

АНОТАЦІЯ

Лахнеко О.Р. Розробка біотехнологічних підходів оцінки пшениці за показниками якості та адаптивності.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2021.

Робота виконана на кафедрі екобіотехнології та біоенергетики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського».

Наявна тенденція до зміну клімату у бік зниження опадів та підвищених температур кидає виклик сучасному сільському господарству та впливає на продуктивність культур, зокрема пшениці. Сучасна селекція має оперативно відповідати на цей виклик і створювати нові сорти до умов вирощування, що змінюються. Використання біотехнологічних підходів на основі молекулярних маркерів може значно прискорити процес відбору зародкової плазми для подальшого використання в селекційних програмах.

В 2012 та 2018 роках групами вчених було звернуто увагу на транскрипційний фактор пшениці TaWRKY2, проте не достатньо описано його різноманіття. До того ж, гени біогенезу проростків *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* є важливими детермінантами для ефективного збереження та використання рослинами води. Розробка біотехнологічних підходів на основі ПЛР-аналізу генів за участі функціональних ДНК-маркерів надасть унікальну можливість для проведення скринінгу великих колекцій зародкової плазми з метою перевірки різноманітності за короткий період часу і високою точністю.

З іншого боку дефіцит води при вирощуванні пшениці впливає на властивості зерна через диверсифіковану експресію білків – збільшується частка білків, які можуть спричиняти харчову непереносимість або алергію у сприйнятливих людей. На сьогоднішній день, все більшою вимогою людства є продукти зі зниженою алергенністю/токсичністю. Протеоміка дозволяє

реалістично оцінити кількість специфічних запасних білків зерна, долаючи обмеження молекулярних методів геноміки та транскриптоміки. Дослідження різноманіття експресованих алергічних/токсичних білків зерна пшениці серед вибірки сучасних та історичних сортів дозволить виявити молекулярні маркери для подальшого ефективного відбору донорів генетичної плазми з метою створення нових менш алергенних/токсичних сортів.

Таким чином, розробка біотехнологічних способів оцінки пшениці за показниками якості білків зерна та адаптивності до дефіциту води є перспективним завданням біотехнології при сучасних реаліях змін клімату та наростаючих питаннях зниження алергенності/токсичності пшениці.

В дисертаційній роботі встановлено, що за умов ґрунтової посухи толерантними були сорти озимої пшениці Астарт, Одеська 267 та Подолянка, бо відрізнялися здатністю адаптуватися до несприятливих умов. Виявлено, що зернова продуктивність за дії ґрунтової посухи залежить від регуляції апертури продихів на абаксіальній стороні листка.

Встановлено, що нуклеотидні послідовності гомологічних генів *TaWRKY2* з шести контрастних сортів пшениці характеризуються різним рівнем поліморфності: 7 SNP для *TaWRKY2-A1*, 12 SNP і 1 інсерція для *TaWRKY2-B1*, 1 делеція для *TaWRKY2-D1* з яких 11 призводять до змін в амінокислотному складі поліпептидів; та 3 інсерції, 3 делеції та 20 SNP для промоторного регіону *TaWRKY2-D1*, з яких 3 SNP потенційно впливають на регуляторні елементи експресії. Виявлено функціональну залежність зміни рівня експресії *TaWRKY2* генів від водного режиму вирощування рослин. Два посухочутливі сорти Поліська 90 і Наталка показали швидке і сильне підвищення експресії *TaWRKY2* генів у прапорцевому листку – у 5,0 та 4,1 разів відповідно. Серед посухотолерантних сортів лише сорт Одеська 267 показав підвищену експресію *TaWRKY2* генів у 1,9 разів, а у колосі серед посухотолерантних сортів лише сорт Подолянка виявив ріст експресії у 1,9 разів.

Виявлено та охарактеризовано 36 SNP, 3 інсерції та 1 делецію в нуклеотидній послідовності гомологічних генів біогенезу продихів пшениці *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* шести контрастних сортів. Проте, лише 15 відмінностей спричиняють зміни в поліпептидному ланцюзі. Досліджено, що гени *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* експресуються на високому рівні лише у молодих листках, які формуються.

Розроблено біотехнологічний підхід оцінки пшениці на основі модифікованого методу ПЛР за використанням 9 розроблених відтворюваних систем ДНК-маркерів до генів посухо-опосередкованого транскрипційного фактору TaWRKY2-A1 (PA1), TaWRKY2-B1 (PB1, PB2 та PB3) та TaWRKY2-D1 (PD1, PD2, PD3, PD4 та PD5) та 7 систем до генів біогенезу продихів *EPF1-A1* (E1A1), *EPF1-B1* (E1B1 та E1B2), *EPF1-D1* (E1D1 та E1D2), *EPF2-A1* (E2A1) та *MUTE-D1* (MD1). Для кожної із систем було підібрано раціональні хімічні умови, температурні та часові режими ПЛР для отримання максимальної кількості бажаних продуктів. Показано на вибірці сортів, диких пшениць та гібридів, що розроблений підхід результативно застосовувати для генотипування, підбору донорів зародкової плазми для схрещувань, дискримінації генетичного матеріалу, що має походження з субгеному D пшениці.

Розроблено біотехнологічний підхід оцінки протеомного складу зерна пшениці на основі одноступінчастої екстракції білків і взаємодоповнюючих 2DE-LC/MS та GF-LC/MS, що в комплексі продукували на 20,4% більше білкових ідентифікацій ніж застосування 2DE-LC/MS. Раціоналізоване ферментативне розщеплення диференційно-експресованих білків трьома ферментами при 2DE-LC/MS підході, що дозволило збільшити кількість ідентифікацій з 57,6% до 74,2%.

Показано, що більшість диференційно-експресованих білків зерна належать до групи метаболічних протеїнів – 27 білків, 44%; далі гліадини – 20 білків, 33%; а найменше глютенінів – 14 білків, 23%. Найбільше алергенних/токсичних епітопів продемонстрували глютеніни (14 білків, 48%)

і гліадини (13 білків, 45%) у порівнянні з неглютенною групою (2 білки, 7%). Найвищий коефіцієнт накопичення алергенних/токсичних білків був у традиційному сорті Українка (48,7% виявлених білків), що пояснюється генетичною неоднорідністю. На противагу, сучасний сорт Сотниця характеризувався лише 4 з 39 алергенних/токсичних білків (10,3%) і вирізнявся як найбільш підходящий донор зародкової плазми для нових сортів харчового напрямку.

Розроблено процесуальні схеми проведення оцінки пшениці за показниками якості білків зерна та адаптивності до посухи. Біотехнологічні підходи проведення оцінки пшениці за показниками якості та адаптивності передбачають одержання фрагментів ДНК та білкових ідентифікацій.

Мета роботи і задачі дослідження. Метою роботи є розробка біотехнологічних підходів оцінки пшениці за показниками якості запасних білків зерна та поліморфізму генів адаптивності до посухи.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **задачі**:

1. Визначити фізіолого-біохімічні властивості шести контрастних сортів пшениці за умов посухи.

2. Дослідити структуру нуклеотидних послідовностей гена посухо-опосередкованого транскрипційного фактору *TaWRKY2* для шести сортів пшениці та охарактеризувати особливості експресії за умов обмеженого водного режиму.

3. Дослідити структуру та функціонально охарактеризувати нуклеотидні послідовності генів біогенезу протекторів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* для шести контрастних сортів пшениці.

4. Розробити біотехнологічні підходи оцінки поліморфізму генів адаптивності до посухи (*TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* та *MUTE*) пшениці на основі модифікованого методу ПЛР та провести апробацію на вибірці зразків.

5. Розробити біотехнологічний підхід оцінки диференційно-експресованих запасних білків зерна пшениці на основі удосконалених методів LC/MS.

6. При використанні розробленого біотехнологічного підходу встановити диференційно-експресовані алергенні/токсичні білки в зерні сучасних та історичного сортів пшениці.

7. Розробити процесуальні схеми проведення оцінки пшениці за показниками якості білкового складу зерна та адаптивності рослин до посухи.

Об'єктом досліджень є біотехнологічні підходи оцінки пшениці за показниками якості запасних білків зерна та адаптивності рослин до посухи.

Предметом досліджень є раціональні параметри оцінки пшениці за показниками якості запасних білків зерна та адаптивності до посухи.

Методи дослідження. Для виконання поставлених завдань у процесі дослідження використано: фізіологічні методи для характеристики контрастних сортів пшениці; біоінформаційні методи для пошуку та порівняння послідовностей ДНК та білків у базах даних; молекулярно-генетичні методи для виділення та аналізу нуклеотидних послідовностей (очищення нуклеїнових кислот, полімеразна ланцюгова реакція, сиквенування, електрофорез нуклеїнових кислот та білків у гелі); біофізичні методи (мікроскопія, спектрофотометрія для визначення концентрації ДНК та білків, рідинна хроматографія, мас-спектрометрія); біохімічні методи для виділення білків із зерна та їх ферментативного розщеплення; методи теорії графів (MS Excel) для обробки результатів досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертації *вперше* одержані такі наукові результати:

- відкрито поліморфізм нуклеотидних послідовностей транскрипційного фактору *TaWRKY2* та генів біогенезу прорихів *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* з трьох субгеномів шести сортів пшениці української селекції та охарактеризовано вплив виявлених відмінностей на амінокислотний склад відповідних поліпептидів;

- розроблено біотехнологічні підходи оцінки поліморфізму пшениці за генами *TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* на основі модифікованого методу

ПЛР за використанням 16-ти оригінальних сконструйованих специфічних систем ДНК-маркерів, що дозволяють розрізняти алелі вищезазначених генів;

- при проведенні оцінки генетичної різноманітності вибірки вітчизняних та зарубіжних сортів за генами *TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* виявлено, що українські сорти пшениці продемонстрували більш різноманітні спектри фрагментів ПЛР та встановлено, що розроблений підхід дозволяє дискримінувати генетичний матеріал, котрий містить у своєму складі D субгеном пшениці;

- розроблено біотехнологічний підхід оцінки диференційно-експресованих запасних білків зерна пшениці за використанням удосконалених 2DE-LC/MS та GF-LC/MS, що покращило ідентифікацію на 20,4%;

- удосконалено ідентифікацію диференційно-експресованих білків в 2DE-LC/MS аналізі розщепленням трьома ферментами – хімотрипсином, трипсином, а потім термолізином, що покращило ідентифікацію білків на 16,6%;

- порівняно білкові склади зерна двох сучасних сортів (Панна та Сотниця) з історичним сортом Українка та встановлено, що найвище накопичення алергенних/токсичних білків у традиційному сорті Українка, а сорт Сотниця вирізнявся як найбільш підходящий донор зародкової плазми для нових сортів харчового напрямку.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення дисертаційної роботи полягає у вирішенні проблеми оцінки та добирання донорів зародкової плазми пшениці за генами адаптивності до посухи та харчової якості запасних білків зерна.

Виявлений та охарактеризований поліморфізм генів адаптивності до посухи *TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* є підґрунтям для фундаментального вивчення ефективності функціонування продуктів кожного алелю. Встановлені раціональні параметри проведення оцінки пшениці за генами адаптивності до посухи дозволяють ефективно характеризувати поліморфізм

дослідних зразків. Розроблено біотехнологічний підхід вивчення диференційного накопичення запасних білків зерна пшениці на основі методів протеоміки, який дозволяє подолати обмеження методів геноміки та транскриптоміки і детально оцінити відмінності в біосинтезі алергенних/токсичних білків.

Розроблені біотехнологічні підходи можуть бути використані для планування генетико-селекційних схем схрещування, генотипування сортів, вирішення питання походження (фальсифікації) сортового матеріалу. Це дозволяє інтенсифікувати створення нових спеціалізованих за використанням сортів м'якої пшениці.

Розроблені біотехнологічні підходи були впроваджені для характеристики найбільш поширених та нових сортів пшениці м'якої селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України на наявність поліморфізму гена транскрипційного фактору *TaWRKY2* та генів біогенезу протидієв *EPF1*, *EPF2* та *MUTE* та використані ІФРГ НАН України для аналізу селекційних ліній м'якої пшениці, відбору бажаних генотипів та проведення селекційних програм (Акт впровадження №106/27 від 28.01.2021). Результати досліджень впроваджено у навчальний процес підготовки фахівців спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» в Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (Акт впровадження від 01.02.2021). Здобувачем було отримано гранти на представлення новітніх результатів на міжнародних воркшопі (ReHOPE; Болгарія; поліморфізм *TaWRKY2-D1* гена) та конференції (INPRO2016; Італія; дослідження протеомів зерна сучасних та традиційного сортів).

Особистий внесок дисертанта. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором особисто або за його безпосередньої участі. Планування роботи та обговорення результатів проводили спільно із науковими керівниками.

Автором особисто здійснено біоінформаційний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей з баз даних, виділення загальної ДНК пшениці; визначено біотехнологічні підходи для виявлення поліморфізму цільових генів; сконструйовано системи праймерів, підібрано раціональні умови ПЛР та проведено ПЛР для вибірки зразків пшениць; проведено вимірювання відносної експресії генів; проведено екстрагування білків пшениці, їх розділення методом електрофорезу та розщеплення ферментами; розроблено процесуальні схеми проведення оцінки пшениці за розробленими біотехнологічними підходами; оформлено представлені у роботі результати. Автором особисто відібрано і критично проаналізовано великий обсяг сучасної зарубіжної та вітчизняної літератури за темою проведеного наукового дослідження.

За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, у тому числі: 2 наукові статті, з яких 1 стаття у науковому фаховому виданні України, яке входить до наукометричних баз, 1 стаття у періодичному науковому фаховому виданні держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку Європейського Союзу (Швейцарія), та віднесеному до 1-го квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank (прирівнюється до двох публікацій, які зараховуються відповідно до абзацу першого пункту 11 постанови Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167); 1 патент України на корисну модель; 10 тез на всеукраїнських та міжнародних конференціях.

Ключові слова: пшениця, молекулярні маркери, посухотолерантність, транскрипційні фактори, глютен.

SUMMARY

Lakhneko O.R. Development of biotechnological approaches for wheat evaluation in terms of quality and adaptability.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 16 Chemical and bioengineering in the specialty 162 Biotechnology and

bioengineering. - National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Kyiv, 2021.

The work was performed at the Department of Environmental Biotechnology and Bioenergy at National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute».

The current climate change trend in the direction of decreasing precipitation and rising temperatures challenges modern agriculture and affects the productivity of crops, in particular wheat. Modern selection have to respond quickly to this challenge and originate new varieties to changing growing conditions. The use of biotechnological approaches based on molecular markers can significantly accelerate the process of selection of germplasm for further use in breeding programs.

In 2012 and 2018, groups of scientists paid attention to the transcription factor of wheat TaWRKY2, but its diversity has not been sufficiently described. In addition, the stomatal biogenesis genes *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* are important determinants for efficient water conservation and use. The development of biotechnological methods based on PCR analysis of genes of interest with the participation of functional DNA markers will provide a unique opportunity to screen large collections of germplasm to verify diversity in a short period of time and high accuracy.

On the other hand, water deficiency in wheat cultivation affects the technological properties of grain due to diversified protein expression – increasing the proportion of proteins that can cause food intolerance or allergies in susceptible people. Today, the growing demand of mankind is products with reduced allergenicity/toxicity. Proteomics allows to realistically estimate the amount of specific grain storage proteins, overcoming the limitations of molecular methods of genomics and transcriptomics. The study of the diversity of expressed allergic/toxic wheat grain proteins among the samples of modern and historical varieties will reveal molecular markers for further effective selection of germplasm donors in order to create new less allergenic/toxic varieties.

Thus, the development of biotechnological approaches for wheat assessment in terms of grain protein quality and adaptability to water scarcity is a promising task of modern biotechnology in the current realities of climate change and the growing issues of reducing allergenicity/toxicity of wheat.

It was established that under the conditions of soil drought the varieties of winter wheat Astarta, Odeska 267 and Podolianka were tolerant, because they differed in their ability to adapt to adverse conditions. It was found that grain productivity under the action of soil drought depends on the regulation of the aperture of the stomata on the abaxial side of the leaf.

It was found that the nucleotide sequences of homologous *TaWRKY2* genes from six contrasting wheat varieties are characterized by different levels of polymorphism: 7 SNP for *TaWRKY2-A1*, 12 SNP and 1 insertion for *TaWRKY2-B1*, 1 deletion for *TaWRKY2-D1* of which 11 polypeptides; and 3 insertions, 3 deletions, and 20 SNPs for the *TaWRKY2-D1* promoter region, of which 3 SNPs potentially affect regulatory elements of expression. The functional dependence of the change in the level of expression of *TaWRKY2* genes on the water regime of plant cultivation was revealed. Two drought-resistant varieties Poliska 90 and Nataalka showed a rapid and strong increase in the expression of *TaWRKY2* genes during the simulation of drought conditions in the flag leaf. Among drought-resistant varieties, only the Odeska 267 variety showed increased expression of *TaWRKY2* genes and only the variety Podolianka showed an increase in relative expression in the ear among drought-resistant varieties.

36 SNPs, 3 insertions and 1 deletion in the sequences of wheat stomatal biogenesis genes *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* from three subgenomes of six contrasting varieties were shown and characterized. However, only 15 polymorphisms cause changes in the polypeptide chain. It has been studied that the genes *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* are expressed at a high level only in the young leaves that are formed.

The biotechnological approach for wheat evaluation based on a modified PCR method using 9 reproducible primer systems for drought-mediated transcription factor genes *TaWRKY2-A1* (PA1), *TaWRKY2-B1* (PB1, PB2 and PB3) and

TaWRKY2-D1 (PD1, PD2, PD5, PD4) and 7 systems to the stomatal biogenesis genes *EPF1-A1* (E1A1), *EPF1-B1* (E1B1 and E1B2), *EPF1-D1* (E1D1 and E1D2), *EPF2-A1* (E2A1) and *MUTE-D1* (MD1). For each of the systems, rational chemical conditions, temperature and PCR modes for enzymatic replication were selected in order to obtain products in the form of amplified DNA. It is shown for the samples of varieties, wild wheat and hybrids that the developed technology can be effectively used for genotyping of varieties, for phylogenetic studies of wheat, characteristics of germplasm donors for crossings, discrimination of genetic material derived from wheat subgenome D.

The biotechnological approach for estimation the proteomic composition of wheat grain based on single-stage protein extraction and complementary 2DE-LC/MS and GF-LC/MS was developed, which in the complex produced 20.4% more protein identifications than the use of 2DE-LC/MS. Rationalized enzymatic cleavage of differentially expressed proteins by three enzymes in the 2DE-LC/MS approach increased the number of identifications from 57.6% to 74.2%.

It is shown that the majority of differentially expressed grain proteins belong to the group of metabolic proteins – 27 proteins, 44%; then gliadins - 20 proteins, 33%; and the least glutenins – 14 proteins, 23%. In contrast, among allergenic/toxic proteins, glutenins with 14 proteins showed the greatest diversity, 48%; gliadins included 13 proteins, 45%; and the non-gluten group consisted of only two proteins, 7%. The highest coefficient of accumulation of allergenic/toxic proteins in the traditional variety Ukrainka (48.7% of detected proteins) was revealed, which is explained by genetic heterogeneity. The modern variety Sotnytsia was characterized by 4 of 39 allergenic/toxic proteins (10.3%) and was identified as a suitable germplasm donor for new less toxic varieties.

The procedural schemes for wheat assessment of grain protein quality and drought adaptability have been developed. Biotechnological approaches for wheat assesment in terms of quality and adaptability involve obtaining DNA fragments and protein identifications.

Purpose and tasks of the study. The purpose of the work is to develop biotechnological approaches for wheat assessment in terms of grain storage protein quality and polymorphism of genes of drought adaptability.

To achieve this goal it was necessary to solve the following **tasks**:

1. To determine the physiological and biochemical properties of six contrasting varieties of wheat under drought conditions.
2. To investigate the structure of nucleotide sequences of the drought-mediated gene of the transcription factor *TaWRKY2* for six wheat varieties and to characterize the expression patterns under conditions of limited water regime.
3. To investigate the structure and functional characterization of nucleotide sequences of stomatal biogenesis genes *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* for six wheat varieties.
4. To develop biotechnological approaches for polymorphism assessment of drought adaptability genes (*TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* and *MUTE*) of wheat on the basis of a modified PCR method and to conduct test on samples.
5. To develop biotechnological approach for evaluation of differentially expressed wheat grain proteins on the basis of modified LC/MS methods.
6. To establish differentially expressed allergenic/toxic proteins in grain of modern and historical varieties using an advanced biotechnological approach.
7. To develop procedural schemes for wheat assessment in terms of grain protein composition and drought adaptability.

The **object** of research is biotechnological approaches for wheat assessment in terms of grain storage protein quality and plants drought adaptability.

The **subject** of research is the rational parameters of biotechnological approaches of wheat assessment in terms of grain storage protein quality and drought adaptability.

Research methods. To perform the tasks in the study process used: physiological methods to characterize the contrasting varieties of wheat; bioinformatics methods for searching and comparing DNA and protein sequences in databases; molecular genetic methods for isolation and analysis of nucleotide

sequences (nucleic acid isolation, polymerase chain reaction, sequencing, electrophoresis of nucleic acids and proteins); biophysical methods (microscopy, spectrophotometry to determine the concentration of DNA and proteins, liquid chromatography, mass spectrometry); biochemical methods for isolation of proteins from grain and their enzymatic cleavage; methods of graph theory (MS Excel) for processing research results.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time the following scientific results were presented in the thesis:

- polymorphism of nucleotide sequences of transcription factor *TaWRKY2* and genes of stomatal biogenesis *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* from three subgenomes of six wheat varieties of Ukrainian breeding was discovered and the influence of the detected differences on the amino acid composition of the respective polypeptides was characterized;

- the biotechnological approaches for wheat polymorphism assessment by genes *TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* based on a modified PCR method using 16 original designed specific systems of DNA markers was developed that allow to distinguish alleles of the genes;

- when assessing the genetic diversity of domestic and foreign varieties by *TaWRKY2*, *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* genes, it was found that Ukrainian wheat varieties showed more diverse spectra of PCR fragments and the developed approach allows to discriminate genetic material with wheat subgenome D;

- the biotechnological approach for evaluation of differentially expressed proteins of wheat grain using advanced 2DE-LC/MS and GF-LC/MS with improved identification by 20,4% has been developed;

- identification of differentially expressed proteins in 2DE-LC/MS analysis was improved by cleavage by three enzymes - chymotrypsin, trypsin, and then thermolysin, which improved the identification of proteins by 16.6%;

- the protein composition of grain of two modern varieties (Panna and Sotnytsia) was compared with the historical variety Ukrainka and the highest accumulation of allergenic/toxic proteins was established in traditional variety

Ukrainka and the variety Sotnytsia stood out as the most suitable germplasm donor for new food varieties.

The practical significance of the obtained results. The practical significance of the dissertation is to solve the problem of evaluation and selection of donors of wheat germplasm with genes of drought adaptability and nutritional quality of grain storage proteins.

The developed biotechnological approaches can be used for planning of genetic-selection schemes of crossing, genotyping, solution of issues of an origin (falsification) of varietal material. This allows us to intensify the creation of new specialized varieties of bread wheat.

The developed biotechnological approaches were implemented for characteristics of the most common and new varieties of bread wheat of the breeding of the Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine for polymorphism of transcription factor gene *TaWRKY2* and stomatal biogenesis genes *EPF1*, *EPF2* and *MUTE* and used for bread wheat lines selection, selection of desired genotypes and conducting breeding programs at the IPPG of NAS of Ukraine (Act of implementation №106/27, 28.01.2021).

The results of the research were introduced into the educational process of training specialists in the specialty 162 "Biotechnology and Bioengineering" (Implementation Act of 01.02.2021).

Grants were received for the presentation of the latest results at the international workshop (ReHOPE; Bulgaria; *TaWRKY2-D1* gene polymorphism) and conference (INPPO2016; Italy; study of grain proteomes of modern and traditional varieties).

Personal contribution of the applicant. The results of the work presented in the dissertation are obtained by the author personally or with her direct participation. Work planning and discussion of the results was carried out jointly with supervisors. The author personally performed bioinformation analysis of nucleotide and protein sequences from databases, isolation of total wheat DNA; identified biotechnological approaches to detect the polymorphism of target genes; primer systems construction,

selection of rational PCR conditions and performed PCRs for set of wheat samples; the measurement of relative gene expression was performed; wheat proteins were extracted, separated by electrophoresis and digested with enzymes; the results presented in the work were prepared. The author personally selected and critically analyzed a large amount of modern foreign and Ukrainian literature on the topic of the research.

On the topic of the dissertation published 13 scientific papers, including: 2 scientific articles, of which 1 article in the scientific professional publication of Ukraine, which is part of scientometric databases, 1 article in the periodical scientific professional publication of the state, which is part of the Organization for Economic Cooperation and Development and European Union (Switzerland), and assigned to the Quartile 1 (Q1) according to the classification SCImago Journal and Country Rank (equated to two publications, which are credited in accordance with the first paragraph of paragraph 11 of resolution of the Cabinet of Ministers of Ukraine from March 6, 2019 № 167); 1 patent of Ukraine for a utility model; 10 abstracts at national and international conferences.

Key words: wheat, drought tolerance, DNA markers, molecular markers, transcription factors, gluten.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових наукових виданнях України та інших країн

1. **Lakhneko O.R.**, Stepanenko A.I., Kuzminskiy Ye.V., Morgun B.V. Polymorphism of some transcription factor genes related to drought tolerance in wheat // *Biotechnologia Acta*. 2018. V. 11 (2). P. 47-56. ISSN: 2410-7751 (друкована версія), ISSN: 2410-776X (онлайн версія). DOI: 10.15407/biotech11.02.047. (Фахове видання з технічних наук. Входить до міжнародних наукометричних баз: CrossRef, DOAJ, Google Scholar, CAS, OAJI, JournalTOCs, GIGA Information Centre, InfoBase Index, Index Copernicus, SIS, ResearchBib, ASI, WorldCat, ProQuest, Cornell University Albert R. Mann Library, EBSCO, CABI, NEICON, EuroPub Citefactor, CABI e-LIBRARY. *(Особистий внесок дисертантки: проводила дослідження вибірок пшениці вибраними ДНК-маркерами та брала участь у написанні статті).*

2. **Lakhneko O.**, Danchenko M., Morgun B., Kováč A., Majerová P., Škultéty L. Comprehensive comparison of clinically relevant grain proteins in modern and traditional bread wheat cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Вип. 21, № 10. С. 3445. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms21103445. (Іноземне фахове видання 1-го квартилю (Швейцарія). Входить до міжнародних наукометричних баз: AGORA, CAB Abstracts, Chemical Abstracts, Web of Science, DOAJ - Directory of Open Access Journals, EMBASE, FSTA, Genamics JournalSeek, Global Health, HINARI, Journal Citation Reports/Science Edition, Julkaisuforum Publication Forum, MEDLINE, Norwegian Register for Scientific Journals, Series and Publishers, PMC - PubMed Central, Polymer Library, PubMed, Scopus, Zetoc) (прирівнюється до двох публікацій, які зараховуються відповідно до абзацу першого пункту 11 постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167); *(Особистий внесок дисертантки: проводила дослідження сортів пшениці та брала участь у написанні статті).*

Патенти

3. **Лахнеко О.Р.**, Степаненко А.І., Великожон Л.Г., Моргун Б.В., Кузьмінський Є.В. Спосіб генотипування пшениці м'якої за геном TaWRKY2-D1.; Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України патентовласник. Патент України на корисну модель UA 146186. 20.01.2021, Бюл.№ 3. *(Особистий внесок дисертантки: розробляла системи ДНК-маркерів, брала участь у підготовці патенту).*

Тези доповідей

4. Stepanenko A., Kishchenko O., Bi H., Shi J., Okada A., Arndell T., Mazonka I., Peterson A., Chen G., Zhou Y., Gajimuradova A., Zhagipar F., Serikbay D., Jataev S., Shavrukov Y., **Lakhneko O.**, Morgun B., Whitford R., Langridge P., Hrmova M., Lopato S., Borisjuk N. Natural variations and genetic interventions for improvement of wheat agricultural traits. Матеріали конференції 2020 Yangling International Agri-science Forum, 2020 жовт. 20. Yangling, China. 2020. с. 88 *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту)*

5. **Lakhneko O.R.**, Stepanenko A.I., Kuzminskiy Ye.V., Morgun B.V. Biotechnology for genotyping of drought related sequences of TaWRKY2-D1 in Triticum aestivum. Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», 2019 квіт. 19. Київ. 2019. с. 47. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

6. Stepanenko A.I., **Lakhneko O.R.**, Zborivska O.V., Stasik O.O., Morgun B.V., Borisjuk N.V. The key transcription factors of stomata development in bread wheat. Матеріали XIV конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин мікроорганізмів». 2019 жовт. 24-25. Київ. 2019. с. 74-75. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

7. **Лахнеко О.Р.**, Карпенко Ю.В., Степаненко А.І., Кузьмінський Є.В., Моргун Б.В. Біоінформатичне дослідження елементів послідовності WRKY2

пшениці м'якої. Матеріали XIV конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин мікроорганізмів». 2019 жовт. 24-25. Київ. 2019. с. 86-87. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

8. **Ляхнеко О.Р.**, Петровський А.П., Кузьмінський Є.В., Моргун Б.В. Біоінформаційний аналіз генетичної послідовності транскрипційного фактору TaWRKY2, пов'язаного з посухостійкістю пшениці. Матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття». 2018 квіт. 20. 2018. с. 89. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

9. **Lakhneko O.**, Stepanenko A., Borysyuk M., Stasik O., Kuzminskiy Ye., Morgun B. Sequence diversity of the gene coding for drought related transcription factor WRKY in selected Ukrainian wheat cultivars. Матеріали конференції The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018). 2018 лип. 03-06. Київ. 2018. с. 141. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

10. **Lakhneko O.**, Stepanenko A., Borysyuk M., Stasik O., Morgun B. Sequence Polymorphism of the gene coding for drought related wheat transcription factor WRKY2. Матеріали воркшопу Resurrection plants: Hope for crop drought tolerance (ReHOPE). 2018 вересн. 20-22. Пловдив, Болгарія. 2018. с. 45. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

11. **Lakhneko O.**, Morgun B., Skultety L., Danchenko M. Comparative proteomics of grain allergens from several wheat varieties. Матеріали конференції The 3rd INPPO World Congress 2018. 2018 верес. 9-12. Падова, Італія. 2018. с. 62. *(Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

12 **Ляхнеко О.Р.**, Моргун Б.В., Кузьмінський Є.В. Перспектива дослідження посухостійкості *Triticum aestivum* L. за допомогою ДНК-маркерних технологій. Матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної

конференції «Біотехнологія ХХІ століття». 2017 квіт. 21, Київ. 2017. с. 122.
(*Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез*)

13 **Лахнеко О.Р.**, Степаненко А.І., Моргун Б.В., Кузьмінський Є.В.
Застосування ДНК-маркерних технологій для виявлення генетичного поліморфізму пшениці в умовах недостатнього зволоження. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів «Наукове забезпечення інноваційного розвитку агропромислового комплексу в умовах змін клімату». 2017 трав. 25-26. Дніпро. 2017. с. 41-42. (*Особистий внесок дисертантки: приймала участь у проведенні експерименту та написанні тез*)