ГЕНОМНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА АНАЛІЗ РІЗНОМАНІТТЯ СЕЛЕКЦІЙНО ВАЖЛИВИХ ГЕНІВ *DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WRI1*, *FAD2*, *FAD3* ТА *FAE1* У *BRASSICA CARINATA*

БЛЮМ Р.Я. [1]*, ГОЦУЛЯК В.Я. [1], ДЕМИДОВ С.В. [2], САВЧУК О.М. [2], РАХМЕТОВ Д.Б. [3], ЄМЕЦЬ А.І. [1], БЛЮМ Я.Б. [1]

[1] Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2А

[2] Науково-навчальний центр «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 03189, Київ, вул. Академіка Глушкова, 2

[3] Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Україна, 01014, Київ, вул. Садово-Ботанічна, 1

Автор для кореспонденції – Р.Я. Блюм, e-mail: blume.rostislav@gmail.com

Абіссинська гірчиця, або каріната (Brassica carinata), на сьогодні розглядається як одна з найбільш перспективних альтернативних олійних культур, зокрема для виробництва рідких біопалив. Селекційні та генно-інженерні дослідження, спрямовані на покращення якості та підвищення виходу олії насіння карінати, набувають усе більшої актуальності з поширенням використання цієї олійної культури в сільському господарстві. Залучення загальнодоступних геномних ресурсів карінати дозволяє суттєво спростити процес покращення цієї перспективної культури, цілеспрямовано фокусуючись на локусах або генах, пов'язаних з біосинтезом ліпідів та жирних кислот. Виходячи з цього, у даному дослідженні було проведено геномний пошук та усебічний аналіз генів-регуляторів синтезу жирних кислот та нейтральних ліпідів (DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3, FAE1) алополіплоїдного виду B. carinata. Загалом було ідентифіковано 24 генів, оскільки кожен з ферментів був кодований декількома гомеологами. Ідентифіковані гени виявляли високий рівень подібності, однак різнилися за некодуючими послідовностями (інтрони та промоторні регіони), що дозволило ідентифікувати низку мікросателітних локусів, специфічних для кожної з родин генів. Отримані результати дозволяють у подальшому розробити високоточні молекулярні маркери для маркер-опосередкованої селекції, що може значною мірою прискорити створення сортів B. carinata із покращеними характеристиками якості олії та її збільшеним вмістом у насінні.

Ключові слова: *Brassica carinata, гени синтезу жирних кислот, гени синтезу тритацилгліцеридів, повногеномне дослідження, SSR, селекція.*

Вступ. Суттєве збільшення обсягів викиду парникових газів (GHG), котре супроводжується поступовим вичерпанням джерел викопних палив, на сьогодні вважається одним з найбільш значущих викликів сучасного промислового розвитку. Наразі по усьому світу вживається ряд заходів, спрямованих на досягнення кліматичної нейтральності, зокрема в рамках програми Green Deal у ЄС, імплементація якої здійснюється з горизонтом планування до 2050 року (Ottomano Palmisano et. al., 2025). Враховуючи зазначені глобальні виклики, біопалива набувають усе більшого дослідницького та промислового інтересу як один з потужних інструментів досягнення кліматичної нейтральності наземного, авіа- та морського транспорту. Зокрема, значну перспективність мають рідкі біопалива, отримані на основі рослинних олій, такі, як біодизель, авіаційне біопаливо для реактивних двигунів, тощо.

На сьогодні більше третини рослинних олій використовуються в промислових цілях (технічне застосування), а близько 10–20 % рослинних олій використовується для виробництва олеохімікатів та біопалив (Carlsson, 2009, Murphy, 2024). У той же час понад 90 % загального виробництва рослинних жирів припадає на «велику четвірку» основних культур, до яких відносять олійну пальму (*Elaeis guineensis*), сою (*Glycine max*), ріпак (*Brassica napus*) та соняшник (*Helianthus annuus*) (Murphy, 2024). Наразі найбільш поширеними олійними культурами в Європі та Північній Америці є соняшник, ріпак, соя та льон (*Linum usitatissimum*) (Chandrawati et al., 2017; Blume et al., 2022). Соняшник, а також озима та яра форми ріпаку, є найбільш поширеними у Центральній Європі та займають близько 90 % площ посівів усіх олійних рослин (Zanetti et al., 2021), а Україна є одним з найбільших світових виробників соняшнику (Blume, 2022). При цьому вирощування олійних культур зай-

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2025

має значну частку земельних угідь, відведених під вирощування харчових культур (Murphy, 2024). Саме через це пошук нових більш продуктивних олійних культур, здатних рости у несприятливих умовах, стає усе більш актуальним напрямком досліджень.

Представники роду *Brassica* привернули значну увагу завдяки їхній високій продуктивності та здатності витримувати низькі температури, що є достатньо важливим для країн Європи та Північної Америки (Warwick, 2011). Останнім часом найбільшу увагу дослідників привернули такі олійні культури з родини Хрестоцвіті (*Cruciferae*), як рижій посівний (*Camelina sativa*), талабан (*Thlaspi arvense*) та каріната, або абіссинська (кільоподібна) гірчиця (*Brassica carinata*), – перспективні джерела отримання біодизелю та авіаційного біопалива (Gesch et al., 2015; Chu et al., 2017; Tao et al., 2017; Niphadkar et al., 2017; Niculescu et al., 2019; Blume et al., 2022). Каріната значною мірою позбавлена проблем зі зниженою врожайністю, яка зазвичай притаманна багатьом новим олійним культурам, оскільки *B. carinata* у минулому обмежено культивувалася в різних країнах (Seepaul et al., 2021).

Генетична спорідненість карінати до основних сільськогосподарських олійних рослин також суттєво спрощує селекційну роботу з цією культурою. Більше того, протягом останніх років в рамках співпраці ІХБГ НАН України та НБС ім. М.М. Гришка НАН України було створено унікальний генофонд селекційних ліній та сортозразків даної олійної культури, що відкриває перспективи для подальшого її поширення та впровадження в Україні. Варто зазначити, що раніше каріната в Україні не вирощувалась (Blume et al., 2023).

Нещодавно опубліковані результати повного секвенування геному алотетраплоїдного (амфідоплоїдного) виду *B. carinata* (BBCC), котрий виник у результаті міжвидової гібридизації *Brassica nigra* (BB) та *Brassica oleracea* (AA) (Yim et al., 2022; Niu et al., 2024). Доступ до даних повногеномного секвенування поліплоїдного геному карінати відкриває широкий спектр можливостей для покращення даної олійної культури. Одним з важливих напрямків селекції та генетичної інженерії є підвищення кількості накопичуваних триацилгліцеридів (ТАГ) у насінні, а також покращення якості такої олії шляхом зміни її жирнокислотного складу. Оскільки переважну більшість ліпідів у витискуваній рослинній олії складають саме ТАГ (близько 98 % (г/г)) (Qian et al., 2020, Gharby, 2022), саме вивчення шляхів їх синтезу та генів, котрі регулюють синтез жирних кислот та ТАГ, є першочерговою задачею при підборі мішеней у геномі *B. carinata* для використання у генетичній інженерії або маркер-опосередкованій селекції.

Ключовими генами, котрі регулюють накопичення олії в насінні, є *LPAT2*, *DGAT1*, *DGAT2*, *WRI1*, *FAD2*, *FAD3*, *FAE1*, що обґрунтовується їх визначальною роллю у біосинтезі ліпідів (рис. 1). Зокрема, гени *DGAT1* та *DGAT2* кодують діацилгліцерол-ацилтрансферази, що каталізують останній етап синтезу ТАГ, переносячи ацильну групу на діацилгліцерол. *LPAT2* (лізофосфатид-ацилтрансфераза) бере участь у формуванні фосфоліпідів і є ключовим ферментом у метаболізмі гліцероліпідів (Lager et al., 2020). *WRI1* (*WRINKLED1*) є транскрипційним фактором, що регулює експресію генів, пов'язаних із біосинтезом жирних кислот та накопиченням олії, в тому числі й у насінні. *FAD2* та *FAD3* кодують десатурази, які модифікують ненасичені жирні кислоти, конвертуючи олеїнову кислоту у лінолеву (*FAD2*) та ліноленову (*FAD3*), що напряму впливає як на складність і стабільність мембранних ліпідів, так і на жирнокислотний склад депонованих у насінні ліпідів. *FAE1* (β-кетоацил-CoA-синтаза) бере участь у елонгації ланцюгів жирних кислот, що є критичним для біосинтезу довголанцюгових жирних кислот (наприклад, ерукової) (Lager et al., 2020).

В ряді попередніх досліджень Хрестоцвітих було показано, що *DGAT*, *LPAT*, *WRI*, *FAD*, *FAE* можуть бути успішно використані як генимішені для регулювання біосинтезу ліпідів (Taylor et al., 2010, Iskandarov et al., 2013; An and Suh, 2015; Aznar-Moreno and Durrett, 2017; Jiang et al., 2017, Morineau et al., 2017; Ozseyhan et al., 2018; Lee et al., 2021; Yin et al., 2022; Ghidoli et al., 2023). Більше того, у попередніх дослідженнях нами повідомлялось про успішну ідентифікацію генів *FAD* та *FAE* у алогексаплоїдного *C. sativa*, котрі є доведеними

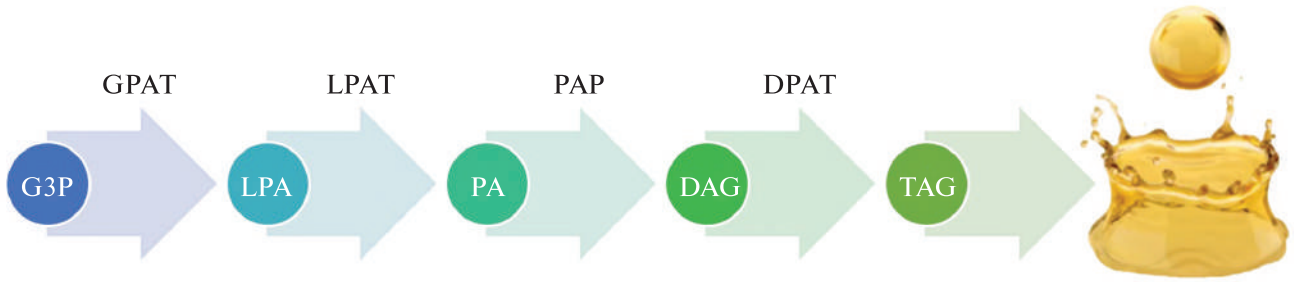

Рис. 1. Роль ацитрансферазних ферментів у біосинтезі ліпідів. Речовини (у кружечках): G3P – гліцерол-3-фосфат; LPA – лізофосфатидна кислота; PA – фосфатидна кислота; DAG – диацилгліцерол; TAG – триацилгліцерол. Ферменти (зверху): GPAT – G3P-ацилтрансфераза; LPAT – лізофосфатид-ацилтрансфераза; PAP – фосфатидат фосфатаза; DGAT – DAG ацилтрансфераза

мішенями для генетичної інженерії, мутагенезу та класичної селекції (Blume et al., 2024). Саме тому метою даної роботи був геномний пошук та аналіз генів-регуляторів біосинтезу ліпідів алополіплоїдного виду *B. carinata* (*DGAT*, *LPAT*, *WRI*, *FAD*, *FAE*), виявлення особливостей їх геномної організації, філогенетичний аналіз їх білкових продуктів та аналіз синтенії цих генів у геномі *B. carinata*, а також пошук мікросателітних послідовностей в інтронах та промоторних ділянках зазначених генів, котрі можуть бути використані для розробки ILP- та/або SSR-маркерів.

Матеріали та методи. *Пошук та ідентифікація генів.* Для повногеномного пошуку була використана остання збірка геному *B. carinata* – GCA_016771965.1 (Yim et al., 2022). Зазначений геном було анотовано *ab initio* за допомогою програмного забезпечення AUGUSTUS (Hoff and Stanke, 2013). Пошук здійснювали за допомогою алгоритму BLAST, як референтні використовували послідовності генів арабідопсису (*Arabidopsis thaliana*) (табл. 1), отримані з бази даних KEGG Genome (https://www.genome.jp/kegg/genome/). Гени *WRI1*, *FAD2*, *FAD3* та *FAE1* ідентифікували за допомогою бібліотеки pyHMMER (https://pyhmmer.readthedocs.io/en/stable/) шляхом пошуку в масиві послідовностей трансльованих пептидів таких амінокислотних послідовностей, які б містили HHM-профілі (з бази даних Pfam), характерні для окремої групи генів (табл. 1) (Mistry et al., 2021; Larralde and Zeller, 2023).

Дані про екзон-інтронну структуру генів отримували, спираючись на AUGUSTUS-анотацію з урахуванням корекцій, зроблених шляхом WebScipio-анотації генів (https://www.webscipio.org/search) (Hatje et al., 2011) в геномі *B. carinata*. Додатково структура генів була верифікована за допомогою Gene Structure Display Server (http://gsds.cbi.pku.edu.cn) (Hu, 2015). SSR-послідовності було ідентифіковано за допомогою онлайн-ресурсу MISA-web (Thiel et al., 2003; Beier et al., 2017).

Номенклатура генів спиралась на систему, запропоновану раніше для представників роду *Brassica* (Østergaard and King, 2008). При такому найменуванні генів після видової назви вказується тип підгеному (A, B або C), а назва родини генів відділяється крапкою (наприклад, *BcarB.DGAT1-1* походить з B-підгеному). Копійність гена певної родини в тому чи іншому підгеномі позначається через риску (–1, –2, тощо).

Реконструкція філогенії генів тубуліну. Для філогенетичного аналізу були використані транс-

Таблиця 1. **HHM-профілі з бази даних Pfam, характерні для аналізованих білків, та ортологи у геномі *A. thaliana***

Білок	Характерний консервативний домен у базі Pfam	Ортолог у геномі *A. thaliana*
DGAT1	–	AT2G19450
DGAT2	–	AT3G51520
LPAT2	–	AT3G57650
WRI1	PF00847	AT3G54320
FAD2	PF00487	AT3G12120
FAD3	PF00487	AT2G29980
FAE1	PF08392	AT4G34520

льовані амінокислотні послідовності ідентифікованих генів *DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WRI1*, *FAD2*, *FAD3* та *FAE1*. Також, при реконструкції філогенії було використано послідовності гомологічних генів інших видів Хрестоцвітих, зокрема: *A. thaliana* (скорочення – At), *A. lyrata* (Al), *B. napus* (Bna), *B. oleracea* (Boe, Bol), *B. rapa* (Bra), *Capsella rubella* (Crb, Crub), *Camelina sativa* (Csat), *Eutrema salsugineum* (Eutsa), та *Raphanus sativus* (Rsat). Послідовності *DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WRI1*, *FAD2*, *FAD3* та *FAE1* зазначених видів було отримані з бази даних KEGG Genome, а послідовності *FAD2*, *FAD3* та *FAE1* у *C. sativa* були ідентифіковані нами раніше (Blume et al., 2024).

Трансльовані амінокислотні послідовності були вирівняні за допомогою алгоритму MUSCLE (Edgar, 2004). У подальшому вирівняні послідовності були відредаговані з метою видалення переривчастих ділянок (гепів) та надмірно гетерогенних ділянок, котрі негативно впливають на точність реконструкції філогенії. Філогенетичні дерева були побудовані з використанням веб-версії програмного забезпечення IQ-TREE (http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/) (Nguyen et al., 2015; Trifinopoulos et al., 2016) за допомогою методу максимальної правдоподібності (ML – Maximum Likelihood) з підбором оптимальної моделі замін за допомогою ModelFinder та з бустреп-підтримкою в 1000 ітерацій, обрахованою за допомогою UFBoot (Kalyaanamoorthy et al., 2017; Hoang et al., 2018). Для набору трансльованих амінокислотних послідовностей DGAT1, DGAT2, FAD2, та FAD3 – JTT+G4 найоптимальнішою моделлю була визначена JTT+G4, для LPAT2 – JTT+I, для WRI1 – JTTDCMut+G4, а для FAE1 – JTTDCMut+I. Отримані філогенетичні дерева були візуалізовані за допомогою програмного забезпечення iTOL v7 (https://itol.embl.de/) (Letunic and Bork, 2024).

Повногеномне порівняння та аналіз синтенії. З метою аналізу еволюційного походження ідентифікованих генів та виявлення внутрішньогеномних дуплікацій нами також було проведено повногеномне порівняння генів аналізованих видів за допомогою алгоритму синтенії MCScanX, інтегрованого у програму TBtools v2.045 (Chen et al., 2023). Для повногеномного аналізу використовували кодуючі послідовності генів *B. carinata*. Даний аналіз базувався на тотальному порівнянні нуклеотидних послідовностей усіх транскриптів *B. carinata* за допомогою алгоритму BLAST з такими параметрами: граничне значення E – $1e^{-5}$, кількість влучань та кількість найкращих вирівнювань – 5. Результати даного аналізу дозволили виявити пари гомологічних генів з найвищим рівнем подібності нуклеотидних послідовностей, які в рамках одного геному є, найвірогідніше, паралогами. Спираючись на .gtf-файл, котрий було створено в ході AUGUSTUS-анотації, нами було отримано дані про геномні координати локусів кожного з анотованих генів та локалізовано генні пари на хромосомах. Результати аналізу були візуалізовані у вигляді хордової діаграми (Circos plot) за допомогою TBtools v2.045 (Chen et al., 2023).

Результати. *Ідентифікація генів DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3 та FAE1.* За результатами повногеномного пошуку було ідентифіковано 24 гени основних ферментів, залучених у біосинтез ліпідів (DGAT1, DGAT2, LPAT2, WRI1, FAD2, FAD3 та FAE1) у амфідиплоїдному (алотетраплоїдному) геномі *B. carinata* (табл. 2). У підгеномі B виявлено дві онологічні копії (*BcarB.DGAT1-1*, *BcarB.DGAT1-2*), розташовані на хромосомах B3 та B4. У підгеномі C знайдено одну копію (*BcarC.DGAT1*) на хромосомі C9. Довжина білкових продуктів варіює в діапазоні від 494 до 656 амінокислот. Слід зауважити, що кожен з підгеномів *B. carinata* був успадкований від різних видів, котрі на ранніх етапах своєї еволюції зазнавали триплікації геномів, саме тому копії генів в межах підгеному слід вважати онологічними (такими, що походь під подій автополіплоїдії). Гени, локалізовані у різних підгеномах, співвідносяться за типом гомеології, тобто є гомологічними генами, що походять в результаті алополіплоїдизації (гібридизації видів-предків *B. carinata*).

По дві копії DGAT2 були виявлено у кожному підгеномі: *BcarB.DGAT2-1*, *BcarB.DGAT2-2* (B2, B5) та *BcarC.DGAT2-1*, *BcarC.DGAT2-2* (C1, C7). Розміри білкових продуктів цих генів варіюють від 318 до 455 амінокислот. Виявлено одну копію WRI1 у підгеномі B (*BcarB.WRI1*) на хромосомі B8. У підгеномі C знайдено дві

копії генів даного транскрипційного фактора (*BcarC.WRI1-1*, *BcarC.WRI1-2*) – на хромосомах C6 та C8 відповідно. Довжина білкових продуктів варіювала в межах 407 і 427 амінокислотних залишків. В свою чергу, було також ідентифіковано по дві копії LPAT2 у кожному з підгеномів: *BcarB.LPAT2-1*, *BcarB.LPAT2-2* (B6, B8) у B підгеномі та *BcarC.LPAT2-1*, *BcarC.LPAT2-2* (C6, C8) у C підгеномі відповідно. Розмір трансльованих білків LPAT2 варіював в межах 390–402 а.з.

Гени ферментів десатурації жирних кислот вирізнялися збереженням високої копійності у геномі *B. carinata*. Зокрема, було ідентифіковано дві копії генів FAD2 (*BcarB.FAD2-1*, *BcarB.FAD2-2*), розташованих на хромосомах B1 та B7, а також дві копії (*BcarC.FAD2-1*, *BcarC.FAD2-2*), які знаходяться на хромосомах C1 та C5 відповідно. Довжина білкових продуктів цих генів варіювала від 383 до 506 а.з. Подібна картина спостерігалась і у випадку генів ферменту FAD3. У підгеномі B виявлено дві копії (*BcarB.FAD3-1*, *BcarB.FAD3-2*), локалізовані на хромосомах B1 та B6. У підгеномі C знайдено дві копії (*BcarC.FAD3-1*, *BcarC.FAD3-2*), розташовані на хромосомі C4 на значній відстані (що свідчить на користь їх незалежного походження, виключаючи тандемну дуплікацію). Розміри білкових продуктів коливалися від 377 до 453 а.з.

У випадку елонгази жирних кислот FAE1 спостерігалася протилежна картина – набір генів був значною мірою редукованим. У підгеномі B виявлено одну копію *(BcarB.FAE1*) на

Таблиця 2. **Ідентифіковані гени у геномі *B. carinata***

Назва гена	Внутрішній ID	Геномні координати гена (Хромосома : локалізація у п.н.)	Ланцюг та напрям гена	Довжина білкового продукту гена, а.з.
BcarB.DGAT1-1	g59780	B3:57,112,730..57,118,104	+	656
BcarB.DGAT1-2	g63629	B4:13,900,264..13,903,217	–	494
BcarC.DGAT1	g304132	C9:9,782,044..9,784,990	+	501
BcarB.DGAT2-1	g39317	B2:64,384,512..64,387,120	–	431
BcarB.DGAT2-2	g82169	B5:11,843,245..11,845,004	–	318
BcarC.DGAT2-1	g169826	C1:20,237,810..20,239,513	–	319
BcarC.DGAT2-2	g283919	C7:46,220,569..46,223,082	+	455
BcarB.WRI1	g162929	B8:63,772,222..63,775,970	+	427
BcarC.WRI1-1	g263377	C6:24,345,102..24,349,685	+	407
BcarC.WRI1-1	g298040	C8:35,939,407..35,943,010	+	410
BcarB.LPAT2-1	g121063	B6:56,508,758..56,511,979	–	402
BcarB.LPAT2-2	g163383	B8:65,557,528..65,560,489	+	390
BcarC.LPAT2-1	g263967	C6:26,436,808..26,439,557	+	391
BcarC.LPAT2-2	g298675	C8:38,335,930..38,338,802	+	390
BcarB.FAD2-1	g17133	B1:51,277,243..51,278,397	+	384
BcarB.FAD2-2	g141790	B7:54,990,401..54,993,204	+	506
BcarC.FAD2-1	g178280	C1:47,003,144..47,004,298	+	384
BcarC.FAD2-2	g254497	C5:50,980,901..50,982,055	+	383
BcarB.FAD3-1	g1939	B1:7,918,277..7,921,628	+	377
BcarB.FAD3-2	g104529	B6:12,283,903..12,289,313	–	453
BcarC.FAD3-1	g223812	C4:14,888,670..14,893,441	+	383
BcarC.FAD3-2	g236378	C4:55,480,423..55,483,954	–	380
BcarB.FAE1	g43587	B3:9,400,100..9,401,620	+	506
BcarC.FAE1	–*	C3:68,067,201..68,073,591	–	506

Примітка. *Bca101_007547 (ген); KAL0791301.1 (білок).

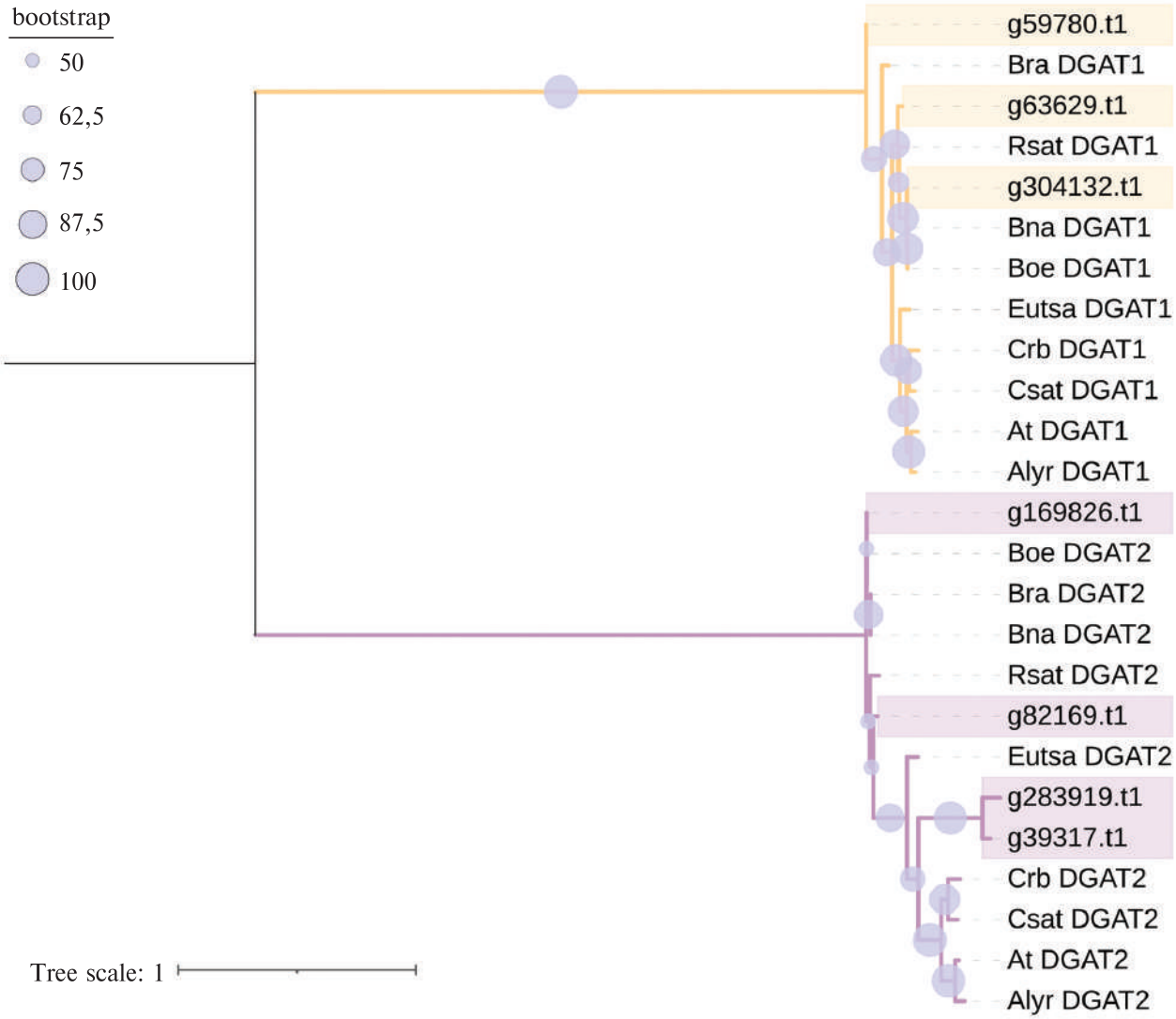

Рис. 2. Реконструкція філогенії ідентифікованих амінокислотних послідовностей генів DGAT1 та DGAT2 *B. carinata* та інших Хрестоцвітих

хромосомі B3. У підгеномі C було знайдено також лише одну копію (*BcarC.FAE1*), розташовану на хромосомі C3. Довжина білкових продуктів обох копій становить 506 амінокислот. Загалом білкові продукти виявлених генів мають розмір у межах від 318 до 656 амінокислотних залишків, залежно від гена, підгеному та копії окремого гена. Найбільша варіабельність розміру білків спостерігається серед копій генів DGAT1, DGAT2, та FAD3.

Реконструкція філогенії та синтенії ідентифікованих генів. З використанням амінокислотних послідовностей трансльованих білків з кодуючої частини ідентифікованих генів DGAT1 та DGAT2 було реконструйовано філогенетичне дерево, яке відображає еволюційні взаємозв'язки генів, включаючи ідентифіковані гени у *B. carinata* (g169826, g304132, g63629, g59780, g82169, g39317, g283919) (рис. 2). За результатами філогенетичного аналізу було встановлено, що білки DGAT1 і DGAT2 утворюють окремі філогенетичні кластери, чим підтверджується їхня функціональна та еволюційна дивергенція. Група DGAT1 включає білки *A. thaliana (AtDGAT1)*, *Arabidopsis lyrata (AlyrDGAT1)*, *Camelina sativa (CsatDGAT1)*, *Capsella rubella*

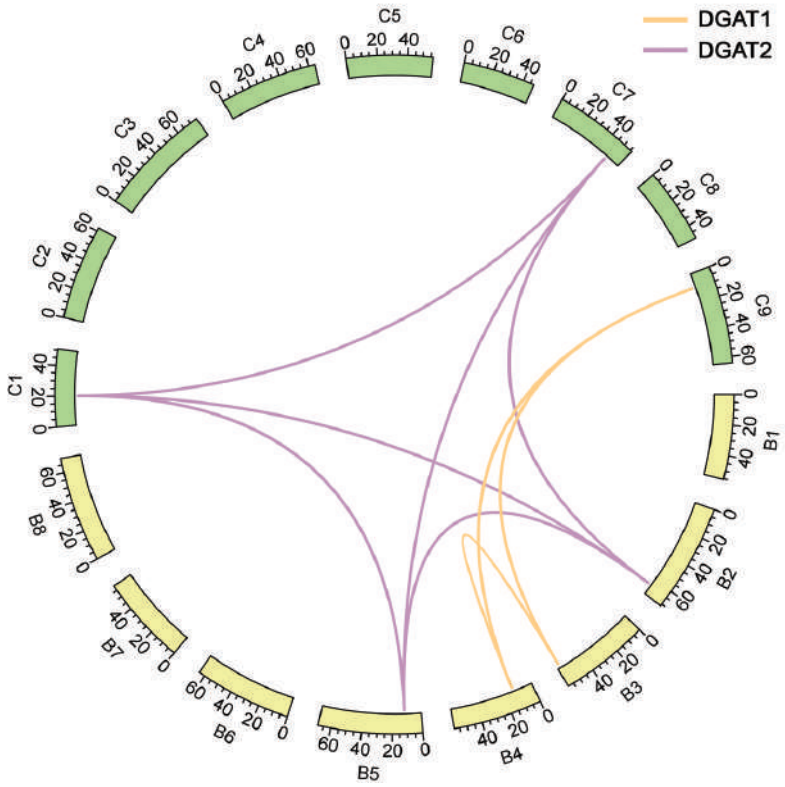

Рис. 3. Аналіз синтенії ідентифікованих генів *DGAT1* та *DGAT2* у геномі *B. carinata*

(CrbDGAT1), *Eutrema salsugineum (EutsaDGAT1)*, а також білки представників роду *Brassica*. Група DGAT2 включає білки *A. thaliana (AtDGAT2)* та *A. lyrata (AlyrDGAT2),* які утворюють більш віддалений кластер. Білки *C. sativa (CsatDGAT2)* та *C. rubella (CrbDGAT2)* знаходяться у близькому спорідненні, з високою бутстреп підтримкою у 93 %. Представники роду *Brassica* (Bna, Bra, Boe) демонструють вищий рівень подібності до білків *B. carinata*.

BcarC.DGAT2-1 (g169826) має високий рівень подібності до білків *B. napus* (BnaDGAT2) та *B. rapa* (BraDGAT2), що свідчить про їх спільне еволюційне походження. Аналогічно, BcarC.DGAT1 (g304132) утворює спільний кластер разом із *BoeDGAT1* та *BnaDGAT1*, що вказує на значну консервативність цих білків у представників *Brassica* (рис. 2). Білки BcarB. DGAT1-2 (g63629) і BcarB.DGAT1-1 (g59780) знаходяться у тому ж підкластері, що й білок *B. rapa* (BraDGAT1), що свідчить про їхню високу подібність, хоча білки B-підгеному *B. carinata* не мають прямого еволюційного походження від A-геному *B. rapa*. Також на представленому філогенетичному дереві BcarB. DGAT2-2 (g82169) розташований ближче до RsatDGAT2, що може вказувати на певні відмінності у послідовності даного білка *B. carinata* в порівнянні з іншими представниками роду *Brassica*. BcarB.DGAT2-1 (g39317) та BcarC.DGAT2-2 (g283919) утворюють окрему філогенетичну підгрупу, демонструючи значну диференціацію їх послідовностей (рис. 2). Загалом, білкові продукти ідентифікованих генів *B. carinata* мають високий рівень подібності з такими у *B. napus*, *B. rapa* та *B. oleracea*. DGAT1 та DGAT2 мають окремі еволюційні траєкторії, що підтверджує функціональну дивергенцію їхніх ролей у біосинтезі ТАГ.

Надалі нами було проведено аналіз внутрішньогеномної синтенії ідентифікованих генів *DGAT1* та *DGAT2 B. carinata* (рис. 3). Встановлено, що ідентифіковані гени локалізуються на різних хромосомах, зокрема копії DGAT1 на хромосомах B3, B4, C9, а копії DGAT2 – на B2, B5, C1, C6, C7. Подібне розташування може вказувати на те, що збільшення копійності генів родин DGAT1 та DGAT2

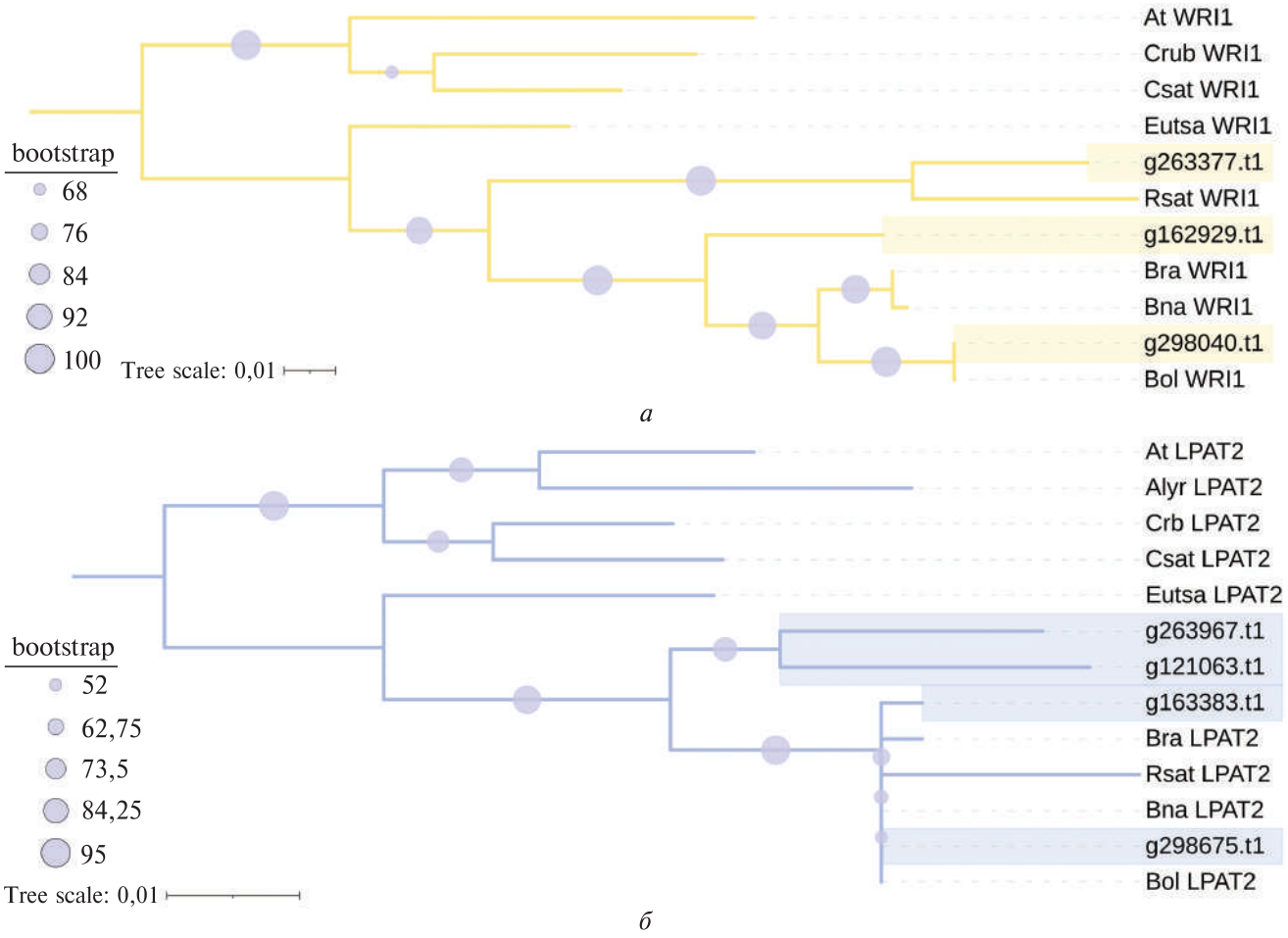

Рис. 4. Реконструкція філогенії ідентифікованих амінокислотних послідовностей генів WRI1 (*а*) та LPAT2 (*б*) *B. carinata* та інших Хрестоцвітих

у геномі *B. carinata* пов'язане в першу чергу саме зі змінами плоїдності (алополіплоїдія при видоутворенні *B. carinata* та триплікація геномів кожного з предкових видів). Синтенні (синтелогічні, тобто підтверджено гомологічні гени за даними синтенії) зв'язки були встановлені між усіма копіями генів в межах підродин DGAT1 та DGAT2. Подібна картина може вказувати на значну еволюційну стабільність геномних блоків (окремих ділянок геному), в яких містяться досліджувані гени. Більша кількість збережених генів DGAT2 може свідчити про важливість представників цієї підродини ферментів у регуляції біосинтезу ТАГ, або більшу міру специфікації (субфункціоналізації) збережених копій DGAT2.

Також було реконструйовано філогенетичні співвідношення амінокислотних послідовностей ідентифікованих генів WRI1 *Brassica carinata* (g263377, g162929, g298040) (рис. 4, *а*). Було встановлено, що BcarC.WRI1-1 (g263377) знаходиться у кластері разом з *RsatWRI1*, утворюючи окрему підгрупу зі 100%-вою бутстреп-підтримкою. Також було показано, що білок BcarB.WRI1 (g162929) розташований у спільній кладі з білками *B. napus (BnaWRI1)* і *B. rapa (BraWRI1),* що вказує на високу спорідненість їхніх послідовностей. В той же час, BcarC. WRI1-1 (g298040) виявляє високу подібність до білка *B. oleracea (BolWRI1)*.

Реконструйоване філогенетичне дерево вказує на високий рівень консервативності WRI1 серед представників *Brassica*, а група білків *Brassica* (Bna, Bra, Bol) демонструє значний рівень подібності з гомологічними білками *B. carinata*, що свідчить про близьке спільне по-

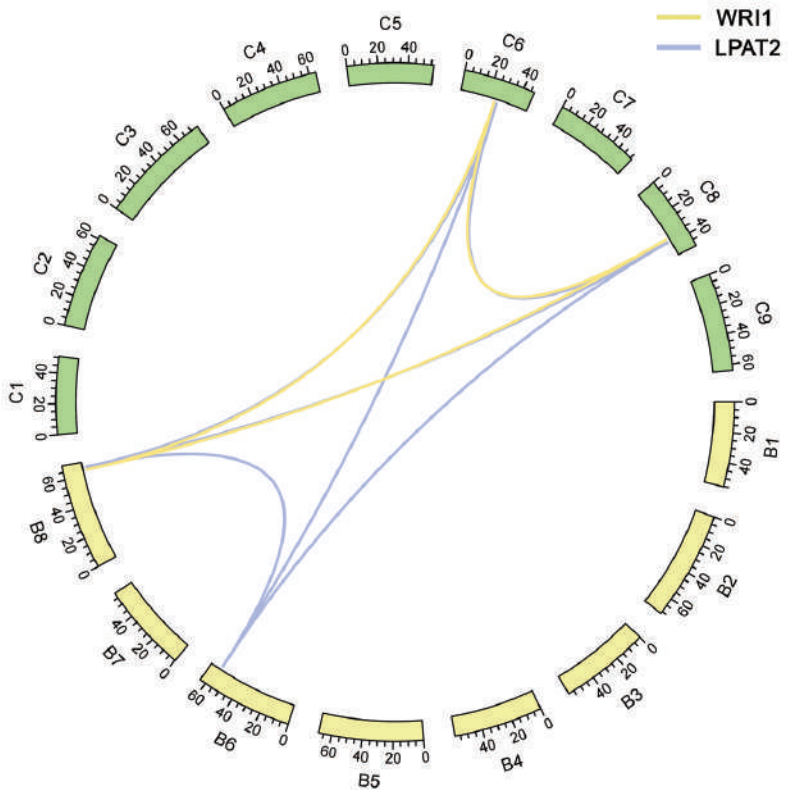

Рис. 5. Аналіз синтенії ідентифікованих генів *WRI1* та *LPAT2* у геномі *B. carinata*

ходження їхніх генів. У той же час білки *A. thaliana (AtWRI1)*, *C. sativa (CsatWRI1)* і *C. rubella (CrubWRI1)* виділяються в окрему кладу, що підтверджує їхнє більш віддалене еволюційне походження. При цьому, копія BcarC.WRI1-1 (g263377) демонструє більшу еволюційну диференціацію, оскільки вона поділяє спільно гілку з RsatWRI1, що може вказувати на значну дивергенцію гену цього білка.

Аналогічним чином було проведено реконструкцію філогенетичних співвідношень білків ідентифікованих генів LPAT2 у геномі *B. carinata* (позначені як g121063, g163383, і g263967) та інших Хрестоцвітих (рис. 4, *б*). З топології отриманого дерева видно, що білки BcarB.LPAT2-1 (g121063), BcarB.LPAT2-2 (g163383), і BcarC.LPAT2-1 (g263967) утворюють кілька близьких кластерів із високим рівнем спорідненості. Зокрема BcarB.LPAT2-1 (g121063) та BcarC.LPAT2-1 (g263967) були виокремлені в спільну кладу, котра демонструє високий рівень бутстреп-підтримки (82 %), що вказує на високий рівень подібності амінокислотної послідовності зазнаних білків. В свою чергу білок BcarB.LPAT2-2 (g163383) був виокремлений у спільну групу з LPAT2 інших видів *Brassica*. Білок BcarC.LPAT2-2 (g298675**)** виявився найбільш подібним до BnaLPAT2 (*B. napus*) і BolLPAT2 (*B. oleracea*). Загалом, аналіз отриманого філогенетичного дерева свідчить про чітку диференціацію білків LPAT2 представників родів *Brassica*, *Arabidopsis*, *Capsella*, тощо. В усіх випадках білки LPAT2 *B. carinata* були виокремлені у спільну велику кладу разом з гомологічними білками інших видів *Brassica*.

Надалі нами було проведено аналіз внутрішньогеномної синтенії ідентифікованих генів *WRI1* та *LPAT2 B. carinata* (рис. 5). Показано, що ідентифіковані гени локалізуються на різних хромосомах, зокрема гени *WRI1* на хромосомах B6, B8, C1, C6, C8; а гени *LPAT2* – на B6, C6, C8. Спостерігається чітка відповідність між копіями генів *WRI1* та *LPAT2* у підгеномах B і C. Варто зазначити, що у геномі збереглося лише 3 копії генів *WRI1*, в той час як *LPAT2* представлений 4-ма копіями. Причиною цього може бути саме функціональна роль *WRI1* як транскрипційного фак-

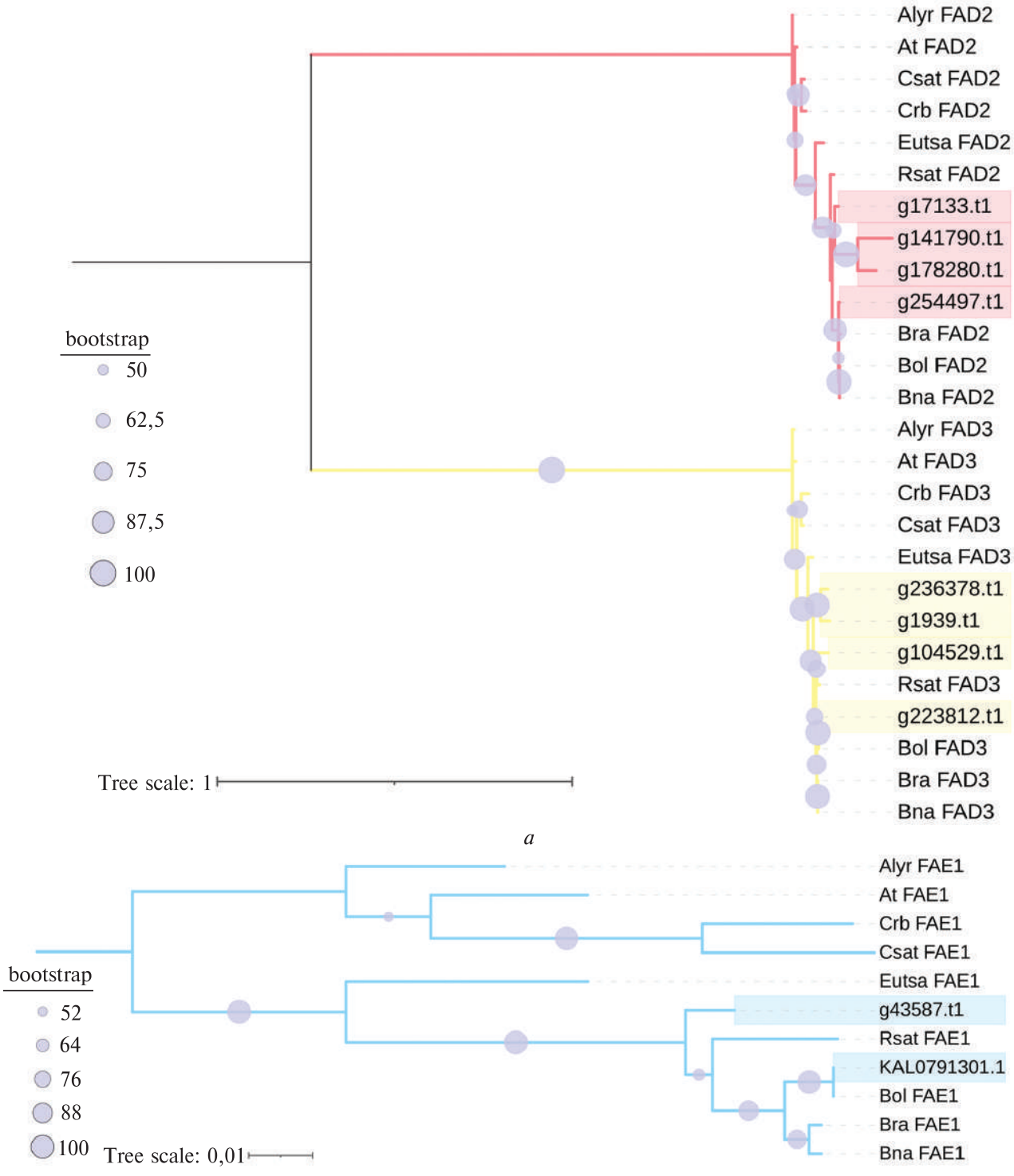

Рис. 6. Реконструкція філогенії ідентифікованих амінокислотних послідовностей генів FAD2, FAD3 (*а*) та FAE1 (*б*) *B. carinata* та інших Хрестоцвітих

тора, збільшення копійності якого може не надавати еволюційних переваг поліплоїдному організму. Цікавим також є те, що гени *WRI1* та *LPAT2* знаходяться в дуже близьких локусах

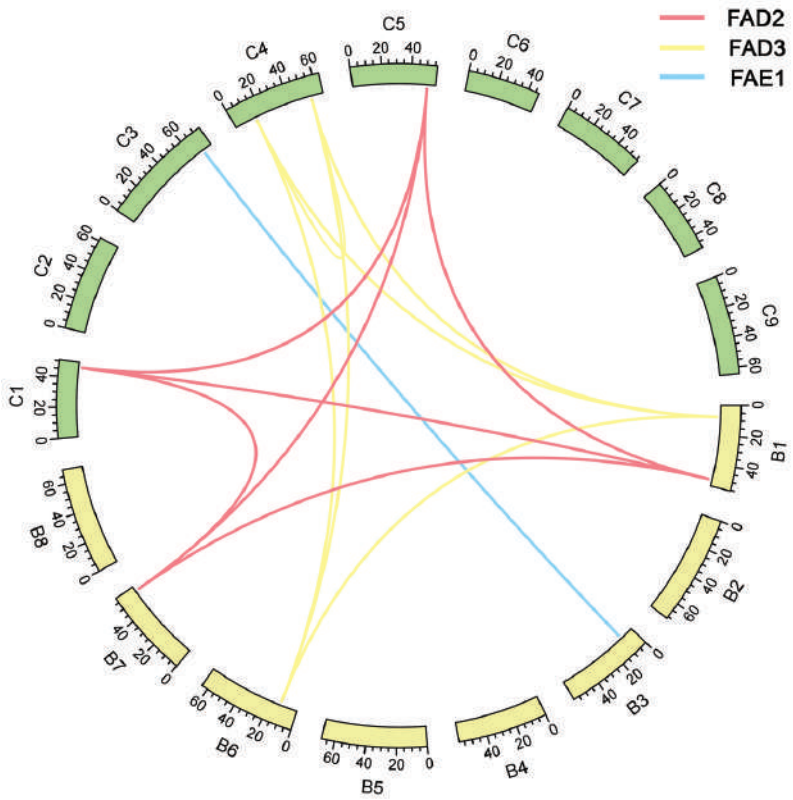

Рис. 7. Аналіз синтенії ідентифікованих генів *FAD2*, *FAD3* та *FAE1* у геномі *B. carinata*

(близько 2 млн. п.н.), що може бути пов'язане із взаємною регуляцією цих генів через їх спільну залученість у біосинтез ліпідів. Дану особливість локалізації генів слід враховувати при створенні молекулярних маркерів на основі їх послідовностей, оскільки шанс зчепленого успадкування цих генів може бути дещо вищим.

Для десатураз жирних кислот також було здійснено реконструкцію філогенетичних зв'язків з використання амінокислотних послідовностей білків генів FAD2 та FAD3, ідентифікованих у геномі *B. carinata,* а також послідовності їх гомологів у інших видів Хрестоцвітих (рис. 6, *а*). З отриманого дерева видно, що BcarB.FAD2-1 (g17133) утворює спільну кладу разом з BcarC.FAD2-1 (g178280), а також з BnaFAD2 та BolFAD2, що свідчить про подібність їх послідовностей, а також, вірогідно, і спеціалізованої функції. BcarB.FAD2-2 (g141790) демонструє більшу еволюційну відстань, що може вказувати на більший рівень дивергенції цього білка. В той же час BcarC. FAD2-2 (g254497) розташований на спільній гілці нижчого порядку з білком *B. rapa* (BraFAD2), що підтверджує їх високу подібність.

Група білків FAD3, в свою чергу, є більш гетерогенною. Білки BcarB.FAD3-1 (g1939), BcarB.FAD3-2 (g104529) і BcarC.FAD3-2 (g236378) формують кластер із RsatFAD3, що свідчить про їхню можливу еволюційну диференціацію відносно інших гомеологів/онологів. Однак, білок BcarC.FAD3-1 (g223812) утворює кластер із BolFAD3, що вказує на його вищу консервативність, через що він зберіг більшу подібність до гомологічних білків інших представників роду *Brassica*.

Результати реконструкції філогенетичного дерева для білків елонгаз жирних кислот (FAE1) Хрестоцвітих (рис. 6, *б*) свідчать про те, що BcarB.FAE1 (g43587) утворює кластер разом із RsatFAE1. Це також вказує на можливі еволюційні чи адаптивні відмінності цього гена у *B. carinata*. BcarC.FAE1 (KAL0791301.1) поділяє спільну кладу з BolFAE1, що вказує на його вищу консервативність та подібність до гомологічних білків представників роду *Brassica*. Ідентифіковані відмінності можуть вказу-

вати на специфічні функціональні особливості FAE1 у *B. carinata*, що заслуговує на подальший аналіз у майбутньому.

Для генів десатураз та елонгаз жирних кислот також було проведено аналіз синтенії (рис. 7). Ідентифіковані гени локалізуються на різних хромосомах, зокрема гени *FAD2*, локалізовані на хромосомах B1, B7, C1 та C5, пари гени *FAD3* знайдено на хромосомах B1, B6, C4, C6, а гени *FAE1* – на B3 та C3. Усі ідентифіковані гени виявляють синтенні зв'язки зі своїми гомоеологами/онологами у підгеномах B та C. Слід зазначити, що гени *FAD2* та *FAD3* збереглись у кількості 4-х копій кожен, в той час як ген *FAE1* був представлений лише двома. Причина такої різної консервативності набору генів наразі невідома та може слугувати тематикою для подальших досліджень.

Пошук мікросателітних послідовностей в інтронах та промоторних регіонах ідентифікованих генів. Нами також було проведено ідентифікацію SSR (мікросателітів) у послідовностях інтронів ідентифікованих генів *B. carinata*. У табл. 3 представлені дані про тип SSR залежно від розміру нуклеотидного повтору, кількість і розташування SSR у кожному інтроні окремого гена. Було встановлено, що найчастіше зустрічаються мономерні (мононуклеотидні) повтори, переважно у вигляді аденіну (A) або тиміну (T), наприклад, $(T)_{10}$, $(A)_{10}$. Димерні (динуклеотидні) повтори, такі як $(AT)_7$, $(CT)_{19}$, спостерігалися в лише у деяких інтронах, значно рідше за мононуклеотидні повтори. Три- та тетрануклеотидні повтори були рідкісними, й біли виявлені лише у двох випадках $(TCT)_7$ у інтроні 1 гена *BcarC.LPAT2-2*, а також $(TTGA)_5$ у інтроні 3 гена *BcarB.WRI1*. Компаундні SSR (змішані мотиви) також спостерігалися у невеликій кількості (лише у 6 випадках), наприклад: $(T)_{10}C(T)_{11}$ або $(A)_{14}(N)_{38}(T)_{22}$ (табл. 3). Загалом слід зазначити, що найдовші мономерні SSR спостерігаються у гені *BcarB.FAD3-1* – $(T)_{67}(N)_{33}(T)_{14}$. Найбільше складних мотивів виявлено у генах WRI1 і FAD3, наприклад, $(T)_{10}(N)_{30}(T)_{13}$ у *BcarB.FAD3-1*, $(A)_{14}(N)_{38}(T)_{22}$ у *BcarC.WRI1-1*. Унікальні компаундні мотиви виявлено в інтроні 2 *BcarB.LPAT2-1* – $(GA)_8(GT)_6$.

Слід зазначити, що зазвичай гени FAD2 та FAE1 інтронів не містять (Blume et al., 2024). Наявність інтроів у генах *BcarB.FAD2-2* та *Bcar*C.*FAE1* може бути як артефактом збірки геному, так і проявом високого мутаційного тиску на копії гомео/онологічних генів. Таким чином, гені *BcarB.FAD2-2* було ідентифіковано $(AT)_6$ в інтроні 1, в атиповому інтроні гена *Bcar*C.*FAE1* мікросателітних повторів виявлено не було. Незалежно від причини появи інтрону в таких генах, мікросателітні послідовності таких інтронів не слід використовувати при підборі маркерів, через можливу невідтворюваність у інших генотипів, потенційну низьку фуннкціональну значимість мутованих копій гена або, знову ж таки, через можливу помилку в збірці геному

Мономерні SSR є домінуючими серед ідентифікованих мікросателітних повторів, локалізованих у інтронах досліджених генів. Компаундні SSR є унікальними для деяких генів і можуть слугувати потенційними маркерами для дослідження генетичної варіативності. Ди-, три- та тетрануклеотидні SSR зустрічаються в меншій кількості, проте також мають значення для детальних досліджень геному і майбутньої розробки молекулярних маркерів.

Також нами було ідентифіковано SSR (мікросателіти) у промоторних ділянках генів (2 тис. п.н. перед старт-кодоном гена) *B. carinata* (табл. 4). Найчастіше мікросателітні повтори представлені мононуклеотидними повторами аденіну (A) або тиміну (T), наприклад, $(T)_{10}$, $(A)_{15}$. Основні динуклеотидні мотиви включали (AT), (TC), (AG), наприклад, $(AG)_{17}$ у промоторі *BcarC.FAD2-2*. Тринуклеотидні SSR трапляються рідко (*BcarB.DGAT1-2*, *BcarB.FAD2-1*, *BcarC.FAD2-1*), наприклад повтори $(TCT)_5$, $(CTT)_6$. Компаундні SSR були ідентифіковані в деяких генах, наприклад, $(A)_{13}(N)_{97}(AG)_6$ у *BcarB.FAD2-1* або $(AT)_{10}(GT)_8$ у *BcarB.WRI1*. Найбільш складний компаундний мотив було виявлено у гена *BcarB.LPAT2-2,* який складався з 236 п.н.: $(A)_{12}(N)_{57}(A)_{10}(N)_{65}(A)_{12}(N)_{65}(TTC)_5$.

Загалом більшість виявлених мікросателітних мотивів у промоторних регіонах були мононуклеотидними. Динуклеотидні SSR, наприклад, $(AG)_{17}$ у *BcarC.FAD2-2*, часто асоційовані з повторюваними мотивами з високою

кількістю повторів, зазвичай більшою, ніж в інтронних ділянках. Компаундні SSR є унікальними для певних генів, таких як LPAT2 і FAD2, і мають складні структури. Тримерні SSR трапляються рідко та були виявлені лише у генів FAD2 та гена *BcarB.DGAT1-2*.

SSR у промоторних регіонах генів *B. carinata* мають значну варіативність у типах і мотивах, що може вказувати на функціональну роль у регуляції експресії. Зокрема, довгі мономерні та компаундні SSR є потенційними цис-регуляторними елементами, які можуть бути важливою складовою регуляції експресії генів та фенотипового прояву тих чи інших ознак. Потенційно детекція змін у таких регіонах може бути пов'язана зі зміною в регуляції досліджуваного гена й матиме кореляцію з фенотиповим проявом ознаки (в даному випадку –

Таблиця 3. **Виявлені мікросателітні повтори в інтронах ідентифікованих генів *B. carinata***

Назва гена	Номер інтрону	Тип SSR за нуклеотидним повтором				
		моно-	ди-	три-	тетра-	компаундні
BcarB.DGAT1-1	intron1	$(T)_{10}$				
	intron3	$(T)_{13}$				
	intron5					$(T)_{10}C(T)_{11}$
	intron5					
	intron10	$(T)_{11}$				
	intron11		$(AT)_7$			
	intron15	$(T)_{12}$				
BcarC.DGAT1	intron5	$(T)_{11}$				
BcarB.DGAT2-1	intron1	(T)10				
BcarB.DGAT2-2	intron1		$(TC)_9$			
	intron6	$(T)_{12}$				
BcarC.DGAT2-1	intron1	$(T)_{16}$				
	intron4	$(A)_{10}$				
BcarC.DGAT2-2	intron2	$(T)_{13}$	$(CT)_{10}$			
BcarB.WRI1	intron3				$(TTGA)_5$	
	intron5	$(A)_{10}$	$(CT)_7$			
BcarC.WRI1-1	intron1	$(A)_{10}$				
	intron4	$(T)_{10}$				
	intron5	$(A)_{10}$				$(CT)_6(N)_{91}(T)_{10}$
BcarC.WRI1-1	intron1					$(A)_{14}(N)_{38}(T)_{22}$
	intron4		$(TC)_9$			
	intron5		$(TC)_7$			
BcarB.LPAT2-1	intron2					$(GA)_8(GT)_6$
BcarB.LPAT2-2	intron1	$(T)_{10}$				
	intron10	$(T)_{10}$				
BcarC.LPAT2-1	intron2	$(T)_{12}$				
	intron9	$(A)_{10}$				
BcarC.LPAT2-2	intron1			$(TCT)_7$		
BcarB.FAD2-2	intron1		$(AT)_6$			
BcarB.FAD3-1	intron1					$(T)_{10}(N)_{30}(T)_{13}$
	intron3					$(T)_{67}(N)_{33}(T)_{14}$
	intron7		$(CT)_{19}$			
BcarB.FAD3-2	intron1	$(T)_{11}$				
	intron7		$(CT)_6$			
	intron8	$(T)_{11}$; $(A)_{16}$				
BcarC.FAD3-1	intron3	$(T)_{10}$				
BcarC.FAD3-2	intron1	$(T)_{11}$				

Таблиця 4. **Виявлені мікросателітні повтори в промотроних ділянках (2 тис. п.н.) ідентифікованих генів *B. carinata***

Назва гена	Тип SSR за нуклеотидним повтором			
	моно-	ди-	три-	компаундні
BcarB.DGAT1-2	$(T)_{10}$	$(AT)_8$	$(TCT)_5$	
BcarC.DGAT1	$(A)_{10}$			
BcarB.DGAT2-1	$(A)_{10}$			
BcarB.DGAT2-2		$(TC)_6$; $(AG)_{12}$		
BcarC.DGAT2-1		$(CT)_8$; $(AG)_8$		
BcarB.WRI1	$(T)_{10}$			$(AT)_{10}(GT)_8$
BcarC.WRI1-1	$(A)_{10}$	$(TG)_6$		
BcarC.WRI1-1	$(T)_{11}$; $(T)_{12}$			
BcarB.LPAT2-1	$(A)_{11}$; $(A)_{15}$			
BcarB.LPAT2-2	$(T)_{11}$			$(A)_{12}(N)_{57}(A)_{10}(N)_{65}$
BcarC.LPAT2-1	$(A)_{10}$			$(A)_{12}(N)_{65}(TTC)_5$
BcarC.LPAT2-2	$(A)_{10}$; $(T)_{14}$			
BcarB.FAD2-1	$(A)_{16}$; $(A)_{10}$		$(CTT)_6$	
BcarB.FAD2-2	$(T)_{12}$	$(TA)_9$		$(A)_{13}(N)_{97}(AG)_6$
BcarC.FAD2-1		$(AG)_8$	$(TCT)_6$; $(CTT)_6$	
BcarC.FAD2-2		$(AG)_{17}$		
BcarB.FAD3-1	$(T)_{11}$; $(A)_{11}$; $(A)_{10}$	$(TA)_8$		
BcarB.FAD3-2	$(T)_{15}$	$(TC)_{10}$		
BcarC.FAD3-1	$(T)_{11}$; $(A)_{11}$			
BcarC.FAD3-2	$(A)_{11}$			
BcarB.FAE1	$(A)_{10}$	$(TA)_6$		

вмісту чи складу олії насіння). Саме тому, отримані дані дозволяють виділити SSR як перспективні маркери для генетичних досліджень, в тому числі й для вивчення регуляторних механізмів у промоторних регіонах.

Слід також зазначити, що в інтронах домінують мономерні повтори, такі як (T), з більшою кількістю компаундних структур, наприклад, $(T)_{10}C(T)_{11}$. В той же час, у промоторних регіонах хоча й також переважають мономерні повтори, але спостерігається наявність більшої кількості димерних та великих компаундних SSR, наприклад $(A)_{12}(N)_{57}(A)_{10}(N)_{65}(A)_{12}(N)_{65}(TTC)_5$. Через це у промоторних регіонах SSR є більш різноманітними. Інтрони, в свою чергу ж, мають довші моно- і димерні повтори, такі як $(T)_{67}(N)_{33}(T)_{14}$. Підвищена різноманітність мотивів мікросателітів у промоторних регіонах може бути також пов'язана з потенційною регуляторною функцією таких елементів послідовності. В той же час, у інтронах SSR можуть бути пов'язані зі структурною стабільністю генів.

Спираючись на результати проведеного аналізу, нами було відібрано декілька локусів мікросателітних повторів, котрі могли б потенційно бути використані як маркерні ділянки для молекулярно-генетичного аналізу та подальшої селекції *B. carinata*. Зокрема, було виділено такі перспективні SSR-ділянки для розробки маркерів:

BcarB.DGAT1-1 (інтрон 5): $(T)_{10}C(T)_{11}$ – компаундний мотив, специфічний для інтрону лише цього гена;

BcarC.WRI1-1 (інтрон 5): $(CT)_6(N)_{91}(T)_{10}$ – унікальний довгий компаундний мотив інтрону даного гена транскрипційного фактора;

BcarB.FAD3-1 (інтрон 3): $(T)_{67}(N)_{33}(T)_{14}$ – довгий компаундний SSR з мононуклеотидних повторів;

BcarB.DGAT2-2 (промотор): $(AG)_{12}$ – простий динуклеотидний мотив у регуляторній ділянці гена фермента синтезу тригліцеридів, що може бути пов'язаний з загальним рівнем накопичення олії у насінні;

BcarB.LPAT2-2 (промотор): $(A)_{12}(N)_{57}(A)_{10}(N)_{65}(A)_{12}(N)_{65}(TTC)_5$ – найдовший серед ідентифікованих компаундних мотивів, котрий може мати як потеційно високу варіабельність довжини, так і регуляторне значнення;
BcarC.FAD2-2 (промотор): $(AG)_{17}$ – довгий димерний повтор у промоторі гена десатурази жирних кислот;
BcarB.WRI1 (промотор): $(AT)_{10}(GT)_8$ – компаундний мотив з динуклеотидних повторів, може бути пов'язаним з вищим рівнем регуляції синтезу жирних кислот (регуляція експресії гена транскрипційного фактора);
BcarB.FAD2-1 (промотор): $(A)_{13}(N)_{97}(AG)_6$ – унікальний компаундний мотив в помоторній ділянці гена десатурази жирних кислот;
BcarB.FAD3-2 (промотор): $(TC)_{10}$ – простий динуклеотидний мотив у регуляторній ділянці гена ферменту синтезу ліноленової кислоти.

Таким чиним, грунтуючись на результатах пошуку генів, пов'язаних з синтезом жирних кислот, та ідентифікації мікросателітних локусів в їхніх некодуючих ділянках дозволяє в перспективі розробити молекулярні маркери для успішної селекції *B. carinata*. Компактність і варіативність SSR роблять їх ідеальними для створення поліморфних маркерів, зокрема для аналізу генетичної різноманітності та ідентифікації сортів. Локалізація в промоторних регіонах дозволяє використовувати SSR для вивчення регуляторних механізмів генів. Комплексні компаундні мотиви можуть забезпечити високий рівень специфічності маркерів, що важливо для ефективної селекції селекції за бажаною ознакою. Таким чином, результати дослідження мають значний потенціал для покращення селекційних програм і подальшого генетичного аналізу *B. carinata*.

Обговорення. Найбільш економічно важливими олійними культурами в Україні традиційно є *B. napus* (ріпак), *B. rapa ssp. oleifera* (суріпиця) та *Brassica nigra* (чорна гірчиця) (Blume et al., 2019). Як вже зазначалось вище, новою нещодавно інтродукованою олійною культурою в Україні є абіссинська гірчиця (Blume et al., 2023). Ця культура також має низку переваг порівняно з ріпаком, зокрема характеризується більшим вмістом олії, накопичує більше біомаси за вегетаційний період; а також здатна пригнічувати ріст бур'янів (Marillia et al., 2014). Крім того, повідомлялося, що *B. carinata* може бути використана для фіторемедіації, оскільки вона має добре розвинену кореневу систему (Marillia et al., 2014; Seepaul et al., 2021), що може мати важливе значення для дезактивації забруднених територій в Україні через військові дії. Більше того, каріната вже вирощується як технічна олійна культура у низці країн, наприклад, у Канаді. Також, подібність процесів вирощування та обробки абіссинської гірчиці є майже ідентичними до ріпаку, який вже широко вирощується по всьому світу (Seepaul et al., 2021).

Однак, актуальними залишаються питання ефективного селекційного вдосконалення згаданих нових олійних культур, таких як каріната, оскільки їх низька продуктивність є чинником, який лімітує їх ефективне використання для виробництва біопалив. Отримані результати з ідентифікації та аналізу ключових генів біосинтезу ліпідів у *B. carinata* мають важливе практичне значення для подальшого селекційного або генно-інженерного покращення карінати з метою підвищення виходу та збільшення якості олії її насіння. Слід також зазначити, що абіссинська гірчиця потенційно може бути використана як поліфункціональна культура подвійного призначення: як промислового, так і харчового. Однак, більшість генотипів гірчиці абіссинської характеризуються підвищеним вмістом ерукової кислоти, яка є небажаним харчовим компонентом. Слід також зазначити, що хоча й у деяких типах дизельного біопалива вміст естерів ерукової кислоти є прийнятним, її наявність у високих концентраціях у олійній сировині може негативно вплинути на якість авіаційного біопалива, яке отримують шляхом гідропроцесингу ТАГ та жирних кислот (HEFA).

Наразі існує ряд робіт, у котрих продемонстровано можливість успішного нокауту генів *FAE1* у *C. sativa* та *B. napus* за допомогою технології CRISPR/Cas9 (Ozseyhan et al., 2018, Liu et al., 2022b; Han et al., 2022). Подібна генетична маніпуляція дозволяє частково вимкнути метаболічний шлях біосинтезу мононенасичених жирних кислот з наддовгим карбоновим ланцюгом. Також, це дозволяє перенаправити синтез жирних кислот в русло підви-

щеної десатурації жирних кислот, оскільки ферменти FAD2 та FAE1 є конкуруючими (Han et al., 2022). Цікавим також є той факт, що нокаут *FAE1* не призводить до негативних фізіологічних наслідків у трансформованих рослин, оскільки переважно експресується на пізніх стадіях розвитку насіння, зокрема у рижію (Han et al., 2022; Blume et al., 2024). У той же час, нокаут генів *FAD2* (особливо усіх наявних у геномі копій) може бути фатальним для трансформантів, оскільки ген цієї десатурази експресується впродовж усього життєвого циклу рослин та має ряд важливих фізіологічних функцій (Jiang et al., 2017, Morineau et al., 2017).

Слід також відзначити, що існує альтернативна стратегія генетичної інженерії та/або селекції карінати, що передбачає використання цього виду в якості платформи для накопичення жирних кислот з наддовгим ланцюгом (Taylor et al., 2010; Roslinsky et al., 2021). Такі жирні кислоти, як ерукова та нервонова, є цінною сировиною для хімічної промисловості та можуть бути використані для виробництва лубрикантів, адгезивів, сурфактантів, складових косметики, полімерів, тощо (Taylor et al., 2010). Отримання генотипів з підвищеним рівнем вмісту жирних кислот з наддовгим ланцюгом у олії насіння передбачає маніпуляції з активністю кетоацил-СоА-синтаза (FAE-ферментів) тим чи іншим чином (Jadhav et al., 2005; Taylor et al., 2010). В одному з нещодавніх досліджень було продемонстровано можливість підвищення рівнів ерукової кислоти в олії *B. carinata*, завдяки привнесенню додаткової копії *BnFAE1* та одночасному сайленсингу *FAD2* шляхом РНК-інтерференції. Подібний комбінований підхід дозволяє збільшити рівень ерукової кислоти до понад 52 % у олії насіння карінати (Tesfaye et al., 2024).

Зменшення кількості поліненасичених жирних кислот є також перспективним напрямом у метаболічній інженерії олійних рослин. Поліненасичені жирні кислоти значною мірою скорочують термін придатності олії та естерів жирних кислот через їх підвищену сприйнятливість до оксидації (через наявність подвійних зв'язків у карбоновому ланцюзі). Надмірна кількість поліненасичених жирних кислот в олійній сировині є також небажаною і при виробництві біопалив шляхом HEFA, оскільки у такому випадку витрачається надмірна кількість водню в ході реакції (Chu et al., 2017; Tao et al., 2017; Niphadkar et al., 2017; Niculescu et al., 2019). Наразі було продемонстровано можливість нокауту генів *FAD2* за допомогою CRISPR-Cas9 на прикладі різних представників Хрестоцвітих, зокрема рижію та ріпаку (Jiang et al., 2017; Morineau et al., 2017; Okuzaki et al., 2018; Liu et al., 2022a; Shi et al., 2022).

Однак, у багатьох випадках нокаут усіх копій гена *FAD2* може призводити до небажаних фізіологічних ефектів у рослин, в тому числі й летальних, оскільки *FAD2* має також значну регуляторну роль (Morineau et al., 2017; Dar et al., 2017). Саме гени *FAD2* Хрестоцвітих відностяься до групи, так званих, housekeeping-FAD2, котрі експресуються у різних тканинах, а не специфічно у насінні (Dar et al., 2017). Ферменти FAD2 є частиною механізму відповіді на різні стресові чинники, зокрема на зміну температури. Для *B. carinata* було показано, що високотемпературний стрес призводить до значних змін у ліпідомі листя, зокрема до зниження активності десатурації жирних кислот (Zoong Lwe et al., 2021). У той же час підвищення активності ферменту FAD2 асоціюють з відповіддю на холодовий стрес (Dar et al., 2017). У багатьох полідплоїдних видів гени *FAD* та *FAE* зберігають збільшений рівень копійності (Sun et al., 2013; Dar et al., 2017), що також спостерігалось і у нашій роботі. Також у генах *FAD* та *FAE* представників *Brassica* спостерігається ефект переваги кодонів (codon usage bias), що також може бути пов'язано важливими регуляторними функціями цих генів (Chaudhary et al., 2022).

Ферменти групи LPAT є одними з ключових регуляторів синтезу ліпідів, в тому числі фосфоліпідів та триацилгліцеридів (рис. 1). Наразі було показано, що підвищення рівнів експресії генів ферментів групи LPAT у *B. napus* збільшує накопичення ТАГ у насінні (Woodfield et al., 2019). Зокрема, було також продемонстровано, що надекспресія генів *LPAT2* та *LPAT5* у *B. napus* призводить до суттєвого збільшення вмісту олії у насінні, в той час як нокдаун або нокаут цих генів призводить до різкого зниження вмісту ліпідів у насінні (Zhang et al., 2022). Більше того, було

встановлено, що нокаут цих генів призводить також до збільшення розміру ліпідних тілець та підвищує рівень акумуляції крохмалю у насінні *B. napus* (Zhang et al., 2019). Повідомлялось також, що надекспресія *LPAT2* може призводити до змін жирнокислотного складу олії насіння. Так, у трансформантів *C. sativa* спостерігалося збільшення вмісту жирних кислот з наддовгим ланцюгом у олії насіння, а у *B. napus* було виявлено збільшення вмісту лінолевої та ліноленової кислот (Yin et al., 2022; Huang et al., 2025). Аналогічний ефект слід також очікувати і для *B. carinata*, оскільки Хрестоцвіті мають подібні метаболічні шляхи синтезу ліпідів (Taylor et al., 2010).

Іншим типом ацилтрансфераз, котрий каталізує безпосередній синтез ТАГ та який може бути використаний в генетичній інженерії для збільшення вмісту олії насіння, є група ферментів DGAT (Cai et al., 2025). Існує декілька підтипів DGAT, зокрема кодовані генами *DGAT1* та *DGAT2*, котрі дивергували на ранніх етапах еукаріотичної еволюції (Turchetto-Zolet et al., 2011). Слід зазначити, що дані ферменти характеризуються позиційною (для молекул ТАГ) та субстратною специфічністю. В одній з робіт повідомлялось, DGAT1 має вище специфічність до олеїнової кислоти в порівнянні з пальмітиновою, та частіше інкорпорує олеїнову кислоту в ТАГ при їх синтезі у *B. napus* (Aznar-Moreno et al., 2015). В іншому дослідженні було продемонстровано, що DGAT1 *B. napus* має найвищу специфічність до ліноленової кислоти (α-ліноленоїл-КоА), дещо меншу до олеїнової, пальмітинової, лінолевої та стеаринової кислот (розташовані у порядку зниження специфічності) (Caldo et al., 2015). Цікавим також є той факт, що N-кінцевий домен DGAT1 виступає в ролі як позитивного, так і негативного модулятора активності ферменту (Caldo et al., 2017).

На прикладі *C. sativa* також було показано, що ферменти DGAT1 або DGAT2 мають специфічність до -КоА-похідних жирних кислот. Зокрема, DGAT2 має найвищу специфічність до ліноленової кислоти (найбільш за вмістом в олії рижію), а DGAT1 не має значних відмінностей у специфічності до жирних кислот, окрім незначної переваги ерукової кислоти (однієї з кислот з найнижчим вмістом в олії рижію) (Lager et al., 2020). З цього можна припустити, що специфічність DGAT може бути адаптованою до типового жирнокислотного складу того чи іншого виду (для ефективного синтезу ТАГ), що можна використовувати у генетичній інженерії. Подібний підхід був використаний нами для підвищення рівнів накопичення середньоланцюгових жирних кислот у *Camelina neglecta* шляхом перенесення ферментів синтезу ТАГ від видів роду *Cuphea* (Wang et al., 2024). Аналогічно, перенесення *DGAT2* від *B. napus* до *Chlamydomonas reinhardtii* та надекспресія цього гена сприяли підвищенню рівнів ліноленової кислоти в олії (Ahmad et al., 2015).

Враховуючи описану вище важливу роль DGAT у синтезі ТАГ, цілком очевидно, що гени цих ферментів розглядаються як важливі мішені у генетичній інженерії Хрестоцвітих й, зокрема, *B. carinata* (Taylor et al., 2010). Наразі було показано, що збереження декількох копій цих генів у поліплоїдних Хрестоцвітих є важливим для коректного синтезу ліпідів, а нокаут усіх копій *DGAT1* або *DGAT2* може призвести не лише до зниження вмісту олії, а й до зміни жирнокислотних профілів ТАГ у насінні (Zhao et al., 2017; Lager et al., 2020; Lee et al., 2024). Нокаут усіх трьох гомеологів *DGAT1* у рижію призводив не лише до зменшенню вмісту олії у насінні, а й до фенотипових дефектів, зокрема до продукування зменшеного та зморшкуватого насіння (Aznar-Moreno and Durrett, 2017).

Іншим важливим геном є *WRI1*, котрий входить до родини білків AP2/EREBP (APETALA2/ethylene-responsive element binding), яка є однією з найбільших груп транскрипційних факторів, зокрема у *A. thaliana*. Транскрипційний фактор WRI1 пов'язують з регуляцією рівнів накопичення ліпідів у насінні та активністю біосинтезу жирних кислот (Baud et al., 2009). На прикладі *C. sativa* та *Lepidium campestre* було показано, що надекспресія гена *WRI1,* перенесеного від *A. thaliana,* призводить до суттєвого збільшення вмісту олії у насінні (An and Suh, 2015; Ivarson et al., 2017). Пізніше також було продемонстровано і зворотній ефект: перенесення будь-якого з гомеологів *WRI1* рижію до нокаутних ліній *A. thaliana*

відновлювало накопичення ліпідів на нормальному рівні (An et al., 2017). Аналогічні ефекти з підвищення рівнів біосинтезу ліпідів, а також пришвидшення початку цвітіння рослин було продемонстровано на прикладі *B. napus* (Li et al., 2015). Цікавим є також той факт, що експресія самого *WRI1* контролюється низкою інших транскрипційних факторів. Зокрема, було показано, що MYB89 виступає в ролі репресора *WRI1* (Li et al., 2017), а MYB56 може промотувати накопичення ліпідів у насінні шлях активації *WRI1* та ряду інших важливих генів (Han et al., 2025). Враховуючи такі особливості регуляція експресії *WRI1*, використання мікросателітних послідовностей у промоторному регіоні *BcarB.WRI1* у якості маркерів може мати значну перспективу.

Значна копійність генів, особливо у таких поліплоїдних видів, як представники *Brassica*, суттєво обмежує можливості сучасної генетичної інженерії. Наявність цілісної геномної інформацію про набір та відмінності генів тієї чи іншої родини білків може значною мірою полегшити редагування геному, допомогти в підборі оптимальної дози гена при CRISPR/Cas9-нокауті та зменшити число нецільових редагувань (Ahmad et al., 2023). Отримані результати у даному досліджені дозволяють цілісно осягнути різноманіття генів *DGAT*, *LPAT*, *WRI*, *FAD*, *FAE*, яке виникло в ході видоутворення *B. carinata*, а також спростити їх використання в якості генів-мішеней для генно-інженерних маніпуляцій.

Тим не менш, підходи класичної селекції для удосконалення *B. carinata* залишаються не менш актуальними (Taylor et al., 2010, Blume et al., 2023). В той же час проведення ефективного скринінгу генетичних ресурсів *B. carinata* з метою виявлення генотипів з бажаними сільськогосподарськими ознаками вимагає використання надійних молекулярних маркерів (Enjalbert et al., 2013). Раніше нами повідомлялося про розробку та успішне використання молекулярних маркерів удля таких представників Хрестоцвітих, як *B. rapa* (Rabokon et al., 2023). Запропоновані маркерні системи, що базуються на поліморфізмі інтронів генів тубуліну, також можуть бути успішно використані і для селекції *B. carinata*. Однак, у випадку селекції генотипів з бажаними ознаками найбільш перспективно використовувати послідовності, асоційовані з конкретними генами тих чи інших ознак задля маркер-опосередкованої селекції.

В ряді досліджень було продемонстровано успішність підходу, котрий передбачає використання ILP- та/або SSR-маркерів, локалізованих в інтронах або промоторах, генів біосинтезу ліпідів та жирних кислот. Наприклад, SSR-маркери до генів *DGAT1*, *DGAT2*, *WRI*, *FAD2* були використані у *Jatropha curcas* для картування та вивчення зв'язку цих маркерів з ефективністю біосинтезу ліпідів або окремих жирних кислот (Ye et al., 2018). Аналогічно, на прикладі сої було продемонстровано ефективність використання SSR-маркерів, пов'язаних з локусом гена *FAD3,* для картування та виявлення ассоціацій з такою ознакою, як вміст ліноленової кислоти в олії насіння (Reinprecht and Pauls, 2016). Також нещодавно було показано можливість використання інтронних послідовностей в якості маркерів (ILP) для генів *FAD3*, *DGAT1*, *WRI1* на прикладі олійної пальми (Li et al., 2022).

Ідентифікація SSR-маркерів у промоторних регіонах та інтронах генів *DGAT*, *LPAT*, *WRI*, *FAD*, *FAE* у *B. carinata*, проведена у даному дослідженні, дозволить у подальшому розробити високоточні молекулярні маркери для маркер-опосередкованої селекції. Це прискорить створення сортів карінати з покращеними характеристиками, такими як підвищена врожайність, стійкість до стресових факторів (посухи, низьких температур) та оптимізований жирнокислотний склад. Крім того, отримані дані щодо геномної організації та синтенії цих генів можуть бути використані для генетичного покращення рослин, адаптації їх до стресових умов, що є критично важливим у контексті зміни клімату та забезпечення стабільності врожайності. Таким чином, результати роботи можуть знайти широке застосування в сільському господарстві та в біопаливній промисловості.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана за підтримки науково-дослідного проєкту ВЦП КНУ ім. Т. Шевченка при НАН України «Розробка технологічних засад отримання біодизелю з олії карінати (*Brassica carinata*) шляхом ліпазної трансестерифікації» № Держреєстрації: 0124U002185 (2024–2025 рр.) та проєкту НАН України в рамках програми 6541230 № Держреєстрації 0123U102104 (2023–2024 рр.).

GENOME-WIDE IDENTIFICATION AND DIVERSITY ANALYSIS OF *DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WRI1*, *FAD2*, *FAD3* TA *FAE1* GENES IN TERMS OF BREEDING IMPORTANCE IN *BRASSICA CARINATA*

R.Y. Blume, V.Y. Hotsuliak, S.V. Demydov, O.M. Savchuk, D.B. Rakhmetov, A.I. Yemets, Y.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a; 04123, Kyiv, Ukraine,
Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Academika Hlushkova ave., 2, 03189, Kyiv, Ukraine
M.M. Hryshko National Botanical Garden NAS of Ukraine,
Sadovo-Botanichna str., 1, 01014, Kyiv, Ukraine

E-mail: blume.rostislav@gmail.com

Abyssinian mustard, or carinata (*Brassica carinata*), is currently considered one of the most promising alternative oilseed crops, in particular for the production of liquid biofuels. Breeding and genetic engineering studies aimed at improving the quality and increasing the yield of carinata seed oil are becoming increasingly relevant with the widespread use of this oilseed crop in agriculture. The involvement of publicly available genomic resources of carinata allows to significantly simplify the process of improving this promising crop, purposefully focusing on loci or genes associated with the biosynthesis of lipids and fatty acids. That is why the aim of this research was a genome-wide identification and comprehensive analysis of genes regulating the synthesis of fatty acids and neutral lipids (*DGAT1*, *DGAT2*, *LPAT2*, *WRI1*, *FAD2*, *FAD3*, *FAE1*) of the allopolyploid species *B. carinata*. A total of 24 genes were identified, as each enzyme was encoded by several homoeologs. The identified genes showed a high level of similarity, but differed in non-coding sequences (introns and promoter regions), which allowed the identification of a number of microsatellite loci specific for each of the gene families. The results obtained allow the further development of highly accurate molecular markers for marker-assisted breeding, which can significantly accelerate the creation of *B. carinata* varieties with improved oil quality characteristics and increased seed oil content.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Ahmad, I., Sharma, A.K., Daniell, H. and Kumar, S., Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of *Brassica* diacylglycerol acyltransferase 2, *Plant Biotechnol. J.*, 2015, vol. 13, pp. 540–550. https://doi.org/10.1111/pbi.12278

Ahmad, N., Fatima S, Mehmood MA, et al., Targeted genome editing in polyploids: lessons from *Brassica*, *Front. Plant Sci.*, 2023, vol. 14, pp. 1152468. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1152468

An, D., and Suh, M.C., Overexpression of *Arabidopsis WRI1* enhanced seed mass and storage oil content in *Camelina sativa, Plant Biotechnol. Rep.,* 2015, vol. 9, pp. 137–148. https://doi.org/10.1007/s11816-015-0351-x

An, D., Kim, H., Ju, S., et al., Expression of *Camelina* WRINKLED1 isoforms rescue the seed phenotype of the *Arabidopsis wri1* mutant and increase the triacylglycerol content in tobacco leaves, *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 34. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00034

Aznar-Moreno, J., Denolf, P., Van Audenhove, K., et al., Type 1 diacylglycerol acyltransferases of *Brassica napus* preferentially incorporate oleic acid into triacylglycerol, *J. Exp. Bot.*, 2015, vol. 66, no. 20, pp. 6497–6506. https://doi.org/10.1093/jxb/erv363

Aznar-Moreno, J.A., and Durrett, T.P., Simultaneous targeting of multiple gene homeologs to alter seed oil production in *Camelina sativa*, *Plant Cell Physiol.*, 2017, vol. 58, pp. 1260–1267. https://doi.org/10.1093/pcp/pcx058

Baud, S., Wuillème, S., To, A., et al., Role of *WRINKLED1* in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 2009, vol. 60, pp. 933–947. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04011.x

Beier, S., Thiel, T., Münch, T., et al., MISA-web: a web server for microsatellite prediction, *Bioinformatics*, 2017, vol. 33, pp. 2583–2585. dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198

Blume, R.Ya., Lantukh, G.V., Levchuk, I.V., et al., Evaluation of perspectivity of use of a new hybrid oil culture of Tyfon in comparison with its parental species as raw material for biodiesel production, *Factors Exp. Evol. Organisms*, 2019, vol. 24, pp. 33–39. https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1074

Blume, R.Ya., Current state and perspectives of false flax (*Camelina sativa*) cultivation in Ukraine, *Factors Exp. Evol. Organisms*, 2022, vol. 31, pp. 28–34. https://doi.org/10.7124/FEEO.v31.1480

Blume, R.Y., Rakhmetov, D.B., and Blume, Y.B., Evaluation of Ukrainian *Camelina sativa* germplasm productivity and analysis of its amenability for efficient biodiesel production, *Ind. Crop. Prod.*, 2022, vol. 187B, pp. 115477. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115477

Blume R.Y., Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., et al., Introduction and performance of emerging biofuel crop *Brassica carinata* in Ukraine, in *European Biomass Conference and Exhibition Proceedings*, de Bari, I., Scarlat, N., and Grassi, A., Eds., Florence: ETA-Florence Renewable Energies, 2023, pp. 104–106. https://doi.org/10.5071/31stEUBCE2023-1AV.4.4

Blume, R.Y., Hotsuliak, V.Y., Nazarenus, T.J., et al., Genome-wide identification and diversity of *FAD2*, *FAD3* and *FAE1* genes in terms of biotechnological importance in *Camelina* species, *BMC Biotechnol.*, 2024, vol. 24, pp. 107. https://doi.org/10.1186/s12896-024-00936-4

Cai, W.-L., Yu, S.-Y., and Hu, Y.-H., Synergistic mechanisms of DGAT and PDAT in shaping triacylglycerol diversity: evolutionary insights and metabolic engineering strategies, *Front. Plant Sci.*, 2025, vol. 16, pp. 1598815. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1598815

Caldo, K.M.P., Acedo, J.Z., Panigrahi, R., et al., Diacylglycerol acyltransferase 1 is regulated by its N-terminal domain in response to allosteric effectors, *Plant Physiol.*, 2017, vol. 175, no. 2, pp. 667–680. https://doi.org/10.1104/pp.17.00934

Caldo, K.M.P., Greer, M.S., Chen, G., et al., Purification and properties of recombinant *Brassica napus* diacylglycerol acyltransferase 1, *FEBS Letters*, 2015, vol. 589, no. 6, pp. 773–778. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.02.008

Carlson, A.S., Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms, *Biochimie.*, 2009, vol. 91, pp. 665–670.

Chandrawati, Singh, N., Kumar, R., et al., Genetic diversity, population structure and association analysis in linseed (*Linum usitatissimum* L.), *Physiol. Mol. Biol. Plant.,* 2017, vol. 23, pp. 207–219. https://doi.org/10.1007/s12298-016-0408-5

Chaudhary, R., Chand, S., Alam, B.K., et al., Codon usage bias for fatty acid genes *FAE1* and *FAD2* in oilseed *Brassica* species, *Sustainability*, 2022, vol. 14, pp. 11035. https://doi.org/10.3390/su141711035

Chen, C., Wu, Y., Li, J., et al., TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining, *Mol. Plant.*, 2023, vol. 16, pp. 1733–1742. https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.09.010

Chu, P.L., Vanderghem, C., MacLean, H.L., and Saville, B.A., Financial analysis and risk assessment of hydroprocessed renewable jet fuel production from camelina, carinata and used cooking oil, *Appl. Energy.*, 2017, vol. 198, pp. 401–409. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.001

Dar, A.A., Choudhury, A.R., Kancharla, P.K., and Arumugam, N., The *FAD2* gene in plants: occurrence, regulation, and role, *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 1789. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01789

Edgar, R.C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acid Res.*, 2004, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340

Enjalbert, J.-N., Zheng, S., Johnson, J.J., et al., *Brassicaceae* germplasm diversity for agronomic and seed quality traits under drought stress, *Ind. Crop. Prod.*, 2013, vol. 47, pp. 176–185. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.037

Gesch, R.W., Isbell, T.A., Oblath, E.A., et al., Comparison of several *Brassica* species in the north central U.S. for potential jet fuel feedstock. *Ind. Crop. Prod.*, 2015, vol. 75, pp. 2–7. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.084

Gharby, S., Refining vegetable oils: chemical and physical refining, *Sci. World J.*, 2022, pp. 6627013. https://doi.org/10.1155/2022/6627013

Ghidoli, M., Ponzoni, E., Araniti, F., et al., Genetic improvement of *Camelina sativa* (L.) Crantz: opportunities and challenges, *Plants*, 2023, vol. 12, pp. 570. https://doi.org/10.3390/plants12030570

Han X., Peng Y., Yin S., et al., Transcriptional regulation of transcription factor genes *WRI1* and *LAFL* during *Brassica napus* seed development, *Plant Physiol.*, 2025, vol. 197, no. 2, pp. kiae378. https://doi.org/10.1093/plphys/kiae378

Han, L., Haslam, R.P., Silvestre, S., et al., Enhancing the accumulation of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in transgenic *Camelina* through the CRISPR-Cas9 inactivation of the competing *FAE1* pathway, *Plant Biotechnol. J.*, 2022, vol. 20, pp. 1444–1446. https://doi.org/10.1111/pbi.13876

Hatje, K., Keller, O., Hammesfahr, B., et al., Cross-species protein sequence and gene structure prediction with fine-tuned Webscipio 2.0 and Scipio, *BMC Res. Notes.*, 2011, vol. 4, pp. 265. https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-265

Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., et al., UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation, *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, no. 2, pp. 518–522. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281

Hoff, K.J., and Stanke M., WebAUGUSTUS — a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes, *Nucleic Acids Res.*, 2013, vol. 41, no. W1, pp. W123–W128. https://doi.org/10.1093/nar/gkt418

Hu, B., GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization

server, *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 8, pp. 1296–1297. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817

Huang, L., Liao, Z., Zou, Y., et al., *BnLPAT2* gene regulates oil accumulation in *Brassica napus* by modulating linoleic and linolenic acid levels in seeds, *PLoS One*, 2025, vol. 20, no. 4, pp. e0321548. https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0321548

Iskandarov, U., Kim, H.J., and Cahoon, E.B., *Camelina*: An emerging oilseed platform for advanced biofuels and bio-based materials, in *Plants and BioEnergy*, McCann, M., Buckeridge, M., and Carpita, N.C., Eds., New York: Springer, 2013, pp. 131–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9329-7_8

Ivarson, E., Leiva-Eriksson, N., Ahlman, A., et al., Effects of overexpression of *WRI1* and hemoglobin genes on the seed oil content of *Lepidium campestre*, *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 7, pp. 2032. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02032

Jadhav, A., Katavic, V., Marillia, E.F., et al., Increased levels of erucic acid in *Brassica carinata* by co-suppression and antisense repression of the endogenous *FAD2* gene, *Metab. Eng.*, 2005, vol. 7, no. 3, pp. 215–220. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.02.003

Jiang, W.Z., Henry, I.M., Lynagh, P.G., et al., Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing, *Plant Biotechnol. J.*, 2017, vol. 15, pp. 648–657. https://doi.org/10.1111/pbi.12663

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., et al., ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates, *Nat. Method.*, 2017, vol. 14, pp. 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Lager, I., Jeppson, S., Gippert, A.-L., et al., Acyltransferases regulate oil quality in *Camelina sativa* through both acyl donor and acyl acceptor specificities, *Front. Plant Sci.*, 2020, vol. 11, pp. 1144. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01144

Larralde, M., and Zeller G., PyHMMER: a Python library binding to HMMER for efficient sequence analysis, *Bioinformatics*, 2023, vol. 39, no. 5, pp. btad214. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad214

Lee, K.-R., Jeon, I., Yu, H., et al., Increasing monounsaturated fatty acid contents in hexaploid *Camelina sativa* seed oil by *FAD2* gene knockout using CRISPR-Cas9, *Front Plant Sci.*, 2021, vol. 12, pp. 702930. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702930

Lee, K.-R., Yeo, Y., Lee, J., et al., Functional characterization of the effects of *CsDGAT1* and *CsDGAT2* on fatty acid composition in *Camelina sativa*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, pp. 6944. https://doi.org/10.3390/ ijms25136944

Letunic, I., and Bork, P., Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool, *Nucleic Acid. Res.*, 2024, vol. 52, no. W1, pp. W78-W82. https://doi.org/10.1093/nar/gkae268

Li, D., Jin, C., Duan, S., et al., MYB89 transcription factor represses seed oil accumulation, *Plant Physiol.*, 2017, vol. 173, no. 2, pp. 1211–1225. https://doi.org/10.1104/pp.16.01634

Li, J., Yang, Y., Sun, X., et al., Development of intron polymorphism markers and their association with fatty acid component variation in oil palm, *Front. Plant Sci.*, 2022, vol. 13, pp. 885418. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.885418

Li, Q., Shao, J., Tang, S., et al., *Wrinkled1* accelerates flowering and regulates lipid homeostasis between oil accumulation and membrane lipid anabolism in *Brassica napus*, *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, pp. 1015. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01015

Liu, H., Lin, B., Ren, Y., et al., CRISPR/Cas9-mediated editing of double loci of *BnFAD2* increased the seed oleic acid content of rapeseed (*Brassica napus* L.), *Front. Plant Sci.*, 2022a, vol. 13, pp. 1034215. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1034215

Liu, Y., Du, Z., Lin, S., et al., CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *BnaFAE1* genes confers low-erucic acid in *Brassica napus*, *Front. Plant Sci.*, 2022b, vol. 13, pp. 848723. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.848723

Marillia, E.F., Francis, T., Falk, K.C., et al., Palliser's promise: *Brassica carinata*, an emerging western Canadian crop for delivery of new bio-industrial oil feedstocks, *Biocatalysis Agricult. Biotechnol.*, 2014, vol. 3, no. 1, pp. 65–74. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.012.

Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., et al., Pfam: The protein families database in 2021, *Nucleic Acid. Res.*, 2021, vol. 49, no. D1, pp. D412-D419. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913

Morineau, C., Bellec, Y., Tellier, F., et al., Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*, *Plant Biotechnol J.*, 2017, vol. 15, pp. 729–739. https://doi.org/10.1111/pbi.12671

Murphy, D.J., 2 – Sustainable vegetable oils, in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Functional Dietary Lipids (Second Edition)*, Sanders, T.A.B., Ed., Cambridge: Woodhead Publishing; 2024, pp. 31–47. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15327-3.00011-2

Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., and Minh, B.Q., IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies, *Mol. Biol. Evol.*, 2015, vol. 32, pp. 268–274. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300

Niculescu, R., Clenci, A., and Iorga-Siman, V., Review on the use of diesel-biodiesel-alcohol blends in compression ignition engines, *Energies*, 2019, vol. 12, pp. 1194. https://doi.org/10.3390/en12071194

Niphadkar, S., Bagade, P., and Ahmed, S., Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives, *Biofuels*, 2017, vol. 9, no. 2, pp. 229–238. https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338

Niu, Y., Liu, Q., He, Z., et al., A *Brassica carinata* pan-genome platform for *Brassica* crop improvement, *Plant Commun.*, 2024, vol. 5, no. 1, pp. 100725. https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100725

Okuzaki, A., Ogawa, T., Koizuka, C., et al., CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*, *Plant Physiol. Biochem.*, 2018, vol. 131, pp. 63–69. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.025

Østergaard, L. and King, G.J., Standardized gene nomenclature for the *Brassica* genus, *Plant Methods,* 2008, vol. 4, pp. 10. https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-10

Ottomano Palmisano, G., Rocchi, L., Negri, L., and Piscitelli, L. Evaluating the progress of the EU countries towards implementation of the European Green Deal: A multiple criteria approach, *Land,* 2025, *14*, 141. https://doi.org/10.3390/land14010141

Ozseyhan, M.E., Kang, J., Mu, X., and Lu, C., Mutagenesis of the *FAE1* genes significantly changes fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa*, *Plant Physiol. Biochem.*, 2018, vol. 123, pp. 1–7. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.021

Qian, Y., Rudzińska, M., Grygier, A., and Przybylski, R., Determination of triacylglycerols by HTGC-FID as a sensitive tool for the identification of rapeseed and olive oil adulteration, *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 17, pp. 3881. https://doi.org/10.3390/molecules25173881

Rabokon, A.M., Blume, R.Y., Sakharova, V.G., et al., Genotyping of interspecific *Brassica rapa* hybrids implying β-tubulin gene intron length polymorphism (TBP/cTBP) assessment, *Cytol. Genet.*, 2023, vol. 57, no. 6, pp. 538–549. https://doi.org/10.3103/S0095452723060075

Reinprecht, Y., and Pauls, K.P., Microsomal omega-3 fatty acid desaturase genes in low linolenic acid soybean line rg10 and validation of major linolenic acid QTL, *Front. Genet.*, 2016, vol. 7, pp. 38. https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00038

Roslinsky, V., Falk, K.C., Gaebelein, R. et al., Development of *B. carinata* with super-high erucic acid content through interspecific hybridization, *Theor. Appl. Genet.*, 2021, vol. 134, pp. 3167–3181. https://doi.org/10.1007/s00122-021-03883-2

Seepaul, R., Kumar, S., Iboyi, J.E., et al., *Brassica carinata*: Biology and agronomy as a biofuel crop, *GCB Bioenergy*, 2021, vol. 13, pp. 582–599. https://doi.org/10.1111/gcbb.12804

Shi, J., Ni, X., Huang, J., et al., CRISPR/Cas9-mediated gene editing of *BnFAD2* and *BnFAE1* modifies fatty acid profiles in *Brassica napus*, *Genes (Basel)*, 2022, vol. 13, no. 10, pp. 1681. https://doi.org/10.3390/genes13101681

Sun, X., Pang, H., Li, M., et al., Evolutionary pattern of the *FAE1* gene in *Brassicaceae* and its correlation with the erucic acid trait, *PLoS One*, 2013, vol. 8. no. 12, pp. e83535. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083535

Tao, L., Milbrandt, A., Zhang, Y., and Wang, W.C., Techno-economic and resource analysis of hydroprocessed renewable jet fuel, *Biotechnol. Biofuels*, 2017, vol. 10, pp. 261. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0945-3

Taylor, D.C., Falk, K.C., Palmer, C.D., et al., *Brassica carinata* – a new molecular farming platform for delivering bio-industrial oil feedstocks: case studies of genetic modifications to improve very long-chain fatty acid and oil content in seeds, *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2010, vol. 4, pp. 538–561. https://doi.org/10.1002/bbb.231

Tesfaye, M., Wang, E.S., Feyissa, T., et al., Enhancing erucic acid and wax ester production in *Brassica carinata* through metabolic engineering for industrial applications, *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, pp. 6322. https://doi.org/10.3390/ijms25126322

Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R., and Graner, A., Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 2003, vol. 106, no. 3, pp. 411–422. https://doi.org/10.1007/s00122-002-1031-0

Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., and Minh, B.Q., W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis, *Nucleic Acid. Res.*, 2016, vol. 44, no. W1, pp. W232-W235. https://doi.org/10.1093/nar/gkw256

Turchetto-Zolet, A.C., Maraschin, F.S., de Morais, G.L., et al., Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis, *BMC Evol. Biol.*, 2011, vol. 11, pp. 263. https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-263

Wang, S., Blume, R.Y., Zhou, Z.-W., et al., Chromosome-level assembly and analysis of *Camelina neglecta* – a novel diploid model for camelina biotechnology research, *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, 2024, vol. 17, pp. 17. https://doi.org/10.1186/s13068-024-02466-9

Warwick, S.I., Brassicaceae in agriculture, in *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, Schmidt, R., and

Bancroft, I., Eds., New York: Springer, 2011, pp. 33–65. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0_2

Woodfield, H.K., Fenyk, S., Wallington, E., et al., Increase in lysophosphatidate acyltransferase activity in oilseed rape (*Brassica napus*) increases seed triacylglycerol content despite its low intrinsic flux control coefficient, *New Phytol.*, 2019, vol. 224, pp. 700–711. https://doi.org/10.1111/nph.16100

Ye, J., Wang, C., Sun, Y., et al., Overexpression of a transcription factor increases lipid content in a woody perennial *Jatropha curcas*, *Front. Plant Sci.*, 2018, vol. 9, pp. 1479. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01479

Yim, W.C., Swain, M.L., Ma, D., et al., The final piece of the Triangle of U: Evolution of the tetraploid *Brassica carinata* genome, *Plant Cell*, 2022, vol. 34, no. 11, pp. 4143–4172. https://doi.org/10.1093/plcell/koac249

Yin, Y., Raboanatahiry, N., Chen, K., et al., Class A lysophosphatidic acid acyltransferase 2 from *Camelina sativa* promotes very long-chain fatty acids accumulation in phospholipid and triacylglycerol, *Plant J.*, 2022, vol. 112, pp. 1141–1158. https://doi.org/10.1111/tpj.15999

Zanetti, F., Alberghini, B., Jeromela, A.M., et al., Camelina, an ancient oilseed crop actively contributing to the rural renaissance in Europe. A review, *Agron. Sustain. Dev.*, 2021, vol. 41, pp. 2. https://doi.org/10.1007/s13593-020-00663-y

Zhang, K., He, J., Yin, Y., et al., Lysophosphatidic acid acyltransferase 2 and 5 commonly, but differently, promote seed oil accumulation in *Brassica napus*, *Biotechnol. Biofuels*, 2022, vol. 15, pp. 83. https://doi.org/10.1186/s13068-022-02182-2

Zhang, K., Nie, L., Cheng, Q., et al., Effective editing for lysophosphatidic acid acyltransferase 2/5 in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) using CRISPR-Cas9 system, *Biotechnol. Biofuels*, 2019, vol. 12, pp. 225. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1567-8

Zhao, C., Li, H., Zhang, W., et al., BnDGAT1s function similarly in oil deposition and are expressed with uniform patterns in tissues of *Brassica napus*, *Front. Plant Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 2205. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02205

Zoong Lwe, Z., Sah, S., Persaud, L., et al., Alterations in the leaf lipidome of *Brassica carinata* under high-temperature stress, *BMC Plant Biol.*, 2021, vol. 21, pp. 404. https://doi.org/10.1186/s12870-021-03189-x

Надійшла в редакцію 12.07.2025
Після доопрацювання 10.08.2025
Прийнята до друку 18.11.2025