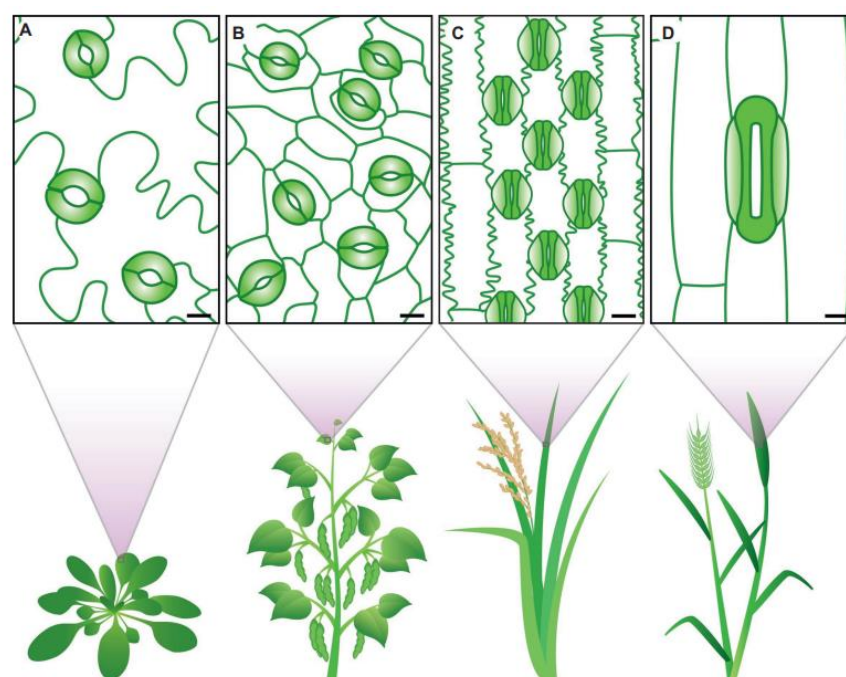


Рисунок 1.1 – Ознаки продихів різняться у різних видів. У еудикоти (А) *Arabidopsis thaliana* та (В) *Phaseolus vulgaris* захисні клітини мають ниркоподібну форму (забарвлені у зелений колір). У злаків (С) *Oryza sativa* та (D) *Triticum aestivum* спостерігаються гантелеподібні захисні клітини (суцільний зелений колір) та спеціалізовані допоміжні клітини (світло-зелений градієнт). Видно чіткі відмінності у розмірі та щільності продихів. Масштаб лінійки 10 мкм [16].

Існують певні відмінності в тому, як продихи різних груп розвиваються та розташовуються на епідермісі [33]. Морфологічні відмінності включають щільність та розмір продихів, форму захисних клітин, наявність або відсутність допоміжних клітин. Всі ці параметри можуть потенційно впливати на продихи, як наслідок впливати на g_s і WUE рослин.

З еволюційним часом різні ознаки продихів змінювалися, що потенційно може сприяти адаптації видів рослин до нових умов середовища [34]. Еудикоти, наприклад, зазвичай мають брунькоподібні продихи, які формуються на епідермісі листа без заздалегідь визначеного місця. У однодольних продихи можуть бути або ниркоподібними, або, як у трав, складатися з гантелеподібних продихів із сусідніми допоміжними клітинами, які в сукупності називаються комплексом продихів [33]. У трав розвиток продихів обмежений основою листа, при цьому пори продихів формуються в певних клітинних місцях, прилеглих до жилок [35]. Хоча характер росту, розташування та морфологія продихів є важливими факторами, які роблять внесок у WUE [36], відносно мало відомо про те, як цілеспрямовані модифікації ознак продихів впливають на фізіологічні реакції у культурних рослин, особливо у польових експериментах.

1.2.2 Роль продихів у посухостійкості

Продихи займають лише близько 5% площі поверхні листа, але їх доля у процесах транспірації води рослинами приблизно 70%. Продихи є надземною контрольною точкою для надходження вуглекислого газу (CO_2) для фотосинтезу та виходу води з рослин через процес транспірації [37]. У відповідь на водний стрес продихи закриваються, що призводить до зниження водного потенціалу листа, зменшення асиміляції вуглецю, окисного стресу та підвищення температури рослини. Поліпшення контролю над процесом транспірації має вирішальне значення для боротьби

з пригніченням фотосинтезу при водному стресі. Щільність продихів та їх розмір визначають загальну площу пор продихів на лист. Повідомлялося про значну генетичну мінливість щільності та розміру продихів у пшениці [24].

1.2.3 Ключові фенотипічні ознаки для модифікації

Динамічні зміни ступеня відкриття пор продихів відповідають за регулювання g_s у короткостроковій перспективі, дозволяючи рослинам швидко скорочувати втрату води відповідно до зовнішніх сигналів. У більш довгостроковій перспективі анатомічні коригування, такі як зміни розміру пор продихів (SS) та їх щільність (SD), можуть змінювати діапазон g_s шляхом зміни максимальної провідності продиху ($g_{s_{max}}$) [38]. $G_{s_{max}}$ має максимальне значення газообміну у стані, коли всі продихи повністю відкриті. Це теоретична оцінка, яка розраховується за допомогою емпіричних анатомічних вимірювань продихів, включаючи SD , глибину пори продиху (оцінюється як ширина захисної клітини) та максимальну площу пори продиху (розраховується на основі довжини пори) [39]. Незважаючи на те, що робочий g_s зазвичай значно нижчий за максимальну потужність, вимірний g_s позитивно корелює з розрахованим $g_{s_{max}}$. Більш того, передбачається, що адаптації в $g_{s_{max}}$ дозволяють рослинам регулювати робочі швидкості газообміну, підтримуючи тургорний тиск захисних клітин в оптимальному стані. Вважається, що це забезпечує кращу чутливість продихів та швидке регулювання реакції апертури [40]. Тому, хоча SS і SD є єдиними змінними, які визначають газообмін листя, зміни цих ознак продихів дозволяють рослинам регулювати як A , так і водоспоживання [16].

Варіації у розмірі та щільності продихів можуть виникати через генетичні фактори та/або зростання в різних умовах навколишнього середовища. Часто передбачається негативна кореляція між двома ознаками продихів. Цей зворотний зв'язок спостерігався при пластичному розвитку у

відповідь на зміни в навколишньому середовищі, а також під час довгострокової еволюційної адаптації [41]. Аналіз гербарних і скам'янілих останків рослин дозволяє припустити, що SS і SD змінювалися у відповідь на концентрацію CO₂ в атмосфері протягом еволюційного часу, ймовірно, щоб забезпечити регулювання $g_{S_{max}}$ та дифузію CO₂ в лист. У зразках, отриманих у періоди, коли концентрація CO₂ була низькою, спостерігалось зменшення SS та збільшення SD. З іншого боку, коли рівень CO₂ у атмосфері був високим, SS збільшувався, а SD зменшувався. Така адаптивна реакція на CO₂ спостерігається у багатьох вимерлих видів; однак це не завжди відбувається у всіх досліджених видів [42]. Хоча різні комбінації SS та SD можуть призводити до подібних змін $g_{S_{max}}$, існують обмеження щодо того, наскільки більша частина епідермісу може бути змінена завдяки продихам. По-перше, абсолютно необхідні й інші функціонально важливі структури листа, такі як жилки та трихоми. По-друге, для ефективного функціонування продихів необхідно, щоб між ними була відстань не менше однієї епідермальної клітини [43]. Тому зміни SS та SD обмежені ділянкою епідермісу [44].

Тому можливо зробити висновок, що рослини оптимізують $g_{S_{max}}$ шляхом збільшення SD у поєднанні зі зменшенням SS. Зміни у бік збільшення SD у поєднанні зі зменшенням SS можуть зберегти або покращити загальну площу пор (через збільшення SD), але також можуть забезпечити більш короткий шлях дифузії (із-за меншої глибини пор), потенційно приводячи до поліпшення газообміну. Хоча малий SS у поєднанні з високим SD часто призводить до підвищення $g_{S_{max}}$, можливо, що $g_{S_{max}}$ може бути знижений тільки за рахунок меншого SS. Зниження $g_{S_{max}}$ через менший розмір SS пов'язане з більш високою економією води для рослин, що зазнають посухи та додаткової обробки ABA. Найменші продихи також пов'язані з покращенням WUE у *Arabidopsis thaliana* [41]; а

сорти рису з меншим SS мають здатність сильно знижувати g_s в умовах посухи [45].

Для кращого розуміння того, як культури зі зміненими SD, SS або функціональними змінами можуть працювати в умовах майбутніх кліматичних сценаріїв, важливо розглянути комбінований вплив численних абіотичних факторів. Особливе значення мають прогнозоване зниження доступності води, підвищення концентрації CO_2 в атмосфері та підвищення температури. У той час як зниження доступності води та підвищення концентрації CO_2 часто призводить до закриття продихів, що призводить до зниження g_s , підвищення температури може мати протилежний ефект, змушуючи продихи відкриватись, щоб пом'якшити наслідки перегріву.

Форма захисних клітин та наявність або відсутність допоміжних клітин також впливають на механізми руху продихів [16]. Різноманітність у морфології продихів зазвичай спостерігається у різних видів і може бути пов'язана з адаптацією до певних умов середовища [46]. Наприклад, у сімействі трав'янистих морфологія продихів часто гіпотетично сприяла успішній диверсифікації, особливо в місцях проживання зі змінною доступністю води [47]. Декілька досліджень, що порівнюють реакцію відкриття та закриття продихів між травами та видами з ниркоподібними продихами, показують, що трави демонструють швидшу та ефективнішу регуляцію продихів [34,48]. Лінійні захисні клітини у формі гантелі вимагають лише невеликих змін в обсязі, щоб викликати відкриття продихів і, отже, досягти більшої площі пор. Велика та швидка реакція продихів трав також пов'язана з фізичною взаємодією між гантелеподібними захисними клітинами та фланкувальними допоміжними клітинами. Допоміжні клітини здатні не лише обмежувати, а й приймати рух захисних клітин, забезпечуючи механічну перевагу. Вони функціонують шляхом швидкого постачання іонами захисних клітин, сприяючи взаємній зміні тургорного тиску [49]. Цей ефективний

осмотичний потік сприяє швидкому руху продохів і тому вважається, що він дає для трав адаптивні переваги. Передбачається, що повільна реакція продохів призводить до менш ефективного поглинання CO_2 під час відкриття продохів та надмірної втрати води під час закриття продохів [36].

В певних умовах навколишнього середовища (наприклад, коливання освітленості) рослини з високочутливими продохами можуть досягати більш високої WUE. Мутантні рослини, позбавлені допоміжних клітин, не відкривають GC так само широко, як звичайні рослини, а також демонструють повільнішу відповідь продохів на зміну інтенсивності світла, що дозволяє припустити, що допоміжні клітини є невід'ємною частиною ефективного функціонування системи продохів у трав [50].

Незважаючи на відносно недавнє відкриття білків MUTE та PAN у травах, що відповідають за наведені вище морфологічні ознаки, залишається ще багато питань без відповіді щодо взаємодії допоміжних та захисних клітин, особливо у нетрав'янистих видів, які демонструють різноманітність морфології комплексу продохів з різною кількістю та розташуванням допоміжних клітин [33]. Подальше вивчення того, як різноманітність морфологій комплексу продохів впливає на фізіологію рослин, може покращити наше розуміння того, як ці особливості можуть сприяти покращенню WUE.

1.2.4 Метаболітичні основи механізму керування продохами

Розуміння механізмів, що регулюють положення та розмір продохів на молекулярному рівні у пшениці, дуже важливе, оскільки ця інформація може бути продуктивно використана для покращення WUE в умовах посухи. Всі рослини відповідають на гострий дефіцит води закриттям продохів, щоб запобігти втраті води шляхом транспірації. В результаті або знижується тургорний тиск або WUE, або створюється атмосфера низької вологості [51]. Також це призводить до зменшення потрапляння CO_2 в листя

[52]. Це дає змогу вивільнити більше електронів для утворення ROS. Зі зменшенням транспірації збільшується кількість тепла, яке має бути розсіяне.

Цікавим є те, що за дослідженнями реакція продихів залежить від вмісту вологи у ґрунті, а не від водного статусу листя [53]. На підставі цих досліджень можна зробити висновок, що продихи реагують на хімічні сигнали, такі як АВА, які виробляються при зневодненні коріння, навіть якщо вміст води в листі достатній. Висока температура всередині рослини, що підвищується за рахунок умов навколишнього середовища шляхом транспірації, сприяє накопиченню АВА і знижує активність продихів. АВА змінює фізіологію рослини та відіграє регуляторну роль у процесі старіння та ремобілізації асимілятів. В інших дослідженнях було помічено, що екзогенне застосування АВА в період антезису збільшує кількість розчинних вуглеводів у пагонах, які в момент дозрівання транспортуються у зерно [54]. Збільшення концентрації цитокініну у ксилемі безпосередньо сприяє відкриттю продихів і впливає на їх чутливість до АВА. Таким чином, очевидно, що продихи поступово реагують на посуху, що призводить до загального зниження фотосинтезу [5].

Однак активність продихів контролюється рядом складних внутрішніх та зовнішніх факторів на додаток до доступності ґрунтової води. Як провідність продихів, так і індекс продихів впливають обмеження руху ізотопів вуглецю ($D^{13}C$). Наприклад, сорти австралійської пшениці *Drysdale* та *Rees*, виведені для низького вмісту $D^{13}C$, демонструють вищу WUE та приблизно на 10% вищу врожайність у жарких та сухих умовах [55]. В умовах, коли культури могли підтримувати найкращий водний баланс, генотипи показали позитивний зв'язок між $D^{13}C$ та врожайністю зерна.

1.2.5 Формування продихів у *T. Aestivum*

Розвиток комплексів продихів у трав, включаючи *T. Aestivum*, відрізняється від такого у дводольних за низкою ознак. Насамперед, продихи у трав формуються з гантелевидних GC, які фланкуються SK, що розвиваються паралельними рядами в певних та специфічних епідермальних клітинних проміжках. На відміну від них, у дводольних GC мають ниркоподібну форму і формують продихи, які розкидані по епідермісу менш упорядкованому порядку.

У листі трави, що зароджується, розвиток продиху відбувається по просторово-часовому градієнту: найраніші стадії відбуваються в нижній частині листа, а потім у міру розширення листа клітини переміщуються вгору [56]. Цей шлях розвитку можна розбити на 6 етапів і проілюструвати з прикладу рисунку 1.2. Спочатку, поблизу основи листа, до специфікації клітин лінії продихів, потенційні попередники проліферують у певних місцях (Стадія 1). По мірі просування недиференційованих клітин вгору листової пластинки альтернативні клітини вступають на шлях розвитку лінії продихів через асиметричний первинний поділ, що призводить до утворення меншої GMC і сестринської більшої клітин (стадія 2). Клітини з проміжків по обидва боки від новоствореної GMC потім діляться асиметрично, утворюючи SMC (Стадія 3). Після того як клітини збільшуються в розмірах, зрілі GMC виявляються у оточенні двох SK, що зароджуються (стадія 4), остаточний симетричний розподіл GMC призводить до утворення двох незрілих GC (стадія 5). Комплекс продиху дозріває та розширюється, утворюючи пару гантелеподібних GC, які поділяються, утворюючи пору продиху (стадія 6).

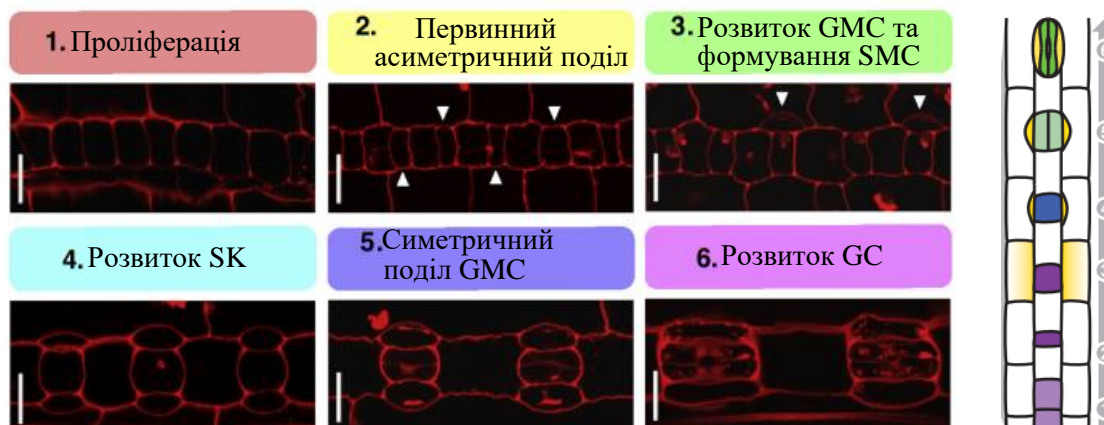


Рисунок 1.2 – Шість стадій розвитку продихів трави. (1) Відбір клітин лінії продихів у певних рядах. (2) Первинний асиметричний поділ призводить до утворення дрібніших захисних материнських клітин (GMC), показаних білими стрілками, і більших епідермальних клітин. (3) Потім GMC розширюються і утворюються допоміжні материнські клітини (SMC) (білі стрілки) за допомогою асиметричних поділів. (4) Дозрівання дочірніх клітин. (5) GMC поділяються симетрично. (6) Подовження та дозрівання GMC для формування комплексу захисних клітин (GC). Масштаб лінійки = 5 мкм [35,50].

Таким чином, кожен зрілий комплекс продихів трав включає центральну пору, пару гантелевидних GC і дві фланкуючі SK. Кожен комплекс займає повітряний простір, або «міжпродихову порожнину», що утворюється між клітинами мезофілу нижнього шару, що сприяє ефективній дифузії газів усередину та назовні листа. Декілька недавніх досліджень дають уявлення про транскрипційні та регуляторні механізми, що лежать в основі розвитку продихів трави. Вони використовують геномні послідовності трави та ґрунтуються на знаннях, отриманих від *Arabidopsis* [35].

1.2.6 Особливості генів bHLH у ортологічних білків

Через новизну досліджень даного напрямку виникає питання обґрунтування певних логічних заключень, які можливо зробити на аналізі ортологічних структур у подібних культур рослин, сортів тощо.

Гени сімейства bHLH широко використовуються тваринами та рослинами для регуляції процесів розвитку. Паралельно з розвитком продихів у *Arabidopsis*, як тканинноспецифічні bHLH-регулятори (MyoD, myogenin, Myf5 і MRF4), так і тканиннонеспецифічні bHLH-фактори (E-подібні білки) діють у декількох точках переходу клітинних станів, визначаючи розвиток [57]. Коли рослини почали використовувати модулі bHLH для регулювання формування продихів? Ранній біоінформаційний аналіз геному моху *P. patens* виявив лише два гени, схожі на SPCH, MUTE і FAMA, які були названі SMF (на ім'я домена SPCH, MUTE і FAMA) [58]. Передбачалося, що ці два гени грають роль у розвитку продихів. Пізніше дослідження частково підтвердило цю гіпотезу, показавши, що SMF1 здатний частково усувати дефекти мутантів *Arabidopsis* MUTE та FAMA [23].

Прямі *in planta* докази функції SMF1 у розвитку продихів були отримані лише відносно недавно, коли було доведено, що мутанти *P. patens* з нокаутом SMF1 мають фенотип "втрати продихів" [59]. Ці результати дозволяють припустити, що гени SMF виникли на ранніх етапах еволюційної історії наземних рослин для контролю формування продихів, і що гени SMF мають подвійну функцію, сприяючи формуванню GMC і GC. Пізніше, у міру розширення групи Ia bHLH генів, кожен паралог набув спеціалізованих функцій для регулювання складніших процесів патернінгу, таких як посилення поділів. Наприклад, на відміну від *P. patens*, у якого тільки маленькі спорофіти мають продихи, листові пластинки еудикоти великі, плоскі та ефективно організовані для фотосинтезу. Еволюційний винахід посилюючих поділів, які дають початок як додатковим продихам, так і клітинам епітелію, дозволяє ділити епідермальні клітини та регулювати щільність продихів у міру розростання листа завширшки. Також підтверджено, що PpSCRM1 взаємодіє з PpSMF1 як у двогібридному аналізі дріжджів, так і у бімолекулярному флуоресцентному

комплементарному аналізу. Генетичні докази також узгоджуються з гетеродимеризацією SMF1-SCRM1, оскільки на капсулах мутанта *ppscrm1* не виявлено продохів у відповідному дослідженні [59]. Це вказує на те, що гетеродимери bHLH підгруп Ia та IIIb функціонують як давній модуль у розвитку продохів [60].

Розуміння генетичного контролю розвитку продохів у трав було розширено двома нещодавніми дослідженнями [50,61]. Автори вивчили роль та функції індуктора експресії CBF (ICE)/SCREAM (SCRM) bHLH та SPEECHLESS (SPCH), MUTE та FAMA-подібних bHLH у модельній траві *B. distachyon* за допомогою мутагенезу, редагування геному та інших нових технологій. Їх найцікавіше відкриття полягає в тому, що BdMUTE діє як один з ключових регуляторів формування дочірніх клітин та правильного поділу материнських клітин.

Поєднуючи вказану інформацію із іншими дослідженнями [47,60,62], можливо зробити висновок про доцільність теоретичного аналізу отриманих у досліді даних для подібних структур. При цьому, з одного боку, це безумовно є логічним та підтверджує відомості стосовно філогенетичних дерев (додаток А демонструє філогенетичне дерево із примітками стосовно еволюційних змін), з іншого ж, даний фактор свідчить про важливість даного набору генів через їх консервативність.

Ілюстрації із досліджень [62] (рисунок 1.3) та [47] (рисунок 1.4) можливо винести як лаконічний висновок про доцільність аналізу ортологічних структур як у інших трав, зокрема важливих для сільського господарства (наприклад, *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Zea mays*), так і у деяких інших модельних рослин (*Arabidopsis Thaliana*).

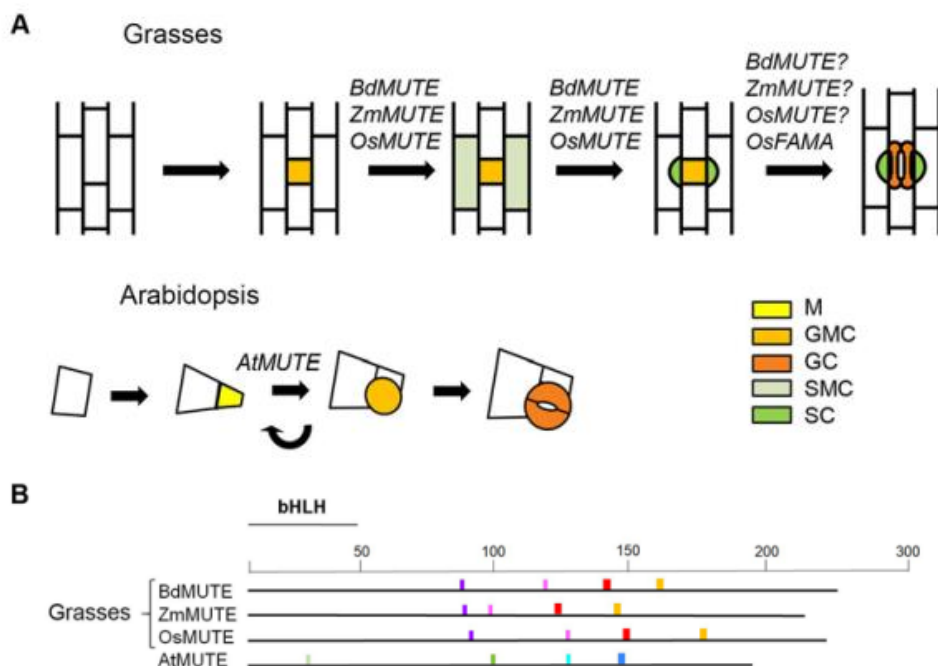


Рисунок 1.3 – Роль ортологів MUTE у трав та AtMUTE у розвитку продохів. (A) Гени MUTE визначають ідентичність SMC. Вони також контролюють долю GMC, причому дія BdMUTE менша, ніж дія ZmMUTE та OsMUTE. OsFAMA регулює останню стадію розвитку продохів. У *Arabidopsis* AtMUTE регулює перехід меристеми до GMC. (B) Схематична діаграма потенційних мотивів рухливості у послідовності білків MUTE. Консервативні мотиви у білках MUTE можуть сприяти міжклітинному переміщенню цих транскрипційних факторів із GMC до SMC. Навпаки, мотиви, що збереглися в AtMUTE, можуть перешкоджати міжклітинному переміщенню. Різнокольорові квадрати представляють різні мотиви [62].

Додатково можливо зазначити, що відповідно до джерела [46] SPCH, MUTE та FAMA розійшлися до еволюційного поділу між однодольними та еудиковими, та різні функції їх ортологів відображають відмінності в онтогенезі продохів між цими двома групами.

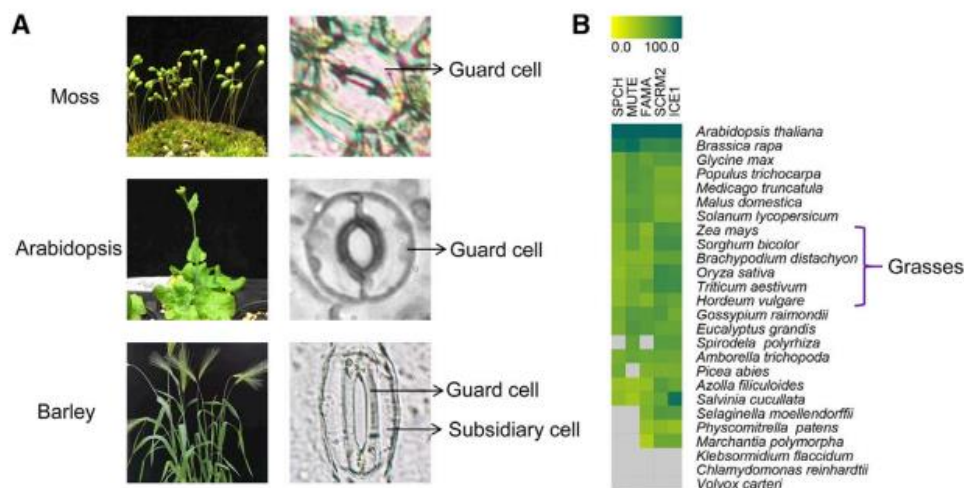


Рисунок 1.4 – Еволюційні та еволюційні особливості для продихів трав. (А) Зображення рослин та продихів *Physcomitrella patens*, *Arabidopsis thaliana* та *Hordeum vulgare*. (В) Теплова карта подібності для розуміння еволюції білків розвитку та патернінгу продихів у різних видів. Кольорові квадрати від нуля (жовтий) до 100% (зелений) вказують на подібність білкових послідовностей кожного виду в порівнянні з *Arabidopsis*. Сірі квадрати означають, що не було знайдено білків, які відповідають критерію відбору [47].

У травах ортологи SPCH, MUTE, FAMA та SCR1/2 були ідентифіковані в геномах рису, кукурудзи, пшениці та *Brachypodium distachyon* (*B. distachyon*) [61]. Коли кількість копій MUTE, FAMA і SCR1/2 незмінна між *Arabidopsis* і травами, у травах відбулася дуплікація SPCH. Сучасні дані свідчать про те, що дві копії SPCH не є однаковими, але перекривається внесок у розвиток продихів у трав. У *B. distachyon* мутанти із втратою функції *spch2* демонструють сильніше зниження числа продихів порівняно з мутантами *spch1*. Втрата обох копій *BdSPCH1/2* у *B. distachyon* призводить до фенотипу з відсутністю продихів, що імітує фенотип мутанта *spch* knock-out у *Arabidopsis* [61]. Мутант рису *ossrch2-1* має знижену густину продихів поряд з дефектами розміщення продихів. Хоча SPCH загалом функціонують для ініціації лінії продихів, вони різняться у різних видів. Зазначається [60], що гени SPCH швидко дивергували, щоб регулювати транскрипційні функції.

У порівнянні з SPCH, MUTE і FAMA, більш функціонально консервативні у різних видів. Надекспресія Zm/OsMUTE та OsFAMA в *Arabidopsis* призвела до утворення надлишкових продихів та зрілих одиночних продихів, відповідно, повторюючи фенотип надекспресії генів *Arabidopsis* [60].

Незважаючи на те, що MUTE та FAMA зберігають консервативні ролі у просуванні ідентичності GMC та GC, вони мають різні механізми регуляції клітинного циклу у *Arabidopsis* та трав. AtMUTE експресується виключно в меристемоїді для зупинки асиметричних поділів, тоді як OsMUTE, як передбачається, сприяє одному асиметричному поділу клітин в зоні продиху. Зазначається, що це відбувається через те, що трави не мають зони меристемоїду, де припинення асиметричного поділу клітин необхідно для диференціації GMC. Оскільки цей перехід регулюється MUTE та FAMA, взаємодія між цими двома генами, а також їх подальшими петлями клітинного циклу могла бути значно змінена під час видоутворення [60].

SCRM/SCRM2 експресується протягом всієї лінії продихів і утворює гетеродимери з трьома bHLH: SPCH, MUTE і FAMA. Сильний ефект дозування AtSCRM/SCRM2 вказує на те, що вони діють надмірно для керування трьома етапами диференціювання продихів [63]. Незважаючи на різку зміну структури листя між *Arabidopsis* і травами, експресія BdSCRM/SCRM2 залишається незмінною у останніх. Проте кожний гомолог функціонально відрізняється.

Мутант із втраченою функцією *bdscrm2* продукує комплекси продихів з незрілими GC, що нагадує фенотип мутанта *osfama-1* рису [61]. Таким чином, BdSCRM1 спеціалізований для сприяння формуванню GMC у проміжках продихів, а BdSCRM2 переважно бере участь у диференціюванні GC (рисунок 1.5).

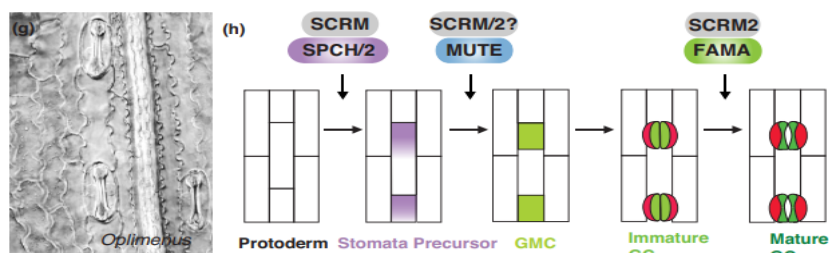


Рисунок 1.5 – Схема розвитку продихів монокотів на прикладі *T. aestivum* та *B. distachyon*. Ідентичність продихів підтримується як SCRM, і SPCH/2. MUTE контролює асиметричний поділ клітин-попередників продихів. Дозрівання GC регулюється FAMA та SCRM2. Під час формування GC утворюються дочірні клітки (червоні), які охоплюють GC [60].

В даний час немає даних про білок-білкову взаємодію, на підставі цих генетичних даних можна припустити, що модуль SCRM-SMF є консервативним у трав. Вважається, що гени bHLH групи Ia (SMF) та IIIb (SCRM) є основним внутрішнім сигнальним модулем для всіх наземних рослин і постійно перебудовуються, щоб відповідати різним програмам розвитку продихів протягом еволюції (рисунок 1.6) [60].

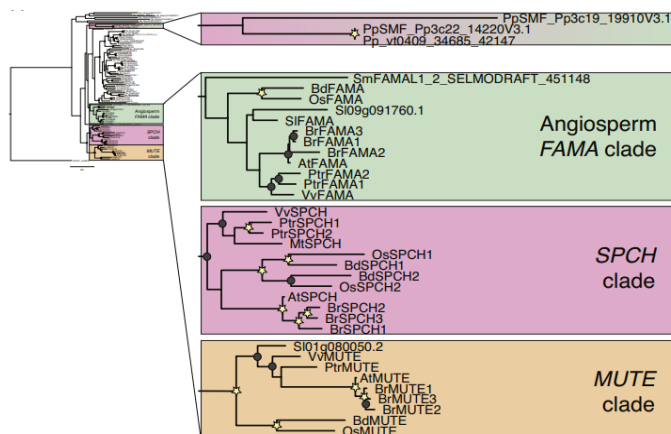


Рисунок 1.6 – Філогенетичний аналіз bHLH Ia. Кластери FAMA, SPCH та MUTE виділені світло-зеленими, рожевими та помаранчевими квадратами відповідно. Кластер SMF мохів виділений градієнтною рамкою. Масштабна лінійка: 2,0 амінокислотні заміни. Зірки: бутстреп-підтримка 90-100; точки: бутстреп-підтримка 60-89. *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Bd*, *Brachypodium distachyon*; *Br*, *Brassica rapa*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Os*, *Oryza sativa*; *Pp*, *Physcomitrella patens*; *Pta*, *Pinus Taeda*; *Ptr*, *Populus trichocarpa*; *Sl*, *Solanum lycopersicon*; *Sm*, *Selaginella moellendorffii*; *Vv*, *Vitis vinifera* [60].

1.2.7 Особливості генів EPF у ортологічних білків

Якщо із bHLH більшість можливих питань відносно вирішено і останні можуть стосуватися у більшості випадків лише відносного результуючого підвищення посухостійкості, то із EPF виникає певна особливість *T. aestivum*.

Спільно з транскрипційними факторами bHLH існує сімейство багатих на цистеїн пептидів, що передають сигнали від клітини до клітини, регулюють клітинні поділи та переходи клітинної долі, необхідні для розвитку продихів. Ці епідермальні структуруючі фактори (EPF) та пов'язані з ними рецепторні компоненти добре вивчені, наприклад, у *Arabidopsis*: EPF2 в основному регулює первинний асиметричний поділ, а EPF1 в основному контролює диференціацію GMC та відстань між продихами. EPF-подібний пептид, відомий як EPFL9 або STOMAGEN, позитивно регулює розвиток продихів, конкуруючи з EPF2 під час раннього розвитку продихів для просування долі клітин лінії продихів [64–66].

Філогенетичні та функціональні аналізи показують, що крім bHLH транскрипційних факторів та епідермальних паттернінг-факторів, їх когнітивні рецепторні компоненти TMM та сімейство ERECTA майже напевно також збереглися у всіх наземних рослин [67]. TOO MANY MOUTHS (TMM) зв'язується із ER (ER і ERL1), утворюючи активні позаклітинні комплекси для зв'язку з EPF1 і EPF2 регулювання правильного розвитку продихів. TMM, який в основному експресується в молодих GC та клітинах-попередниках продихів, є частиною авторегуляторного механізму та прямою мішенню регуляторів транскрипції SPCH [68].

Це дає вагомі підстави вважати, що у травах існує консервативний функціональний модуль розвитку продихів і стосовно EPF. Однак, незважаючи на очевидність того, що ряд пептидів EPF/L консервативний

між дводольними та однодольними рослинами [69], специфічні особливості функціонування кожного з них у травах неясні.

Оскільки зараз доступні геномні послідовності кількох трав, то можливо проаналізувати філогенетику EPF/L у травах (рисунок 1.7).

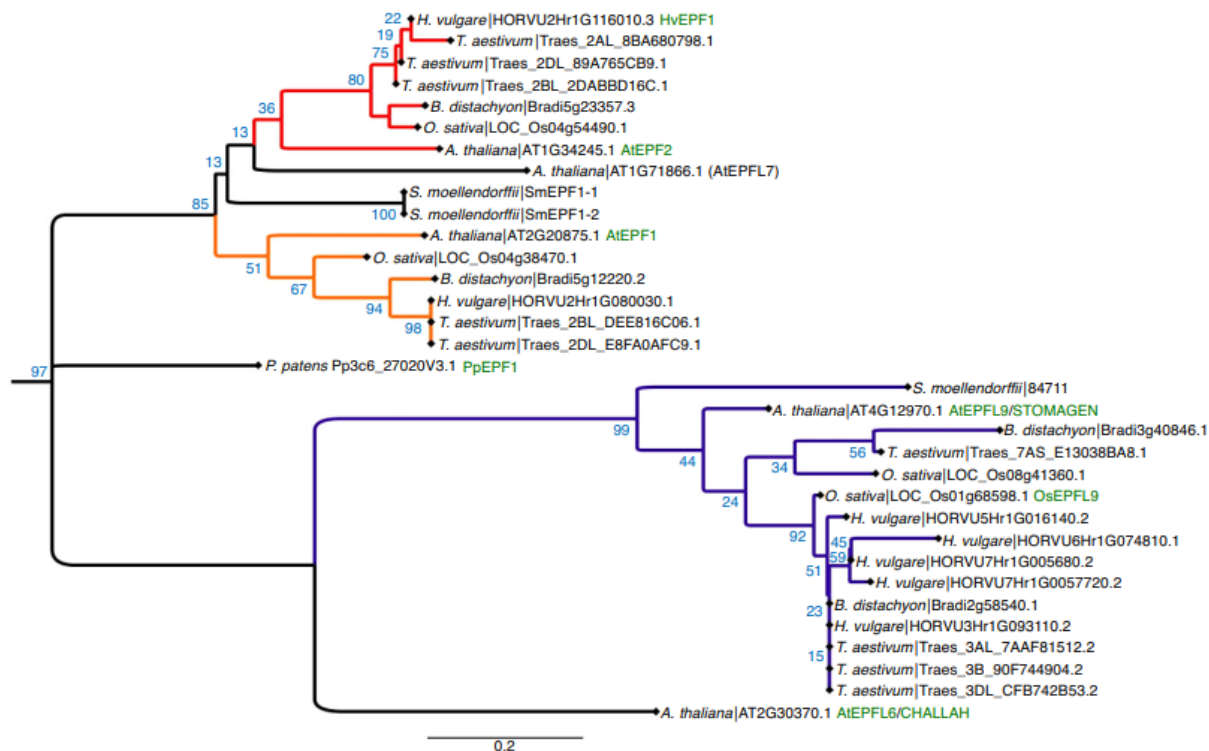


Рисунок 1.7 – Філогенетичний аналіз EPF та EPF-подібних (EPFL) пептидів у видів трав. Послідовності у дослідженні отримані в результаті BLAST-пошуку пептидів, що кодуються геномами *Hordeum vulgare* (ячмінь), *Triticum aestivum* (пшениця), *Brachypodium distachyon* та *Oryza sativa* (рис). Додаткові послідовності з BLAST-пошуку геномів *Arabidopsis thaliana*, *Selaginella moellendorffii* та *Physcomitrella patens* включені для забезпечення еволюційного контексту. Поруч із гілками показаний відсоток реплікованих дерев, у яких відповідні таксони кластеризувалися разом у ході бутстреп-тесту (1000 реплік). Дерево створено у масштабі, довжина гілок у тих самих одиницях, як і еволюційні відстані, використані для складання філогенетичного дерева [35].

Майже всі досліджені геноми у дослідженні [35] кодують два пептиди, тісно пов'язані із регуляторами прорихів EPF1 і EPF2. Винятком якраз і є пшениця (*Triticum aestivum*), яка, як гексаплоїд, має безліч ортологів як EPF1, так і EPF2.

Для EPFL9 у травах наявна дуплікація гена, що призвело до появи принаймні двох різних EPFL9-подібних генів у всіх досліджених видів. Очевидно, що комплекси продихів у трав формуються двома різними типами асиметричних поділів (які утворюють GMC і SMC) і що транскрипційні фактори bHLH, що регулюють ці ділення, певною мірою функціонально диверсифікувалися з *Arabidopsis* [50]. Сигнальні пептиди EPF розвивалися паралельно з транскрипційними факторами bHLH для регуляції розвитку SK у трав [67].

1.3 Досягнення у генетичній модифікації продихів *T. Aestivum* та їх ортологів

1.3.1 Гени групи bHLH

Гени групи bHLH, а саме SPCH, MUTE і FAMA, визначають ініціацію та проліферацію стовбурових клітин продихів (меристемоїдних материнських клітин (MMC) та меристемоїдів), диференціацію материнських клітин (GMC) та термінальну диференціацію захисних клітин (GC) [70], що відповідає наведеній вище інформації.

У дослідженні [71] транскрипційний фактор SPEECHLESS (SPCH) насамперед впливає на розмір та товщину листа. У дослідженні також встановлено, що для міжшарової координації потрібний рецептор клітинної поверхні TOO MANY MOUTHS (TMM).

У іншому огляді [35] зазначається, що мутанти, позбавлені функції VdMUTE, відомі як рослини з дефектом ідентичності дочірніх клітин (sid), виробляють GC без фланкуючих SK. Ці рослини дозволили дослідникам вперше перевірити важливість SK у поведінці продихів трави. Те, що у рослин sid знижений gs і порушений ріст, підтверджує важливу роль SK та відкриває можливості для покращення контролю апертури продихів та

продуктивності рослин шляхом цілеспрямованого маніпулювання розвитком SK.

Дослідниками було проаналізовано [62] ортологи *Arabidopsis* MUTE у трьох видів трав: BdMUTE у *Brachypodium distachyon*, BZU2/ZmMUTE у кукурудзи та OsMUTE у рису, що підтвердило дані стосовно розбігу функцій MUTE у трав та *Arabidopsis* через особливості кінцевої морфології, як зазначено у пункті 1.2.6. Особливістю є огляд ортологів MUTE та аналіз їх дії: дія BdMUTE менша, ніж BZU2/ZmMUTE і OsMUTE. Це підтверджує ідею дивергенції не тільки від *Arabidopsis*, але також всередині трав.

Ще одна низка дослідів на *B. distachyon* [50,61] показує вищу важливість MUTE для трав у порівнянні із *Arabidopsis*. Зазначається, що AtICE1 і AtSCRM2 дублюють один одного у розвитку продихів у *Arabidopsis*, тоді як у *B. distachyon* BdICE1 функціонує у встановленні доли продихів, а BdSCRM2 необхідний для диференціації комплексів продихів. Більш того, основна функція AtSPCH полягає в управлінні асиметричним розподілом, а BdSPCH визначають долю продихів, оскільки BdSPCH2 має потенціал у трансдиференціюванні волоскових клітин у продихах [47]. Тобто, відзначається мобільність білка BdMUTE у *B. distachyon*, що дозволяє припустити, що BdMUTE може відігравати життєво важливу роль у формуванні дочірніх клітин у видів трав.

Тобто, BdMUTE, окрім рекрутування SK, контролює долю GMC повністю автономно [72]. Дослідження цікаве спробою пояснити ці процеси: за думкою дослідників, неповна пенетрантність *bdmute* дозволяє припустити, що існують невідомі фактори ініціації формування продихів цього мутанта, а повне порушення доли GMC у *osmute* та *bzu2-1* дозволяє припустити, що ці невідомі гени, що регулюють долю GMC, могли бути заблоковані сільськогосподарською практикою [62]. Зазначається, що у рисі білки, що кодуються цими генами, роблять це, як і в *Arabidopsis*, шляхом позитивної регуляції експресії OsFAMA. Оскільки OsFLP

контролює орієнтацію площини розподілу GMC [73], тому можливо, що за позитивну регуляцію в такому випадку відповідає OsMUTE, при цьому його можлива роль у морфогенезі GC залишається частково незрозумілою. FAMA і FLP, регульовані MUTE, крім контролю диференціювання GC, також забезпечують, щоб GMC проходили один розподіл, при цьому OsFAMA та OsFLP не забезпечують репресію зайвого поділу GMC, та, нарешті, наявність у колеоптілі риси продихів, подібних до продихів *Arabidopsis*, ставить під сумнів роль саме OsMUTE/OsFAMA в цьому ембріональному органі і припускає, що SK необхідні для морфогенезу GC [72].

Також цікавим є дослідження [74], де також зазначається, що транскрипційний фактор VdMUTE є ортологом регулятора продихів AtMUTE, який визначає долю попередників GC у *Arabidopsis*. При цьому відмічається його важлива роль при формуванні фланкуючих SK, та відзначається, що це, скоріше за все, пов'язано із придбанням ним рухливості від клітини до клітини у *Brachypodium*. Фізіологічні аналізи рослин без SK експериментально підтверджують класичну гіпотезу про те, що SK забезпечують більшу реактивність продихів та більший діапазон апертур пор. Маніпулювання формуванням та функцією SK у культурах, таким чином, може бути ефективним підходом для підвищення продуктивності рослин.

1.3.2 Гени EPF

Клітинно-клітинна сигналізація забезпечує належну щільність та відстань між продихів. Молекулярні компоненти цієї сигналізації включають секретовані цистеїн-багаті пептиди EPIDERMAL PATTERNING FACTOR (EPF)/EPF-LIKES, рецепторні кінази сімейства ERECTA з багатими лейциновими повторами (LRR-RK) і LRR-рецептор-подібний білок TOO MANY MOUTHS, сигнальний каскад мітоген-

активованих протеїнкіназ (MAPK), опосередкований YODA (YDA), МКК4/5 та МРК3/6 [75].

Серед цих сигнальних компонентів EPF2 насамперед сприймається ERECTA як сигнал обмеження ініціації ліній клітин продихів, а EPF1 насамперед сприймається ERECTA-LIKE1 (ERL1) як сигнал забезпечення відстані між продихами [76].

Крім того, у дослідженнях також були ідентифіковані нові білки полярності, які здійснюють асиметричний поділ клітин (ACD) у лініях клітин продихів [77].

До цього ж недавні дослідження [69] охарактеризували роль HvEPF1, ячмінного ортолога AtEPF1/2, який при ектопічній експресії пригнічує розвиток продихів. Аналіз надекспресуючого HvEPF1 епідермісу листя ячменю показав, що багато GMC не прогресують до формування комплексів продихів. Більш того, високий рівень експресії HvEPF1 інгібує первинний асиметричний поділ, в результаті якого утворюються GMC, дозрівання GMC, виробництво SMC та формування порожнин продихів. Таким чином можливо зробити висновок, що трав'яний сигнальний пептид, подібний за послідовністю з EPF1 і 2 *Arabidopsis*, здатний запобігати утворенню GMC і викликати зупинку розвитку GMC до утворення SMC [35].

При цьому як функціонує HvEPF1 при нормальному ендегенному рівні, ще належить з'ясувати. Одна з потенційних функцій, враховуючи велику кількість заарештованих GMC, позбавлених SK, полягає в тому, що HvEPF1 в першу чергу знижує рівень білка HvSPCH, запобігаючи подальшому розвитку GMC лінії продихів. Актуальним є питання про те, чи регулює активність HvEPF1 прямо або опосередковано через ген або білок HvMUTE або інші мішені, розташовані нижче від HvSPCH [35].

Сильне зниження частоти продихів та газообміну, спричинене збільшенням рівня HvEPF1, призвело до покращення посухостійкості

ячменю та ефективності використання води. Зниження здатності до фотосинтезу не вплинуло на врожайність зерна ні в умовах нормального зрошування, ні в посушливих умовах. Ці результати вказують на перспективні шляхи покращення зернових культур шляхом маніпулювання щільністю продихів. Відомості про функцію EPF/L трави розширилися завдяки дослідженню, що описує використання методів редагування генів для нокауту рисового ортолога *Arabidopsis* EPFL9, OsEPFL9a, що призвело до 8-кратного зниження щільності продихів [78]. Ці дослідження EPF/L ячменю та рису підтверджують, що, як і в *Arabidopsis*, у травах активні як позитивні, так і негативні регулятори розвитку продихів.

При надекспресії ортологічного SDD1 *Arabidopsis* в кукурудзі [79] та томаті [80] змогли зменшити щільність продихів у листі, що призвело до зниження споживання води та покращення стійкості до посухи у обох культур, а також до покращення WUE у кукурудзи [16].

Аналогічних результатів було досягнуто у ячменю шляхом надекспресії HvEPF1 [69]. В умовах посухи трансгенні лінії ячменю були здатні утримувати вищі рівні вмісту води в ґрунті завдяки приблизно 50% скорочення щільності продихів і більш коротким захисним клітинам. Ці рослини були здатні уникати водного стресу протягом більш тривалих періодів, демонструючи падіння активності фотосистеми II на 4-5 днів пізніше, ніж контрольні рослини. Аналіз ізотопів вуглецю показав, що мутантні рослини покращену WUE при водному стресі, і, незважаючи на невелике зниження A, не спостерігалось згубного впливу на зростання рослин або врожайність [16].

Аналогічно, надекспресія рисового OsEPF1 призвела до появи рослин рису з покращеною WUE [17]. Дві генетично модифіковані лінії, одна з помірним (~58%), а інша з сильним (~88%) зниженням щільності продихів, мали покращене водозбереження на вегетативній стадії, використовуючи на 42% і 38% менше води відповідно, ніж контроль. Протилежний ефект на

розвиток апарату продохів був отриманий при надекспресії гена SHORTROOT 1 (*ZmSHR1*) кукурудзи в рисі, що призвело до підвищення щільності та деяких випадках до зниження розміру продохів [81]. Незважаючи на зміни у властивостях продохів, ні *A*, ні *gs* суттєво не відрізнялися від контролю, що говорить про те, що збільшення щільності не чинить ні позитивного, ні негативного впливу на газообмін. У даному конкретному дослідженні не повідомлялося про WUE, але, судячи з значень *A* і *gs*, зміни є малоймовірними [16].

Дослідження *TaEPFL1* з мутанта маточного листа пшениці HTS-1, де виконувалося вирівнювання послідовностей та філогенетичний аналіз зазначеного об'єкту, показали, що *TaEPFL1* є членом сімейства генів EPFL, що кодує білок EPFL1. Ген *TaEPFL1* має аномально високий рівень експресії в маточках у HTS-1 в порівнянні з рівнем експресії в маточках і тичинках. Гетерологічна експресія гена *TaEPFL1* в *Arabidopsis* (95,83% ідентичності із ортологом у *T. aestivum*) викликала скорочення довжини ниток і квітконіжок, деградацію ниток і, можливо, зниження експресії гена *AtACO2* [82]. Зазначається, що *TaEPFL1* відіграє важливу роль у розвитку тичинок і що надекспресія цього гена призводить до аномальних тичинок. Це опосередковано стосується і нашої задачі, так як тичинки вважаються важливим репродуктивним органом рослини, зростання та розвиток якого безпосередньо впливає на відтворення та врожайність культури (що можливо трактувати ще як генетичне поліпшення таких ознак пшениці, як чоловіча стерильність та врожайність).

У іншому дослідженні EPF [3], а саме мутантів, що демонструють змінену щільність продохів, перевірили, чи можна покращити WUE безпосередньо шляхом маніпуляції генами, що контролюють щільність продохів. Як результат встановили, що зниження $g_{w_{max}}$ за рахунок зменшення щільності продохів у рослин, що конститутивно надекспресують EPF2 (EPF2OE), збільшило як миттєву, так і довгострокову

WUE без істотної зміни фотосинтетичної здатності. І навпаки, рослини, позбавлені експресії EPF1 і EPF2, демонстрували більш високу щільність продихів, вищий $g_{w_{max}}$ і нижчу миттєву WUE, і навіть нижчу (але значно) довгострокову WUE.

Цікаві особливості наведені і у дослідженні [83], де дослідники надекспресували OsEPF1 рису для отримання рослин рису зі зниженою щільністю продихів, що дійсно призвело до зниження провідності продихів листя та підвищення ефективності використання води при не істотному впливі на фотосинтез у трансгенних лініях OsEPF1 і OsEPFL9. Аде цікавим є і те, що окрім цього виявлено, що аеренхіма кори кореня (RCA) формується конститутивно в лініях OsEPF1OE незалежно від віку та положення тканини, що свідчить про пов'язаність розвитку RCA та розвитку продихів двома можливими механізмами: зниження провідності продихів перешкоджає дифузії кисню до кореня, створюючи дефіцит кисню та стимулюючи утворення RCA, або ж у цьому може бути задіяний невідомий сигнальний шлях EPF.

Цікавим є можливість одночасного використання антагоністичних пептидів для досягнення іноді неочікуваних результатів, наприклад, у дослідженні [84] вивчалися патерни експресії, трансгени надекспресії та міжвидова комплементация антагоністичних лігандів продихів, а саме ортологічні пептиди *Arabidopsis* AtEPF2 і AtSTOMAGEN/AtEPFL9 в *T. aestivum* та *Brachypodium*. Застосування біологічно активних пептидів VdEPF2 пригнічувало ініціацію продихів, при цьому цілком не впливаючи на диференціацію попередників продихів в *Brachypodium*. Крім того, інгібуюча роль цих EPF-пептидів під час розвитку продихів у *Brachypodium* пригнічувалася контрастною позитивною дією пептиду VdSTOMAGEN у дозозалежній манері.

Це можливо використати при створенні нових стратегій підвищення врожайності сільськогосподарських культур шляхом використання

антагоністичних пептидів рослинного походження, які оптимізують густину продихів на епідермісі рослин при створенні незвичайного розміщення продихів. Наприклад, у дослідженні [85] основними напрямками дослідження були EPF1 (експресія забезпечувала низьку щільність продихів), тоді як епідермальний фактор EPFL9 (Stomagen), мав оборотний ефект. У дослідженні виведені ефективні відстані впливу епідермальних факторів із наступним логічним заключенням: ефективна відстань впливу EPF1 значно більша за Stomagen і становить від 200 до 400 мкм, у той час як у Stomagen цей показник становить до 100 мкм.

Дуже цікавим також є і дослідження [86], де показано, що пригнічення експресії TaEPF1 знижує щільність продихів та зупиняє розвиток продихів у пшениці. У різних лініях TaEPF1-OE, представлених у зазначеному дослідженні, був виявлений діапазон щільності продихів, причому максимальне зниження ~90% було виявлено в екстремальному фенотипі. Зазначається, що зниження на рисі і ячмені у інших дослідженнях сягають до 75% і до 99% відповідно. Як наслідок, можливо зробити висновок, що в умовах контрольованого середовища та теплиці лінії з помірним пригніченням диференціації продихів (пригнічення експресії TaEPF1) знижують споживання води при збереженні фотосинтезу, що призводить до покращення WUE, при цьому є можливість підтримувати врожайність, еквівалентну контрольним рослинам дикого типу. Це суперечить загальній парадигмі підвищення WUE при надекспресії EPF1 та EPF2, але це і є особливістю *T. aestivum*, зазначеною у пункті 1.2.7 – велика кількість ортологів EPF1 та EPF2.

1.3.3 Допоміжні системи

Тут наведені цікаві дослідження допоміжних генів, які не відносяться до основного кластеру досліджуваних генів, але аналіз яких допомагає краще розуміти можливі структури та потенціал генетичної модифікації.

У дослідженні [87] клонували фактор транскрипції NAC кукурудзи, ZmNAC49, і визначили його функцію у відповідь на посуху. Виявлено, що ZmNAC49 локалізовано в ядрі і він має транскрипційну активаційну активність. Експресія ZmNAC49 швидко та сильно індукується стресом посухи, а надекспресія підвищує стійкість до стресу у кукурудзи. Надекспресія також значно знижує швидкість транспірації, провідність продихів та щільність продихів у кукурудзи. Надекспресія ZmNAC49 впливає на експресію генів, пов'язаних з розвитком продихів, а саме ZmTMM, ZmSDD1, ZmMUTE та ZmFAMA. Крім того, виявлено, що ZmNAC49 може безпосередньо зв'язуватися з промотором ZmMUTE та пригнічувати його експресію. Загалом ці результати показують, що транскрипційний фактор ZmNAC49 пригнічує експресію ZmMUTE, знижує щільність продихів і тим самим підвищує посухостійкість кукурудзи.

Гетеротримерні комплекси білкової фосфатази 2A (PP2A) складаються з будівельної субодиниці А, регуляторної субодиниці В та каталітичної субодиниці С, з декількома ізоформами для кожної субодиниці та диференційовано зібраними комплексами. Ці комплекси, диференційно зібрані з різних ізоформ субодиниць А, В і С, регулюють розвиток, зростання, метаболізм та стресові реакції у рослин.

PP2A контролює опосередкований синім світлом рух продихів, а асоціації з SnRK2 регулює АВА-тригерне закриття продихів. Функція PP2A необхідна для формування профазы та орієнтації клітинного поділу у кукурудзи під час розвитку продихів. У дослідженні [88] повідомляється про PP2A-опосередковану позитивну регуляцію стабільності SPCH шляхом прямої взаємодії між SPCH та А-субодиницею PP2A для розвитку продихів. При цьому надекспресія PP2A-А не показала видимого фенотипу, що вказує на те, що дві інші субодиниці також необхідні для стабілізації SPCH та наступних наслідків, як показано на рисунку 1.8.

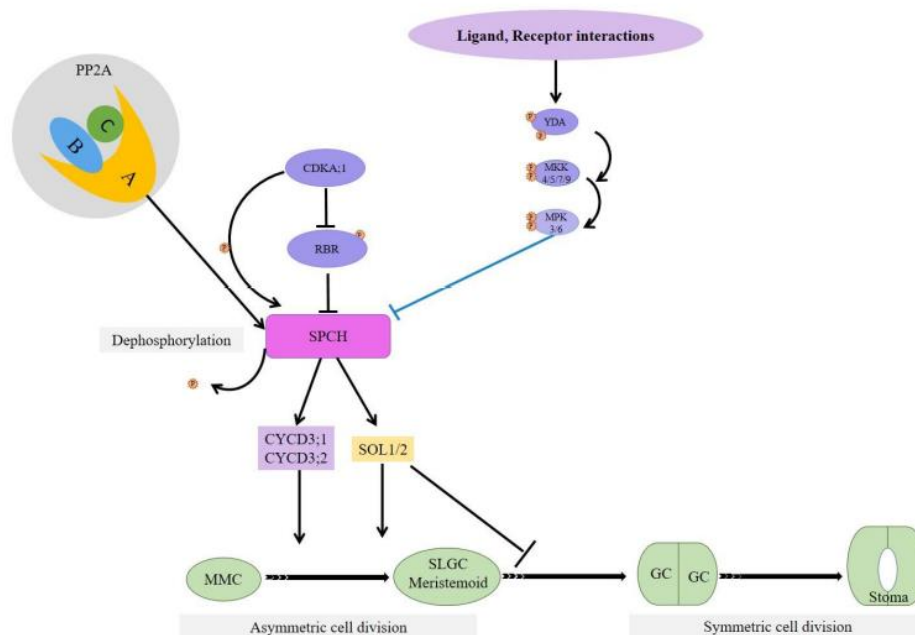


Рисунок 1.8 – Субодиниця А РР2А, яка безпосередньо взаємодіє з SPCH, в асоціації із субодиницями В і С та SPCH дефосфорилює SPCH на певній ділянці. РР2А-індуковане дефосфорилювання збільшує накопичення SPCH та стабільність [68]

У цьому ж дослідженні зауважується, що IDD16 пригнічує SPCH-індуковану ініціацію продихів. Дзеркально до IDD16, SNRK позитивно регулює розвиток лінії продихів шляхом позитивного регулювання SPCH (рисунок 1.9) [68].

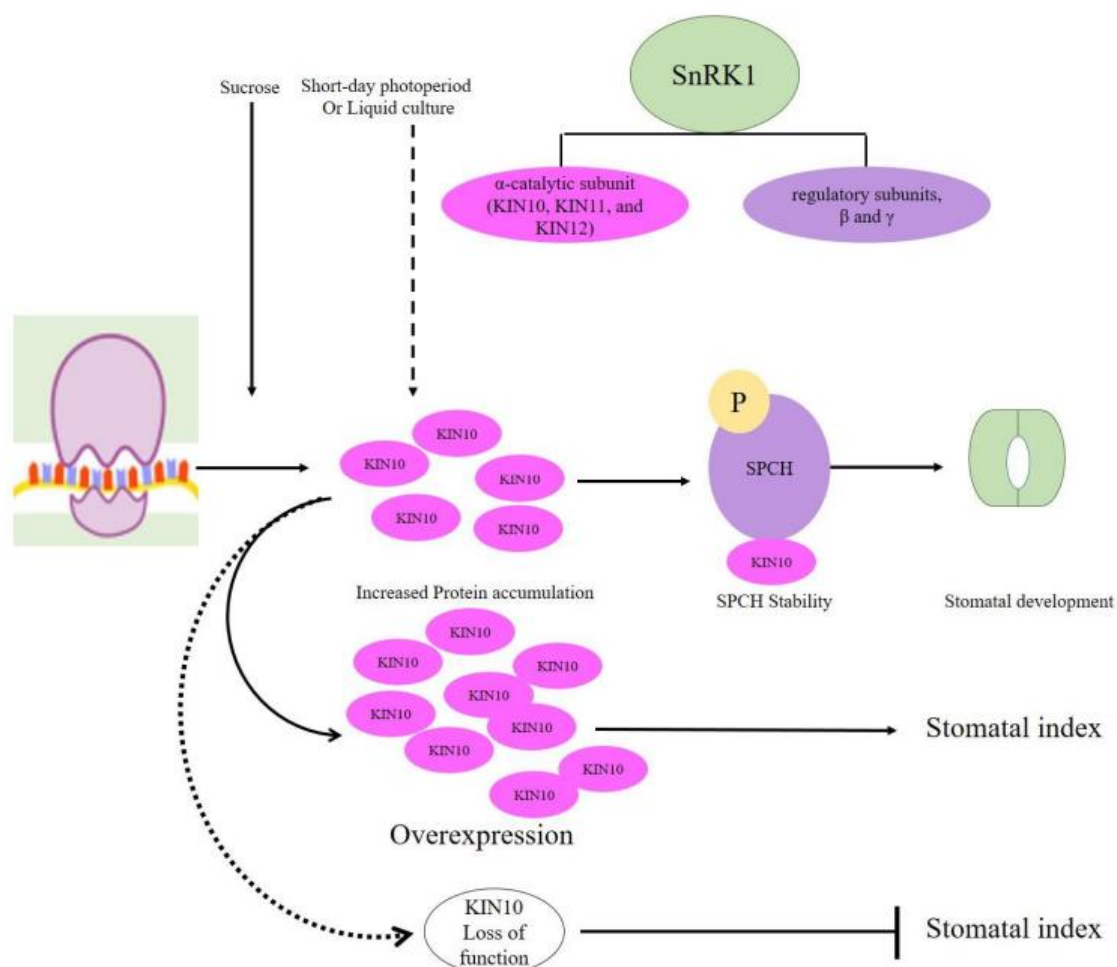


Рисунок 1.9 – Сукрозна неферментуюча-1 (SNF1)-споріднена кіназа 1 (SnRK1), особливо субодиниця KIN10, сприяє фосфорилюванню та стабілізації SPCH та розвитку продихів в умовах короткого фотоперіоду або енергетичного голодування рослин. Сукроза індукує накопичення білка KIN10 шляхом збільшення його трансляції. Надекспресія KIN10 збільшує індекс продихів, тоді як втрата функції KIN10 знижує індекс продихів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Опис рослинного матеріалу

Для дослідження використано 6 сортів *Triticum aestivum* L (також відомої як пшениця м'яка озима).

Із них посухостійкі:

- Астарта (районований сорт Інституту фізіології рослин і генетики НАН України).
- Одеська 267 (районований сорт Селекційно-генетичного інституту-Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України).
- Подолянка (районований сорт Інституту фізіології рослин і генетики НАН України).

Та не посухостійкі:

- Дарунок Поділля (районований сорт Інституту фізіології рослин і генетики НАН України).
- Наталка (районований сорт Інституту фізіології рослин і генетики НАН України).
- Поліська 90 (районований сорт Інституту землеробства НААН України).

Всі вказані сорти мають високий потенціал врожайності (універсальними та високоінтенсивними по характеру), що можливо побачити у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристика використаних для проведення дослідження сортів *T. aestivum* для статистичного аналізу ключових параметрів продохів.

Інформація розширена за допомогою відомостей [89].

Сорт	Біологічні ознаки	Максимальні врожаї, ц/га
Астарта	Посухостійкий, середньостебловий, середньостиглий, зимостійкий та стійкий до вилягання, високоврожайний	96,3-117,7
Дарунок Поділля	Середньостебловий, середньостиглий, стійкий до вилягання, середньо зимо- та посухостійкий, високопродуктивний	63,9-91,4
Наталка	Середньостебловий, середньоранній, стійкий до вилягання, зимостійкий, посухостійкий, стійкий до ураження борошнистою росою, високоврожайний	50,3-93,6
Одеська 267	Посухостійкий, середньостиглий, морозостійкий, висока стійкість до проростання та осипання, середня - до вилягання.	56,8-67,0
Подільянка	Посухостійкий, середньорослий, середньостиглий, зимостійкий та середньостійкий до вилягання та ураження кореневими гнилями, високоврожайний	96,0-113,7
Поліська 90	Посухостійкий, середньостиглий, стійкий до проростання зерна в колосі та полягання, стійкий до комплексу хвороб	44,3-75,2

Також для аналізу залучені стабільні селекційні генотипи пшениці 3155-3164 із невідомими властивостями стосовно протидії негативним факторам, вирощені на польових ділянках Дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

2.2 Методика визначення вихідних параметрів продохового апарату

Ключові параметри продохового апарату, а саме кількість продохів та їх розмір, визначали за допомогою методу відбитків. Заміри проводили для обох сторін листку, для адаксіальної та абаксіальної сторони. Це є необхідним через складність морфології листків зернових, у яких на відміну

від дводольних кількість продихів на різних сторонах листка може варіюватись.

Метод відбитків полягає у наступному [89]:

1. У кожному із виконуваних варіантів експерименту відбирається 5 листків.
2. на кожен із цих листків з обох сторін, близько до центральної жилки, наноситься по 5 тонких мазків прозорого лаку.
3. Розчинник випаровується з лаку. Після цього на утвореній плівці є добре помітні відбитки епідермісу із продихами.
4. Зняття плівки відбувається за допомогою пінцету після повного висихання.
5. Після зазначених процедур, залежно від можливостей наявного обладнання, можливо виконати фотографування під мікроскопом з подальшим залученням комп'ютерних алгоритмів для підрахунку ключових параметрів, або ж можливо підрахувати зазначені параметри при розгляді об'єкту під світловим мікроскопом.

2.3 Методика розрахунку ключових параметрів

Для зйомки фотографій та їх аналізу використовували профільне програмне забезпечення TopView, за допомогою якого можливо швидко та з мінімізацією похибки вимірювати необхідні параметри (рисунок 2.1).

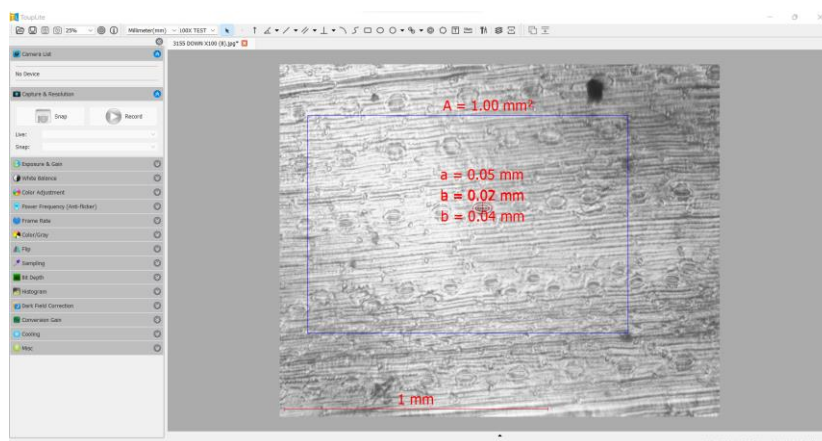


Рисунок 2.1 – Інтерфейс та демонстрація можливостей ПЗ TourView на прикладі замірів параметрів зразка селекційного генотипу 3155.

Для первинної обробки даних використовувалося програмне забезпечення Microsoft Excel. Підраховували параметри, зазначені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Параметр та відповідне збільшення мікроскопа

Параметр	Збільшення мікроскопа
Кількість продихів на одиниці площі листової пластинки	100 [90]
Довжина, ширина, площа продихової щілини	200 [91]
Довжина, ширина, площа замикаючої клітини	200 [91]

Вимірювання проводили в 20–кратній повторності.

Для подальшого обрахунку за допомогою програмного забезпечення використовувалася WEB-платформа для програмування Google Colaboratory та програмне забезпечення PyCharm.

Програмне забезпечення розроблялося із використанням Python 3.9 та залученням існуючих бібліотек без їх модифікації. Усі бібліотеки наявні у

середовищах Google Colaboratory за замовченням, для PyCharm бібліотеки повинні бути інстальовані окремо. Бібліотеки також наявні у Anaconda.

Для алгоритмів очистки даних розроблено ПЗ, наведене у додатку Б.

В його основі закладений підхід mRMR – це підхід до відбору ознак, який прагне вибрати ознаки з високою кореляцією з класом (виходом) та низькою кореляцією між собою. Для безперервних ознак F-статистика може використовуватись для розрахунку кореляції з класом (релевантність), а коефіцієнт кореляції Пірсона – для розрахунку кореляції між ознаками (знаменник). Після цього ознаки вибираються один за одним шляхом застосування жадібного пошуку для максимізації об'єктивної функції, яка є функцією релевантності та надмірності. Два часто використовувані типи об'єктивної функції – MID (Mutual Information Difference criterion) і MIQ (Mutual Information Quotient criterion), що є різницею або коефіцієнтом релевантності та надмірності, відповідно. Для тимчасових даних підхід до вибору ознак за допомогою MPMR потребує застосування деяких методів попередньої обробки, які заздалегідь згладжують тимчасові дані в єдину матрицю. Це може призвести до втрати можливої важливої інформації серед тимчасових даних (наприклад, інформації про тимчасовий порядок). Поширений спосіб згладжування даних, що використовується як етап попередньої обробки для mRMR, показаний на рисунку 2.2 [92].

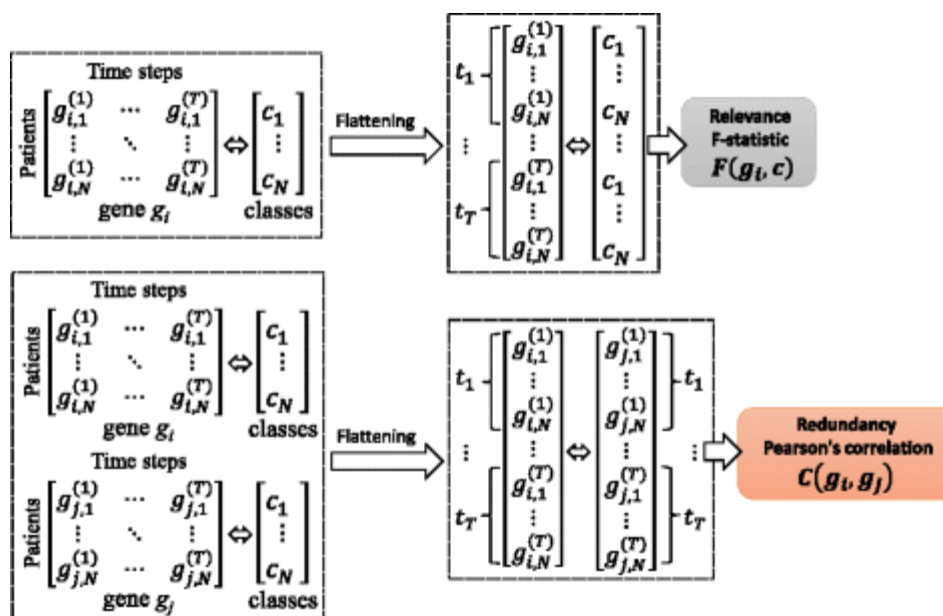


Рисунок 2.2 – Згладжування даних зазвичай використовується як етап попередньої обробки для mRMR

Релевантність ознаки f на i -й ітерації (чисельник) обчислюється як F-статистика між ознакою та цільовою змінною (F-тест). Знаменник обчислюється як середня (за Пірсоном) кореляція між ознакою та всіма ознаками, які були відібрані на попередніх ітераціях. Таким чином, формула виглядає так:

$$score_i(f) = \frac{F(f, target)}{\sum_{s \in \text{features selected until } i-1} |corr(f, s)| / (i - 1)} \quad (1)$$

Для презентації отриманих результатів розроблено ПЗ, наведене у додатку В.

Аналіз головних компонентів, або PCA, – це метод зменшення розмірності, який часто використовується для зменшення розмірності великих наборів даних шляхом перетворення великого набору змінних у менший, який, як і раніше, містить більшу частину інформації з великого набору.

Скорочення кількості змінних у наборі даних, звичайно, відбувається за рахунок точності, але хитрість у скороченні розмірності полягає в тому, щоб обміняти трохи точності на простоту. Адже менші набори даних легше досліджувати та візуалізувати, а алгоритми машинного навчання без зайвих змінних набагато простіше та швидше аналізують дані.

Таким чином, ідея PCA проста – зменшити кількість змінних у наборі даних, зберігши при цьому якнайбільше інформації.

Можливо зазначити основні етапи залучення методу головних компонент.

Стандартизація.

Мета цього кроку – стандартизувати діапазон безперервних вихідних змінних в такий спосіб, щоб кожна їх вносила рівний внесок у аналіз.

Більш конкретно, причина, через яку дуже важливо провести стандартизацію до PCA, полягає в тому, що остання дуже чутлива до дисперсії вихідних змінних. Тобто, якщо між діапазонами вихідних змінних існують великі відмінності, то змінні з великими діапазонами переважатимуть над змінними з малими діапазонами (наприклад, змінна з діапазоном від 0 до 100 переважатиме над змінною з діапазоном від 0 до 1), що призведе до необ'єктивних результатів. Таким чином, перетворення даних у порівнянні шкали може запобігти цій проблемі.

Математично це можна зробити шляхом віднімання середнього значення та поділу на стандартне відхилення для кожного значення кожної змінної.

Обрахунок коваріаційної матриці

Мета цього кроку – зрозуміти, як змінні вхідного набору даних відрізняються від середнього значення по відношенню один до одного, або, іншими словами, подивитися, чи існує між ними якийсь зв'язок. Тому що іноді змінні сильно корелюють між собою таким чином, що містять

надмірну інформацію. Тому, щоб виявити ці кореляції, ми обчислюємо підступну матрицю.

Коваріаційна матриця – це симетрична матриця $p \times p$ (де p – число вимірювань), в якій як елементи вказані коваріації, пов'язані з усіма можливими парами вихідних змінних. Наприклад, для тривимірного набору даних з трьома змінними x , y та z коваріаційна матриця являє собою матрицю 3×3 .

Якщо коваріація позитивна, то:

- дві змінні збільшуються або зменшуються разом (корелюють);
- якщо негативна, то одна збільшується, коли інша зменшується (зворотна кореляція).

Вичислення власних векторів для виявлення головних компонент проводилося у наступний спосіб.

Власні вектори та власні значення - це поняття лінійної алгебри, які обчислюються з коваріаційної матриці, щоб визначити головні компоненти даних. Перш ніж перейти до пояснення цих понять, спочатку розберемося, що ми маємо на увазі під головними компонентами.

Головні компоненти – це нові змінні, які будуються як лінійні комбінації чи суміші вихідних змінних. Ці комбінації будуються таким чином, щоб нові змінні (тобто головні компоненти) були некорельованими, а більшість інформації, що міститься у вихідних змінних, була стиснута або спресована в перші компоненти. Таким чином, ідея полягає в тому, що 10-мірні дані дають 10 головних компонент, але PCA намагається помістити максимум можливої інформації в першу компоненту, потім максимум інформації, що залишилася в другу і так далі.

Організація інформації в головних компонентах таким чином дозволить зменшити розмірність без втрати великої кількості інформації, і це за рахунок відкидання компонентів з низькою інформацією та розгляду компонентів, що залишилися, в якості нових змінних. Важливо розуміти,

що основні компоненти менш інтерпретовані та не мають жодного реального значення, оскільки вони побудовані як лінійні комбінації вихідних змінних. З геометричної точки зору, головні компоненти являють собою напрямки даних, які пояснюють максимальну кількість дисперсії, тобто лінії, які відображають найбільшу кількість інформації [93,94].

РОЗДІЛ 3. ОДЕРЖАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Аналіз ключових параметрів продихів

Стан функціонування продихів є одним із вирішальних факторів, які впливають на рівень транспірації та стабілізацію водного режиму рослин в умовах посухи. Одною із важливих характеристик зазначеного процесу є ступінь відкриття продихів, що обумовлює зниження тургору в усіх клітинах продихового комплексу. У разі наявності коливань інтенсивності транспірації можуть виникнути структурно-функціональні зміни їх будови на адаксіальній та абаксіальній поверхнях листків. Виходячи із відомостей літературного огляду, зміни кількості продихів та ступінь їх відкритості можуть критично впливати на ефективність використання води, швидкість фотосинтезу та накопичення біомаси. Через це можливо зазначити виключну важливість характеристик продихового апарату для адаптації рослини в несприятливих умовах [89].

Відповідно до аналізу існуючих даних [89] на підставі алгоритмів очистки даних, із 32 досліджуваних ключових параметрів (по 16 параметрів у двох режимах замірів – звичайні умови та посуха, загальна можлива кількість наборів із 32 параметрів по 4 дорівнює 35960) можливо зазначити наступний набір із найвищим балом і наступними параметрами, де АД – адаксіальна сторона, АБ – абаксіальна сторона, ЗВ – звичайні умови, ПОС – умови посухи:

Набір 1:

- ширина продихової щілини (мкм) АД ЗВ;
- продиховий індекс (%) АБ ПОС;
- площа продихової щілини (мкм²) АБ ПОС;
- площа замикаючої клітини (мкм²) АБ ЗВ.

Зазначений набір дійсно гарно репрезентує розподіл даних, але при цьому варто відзначити високий бал та інші можливі комбінації в межах 5% відхилення у вазі, що свідчить про доцільність їх замірів:

Набір 2:

- Ширина продихової щілини (мкм) АД ЗВ;
 - Ширина замикаючої клітини (мкм) АД ЗВ;
 - Площа продихової щілини (мкм²) АБ ПОС;
 - Площа замикаючої клітини (мкм²) АБ ПОС;
- | score: -3,346 from SET 1 | Gap: +1,006 % from SET 1.

Набір 3:

- Ширина продихової щілини (мкм) АД ЗВ;
 - Площа замикаючої клітини (мкм²) АД ЗВ;
 - Площа продихової щілини (мкм²) АБ ПОС;
 - Площа замикаючої клітини (мкм²) АБ ПОС;
- | score: -3,502 from SET 1 | Gap: +2,303 % from SET 2.

Набір 4:

- Продиховий індекс % (мкм) АД ЗВ;
 - Ширина продихової щілини (мкм) АБ ПОС;
 - Площа продихової щілини (мкм²) АБ ЗВ;
 - Площа замикаючої клітини (мкм²) АБ ПОС;
- | score: -3,541 from SET 1 | Gap: +0,579 % from SET 3.

Набір 5:

- Ширина продихової щілини (мкм) АД ПОС;
 - Ширина замикаючої клітини (мкм) АД ПОС;
 - Продиховий індекс % АБ ПОС;
 - Площа продихової щілини (мкм²) АБ ЗВ;
- | score: -3,578 from SET 1 | Gap: +0,547 % from SET 4.

3.2 Аналіз існуючих даних за допомогою ПЗ на основі PCA

Набір 1 використаний для подальшого аналізу за допомогою методу головних компонент, показав високу якість презентації даних та наявність кластеризації навіть на невеликій вибірці даних (рисунок 3.1, рисунок 3.2), що дає змогу потенційно залучити розроблене програмне забезпечення у прогнозуванні посухостійкості отриманих стабільних селекційних генотипів.

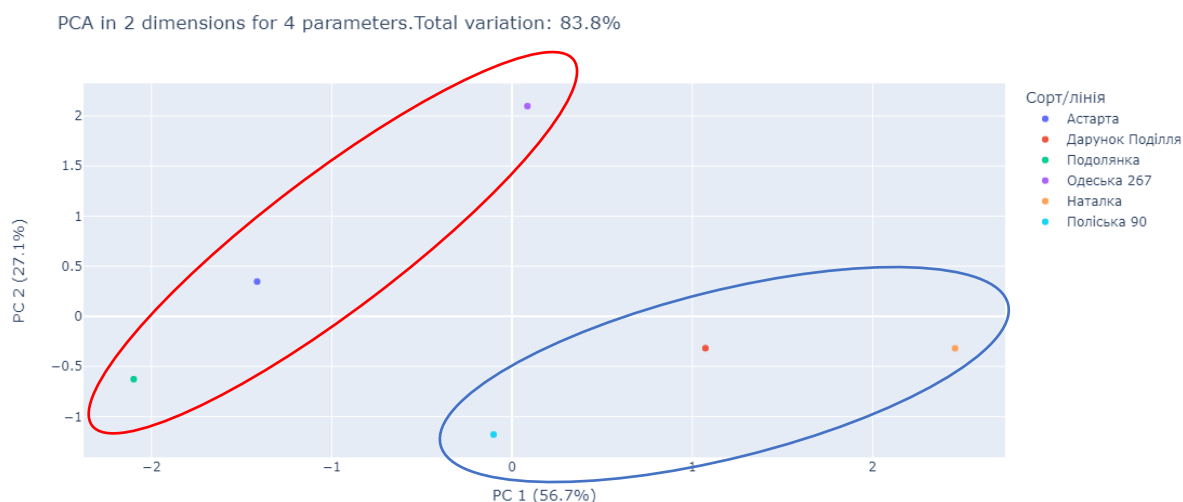


Рисунок 3.1 – Результат роботи методу головних компонент із зменшенням розмірності до двох осей із варіацією 83,8%. На зображенні чітко видно кластери посухостійких (синій овал) та посухонестійких (червоний овал) сортів.

PCA in 3 dimensions for 4 parameters.Total variation: 92.3%

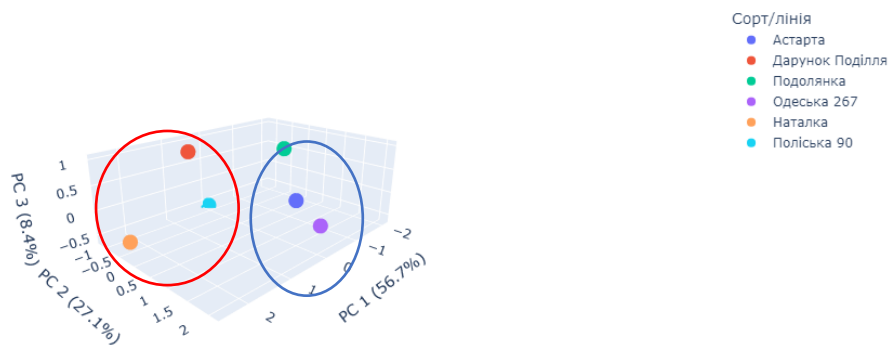


Рисунок 3.2 – Результат роботи методу головних компонент із зменшенням розмірності до трьох осей із варіацією 92,3%. На зображенні

чітко видно кластери посухостійких (синій овал) та посухонестійких (червоний овал) сортів.

3.3 Прогнозування на підставі експериментальних даних

Так як для стабільних селекційних генотипів 3155-3164 заміри зроблені тільки за звичайних умов (додаток), то прогнозувати остаточну посухостійкість можливо із нижчою точністю. Разом з тим, можливо використати Набір 21 (найбільша вага із варіантів, що складаються лише за звичайних умов) із відхиленням у 9,81 від найбільшої ваги для прогнозування лише за даними звичайних умов з такими параметрами:

- Ширина продихової щілини (мкм) АД ЗВ;
- Ширина замикаючої клітини (мкм) АД ЗВ;
- Площа замикаючої клітини (мкм²) АД ЗВ;
- Продиховий індекс % (мкм) АД ЗВ;

| score: -9,81 from SET 1 | Gap: +1,407 % from SET 20.

Відповідно до такого набору даних можливо зробити наступні прогнозування на підставі отриманих даних (рисунок 3.3, рисунок 3.4):

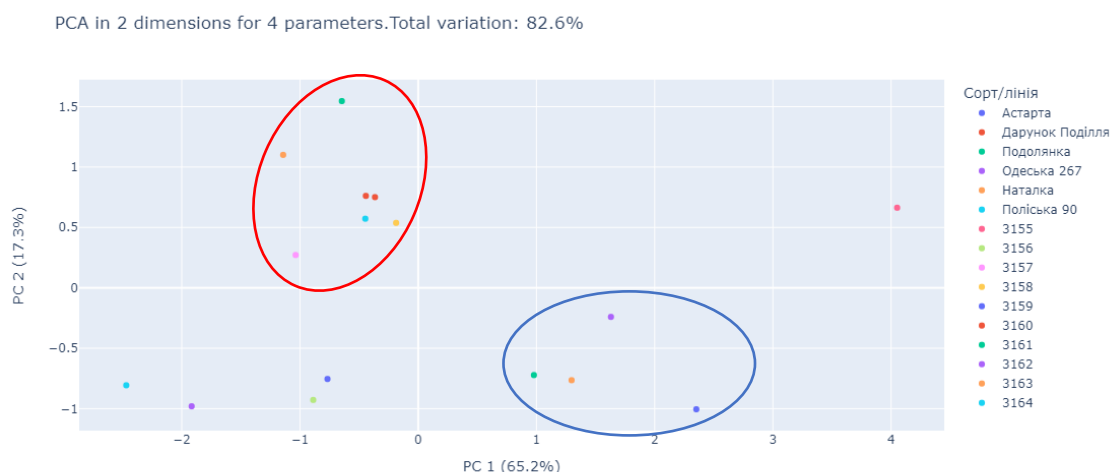


Рисунок 3.3 – Результат роботи методу головних компонент із зменшенням розмірності до двох осей із варіацією 82,6%. На зображенні чітко видно кластери посухостійких (синій овал) та посухонестійких (червоний овал) сортів.

Таблиця 3.1

Отримані експериментальні дані стабільних селекційних генотипів

3155-3164

Сорт/лінія	Кількість продихів (шт./мм ²) АД	Продиховий індекс % АД	Довжина продихової щілини (мкм) АД	Ширина продихової щілини (мкм) АД	Площа продихової щілини (мкм ²) АД	Довжина замикаючої клітини (мкм) АД	Ширина замикаючої клітини (мкм) АД	Площа замикаючої клітини (мкм ²) АД
Адаксіальна сторона								
3155	57.40	24.80	35.00	4.00	167.60	56.80	4.48	246.68
± SD 3 (P < 0,05)	1.19	4.71	0.71	0.15	4.73	1.16	0.18	14.80
3156	47.20	18.40	33.80	3.60	121.00	50.00	3.64	181.58
± SD 3 (P < 0,05)	2.17	0.61	1.36	0.30	9.81	0.53	0.43	20.71
3157	57.80	19.00	31.60	3.00	94.80	43.40	3.92	169.54
± SD 3 (P < 0,05)	1.61	0.53	0.80	0.00	2.41	0.77	0.30	11.36
3158	61.60	19.80	32.00	3.00	96.00	49.00	4.06	198.94
± SD 3 (P < 0,05)	0.38	0.28	0.62	0.00	1.87	1.05	0.28	15.26
3159	57.20	19.00	29.20	3.60	104.60	50.00	3.64	182.42
± SD 3 (P < 0,05)	1.28	0.62	0.55	0.18	4.25	0.53	0.43	22.84
3160	60.60	20.20	32.00	3.00	96.00	49.40	3.78	186.20
± SD 3 (P < 0,05)	0.77	0.43	0.67	0.00	2.00	0.61	0.18	9.90
3161	60.00	22.00	25.00	3.20	79.80	41.00	3.78	154.98
± SD 3 (P < 0,05)	0.75	0.53	0.53	0.15	3.36	0.53	0.18	8.09
3162	57.80	18.20	26.00	3.40	89.00	39.80	3.50	139.58
± SD 3 (P < 0,05)	0.64	0.28	0.53	0.18	6.45	0.64	0.24	10.52
3163	57.40	19.00	34.00	3.60	122.20	49.60	4.34	215.46
3163	57.40	19.00	34.00	3.60	122.20	49.60	4.34	215.46
± SD 3 (P < 0,05)	1.57	0.71	0.75	0.18	6.39	0.69	0.28	15.01
3164	45.40	16.40	30.00	3.00	90.00	46.40	3.50	162.40
± SD 3 (P < 0,05)	1.15	0.38	0.53	0.00	1.58	0.38	0.24	11.01
Абаксіальна сторона								
3155	54.60	20.60	31.60	2.20	69.20	45.60	4.00	182.40
± SD 3 (P < 0,05)	2.12	0.45	0.51	0.15	3.96	0.45	0.00	1.79
3156	55.60	18.40	33.00	2.40	72.60	43.20	3.60	156.00
± SD 3 (P < 0,05)	1.02	0.38	0.62	0.18	5.07	0.64	0.18	9.35
3157	54.60	17.40	32.40	2.00	64.80	43.60	3.40	148.20
± SD 3 (P < 0,05)	0.61	0.38	0.69	0.00	1.38	0.51	0.18	8.05
3158	58.20	19.00	32.40	2.40	78.20	43.20	3.60	154.40
± SD 3 (P < 0,05)	0.95	0.33	0.65	0.18	7.32	0.89	0.18	5.07
3159	58.00	19.00	32.60	2.20	71.20	42.20	3.80	160.80
± SD 3 (P < 0,05)	0.75	0.33	0.61	0.15	3.58	0.83	0.15	8.13
3160	59.20	19.20	33.40	2.20	66.80	44.40	3.80	169.00
± SD 3 (P < 0,05)	0.49	0.28	0.61	0.15	1.21	0.56	0.15	7.71
3161	56.60	18.00	31.80	2.20	70.40	45.20	3.60	162.40
± SD 3 (P < 0,05)	0.90	0.41	0.83	0.15	7.01	0.43	0.18	7.54
3162	56.60	18.40	34.20	2.20	68.40	44.60	3.40	151.00
± SD 3 (P < 0,05)	1.17	0.51	0.64	0.15	1.28	0.61	0.18	6.51
3163	57.40	19.20	34.80	2.00	69.60	46.20	3.20	147.40
± SD 3 (P < 0,05)	0.61	0.28	0.60	0.00	1.19	0.49	0.15	5.39
3164	57.20	18.40	32.60	2.00	65.20	45.80	3.40	155.80
± SD 3 (P < 0,05)	0.89	0.51	0.80	0.00	1.61	0.89	0.18	9.07

РОЗДІЛ 4. СТАРТАП ПРОЄКТ

4.1 Резюме

Темою економічної частини магістерської дисертації є «Впровадження у виробництво нового сорту пшениці з підвищеною посухостійкістю через стартап-проєкт».

Таблиця 4.1

Резюме стартап-проєкту

Показник	Характеристика
1. Сутність ідеї	Впровадження у виробництво нового сорту пшениці з підвищеною посухостійкістю.
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Наявні на українському та світовому ринку зерна
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Споживач отримає новий посухостійкий сорт пшениці, що дозволить зменшити частку втрати врожаю
4. Ступінь розробленості технології реалізації	Наявність технологій-аналогів стосовно генетичного поліпшення пшениці
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 31 - Сирі та необроблені продукти сільського господарства, аквакультури, плодовництва та лісівництва
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	А 01.11 «Вирощування зернових культур (крім рису), бобових культур і насіння олійних культур» М 72.11 «Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій»
7. Очікувана потужність стартапу	Середнє
8. За масштабом виробництва	Серійне
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне

10. За ресурсами, що споживатимуться	Капіталомістке, працемістке, інформаційномістке
11. За чисельністю персоналу	Мале
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні
13. Бажане географічне розташування: - потужностей стартапу; - офісу стартапу; - збутової мережі; - постачальників комплектуючих.	- смт. Глеваха, Київська обл. (ДСВ ІФРГ НАН України) - м. Київ - по всій території України - Україна та країни ЄС
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	Розробка
15. Гранична корисність ідеї стартапу	Виведення пшениці з підвищеною посухостійкістю, зменшення втрат врожаю через несприятливі кліматичні умови
16. Бізнес-модель стартапу	B2B
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	ТОВ «Сингента»: сорт Мулан, насіння пшениці, 23200 грн/т, впроваджено у виробництво; ТОВ «Давіпа»: сорт Ахімса, насіння пшениці, 24500 грн/т, впроваджено у виробництво.
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	ООО «СААТБАУ РУС»: сорт Балітус, насіння пшениці, 28600 грн/т, впроваджено у виробництво; ТОВ «Байер» Агророзділ: сорт Леннокс, насіння пшениці, 25400 грн/т, впроваджено у виробництво;
19. Ключові фактори успіху стартапу	Більш висока посухотолерантність та нижча ціна насіння, ніж у конкурентів при збереженні показників якості зерна на високому рівні

20. Споживачі на етапі впровадження	Сільськогосподарські підприємства компанії малого масштабу, фермери
21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	5 400 т/рік
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	50 тон
23. Споживачі на етапі розвитку	Сільськогосподарські підприємства малого і середнього масштабу, фермерські господарства, селяни.
24. Споживачі на етапі зрілості	Державні та приватні сільськогосподарські підприємства різного масштабу, фермерські господарства, селяни
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	25 500 грн/т
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	216%
27. Капіталовкладення в проєкт	122 806 600 грн
28. Період повернення капіталовкладень у проєкт	1.3 роки
29. Джерела фінансування	Зовнішнє
30. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Насіння пшениці
31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних)	Вітчизняні: ТОВ «Біолабтех ЛТД» – обладнання, Аграрна компанія «Ерідон» – засоби захисту рослин, мінеральні добрива; Закордонні: Sigma-Aldrich – реактиви для дослідження.
32. Планове місце реалізації результату розробки (місце, планова доля реалізації продукту через це місце)	Державні та приватні посівні компанії різного масштабу – 90%, селяни – 10%

33. Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Дистриб'ютори
34. Методи просування результатів розробки на ринок	Проведення презентацій нового сорту пшениці на тематичних заходах «День поля», розсилка на пошту для потенційних клієнтів, реклама через вебсайт

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Задля продуктивного планування та розробки бізнес-ідеї стартапу, потрібно провести аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища (таблиця 4.2), які потрібно взяти до уваги при створенні проєкту.

Таблиця 4.2

Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища

Фактори	Загрози	Можливості
Економіка		
1. Підвищення рівня інфляції у країні	- понижена платоспроможність селян та бізнесу	- підвищений прибуток при реалізації товару у закордонні держави
2. Зниження ставки ПДВ для аграрного сектору	- зниження податкового прибутку держави, а отже зменшення фінансування державних установ	- збільшення розміру коштів у приватних компаній та ФОПів, на які можна закупити більше продукції
3. Збільшення ставок на кредити	- банки, як джерело інвестицій, стають менш привабливими для позичальників	- пошук інших інвесторів та джерел фінансування
Політика		

1. Переведення державних послуг в online формат	- необхідність затрати часу для навчання та звикання населення та бізнесу до нового формату державних послуг	- розробка онлайн-платформи «Дія.Бізнес», де працює безкоштовний консалтинговий центр та розміщено багато корисних безкоштовних матеріалів
2. Воєнний стан у країні	- часткова окупація Херсонської та Запорізької областей із великою часткою полів з чорноземами	- допомога бізнесу від держави - зниження податків для підприємців
3. Співпраця з іншими країнами	- висока конкуренція на світовому аграрному ринку	- гарна репутація українського зерна на світовому ринку
Науково-технічний прогрес		
1. Поява нових наукових праць у сфері генетики та біотехнології рослин	- висока вартість підписки на наукові журнали - висока вартість публікацій у наукових журналах міжнародного рівня	- перспективи для створення нових сортів сільськогосподарських культур
Демографія		
1. Еміграція населення до інших країн	- зменшення висококваліфікованих кадрів в Україні	- приток капіталу в економіку через емігрантів, що надсилають кошти своїм рідним в Україну

Також потрібно враховувати зовнішнє оперативне середовище (таблиця 4.3), до якого належать споживачі продукції, конкуренти, посередники та постачальники сировини і матеріалів.

Таблиця 4.3

Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти	<ul style="list-style-type: none"> - виведення сорту зерна з більшим відсотком посухотолерантності, ніж пропонують конкуренти - створення більш сприятливих умов праці для кваліфікованих кадрів 	<ul style="list-style-type: none"> - мають гарну репутацію у споживачів - виробництво насіння вже протестоване і вирощується у потоці
Постачальники	<ul style="list-style-type: none"> - швидкий термін забезпечення українських постачальників - приємні ціни у вітчизняних постачальників - висока якість матеріалів у іноземних постачальників 	<ul style="list-style-type: none"> - великий термін поставки сировини та матеріалів у іноземних постачальників - ціна на товар іноземних постачальників залежить від курсу валют, що є досить нестабільним
Посередники	<ul style="list-style-type: none"> - збільшення ринків збуту - збільшення асортименту вибору сировини та матеріалів 	<ul style="list-style-type: none"> - необхідність оплати послуг посередника, що впливає на собівартість продукції - неможливість співпраці з виробником напряму, лише через офіційного представника в країні
Споживачі	<ul style="list-style-type: none"> - при високому попиту у споживачів, є можливість розширення бізнесу та асортименту продукції 	<ul style="list-style-type: none"> - при низькому попиті у споживачів, банкрутство бізнесу

Аналіз зацікавлених сторін (таблиця 4.4) проводиться з метою визначення потенційних загрози при розробці та реалізації стартап проєкту, описаного в магістерській дисертації.

Таблиця 4.4

Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проєкту	Цікавість її до проєкту	Загальний коефіцієнт впливу на проєкт
Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища			
Виробник	Виведення нового сорту посухотолерантної пшениці та вирощування посівного матеріалу	Запуск бізнесу у прибутковій для України сфері, що забезпечить високу вірогідність успіху стартап проєкту	0,5
Постачальник	Забезпечення виробництва сировиною та матеріалами	Постійних дохід від нового постійного клієнта	0,1
Споживачі	Забезпечують дохід виробництву	Можливість придбати якісне зерно із підвищеною посухотолерантністю, що зменшить втрати врожаю	0,1
Посередники	Збільшують ринки збуту продукту та асортимент виробу продукції постачальників	Отримання прибутку за свої послуги	0,1
Зовнішнє середовище			
Політичні структури	Правове регулювання	Покращення економічної ситуації	0,04

	діяльності аграрного бізнесу	в країні при імпорті продукції та забезпечення українських аграріїв якісним посівним матеріалом	
Суб'єкти економічного середовища	Основні споживачі продукції	Підвищення ВВП України, позитивний вплив на внутрішню та зовнішню економіку країни	0,05
Суб'єкти демографії	Менша частина споживачів продукції (селяни)	Можливість придбати якісне насіння із підвищеною посухотолерантністю, що зменшить втрати врожаю	0,04
Суб'єкти НТП	Розробка нових технологій виведення посухотолерантних сортів пшениці	Впровадження розробки у виробництво	0,07

Проаналізувавши данні з таблиці, можна стверджувати, що найбільший вплив на проєкт серед суб'єктів зовнішнього оперативного середовища та зовнішнього середовища має виробник. Інші ж зацікавлені сторони мають набагато меншу вагу.

Аналіз внутрішнього середовища підприємства дає змогу виявити переваги та недоліки при реалізації стартап-проєкту, що сприятиме розробці та реалізації стартап-проєкту, та те, що створить для цього перешкоди та ризику (таблиця 4.5).

Таблиця 4.5

Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Організаційна структура	- чітка організація підприємства, належний контроль якості	- віддаленість лабораторії та полів
Персонал	- підприємство забезпечене кваліфікованим персоналом - гідні умови праці	- робота з отруйними речовинами (гербіциди, інсектициди тощо)
Вирощування насіння	- сучасні технології вирощування насіння - якісна сільськогосподарська техніка	- є чинники, що потребують особливих умов праці
R&D	- високий дослідницький потенціал - нові лабораторії з сучасним високоякісним обладнанням	- відсутність публікацій у світових наукових журналах за останній час
Маркетинг	- наявність партнерів, які готові спробувати і прорекламувати продукт стартапу	- замало реклами на сучасних платформах (інтернет, соц. мережі)

З таблиці вище можна зробити висновок, що для покращення ефективності бізнесу необхідно розвивати свій авторитет перед науковим товариством, більше приділяти уваги публікаціям результатів досліджень та просувати продукт в інтернеті та засобах масової інформації.

Проаналізувавши усі чинники, що були представлені у цьому підрозділі, до розробки пропонується наступний об'єкт стартап проєкту: виведення нового сорту посухотолерантної пшениці із подальшим вирощуванням посівного матеріалу для продажу. Даний сорт матиме перевагу перед конкурентами завдяки підвищенню витривалості до обмеженого зволоження на 30 %, що в свою чергу дасть змогу зменшити втрати врожаю через несприятливі кліматичні умови.

4.3 Визначення ключових факторів успіху проєкту

На українському аграрному ринку представлені аналогічні сорти пшениці, що проявляють підвищену посухотолерантність. Визначимо характеристики сорту пшениці, що є ключовими:

- Посухотолерантність, ум. од.
- Ціна, грн
- Вміст білка у насінні, %
- Країна походження, назва

Оцінимо обрані характеристики за методом Шонфільда (таблиця 4.6.1):

Таблиця 4.6.1

Оцінки характеристики за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик		
		Наша продукція (Україна)	Мулан (ТОВ «Сингента», Україна)	Балітус (ТОВ «СААТБАУ РУС», рф)
Посухотолерантність, ум.од.	0,5	10	8	7
Ціна, грн	0,2	9	10	5
Вміст білка у насінні, %	0,2	9	9	9
Країна походження, назва	0,1	10	10	0

Таблиця 4.6.2

Бальна оцінка характеристики за методом Шонфільда

Характеристика	Бальна оцінка характеристик		
	Наша продукція	Мулан (ТОВ «Сингента», Україна)	Балітус (ТОВ «СААТБАУ РУС», рф)
Посухотолерантність, ум. од.	5	4	3,5
Ціна, грн	1,8	2	1
Вміст білка у насінні, %	1,8	1,8	1,8
Країна походження, назва	1	1	0

Після проведення бальної оцінки характеристики, будемо графік порівняння показників нашого підприємства та конкурентів (рисунок 4.1).

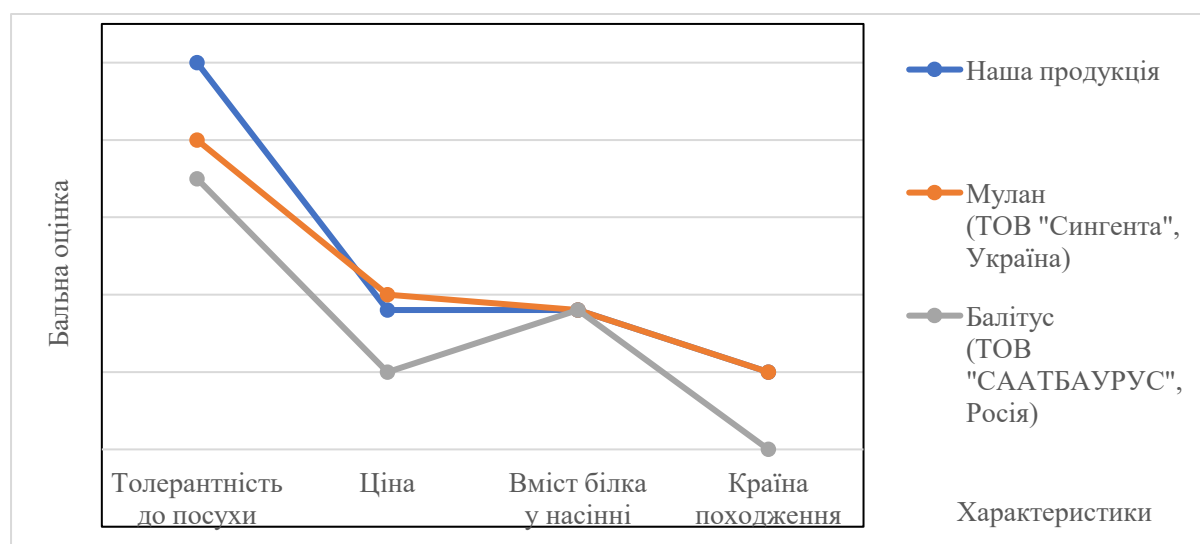


Рисунок 4.1 – Графік порівняння показників нашого підприємства та конкурентів

Як видно з проведеного аналізу, сорт пшениці нашого виробництва програє конкурентам за ціною, проте за графою посухотолерантність він є кращий за обох конкурентів.

Розглянемо можливі варіанти розвитку ідеї стартапу (таблиця 4.7).

Таблиця 4.7

Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1. Зниження ціни на продукт	Зниження собівартості продукції шляхом оптимізації процесів вирощування зерна
2. Розширення потужності виробництва	Задоволення потреб не лише українських фермерів та сільськогосподарських підприємств, а й вихід на іноземні ринки збуту.
3. Збільшення фінансування відділу R&D	Дозволить залучити висококваліфіковані кадри до вивчення посухостійкості та виведення нових сортів пшениці, підтягування показників схожості та врожайності до ринкових критеріїв.

4.4 Визначення потенційних споживачів

Таблиця 4.8

Класифікація потенційних споживачів

Критерії	Значення
1. Юридична особа	
1. Форма власності	Будь-яка
2. КВЕД	A 01.11 «Вирощування зернових культур (крім рису), бобових культур і насіння олійних культур»
3. За потужністю	Малі, середні, великі
4. За масштабом виробництва	Масові
5. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні
6. За ресурсами, що споживаються	Працемісткі
7. За чисельністю персоналу	Малі, середні, великі
8. За сферою діяльності	Виробничі
9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні, іноземні

10. За географічним розташуванням	По всій території України
11. За віддаленістю органів управління	Національні
12. За характером господарської діяльності	Сільськогосподарські
13. За рівнем технологічної цілісності	Провідні, дочірні
14. За долею іноземного капіталу	З іноземними інвестиціями
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні, корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	Безперервні, періодичні
17. За роботою протягом року	Сезонні
18. За географічним розташуванням на території України	Села України з великими площами полів з чорноземами
19. За наявністю вільних ОбЗ	Наявні
20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: – Регіон – Чисельність населення – Динаміка росту регіону – Структура регіону – Правові обмеження торгівлі	(на прикладі однієї області) - м. Черкаси та Черкаська область. - 1,22 млн осіб - 11,7 % інфляції за останній рік - Є великі міста - Податок на прибуток для аграріїв 14 %
2. Фізична особа	
1. Вік	Від 18 років
2. За платоспроможністю	25 500 грн/т
3. За соціальним рівнем	Мають власне майно (дім, господарство та землю), дохід від 50 000 грн
4. За способом життя	Селяни, що звикли працювати із землею
5. Тип особистості споживачів	Реаліст
6. За ставленням до товару: – мотивація придбання – пошук вигоди	- близький початок посівної кампанії

<ul style="list-style-type: none"> – ставлення до товару – інформованість про товар – інтенсивність споживання товару 	<ul style="list-style-type: none"> - аналізує ринок зерна та вибирає найкращу пропозицію - позитивне - через біржу зерна - лише перед початком посівної кампанії
7. За сімейними цінностями	Пари, які перебувають у відносинах або одружені, з дітьми або без них
8. За співвідношенням бажання придбати і цінові межі	1,9 : 1
9. За інтенсивністю споживання товару	Періодичне придбання
10. За інформованістю	Через інтернет, біржу зерна

На основі проведеного аналізу можна виділити 3 групи споживачів (таблиця 4.9).

Таблиця 4.9

Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
Селяни-ФОПи, що мають свої паї	Отримання прибутку від продажу вирощеної пшениці, при зменшених втратах врожаю через несприятливі погодні умови
Агрохолдинги	
Приватні сільськогосподарські підприємства	

Далі проведемо розробку паспорта потенційного клієнта (таблиця 4.10).

Таблиця 4.10

Паспорт потенційного клієнта – приватне сільськогосподарське
підприємство

Характеристика	Значення
Організаційно-правова форма	Приватна власність
Класифікація: – за чисельністю персоналу – за сезонністю виробництва – за організацією виробничих процесів	- мале - сезонне - періодичне
Розташування	Села України з великими площами чорноземних полів
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Новий сорт пшениці з підвищеною посухотолерантністю
Призначення придбаної розробки	Вирощування пшениці та отримання врожаю з мінімальними втратами
Кваліфікація персоналу підприємства	Кваліфіковані кадри
Потенційний обсяг споживання розробки	Серійний

Запланований обсяг вирощеного посівного матеріалу за один сезон складає 5 400 тон пшениці. Враховуючи графік початку посівної кампанії складено план обсягу реалізації стартап-продукту (таблиця 4.11).

Таблиця 4.11

Запланований обсяг реалізації стартап-продукту

	Січень 2023	Лютий 2023	Березень 2023	Квітень 2023	Травень 2023	Червень 2023	Липень 2023	Серпень 2023	Вересень 2023	Жовтень 2023	Листопад 2023	Грудень 2023
Запланований обсяг	300	1300	2000	300	100	100	100	200	400	200	200	200

4.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Після аналізу потенційних споживачів та якими критеріями вони керують при прийнятті рішення, можна визначити ціну, з якою продукт вийде на ринок (таблиця 4.12).

Таблиця 4.12

Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	К-ть, т.	Ціна, грн/т	К-ть, т.	Ціна, грн/од
Сорт посухотолерантної пшениці	5 400	25 500	9000	23 200
			6000	28 600

Розрахунок ціни за витратним методом:

$$Ц = С + \text{фіксований відсоток прибутку} \text{ [грн/од]}$$

$$Ц = 8\,075 + 5\% = 8\,480 \text{ грн/т,}$$

де Ц – прогнозована ціна товару, грн/т;

С – розрахована очікувана вартість товару, грн/т.

Дана ціна не підходить для реалізації, оскільки при її прийнятті період повернення капіталовкладень буде більш 10 років, що є не вигідним.

Розрахунок ціни за агрегатним методом:

Для продукту даного стартап-проекту, цей метод для розрахунку ціни не підходить, оскільки важко визначити усі складові частини продукту.

Розрахунок ціни за параметричним методом:

$$C_n = C_b \times \frac{B_n}{B_b}$$

Де C_n – ціна нашого продукту, грн/од.

C_b – ціна аналогу, грн/од.

B_n – бали нової моделі.

B_b – бали базової моделі.

Продукт	Параметри					
	1		2		3	
	Бали	Коефіцієнт вагомості	Бали	Коефіцієнт вагомості	Бали	Коефіцієнт вагомості
Аналог	49	0,5	76	0,3	65	0,2
Новий	56	0,5	87	0,3	61	0,2

Ціна продукту аналогу становить 23 200 грн/т. Розраховуємо ціну:

$$C_n = 23\,200 \times \frac{56 \times 0,5 + 87 \times 0,3 + 61 \times 0,2}{49 \times 0,5 + 76 \times 0,3 + 65 \times 0,2} = 25\,500 \text{ грн/т}$$

Дана ціна буде задовольняти як виробника з точки зору прибутку, так і споживача враховуючи показники якості продукту.

Розрахунок ціни за конкурентним методом:

Розрахунок ціни на стартап продукт здійснюється шлях урахування цін аналогів, що вже присутні на ринку:

$$C = \frac{C_1 + C_2}{2} = \frac{23\,200 + 28\,600}{2} = 25\,900 \text{ грн/т}$$

Дана ціна також буде вигідною і для виробника і для покупця, проте ціна за параметричним методом буде приємніша для клієнтів.

Розрахунок точки безбитковості:

Об'єм виробництва	Постіні витрати	Змінні витрати	Загальні витрати	Дохід	Чистий прибуток
49,86032	1 150 000	121 438	1 271 438	1271438	0
600	1 150 000	1 461 333	2 611 333	15300000	12 688 667
1 200	1 150 000	2 922 666	4 072 666	30600000	26 527 334
1 800	1 150 000	4 383 999	5 533 999	45900000	40 366 001
2 400	1 150 000	5 845 332	6 995 332	61200000	54 204 668
3 000	1 150 000	7 306 665	8 456 665	76500000	68 043 335
3 600	1 150 000	8 767 998	9 917 998	91800000	81 882 002
4 200	1 150 000	10 229 331	11 379 331	1,07E+08	95 720 669
4 800	1 150 000	11 690 664	12 840 664	1,22E+08	109 559 336
5 400	1 150 000	13 151 997	14 301 997	1,38E+08	123 398 003

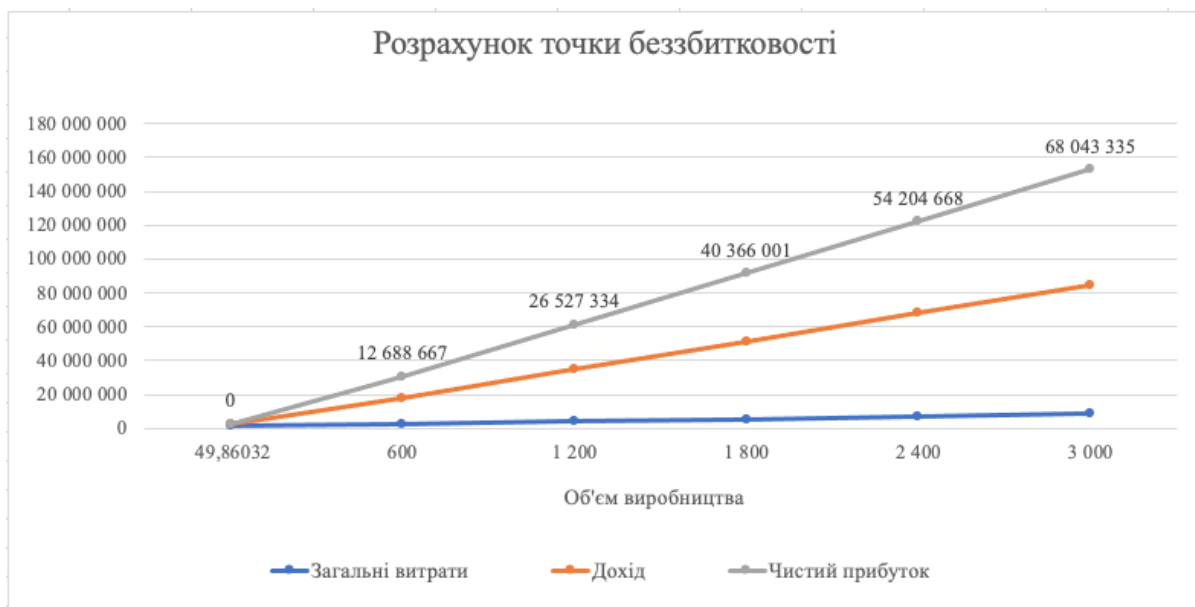


Рисунок 4.2 – Розрахунок точки безбитковості

Як видно з розрахунків та графіку, виконаних у програмі Microsoft Excel, точка безбитковості становить $49,86032 \approx 50$ тон продукції.

Проведемо калькуляцію з урахуванням усіх етапів реалізації стартап проекту (таблиця 4.13):

Таблиця 4.13

Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми.

№	Етап розробки/елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1	Етап розробки ідеї (1 міс.): - амортизація комп'ютерного обладнання - заробітна плата працівникам - електроенергія - абонплата за інтернет	- 5 од. обладнання - 5 - 60 кВт*год - 1	- 800 грн - 120 000 грн - 200 грн - 300 грн
2	Етап ринкового дослідження (1 міс.): - амортизація комп'ютерного обладнання - заробітна плата працівникам - електроенергія - абонплата за інтернет	- 5 од. обладнання - 5 - 60 кВт*год - 1	- 800 грн - 120 000 грн - 200 грн - 300 грн
3	Етап наукової розробки (12 міс.): - амортизація лабораторного обладнання - амортизація будівлі - реактиви - заробітна плата працівникам - амортизація іншого обладнання (комп'ютери тощо) - електроенергія - водопостачання - абонплата за інтернет	- 30 од. обладнання - 1 будівля - 12 наборів реактивів - 10 осіб - 10 од. обладнання - 3600 кВт*год - 120 м3 - 12	- 2 400 000 грн - 400 000 грн - 240 000 грн - 3 600 000 грн - 19 000 грн - 13 000 грн - 3600 грн - 3600 грн
4	Етап реалізації виробництва стартапу (12 міс.): - сировина - матеріали - амортизація обладнання та техніки	- 1 т - 5 400 шт	- 15 000 грн - 54 000 грн - 11 000 000 грн

	<ul style="list-style-type: none"> - заробітна плата працівникам - амортизація будівель - електроенергія - водопостачання 	<ul style="list-style-type: none"> - 57 од. обладнання та техніки - 48 осіб - 2 будівлі - 1 200 000 кВт*год - 145 000 м³ 	<ul style="list-style-type: none"> - 7 338 000 грн - 1 600 000 грн - 4 320 000 грн - 4 200 000 грн
5	<p>Етап підготовки пакету документів (1 міс.):</p> <ul style="list-style-type: none"> - амортизація комп'ютерного обладнання - заробітна плата працівникам - електроенергія - сертифікати, ліцензії, реєстрація 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 од. обладнання - 5 - 60 кВт*год - 7 шт 	<ul style="list-style-type: none"> - 1200 грн - 100 000 грн - 200 грн - 700 000 грн
6	<p>Етап впровадження маркетингових заходів (12 міс.):</p> <ul style="list-style-type: none"> - амортизація комп'ютерного обладнання - заробітна плата працівникам - електроенергія - реклама у Google/Facebook - абонплата за інтернет 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 од. обладнання - 5 - 650 кВт*год - 12 -12 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 600 грн - 1 300 000 грн - 1000 грн - 2 000 000 грн - 3600 грн
7	<p>Етап транспортування продукту (12 міс.):</p> <ul style="list-style-type: none"> - амортизація транспортувальних фур - заробітна плата працівникам - паливо 	<ul style="list-style-type: none"> - 6 фур - 6 - 40 000 л 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 320 000 грн - 720 000 грн - 1 800 000 грн

Тепер оцінюємо стартап на відповідність ціновим ринкам обладнання, сировини та робочої сили (таблиці 4.14, 4.15, 4.16).

Таблиця 4.14

Забезпеченість проєкту основними засобами

Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ, грн	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікувальний постачальник	Джерело фінансування придбання
Будівля	25 000 000	20 років	БК «УкрБуд»	Інвестори
Лабораторне обладнання	24 000 000	5 років	ТОВ «Біолабтех ЛТД»	Інвестори
Комбайни	12 000 000	5 років	John Deere	Інвестори
Елеватор	7 000 000	20 років	ПП «ЕлеваторБудМаш»	Інвестори
Системи поливу	5 000 000	5 років	Rain Bird	Інвестори
Оприскувальні системи	4 000 000	5 років	Rain Bird	Інвестори
Обладнання фасівки та пакування	10 000 000	5 років	ТОВ «Біолабтех ЛТД»	Інвестори
Фури	6 000 000	5 років	Mercedes-Benz	Інвестори
Всього:	93 000 000 грн			

Таблиця 4.15

Забезпечення проєкту оборотними фондами

Назва ОбФ	Норма витрат на рік	Ціна, грн/од	Очікувальний постачальник	Джерело фінансування
Сировина	1 т	15 000	ТОВ «Нібулон» СП	Інвестори
Матеріали	5 400 шт	10	Імпорт	Інвестори
Електроенергія	1 200 000 кВт*год	3	ПРАТ «ЧЕРКАСИОБЛЕ НЕРГО»	Інвестори

Водопостачання	150 000 м ³	30	ПРАТ «ЧЕРКАСИВОДО КАНАЛ»	Інвестори
Паливо	100 000 л	60	WOG	Інвестори
Інтернет	12 абонплат	300	Київстар	Інвестори
Реклама	12 підписок на Google/ Facebook	2 000 000 грн	Google, Facebook	Інвестори
Всього:	16 172 600 грн			

Таблиця 4.16

Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Плановий рівень заробітної плати		Джерело фінансування
			Заробітна плата за місяць (1 робітник), грн	Річна* заробітна плата (всіх), грн	
Основні робочі	Комбайнер- водій	6	16 000	1 520 000	Інвестори
	Технік-технолог з наповнення	2	13 000	78 000	Інвестори
	Оператор систем поливу та оприскування	2	16 000	192 000	Інвестори
Спеціалісти	Агроном	2	30 000	720 000	Інвестори
	Наукові співробітники	8	30 000	2 880 000	Інвестори
Молодший персонал	Прибиральниця	2	12 000	288 000	Інвестори
	Охоронець	2	12 000	288 000	Інвестори
	Вантажник	4	15 000	720 000	Інвестори
	Пакувальник	4	12 000	192 000	Інвестори
	Лаборант	4	15 000	720 000	Інвестори

	Різноробочі на полях	20	15 000	1 800 000	Інвестори
Керівний та адміністративний персонал	Юристи	4	18 000	864 000	Інвестори
	Начальник юридичного відділу	1	25 000	300 000	Інвестори
	Маркетологи	2	18 000	432 000	Інвестори
	Начальник маркетингового відділу	1	25 000	300 000	Інвестори
	Старший лабораторії розробки	1	60 000	720 000	Інвестори
	Начальник контролю якості	1	45 000	540 000	Інвестори
	Бухгалтер	2	16 000	384 000	Інвестори
	Головний бухгалтер	1	25 000	300 000	Інвестори
	Менеджери продажу та закупівель	2	16 000	384 000	Інвестори
	Начальник відділ продажів та закупівель	1	25 000	300 000	Інвестори
	Всього:	13 634 000 грн			

* Заробітна плата на деяких посадах розрахована на 3-6 місяців за рік, оскільки вирощування пшениці є сезонною роботою.

Завершальним етапом оцінки вартості стартап-проекту є оцінка його техніко-економічного індексу (таблиця 4.17).

Таблиця 4.17

Техніко-економічні показники проєкту

Показник	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Од.	$V = 5\,400$ т
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком (окремо на процес розробки і на процес реалізації проєкту)	Осіб	Розробка: $Ч_{сп} = 26$ осіб Реалізація: $Ч_{сп} = 72$ особи
3. у тому числі - основних - допоміжних - керівний та адмін. персонал:	Осіб	Розробка: - основні: 20 - допоміжні: 6 Реалізація: - основні: 20 - допоміжні: 36 - керівний та адмін. персонал: 16
4. Середньорічний виробіток робітника (окремо на процес розробки і на процес реалізації проєкту)	Од./особу	Розробка: $ПП_{с.р.} = V/Ч_{сп} = 208$ Реалізація: $ПП_{с.р.} = V/Ч_{сп} = 75$
5. Капіталовкладення у проєкт (окремо на процес розробки і на процес реалізації проєкту): - всього - на одиницю продукції	Грн Грн/од.	Розробка: $Кв = OF + OB\Phi = 6\,921\,800$ грн Реалізація: $Кв = V(OF + OB\Phi) = 122\,806\,600$ грн $Код.п. = OF + OB\Phi = 22\,742$ грн
6. Повна собівартість (окремо на процес	Грн Грн/од.	Розробки:

розробки і на процес реалізації проєкту): - всього - на одиницю продукції		$C = A + \text{ОбФ} = 8\,380\,133$ грн Реалізації: $C_{\text{в}} = B(A + \text{ОбФ}) = 43\,606\,600$ грн $C_{\text{од.п}} = A + \text{ОбФ} = 8\,075$ грн
7. Відносний прибуток	Грн/од.	$\Pi = \text{Ц} - C = 17\,425$ грн
8. Рентабельність	%	$R = (\Pi / C) \times 100 = 216\%$
9. Період повернення капіталовкладень	Років	$T_{\text{пов}} = K / \Pi = 1,3$ років
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн/грн	$\Phi_{\text{в}} = (\text{Ц} \times B) / \text{ОФ} = 1,48$
11. Фондоємкість	Грн/грн	$\Phi_{\text{с}} = 1 / \Phi_{\text{в}} = 0,68$
12. Коефіцієнт економічної ефективності		$E = \Pi / K = 0,77$

4.6 Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів реалізації проєкту

Таблиця 4.18

Карта бізнес-процесів виконання стартап-проєкту

Стадія реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтов на тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Аналіз ринку та конкурентів, пошук постачальників, підбір техніки та лабораторного обладнання, патентний пошук	Витрати часу, трудові ресурси, капітал	2 місяців	300 000 грн

Реалізація ідеї	Закупівля обладнання та техніки, закупівля витратних матеріалів, виведення посухотолерантного сорту пшениці, вирощування пробної партії на демо-полях, селекція пшениці, підготовка пакету документів, підписання договорів з постачальниками	Витрати часу, трудові ресурси, капітал	12 місяців	110 000 000 грн
Впровадження у виробництво	Обробіток землі, внесення добрив, посів пшениці, оприскування, збір урожаю, очищення-калібрування зерна, закупівля реклами	Витрати часу, трудові ресурси, капітал	6 місяців	10 000 000 грн
Масова реалізація	Зберігання зерна на елеваторі, його пакування, контроль якості зерна, продаж пшениці	Витрати часу, трудові ресурси, капітал	6 місяців	11 000 000 грн

Таблиця 4.19

Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи								
	Наукові співробітники, лаборанти	Комбайнер-водій	Агроном	Працівники відділу закупівель	Працівники юридичного відділу	Різноробочі на полях	Оператор поливу та оприскування технолог 3	Адміністративний та керівний апарат	Пакувальник
Літературний та патентний пошук	+		+						
Закупівля обладнання та техніки				+					
Виведення посухотолерантного сорту пшениці	+		+						
Вирощування пробної партії на демо-полях	+		+						
Селекція пшениці	+		+						
Обробіток ґрунту		+				+			
Внесення добрив						+			
Посів пшениці на промислових полях		+				+			

4.7 Ризики розробки та методи управління ними

Таблиця 4.20

Ризики інноваційної розробки

Стадія реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Аналіз ринку та конкурентів, пошук постачальників, підбір техніки та лабораторного обладнання, патентний пошук	Порушення логістики поставок лабораторного обладнання та сільсько-господарської техніки з-за кордону через воєнний стан в країні	Нестача кадрів
Реалізація ідеї	Закупівля обладнання та техніки, закупівля витратних матеріалів, виведення посухотолерантного сорту пшениці, вирощування пробної партії на демо-полях, селекція пшениці, підготовка пакету документів, підписання договорів з постачальниками	Сировина, матеріали, обладнання та техніка низької якості	Проблеми з виведенням посухотолерантного сорту пшениці, низька врожайність чи погана посухостійкість, проблеми з юридичної реєстрації та отримання відповідних сертифікатів, ліцензій

Впровадження у виробництво	Оранка землі, внесення добрив, посів пшениці, її оприскування, збір урожаю, закупівля реклами	Нестача кадрів	Незадовільна врожайність пшениці, великий відсоток втрат врожаю
Масова реалізація	Зберігання зерна на елеваторі, його калібрування та пакування, контроль якості зерна, продаж пшениці	Введення воєнного стану в країні, через що економічна криза та зростання інфляції	Швидке зношення техніки та обладнання, затримка з постачанням паливно-мастильних матеріалів

Таблиця 4.21

Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Зовнішні ризики			
Макроекономічні ризики	Введення воєнного стану в країні, через що економічна криза та зростання інфляції	3	3
	Порушення логістики поставок лабораторного обладнання, реактивів і сільсько-господарської техніки з-за кордону через воєнний стан в країні	3	3

Товарний ризик	Сировина, матеріали, обладнання та техніка низької якості	3	1
Культурно-соціальний, демографічний ризик	Нестача кадрів	2	3
Внутрішні ризики			
Ризик персоналу	Нестача кадрів	2	3
Техніко-технологічний ризик	Незадовільна врожайність пшениці, великий відсоток втрат врожаю	1	3
	Швидке зношення техніки та обладнання	2	2
Юридичний ризик	Проблеми з юридичною реєстрацією отриманням відповідних сертифікатів, ліцензій	1	2
Науково-технічний ризик	Проблеми з виведенням посухотолерантного сорту пшениці	1	3

Для ризиків, що опинились у жовтій та червоній зоні створимо план управління ризиками (таблиця 4.22).

Таблиця 4.22

План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методом управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Введення воєнного стану в країні, через що економічна криза та зростання інфляції	Прийняття ризику	Адміністративний та керівний апарат	Період розробки, період реалізації, період, впровадження, масове виробництво	Створення резервних фондів
Порушення логістики поставок лабораторного обладнання, реактивів та сільсько-господарської техніки з-за кордону через воєнний стан в країні	Прийняття ризику	Адміністративний та керівний апарат	Період, впровадження, період реалізації у масове виробництво	Пошук та розробка нових шляхів логістики
Сировина, матеріали, обладнання та техніка низької якості	Ухилення від ризику	Адміністративний та керівний апарат	Реалізація ідеї	Обрання перевірених та надійних постачальників
Нестача кадрів	Прийняття ризику	Адміністративний та керівний апарат	Впровадження у виробництво	Покращення умов праці, підвищення заробітної плати
Незадовільна врожайність пшениці, великий відсоток втрат врожаю	Попередження ризику	Агрономи	Реалізація ідеї	Графік вчасного посіву, оприскування, внесення добрив, контроль показників якості

				пшениці на різних етапах росту і розвитку
Швидке зношення техніки та обладнання	Прийняття ризику	Майстри	Реалізація ідеї	Постійний моніторинг стану обладнання та своєчасний ремонт
Проблеми з виведенням посухотолерантного сорту пшениці	Попередження ризику	Наукові співробітники	Впровадження у виробництво	Збільшене фінансування на науковий відділ, рекрутинг високо-кваліфікованих фахівців

ВИСНОВКИ

Під час виконання магістерської дисертації вдалося виконати як теоретичні завдання, що допоможе у цілісному сприйнятті процесів біогенезу продихів *Triticum aestivum* та інших культурних рослин, так і практично поставлених завдань, що допоможе підвищити пропускну здатність оброблення результатів та швидко і зручно прогнозувати кінцевий ефект модифікації при селекції або генетичній модифікації, що підтверджує досягнення початкової мети. Відповідно до наданих завдань зазначається наступне:

1. Проведено аналіз сучасних наукових джерел літератури та уточнено відомості стосовно досягнень у розумінні процесів формування продихів у *Triticum aestivum* та інших культурних рослинах:
 - MUTE та його ортологи є вирішальним фактором при розвитку продихового комплексу трав через ключову роль при формуванні фланкуючих клітин, що на пряму впливає на WUE;
 - висока кількість досліджень EPF та їх ортологів дозволяє остаточно уточнити їх роль: EPF2 в основному регулює первинний асиметричний поділ, а EPF1 в основному контролює диференціацію GMC та відстань між продихами;
 - важливо зазначити активізацію досліджень одночасного використання антагоністичних пептидів (EPFL9 (Stomagen) тощо);
 - новий напрям спрямований на вивчення локалізації впливу вищезазначених факторів.
2. Усі використовувані для дослідження параметри мають вагоме значення для ідентифікації посухотолерантності, але найголовніший набір складається з наступних чотирьох із вагою 3,277:
 - ширина продихової щілини (мкм), адаксіальна сторона, звичайні умови;

- продиховий індекс (%), абаксіальна сторона, умови посухи;
 - площа продихової щілини (мкм²), абаксіальна сторона, умови посухи;
 - площа замикаючої клітини (мкм²), абаксіальна сторона, звичайні умови.
3. Розроблено програмні рішення для комплексного аналізу ключових параметрів продихів на етапах процесінгу та презентації даних, а саме на основі MRMR (відбір параметрів) (велика кількість наборів не є «шумними» та PCA (процесінг та презентація результату), із співпадінням очікуваної кластеризації відповідно до теоретичних даних і з високою варіацією (для 2D 82,6%+ та min для 3D 92,3%+) та логічно допустимими спрогнозованими даними.
 4. Розширено пул статистичних даних експериментально отриманими даними стабільних селекційних генотипів 3155-3164. На підставі розробленого ПЗ можливо спрогнозувати, що стабільні селекційні генотипи 3155, 3163 є посухотолерантними.
 5. На основі магістерської дисертації успішно розроблений стартап-проект з виведення нового сорту пшениці м'якої озимої з підвищеною на 30% посухотолерантністю, розраховані наступні показники: собівартість продукції, основні економічні показники. На підставі зазначеного можливо стверджувати про доцільність реалізації вказаного проекту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Vatén A., Bergmann D.C. Mechanisms of stomatal development: An evolutionary view. *Evodevo. BioMed Central*, 2012. Vol. 3, № 1. P. 1–9.
2. Peterson K.M., Rychel A.L., Torii K.U. Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *The Plant Cell. Oxford Academic*, 2012. Vol. 22, № 2. P. 296–306.
3. Franks P.J. et al. Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytol. New Phytol*, 2015. Vol. 207, № 1. P. 188–195.
4. Fleury D. et al. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany. Oxford Academic*, 2010. Vol. 61, № 12. P. 3211–3222.
5. Zahoor I. et al. Molecular mechanism of drought tolerance in wheat. *Climate Change and Food Security with Emphasis on Wheat. Academic Press*, 2020. P. 129–154.
6. Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 529, № 7584. P. 84–87.
7. Dahal K., Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase respiration maintains both mitochondrial and chloroplast function during drought. *New Phytol. New Phytol*, 2017. Vol. 213, № 2. P. 560–571.
8. Fahad S. et al. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science. Frontiers Media S.A.*, 2017. Vol. 8. P. 1147.
9. Timmusk S., Seisenbaeva G., Behers L. Titania (TiO₂) nanoparticles enhance the performance of growth-promoting rhizobacteria. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–13.
10. Danish S., Zafar-ul-Hye M. Co-application of ACC-deaminase producing PGPR and timber-waste biochar improves pigments formation, growth and

- yield of wheat under drought stress. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–13.
11. Danish S. et al. Rhizobacteria with ACC-deaminase activity improve nutrient uptake, chlorophyll contents and early seedling growth of wheat under peg- induced osmotic stress. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2019. Vol. 21. P. 1212–1220.
 12. Fábíán A. et al. Stigma functionality and fertility are reduced by heat and drought co-stress in wheat. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10.
 13. Utilization of synthetics for drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Biosciences (IJB)*. *International Journal of Biosciences*, 2014. Vol. 5, № 1. P. 104–112.
 14. Varshney R.K. et al. Can genomics deliver climate-change ready crops? *Curr Opin Plant Biol*. *Curr Opin Plant Biol*, 2018. Vol. 45, № Pt B. P. 205–211.
 15. Flexas J. Genetic improvement of leaf photosynthesis and intrinsic water use efficiency in C3 plants: why so much little success? *Plant Science*. *Plant Sci*, 2016. Vol. 251. P. 155–161.
 16. Bertolino L.T., Caine R.S., Gray J.E. Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10. P. 225.
 17. Caine R.S. et al. Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 221, № 1. P. 371–384.
 18. Hughes J. et al. Reducing stomatal density in barley improves drought tolerance without impacting on yield. *Plant Physiology*. Oxford Academic, 2017. Vol. 174, № 2. P. 776–787.
 19. Lv S. et al. Comparative analysis of the transcriptional response of tolerant and sensitive wheat genotypes to drought stress in field conditions.

- Agronomy. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. Vol. 8, № 11. P. 247.
20. Lobell D.B., Gourdj S.M. The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiology*. Oxford Academic, 2012. Vol. 160, № 4. P. 1686–1697.
 21. Ma J. et al. Transcriptomics analyses reveal wheat responses to drought stress during reproductive stages under field conditions. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation, 2017. Vol. 8.
 22. Ahmed A.A.S. et al. Selection for Drought Tolerance in Wheat Population (*Triticum aestivum* L.) by Independent Culling Levels. *World Journal of Agricultural Research*. Science and Education Publishing Co., Ltd., 2014. Vol. 2, № 2. P. 56–62.
 23. Nezhadahmadi A., Prodhan Z.H., Faruq G. Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*. Hindawi Publishing Corporation, 2013. Vol. 2013.
 24. Kulkarni M. et al. Drought response in wheat: key genes and regulatory mechanisms controlling root system architecture and transpiration efficiency. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S. A, 2017. Vol. 5, № DEC.
 25. Hetherington A.M., Woodward F.I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*. Nature Publishing Group, 2003. Vol. 424, № 6951. P. 901–908.
 26. Kollist H., Nuhkat M., Roelfsema M.R.G. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 203, № 1. P. 44–62.
 27. Sorrentino G. et al. Abscisic acid induces rapid reductions in mesophyll conductance to carbon dioxide. *PLOS ONE*. Public Library of Science, 2016. Vol. 11, № 2. P. e0148554.

28. Chaves M.M. et al. Controlling stomatal aperture in semi-arid regions — the dilemma of saving water or being cool? *Plant Science*. Elsevier, 2016. Vol. 251. P. 54–64.
29. Bartlett M.K. et al. The correlations and sequence of plant stomatal, hydraulic, and wilting responses to drought. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences, 2016. Vol. 113, № 46. P. 13098–13103.
30. McAdam S.A.M., Susmilch F.C., Brodribb T.J. Stomatal responses to vapour pressure deficit are regulated by high speed gene expression in angiosperms. *Plant Cell Environ*. *Plant Cell Environ*, 2016. Vol. 39, № 3. P. 485–491.
31. Qi X., Torii K.U. Hormonal and environmental signals guiding stomatal development. *BMC Biology*. BioMed Central, 2018. Vol. 16, № 1. P. 1–11.
32. Zhao W. et al. Response of stomatal density and bound gas exchange in leaves of maize to soil water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*. Springer, 2014. Vol. 37, № 1. P. 1–9.
33. Rudall P.J., Chen E.D., Cullen E. Evolution and development of monocot stomata. *Am J Bot*. *Am J Bot*, 2017. Vol. 104, № 8. P. 1122–1141.
34. Haworth M. et al. Allocation of the epidermis to stomata relates to stomatal physiological control: stomatal factors involved in the evolutionary diversification of the angiosperms and development of amphistomaty. *Environmental and Experimental Botany*. Elsevier, 2018. Vol. 151. P. 55–63.
35. Hepworth C. et al. Stomatal development: focusing on the grasses. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends, 2018. Vol. 41. P. 1–7.
36. Lawson T., Vialet-Chabrand S. Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 221, № 1. P. 93–98.

37. Shahinnia F. et al. Genetic association of stomatal traits and yield in wheat grown in low rainfall environments. *BMC Plant Biology*. BioMed Central Ltd., 2016. Vol. 16, № 1. P. 1–14.
38. Dow G.J., Bergmann D.C., Berry J.A. An integrated model of stomatal development and leaf physiology. *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 201, № 4. P. 1218–1226.
39. Sack L., Buckley T.N. The developmental basis of stomatal density and flux. *Plant Physiology*. Oxford Academic, 2016. Vol. 171, № 4. P. 2358–2363.
40. Dow G.J., Bergmann D.C. Patterning and processes: how stomatal development defines physiological potential. *Curr Opin Plant Biol*. *Curr Opin Plant Biol*, 2014. Vol. 21. P. 67–74.
41. Dittberner H. et al. Natural variation in stomata size contributes to the local adaptation of water-use efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*. Blackwell Publishing Ltd, 2018. Vol. 27, № 20. P. 4052–4065.
42. Field K.J. et al. Stomatal density and aperture in non-vascular land plants are non-responsive to above-ambient atmospheric CO₂ concentrations. *Ann Bot*. *Ann Bot*, 2015. Vol. 115, № 6. P. 915–922.
43. Dow G.J., Berry J.A., Bergmann D.C. The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*. *New Phytol*, 2014. Vol. 201, № 4. P. 1205–1217.
44. de Boer H.J. et al. Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. *The New Phytologist*. Wiley-Blackwell, 2016. Vol. 210, № 4. P. 1219.
45. Ouyang W. et al. Stomatal conductance, mesophyll conductance, and transpiration efficiency in relation to leaf anatomy in rice and wheat genotypes under drought. *J Exp Bot*. *J Exp Bot*, 2017. Vol. 68, № 18. P. 5191–5205.

46. Chen Z.H. et al. Molecular evolution of grass stomata. *Trends Plant Sci.* *Trends Plant Sci*, 2017. Vol. 22, № 2. P. 124–139.
47. Cai S. et al. Speedy grass stomata: emerging molecular and evolutionary features. *Mol Plant.* *Mol Plant*, 2017. Vol. 10, № 7. P. 912–914.
48. McAusland L. et al. Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol.* *New Phytol*, 2016. Vol. 211, № 4. P. 1209–1220.
49. Schäfer N. et al. A tandem amino acid residue motif in guard cell SLAC1 anion channel of grasses allows for the control of stomatal aperture by nitrate. *Current biology.* *Curr Biol*, 2018. Vol. 28, № 9. P. 1370-1379.e5.
50. Raissig M.T. et al. Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 2017. Vol. 355, № 6330. P. 1215–1218.
51. Khazaei H. et al. Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution.* Springer, 2009. Vol. 57, № 2. P. 307–314.
52. Azhand M., Saeidi M., Abdoli M. Evaluation of the relationship between gas exchange variables with grain yield in barley genotypes under terminal drought stress. *International Journal of Biosciences.* *International Journal of Biosciences*, 2015. Vol. 6, № 2. P. 366–374.
53. Sharifi P., Mohammadkhani N. Effects of drought stress on photosynthesis factors in wheat genotypes during anthesis. *Cereal Research Communications.* Cereal Research Non-Profit Company, 2016. Vol. 44, № 2. P. 229–239.
54. Travaglia C. et al. Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field

- conditions of soil water restriction. *Journal of Plant Growth Regulation* 2007 26:3. Springer, 2007. Vol. 26, № 3. P. 285–289.
55. Akter N., Rafiqul Islam M. Heat stress effects and management in wheat. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. Springer, 2017. Vol. 37, № 5. P. 1–17.
 56. Liu T., Ohashi-Ito K., Bergmann D.C. Orthologs of *Arabidopsis thaliana* stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development*. The Company of Biologists, 2009. Vol. 136, № 13. P. 2265–2276.
 57. Putarjunan A., Torii K.U. Stomagenesis versus myogenesis: parallels in intrinsic and extrinsic regulation of transcription factor mediated specialized cell-type differentiation in plants and animals. *Dev Growth Differ*. *Dev Growth Differ*, 2016. Vol. 58, № 4. P. 341–354.
 58. Macalister C.A., Bergmann D.C. Sequence and function of basic helix-loop-helix proteins required for stomatal development in *Arabidopsis* are deeply conserved in land plants. *Evol Dev*. *Evol Dev*, 2011. Vol. 13, № 2. P. 182–192.
 59. Chater C.C. et al. Origin and function of stomata in the moss *Physcomitrella patens*. *Nature Plants*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 2, № 12. P. 1–7.
 60. Qu X., Peterson K.M., Torii K.U. Stomatal development in time: the past and the future. *Curr Opin Genet Dev*. *Curr Opin Genet Dev*, 2017. Vol. 45. P. 1–9.
 61. Raissig M.T. et al. Grasses use an alternatively wired bHLH transcription factor network to establish stomatal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences, 2016. Vol. 113, № 29. P. 8326–8331.
 62. Serna L. The role of grass MUTE orthologues during stomatal development. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 11. P. 55.

63. Kanaoka M.M. et al. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. *The Plant Cell*. Oxford Academic, 2008. Vol. 20, № 7. P. 1775–1785.
64. Sugano S.S. et al. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 463, № 7278. P. 241–244.
65. Le J. et al. Signaling to stomatal initiation and cell division. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation, 2014. Vol. 5, № JUN. P. 297.
66. Qi X. et al. Autocrine regulation of stomatal differentiation potential by EPF1 and ERECTA-LIKE1 ligand-receptor signaling. *Elife*. eLife Sciences Publications Ltd, 2017. Vol. 6.
67. Caine R.S. et al. An ancestral stomatal patterning module revealed in the non-vascular land plant *Physcomitrella patens*. *Development*. Company of Biologists Ltd, 2016. Vol. 143, № 18. P. 3306–3314.
68. Wakeel A., Wang L., Xu M. SPEECHLESS and MUTE mediate feedback regulation of signal transduction during stomatal development. *Plants*. Plants (Basel), 2021. Vol. 10, № 3. P. 1–14.
69. Hughes J. et al. Reducing Stomatal Density in Barley Improves Drought Tolerance without Impacting on Yield. *Plant Physiology*. Oxford Academic, 2017. Vol. 174, № 2. P. 776–787.
70. Pillitteri L.J., Torii K.U. Mechanisms of stomatal development. *Annu Rev Plant Biol*. *Annu Rev Plant Biol*, 2012. Vol. 63. P. 591–614.
71. Dow G.J., Berry J.A., Bergmann D.C. Disruption of stomatal lineage signaling or transcriptional regulators has differential effects on mesophyll development, but maintains coordination of gas exchange. *New Phytol*. *New Phytol*, 2017. Vol. 216, № 1. P. 69–75.
72. Serna L. The role of grass MUTE orthologs in GMC progression and GC morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12.

73. Wu Z. et al. Multiple transcriptional factors control stomata development in rice. *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 223, № 1. P. 220–232.
74. Raissig M.T. et al. Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, 2017. Vol. 355, № 6330. P. 1215–1218.
75. Pillitteri L.J., Dong J. Stomatal development in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*. Arabidopsis Book, 2013. Vol. 11. P. e0162.
76. Torii K.U. Mix-and-match: ligand-receptor pairs in stomatal development and beyond. *Trends Plant Sci*. Trends Plant Sci, 2012. Vol. 17, № 12. P. 711–719.
77. Lau O.S., Bergmann D.C. Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development*. Development, 2012. Vol. 139, № 20. P. 3683–3692.
78. Yin X. et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1 mediated targeting of a stomatal developmental gene EPFL9 in rice. *Plant Cell Reports*. Springer, 2017. Vol. 36, № 5. P. 745–757.
79. Liu Y. et al. Overexpression of maize SDD1 (ZmSDD1) improves drought resistance in *Zea mays* L. by reducing stomatal density. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, 2015. Vol. 122, № 1. P. 147–159.
80. Morales-Navarro S. et al. Overexpression of a SDD1-like gene from wild tomato decreases stomatal density and enhances dehydration avoidance in arabidopsis and cultivated tomato. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., 2018. Vol. 9. P. 940.
81. Schuler M.L. et al. SHORTROOT-mediated increase in stomatal density has no impact on photosynthetic efficiency. *Plant Physiol*. Plant Physiol, 2018. Vol. 176, № 1. P. 757–772.

82. Sun Q. et al. TaEPFL1, an EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) secreted peptide gene, is required for stamen development in wheat. *Genetica. Genetica*, 2019. Vol. 147, № 2.
83. Mohammed U. et al. Rice plants overexpressing OsEPF1 show reduced stomatal density and increased root cortical aerenchyma formation. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–13.
84. Jangra R. et al. Duplicated antagonistic EPF peptides optimize grass stomatal initiation. *Development (Cambridge). Company of Biologists Ltd*, 2021. Vol. 148, № 16.
85. Zeng S.M. et al. Effective range of non-cell autonomous activator and inhibitor peptides specifying plant stomatal patterning. *Development (Cambridge). Company of Biologists Ltd*, 2020. Vol. 147, № 17.
86. Dunn J. et al. Reduced stomatal density in bread wheat leads to increased water-use efficiency. *J Exp Bot. J Exp Bot*, 2019. Vol. 70, № 18. P. 4737–4747.
87. Xiang Y. et al. The transcription factor ZmNAC49 reduces stomatal density and improves drought tolerance in maize. *J Exp Bot. J Exp Bot*, 2021. Vol. 72, № 4. P. 1399–1410.
88. Bian C. et al. Protein phosphatase 2A promotes stomatal development by stabilizing SPEECHLESS in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*, 2020. Vol. 117, № 23. P. 13127–13137.
89. ЛАХНЕКО О.Р. РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ ОЦІНКИ ПШЕНИЦІ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ЯКОСТІ ТА АДАПТИВНОСТІ. Київ: Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», 2021.
90. Royer D.L. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology. Elsevier*, 2001. Vol. 114, № 1–2. P. 1–28.

91. Maherali H. et al. Stomatal acclimation over a subambient to elevated CO₂ gradient in a C₃/C₄ grassland. *Plant, Cell and Environment*. 2002. Vol. 25, № 4. P. 557–566.
92. Radovic M. et al. Minimum redundancy maximum relevance feature selection approach for temporal gene expression data. *BMC Bioinformatics*. BioMed Central Ltd., 2017. Vol. 18, № 1. P. 1–14.
93. A One-Stop Shop for Principal Component Analysis | by Matt Brems | Towards Data Science [Electronic resource]. URL: <https://towardsdatascience.com/a-one-stop-shop-for-principal-component-analysis-5582fb7e0a9c> (accessed: 08.06.2022).
94. Visualizing Word Embedding with PCA and t-SNE | by Ruben Winastwan | Towards Data Science [Electronic resource]. URL: <https://towardsdatascience.com/visualizing-word-embedding-with-pca-and-t-sne-961a692509f5> (accessed: 08.06.2022).

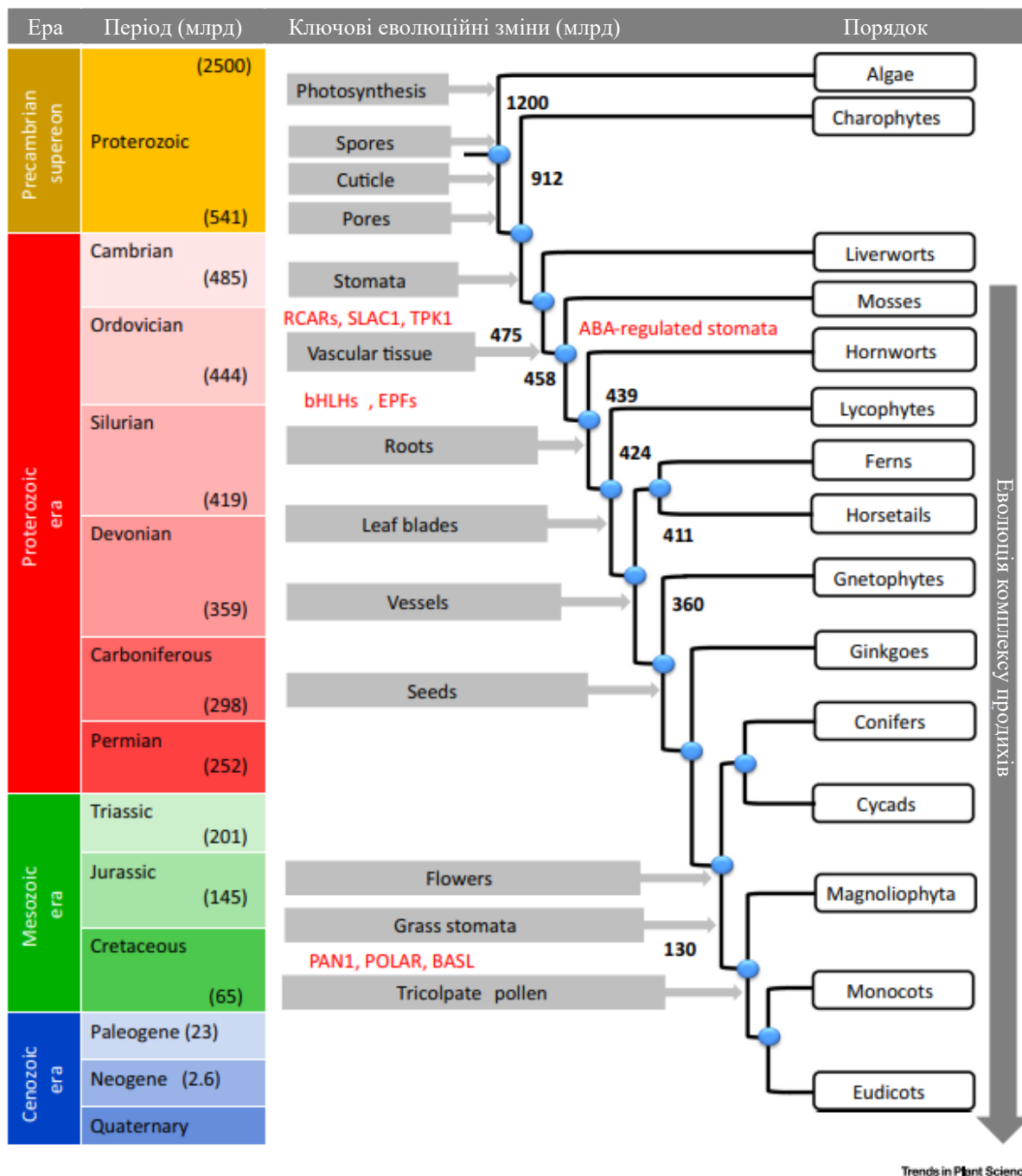


Рисунок А.1 – Схематична діаграма ключових еволюційних змін рослин. Червоним кольором виділено ключові білки для еволюції продихів. Додаткові скорочення: BASL – порушення асиметрії у лінії продихів; PAN1 - LRR-RLK білок PANGLOSS 1; POLAR - полярна локалізація під час асиметричного поділу та перерозподілу; RCAR – регуляторні компоненти рецепторів ABA; SLAC1 – повільний аніонний канал; TPK1 – двопорний K⁺ канал [46].

Програмне забезпечення для очистки даних на основі MRMR

```

import pandas as pd
import numpy as np
import math
import copy

from numpy import log
from scipy.special import digamma
from sklearn.neighbors import BallTree, KDTree
from itertools import chain, combinations
#%%
"""
For that moment code is working with one type of objects for
analysis, so code
have to be previously optimised for style like this
---
    Param 1      Param 2      ... Param N          Cell Type
<int/float> <int/float>  <int/float>  <Cell type 1>
    ...          ...          ...          ...
<int/float> <int/float>  <int/float>  <Cell type N>
---
"""

file_name = "Drought FS.csv"
identificator_column_name = "Сорт/лінія"
cell_type = "Type 1"
number_of_feature_selection_parameters = 4
#%%
# Block of data preparation
df = pd.read_csv(file_name)

df = df.loc[df[identificator_column_name] == cell_type]

df.drop([identificator_column_name], axis='columns',
inplace=True)

labels_of_df = list(df)

#%%
# Utility functions

def add_noise(x, intens=1e-10):
    # small noise to break degeneracy, see doc.
    return x + intens * np.random.random_sample(x.shape)

def query_neighbors(tree, x, k):
    return tree.query(x, k=k + 1)[0][:, k]

def count_neighbors(tree, x, r):
    return tree.query_radius(x, r, count_only=True)

```

```

def avgdigamma(points, dvec):
    # This part finds number of neighbors in some radius in
    the marginal space
    # returns expectation value of <psi(nx)>
    tree = build_tree(points)
    dvec = dvec - 1e-15
    num_points = count_neighbors(tree, points, dvec)
    return np.mean(digamma(num_points))

def build_tree(points):
    if points.shape[1] >= 20:
        return BallTree(points, metric='chebyshev')
    return KDTree(points, metric='chebyshev')
#%%
def entropy(x, k=3, base=2):
    """
    The classic K-L k-nearest neighbor continuous entropy
    estimator
    x should be a list of vectors, e.g. x = [[1.3], [3.7],
    [5.1], [2.4]]
    Output: numpy.float64
    """
    assert k <= len(x) - 1, "Set k smaller than num. samples -
    1"
    x = np.asarray(x)
    n_elements, n_features = x.shape
    x = add_noise(x)
    tree = build_tree(x)
    nn = query_neighbors(tree, x, k)
    const = digamma(n_elements) - digamma(k) + n_features *
    log(2)
    return (const + n_features * np.log(nn).mean()) / log(base)
#%%
def mi(x, y, z=None, k=3, base=2, alpha=0):
    """
    Mutual information of x and y (conditioned on z if z is not
    None)
    x, y should be a list of vectors, e.g. x = [[1.3], [3.7],
    [5.1], [2.4]]
    if x is a one-dimensional scalar and we have four samples
    Output: numpy.float64
    """
    assert len(x) == len(y), "Arrays should have same length"
    assert k <= len(x) - 1, "Set k smaller than num. samples -
    1"
    x, y = np.asarray(x), np.asarray(y)
    x, y = x.reshape(x.shape[0], -1), y.reshape(y.shape[0], -1)
    x = add_noise(x)
    y = add_noise(y)
    points = [x, y]
    if z is not None:

```

```

        z = np.asarray(z)
        z = z.reshape(z.shape[0], -1)
        points.append(z)
    points = np.hstack(points)
    # Find nearest neighbors in joint space, p=inf means max-
norm
    tree = build_tree(points)
    dvec = query_neighbors(tree, points, k)
    if z is None:
        a, b, c, d = avgdigamma(x, dvec), avgdigamma(
            y, dvec), digamma(k), digamma(len(x))
        if alpha > 0:
            d += lnc_correction(tree, points, k, alpha)
    else:
        xz = np.c_[x, z]
        yz = np.c_[y, z]
        a, b, c, d = avgdigamma(xz, dvec), avgdigamma(
            yz, dvec), avgdigamma(z, dvec), digamma(k)
    return (-a - b + c + d) / log(base)
"""
# %% md
Selection of sets
# %%
# Calculating number of possible variants of sets
number_of_sets =
int((math.factorial(len(labels_of_df)))/(math.factorial(number
_of_feature_selection_parameters)*math.factorial(len(labels_of
_df)-number_of_feature_selection_parameters)))
# %%
"""
Creating set variations of N parameters {set number :
parameters} | {int : tuple}
"""
def all_subsets(ss):
    return chain(*map(lambda x: combinations(ss, x), range(0,
len(ss)+1)))

sets_dict = {}

set_number = 1
for subset in all_subsets(labels_of_df):
    if len(subset) == 4:
        sets_dict[set_number] = subset
        set_number += 1

# print(sets_dict)
# %%
"""
Calculating entropy using "entropy" function
Result of block: {set number: entropy sum for the set} | {int
: numpy.float64}
"""
sets_entropy_dict = copy.deepcopy(sets_dict)

```

```

for key, value in sets_entropy_dict.items():
    temp_df = pd.DataFrame()
    for parameter_name in value:
        temp_df[parameter_name] = df[parameter_name]

    temp_labels = list(temp_df)
    array = temp_df.to_numpy()
    temp_entropy_list = []

    for parameter_name, i in zip(temp_labels,
range(len(temp_labels))):
        entropy_for_parameter = entropy(array[:,
i].reshape(len(array), 1))
        temp_entropy_list.append(entropy_for_parameter)

    sets_entropy_dict[key] = np.sum(temp_entropy_list)

# Printing used for a cursory check for possible problems in
# calculations and data adequacy
# print(sets_entropy_dict)
#%%
"""
Calculating mutual information using "mi" function
Result of block: {set number: mi sum for the set} | {int :
numpy.float64}
"""
sets_mi_dict = copy.deepcopy(sets_dict)

for key, value in sets_mi_dict.items():
    temp_df = pd.DataFrame()
    for parameter_name in value:
        temp_df[parameter_name] = df[parameter_name]

    temp_labels = list(temp_df)
    array = temp_df.to_numpy()
    temp_mi_list = []

    for i in range(len(temp_labels)):
        for j in range(len(temp_labels)):
            if i == j:
                continue
            else:
                mi_for_parameter = mi(array[:,
i].reshape(len(array), 1), array[:, j].reshape(len(array), 1))
                temp_mi_list.append(mi_for_parameter)

    sets_mi_dict[key] = np.sum(temp_mi_list)

# Printing used for a cursory check for possible problems in
# calculations and data adequacy
# print(sets_mi_dict)

```

```

#%%
"""
Calculating set weight {set number: weight (entropy - mi)} |
{int : numpy.float64}
"""
sets_weight_dict = {}

for key in sets_dict.keys():
    sets_weight_dict[key] = sets_entropy_dict[key] -
sets_mi_dict[key]

# print(sets_weight_dict)
#%%
"""
Sorting data and taking best N sets of features {set number:
weight} | {int : numpy.float64}
"""
temporary_list = list(sets_weight_dict.items())
temporary_list.sort(key=lambda i: i[1], reverse = True)
filtred_temporary_list =
temporary_list[0:number_of_feature_selection_parameters+1]

sorted_sets_weight_dict = {key:value for key, value in
filtred_temporary_list}

# print(sorted_sets_weight_dict)
#%%
"""
Binding set weight to its parameters {<parameters>: weight} |
{tuple : numpy.float64}
"""

result_dict = {}

for set_number, sum in sets_weight_dict.items():
    result_dict[set_number] = sum
    result_dict[sets_dict[set_number]] =
result_dict.pop(set_number)

# print(result_dict)
#%%
"""
Detailed result of processed data with gaps (all sets)
"""

temporary_list_gaps = list(sets_weight_dict.items())
temporary_list_gaps.sort(key=lambda i: i[1], reverse = True)

gap_dict = {}

min_value = min(list(sets_weight_dict.values()))
max_value = max(list(sets_weight_dict.values()))

```

```
for pair in temporary_list_gaps:
    if temporary_list_gaps.index(pair) == 0:
        gap_dict[pair[0]] = 0
    else:
        percentage_gap =
        ((temporary_list_gaps[temporary_list_gaps.index(pair)-1][1] -
        pair[1])*100)/(max_value - min_value)
        gap_dict[pair[0]] = percentage_gap

counter = 0

for key, value in gap_dict.items():
    counter += 1
    print (f"Set: {' , '.join(sets_dict[key])} | score:
    {round(sets_weight_dict[key], 3)} | Gap: {round(value, 3)} %")
    if counter == 10:
        break
```

Програмне забезпечення для презентації даних на основі PCA

```

import pandas as pd
import numpy as np
from sklearn.preprocessing import StandardScaler
from sklearn.decomposition import PCA
from matplotlib import pyplot as plt
import plotly.express as px
#%%
#Creating input parameters
csv_file_name='Drought Start Normalized Reduced.csv'
object_type='Сорт/лінія'
#%%
# Creating data frame
df_raw = pd.read_csv(csv_file_name)

# Separating out the object
df_no_object_type = df_raw.drop(object_type, 1)

#Preprocessing PCA
parameters = list(df_no_object_type)
# Separating out the features
df = df_no_object_type.loc[:, parameters].values
# Standardizing the features
stand_scaler_for_pca = StandardScaler()
df = stand_scaler_for_pca.fit_transform(df)
#%%
# Running the PCA for 2D
pca_2D = PCA(n_components=2)
principal_components_2D = pca_2D.fit_transform(df)
result_PCA_2D_final = pd.DataFrame(data =
principal_components_2D, columns = ['PCA%i' % i for i in
range(2)])
# Adding color column
result_PCA_2D_final.loc[:, object_type] = df_raw[object_type]
# Labeling and explaining variation
labels_pca_2D = {
    str(i): f"PC {i+1} ({var:.1f}%)"
    for i, var in enumerate(pca_2D.explained_variance_ratio_ *
100)
}
# Calculating total variation
pca_2D_total_variation =
sum(pca_2D.explained_variance_ratio_.tolist()) * 100
# Renaming columns for adding variation
result_PCA_2D_final.rename(columns={'PCA0':
labels_pca_2D['0'], 'PCA1': labels_pca_2D['1']}, inplace=True)

# Running the PCA for multiple 2D
pca_multi_2D = PCA()
principal_components_multi = pca_multi_2D.fit_transform(df)

```

```

# Adding color column
df_raw_numpy = df_raw[object_type].to_numpy()
principal_components_multi =
np.append(principal_components_multi, df_raw_numpy[:, None],
1)
# Labeling and explaining variation
labels_pca_multi_2D = {
    str(i): f"PC {i+1} ({var:.1f}%)"
    for i, var in
enumerate(pca_multi_2D.explained_variance_ratio_ * 100)
}

# Running the PCA for 3D
pca_3D = PCA(n_components=3)
principal_components_3D = pca_3D.fit_transform(df)
result_PCA_3D_final = pd.DataFrame(data =
principal_components_3D, columns = ['PCA%i' % i for i in
range(3)])
# Adding object column
result_PCA_3D_final.loc[:, object_type] = df_raw[object_type]
# Labeling and explaining variation
labels_pca_3D = {
    str(i): f"PC {i+1} ({var:.1f}%)"
    for i, var in enumerate(pca_3D.explained_variance_ratio_ *
100)
}
# Calculating total variation
pca_3D_total_variation =
sum(pca_3D.explained_variance_ratio_.tolist()) * 100
# Renaming columns for adding variation
result_PCA_3D_final.rename(columns={'PCA0':
labels_pca_3D['0'], 'PCA1': labels_pca_3D['1'], 'PCA2':
labels_pca_3D['2']},
inplace=True)

#%%
# 2D visualisation of the all original dimensions

fig_all_param_correlation = px.scatter_matrix(df_raw,
dimensions=parameters, color=object_type,
title =
"Visualisation of the all original dimensions")
fig_all_param_correlation.update_traces(diagonal_visible=False
)
fig_all_param_correlation.show()
#%%
#2D interactive plot

fig = px.scatter(result_PCA_2D_final, x = labels_pca_2D["0"],
y = labels_pca_2D["1"], color=object_type,
title = f"PCA in 2 dimensions for
{len(parameters)} parameters." +
f"Total variation:

```

```

{pca_2D_total_variation:.1f}%")
fig.show()
#%%
#Multiple 2D interactive plot

fig_PCA_multi = px.scatter_matrix(
    principal_components_multi,
    labels=labels_pca_multi_2D,
    dimensions=range(len(parameters)),
    color=df_raw.columns.get_loc(object_type)
)
fig_PCA_multi.update_traces(diagonal_visible=False)
fig_PCA_multi.show()
#%%
# Loading scores

loading_scores = pd.Series(pca_2D.components_[0], index =
parameters)
sorted_loading_scores =
loading_scores.abs().sort_values(ascending = False)
top_10_parameters = sorted_loading_scores[0:10].index.values

print(loading_scores[top_10_parameters])
#%%
#3D static plot

# Creating color codes
df_raw[object_type] = pd.Categorical(df_raw[object_type])
color=df_raw[object_type].cat.codes

# Plot initialisation
fig = plt.figure()
ax = fig.add_subplot(111, projection='3d')
ax.scatter(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["0"]],
result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["1"]],
          result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["2"]], c=color,
cmap='Set2_r', s=60
)
# dec & labeling
xAxisLine = ((min(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["0"]]),
max(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["0"]])),
(0, 0), (0,0))
ax.plot(xAxisLine[0], xAxisLine[1], xAxisLine[2], 'r')
yAxisLine = ((0, 0),
(min(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["1"]]),
max(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["1"]])), (0,0))
ax.plot(yAxisLine[0], yAxisLine[1], yAxisLine[2], 'r')
zAxisLine = ((0, 0), (0,0),
(min(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["2"]]),
max(result_PCA_3D_final[labels_pca_3D["2"]]))))

```

```
ax.plot(zAxisLine[0], zAxisLine[1], zAxisLine[2], 'r')
ax.set_xlabel(labels_pca_3D["0"])
ax.set_ylabel(labels_pca_3D["1"])
ax.set_zlabel(labels_pca_3D["2"])
ax.set_title(f"PCA in 3 dimensions for {len(parameters)}
parameters." +
            f"Total variation:
{pca_3D_total_variation:.1f}%")
ax.view_init(35, 135)
plt.show()
#%%
#3D interactive plot

fig = px.scatter_3d(result_PCA_3D_final, x
=labels_pca_3D["0"], y =labels_pca_3D["1"], z
=labels_pca_3D["2"],
                    color = object_type, title = f"PCA in 3
dimensions for {len(parameters)} parameters." +
                    f"Total variation:
{pca_3D_total_variation:.1f}%")
fig.show()
```