

Katarzyna Mikołajczyk, Iwona Bartkowiak-Broda

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Markery DNA w hodowli jakościowej rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) w aspekcie modyfikacji zawartości kwasów tłuszczowych

DNA markers in rapeseed (*Brassica napus* L.) quality breeding with respect to fatty acids content modification

Słowa kluczowe: rzepak ozimy (*Brassica napus* L.), hodowla jakościowa, markery DNA, kwasy tłuszczowe

Key words: winter rapeseed (*Brassica napus* L.), quality breeding, DNA markers, fatty acids

Rzepak (*Brassica napus* L.) jest ważną rośliną hodowlaną strefy klimatu umiarkowanego. Olej rzepakowy znajduje coraz szersze zastosowanie nie tylko w przemyśle spożywczym, lecz także w technologii, jako surowiec do produkcji biopaliwa. Na świecie prowadzone są prace, mające na celu uzyskanie niskoglukozynolanowych odmian rzepaku, wykazujących jednocześnie zróżnicowanie pod względem zawartości i składu kwasów tłuszczowych. Istotne jest, aby hodowli jakościowej towarzyszyła selekcja z zastosowaniem jednoznacznych i efektywnych metod, jakie stanowią markery DNA, nie podlegające modyfikującemu wpływowi środowiska, co znacząco przyspiesza i upraszcza proces hodowlany. Praca zawiera przegląd danych literaturowych dotyczących poszukiwania i zastosowania markerów DNA w hodowli jakościowej rzepaku ozimego, odmian o zmodyfikowanej zawartości kwasów tłuszczowych, w aspekcie wykorzystania oleju rzepakowego jako surowca w przemyśle spożywczym, chemicznym oraz do produkcji biopaliwa. Przedstawiono kluczowe etapy procesu biosyntezy kwasów tłuszczowych w komórkach roślinnych z uwzględnieniem enzymów regulatorowych, których ekspresja może mieć wpływ na poziom danego kwasu tłuszczowego w materiale zapasowym nasion.

Rapeseed (*Brassica napus* L.) belongs to the most important oilseed crops cultivated in the moderate climate regions of the world. Rapeseed oil is applied not only for human nutrition but also it is used as a raw material in industry and technology, for biofuel production. Several approaches are being undertaken in order to obtain low-glucosinolates rapeseed cultivars of different fatty acids composition and content. In such a case, marker assisted selection is of great value due to its capability of no-doubt discrimination between homo- and heterozygotes, irrespective of the changing environmental conditions. This review comprises published data concerning the use of DNA markers in quality breeding of rapeseed cultivars with differentiated fatty acids content. In addition, a metabolic pathway of fatty acids biosynthesis in plant cells is presented, including the regulatory enzymes responsible for particular fatty acids level in the seed storage oils.

Wstęp

Tłuszcze — estry glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych, są cennym źródłem surowców stosowanych w przemyśle spożywczym oraz w technologii. Stanowią znaczący element diety człowieka ze względu na wysoką wartość energetyczną. Tłuszcze roślinne gromadzone są jako materiał zapasowy w mikrosomach zlokalizowanych w komórkach nasion. Olej z nasion uzyskiwany jest na drodze tłoczenia lub ekstrakcji.

Około dziewięćdziesięciu procent produkcji olejów roślinnych przeznaczonych jest do konsumpcji. Są spożywane głównie jako oleje sałatkowe i smaźnicze oraz w formie margaryn i tłuszczów piekarniczych. Tłuszcze roślinne stanowią również cenny surowiec dla celów technicznych — do produkcji biopaliwa, smarów, olejów hydraulicznych, a także warstw ochronnych, tworzyw sztucznych, mydeł i detergentów (Altin i in. 2001; Töpfer i in. 1995) (tab. 1). Jednym z głównych źródeł oleju roślinnego, szczególnie istotnym w strefie klimatu umiarkowanego, jest rzepak. W Polsce zajmuje on 97% powierzchni przeznaczonej pod uprawę roślin oleistych. Nasiona odmian rzepaku ozimego w suchej masie zawierają 42–49% oleju, podczas gdy jarego około 40% (Krzymański 1984). Jego jakość i przeznaczenie zależą przede wszystkim od proporcji kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład oleju: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, linolenowego i erukowego (Krzymański 1970; Thormann i in. 1996) (rys. 1).

a) kwas laurynowy — <i>lauric acid</i> C _{12:0}	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -COO ⁻
b) kwas mirystynowy — <i>myristic acid</i> C _{14:0}	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -COO ⁻
c) kwas palmitynowy — <i>palmitic acid</i> C _{16:0}	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COO ⁻
d) kwas stearynowy — <i>stearic acid</i> C _{18:0}	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COO ⁻
e) kwas oleinowy — <i>oleic acid</i> C _{18:1} (Δ ₉)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COO ⁻
f) kwas linolowy — <i>linoleic acid</i> C _{18:2} (Δ ₉ Δ ₁₂)	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COO ⁻
g) kwas linolenowy — <i>linolenic acid</i> C _{18:3} (Δ ₉ Δ ₁₂ Δ ₁₅)	CH ₃ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COO ⁻
h) kwas erukowy — <i>erucic acid</i> C _{22:1} (Δ ₁₃)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₁₁ -COO ⁻

Rys. 1. Wzory chemiczne kwasów tłuszczowych występujących w olejach roślinnych — *Chemical formulas of fatty acids present in plant oils*

Tabela 1

Możliwości zastosowania kwasów tłuszczowych występujących w olejach roślinnych
The potential applications of fatty acids derived from plant oils

Kwas tłuszczowy <i>Fatty acid</i>	Zastosowanie — <i>Potential applications</i>	
	cele spożywcze — <i>food</i>	cele przemysłowe — <i>industry and technology</i>
Laurynowy C _{12:0} — <i>Lauric acid</i> Mirystynowy C _{14:0} — <i>Myristic acid</i>	cukiernictwo, śmietanki syntetyczne <i>confectionery, synthetic creams</i>	detergenty, środki piorące, kosmetyki <i>detergents, laundries, cosmetics</i>
Palmitynowy C _{16:0} — <i>Palmitic acid</i>	tuszcze piekarnicze <i>shortenings</i>	mydła, świece, smary <i>soaps, candles, lubricant grease</i>
Stearynowy C _{18:0} — <i>Stearic acid</i>	cukiernictwo <i>confectionery</i>	kosmetyki, środki farmaceutyczne, świece <i>cosmetics, pharmaceuticals, candles</i>
Oleinowy — <i>Oleic acid</i> C _{18:1} (Δ9)	margaryny, oleje smazalnice, oleje sałatkowe <i>margarine, frying oil, salad oil</i>	mydła, detergenty, warstwy powlekające, tworzywa sztuczne, kosmetyki, środki farmaceutyczne, polimery <i>soaps, detergents, coatings, plasticizer, cosmetics, pharmaceuticals, polymers</i>
Linolowy — <i>Linoleic acid</i> C _{18:2} (Δ9 Δ12)	oleje sałatkowe, margaryny <i>salad oil, margarine</i>	warstwy powlekające, farby szybko schnące <i>coatings, drying oils</i>
Linolenowy — <i>Linolenic acid</i> C _{18:3} (Δ9 Δ12 Δ15)	oleje sałatkowe, margaryny <i>salad oil, margarine</i>	laktery, warstwy powlekające, linoleum, farby szybko schnące <i>varnishes, coatings, linoleum, drying oils</i>
Erukowy — <i>Erucic acid</i> C _{22:1} (Δ13)	—	polimery, kosmetyki, smary, plastyfikatory do tworzyw sztuucznych, środki powierzchniowo czynne, detergenty, środki farmaceutyczne <i>polymers, cosmetics, lubricants, plasticizer, surfactant, detergents, pharmaceuticals</i>

Źródło: wg Töpfer i in. 1995

Cele i metody modyfikacji zawartości kwasów tłuszczowych w oleju występującym w nasionach rzepaku

W zależności od sposobu wykorzystania wymagana jest różna zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych (Harwood 1996; Rakow i Raney 2003) (tab. 2). Dla celów spożywczych, dla których wykorzystywana jest większość produkowanego oleju rzepakowego — wymagany jest olej bezerukowy, ponieważ kwas ten okazał się szkodliwy dla zdrowia człowieka (Krzymański 1970). Ze względów dietetycznych olej rzepakowy stanowi cenne źródło wielonienasyconych kwasów tłuszczowych — linolowego i linolenowego, należących do grupy tzw. niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), które nie są syntetyzowane w organizmie człowieka i zwierząt, a więc muszą być dostarczane z zewnątrz, w pożywieniu i paszy pochodzenia roślinnego. NNKT wchodzi w skład błon komórkowych, osłonek mielinowych (sfingolipidy), umożliwiają usuwanie z organizmu nadmiaru cholesterolu, jak również biorą udział w tworzeniu prostaglandyn, zaangażowanych w reakcje odpornościowe organizmu (Roy i Tarr 1997; Fitzpatrick i Scarth 1998). Prowadzone od ponad dwudziestu lat badania kliniczne wykazały, że szczególnie kwasy tłuszczowe o trzech wiązaniach nienasyconych, jak kwas linolenowy, są istotne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmów. Pełnią one ważne funkcje w zapobieganiu i leczeniu: choroby wieńcowej, nadciśnienia, cukrzycy, a także stanów zapalnych oraz zaburzeń układu odpornościowego. Ważna jest również proporcja zawartości kwasów o trzech wiązaniach nienasyconych do zawartości kwasów o dwóch wiązaniach — optymalnie powinna wynosić 1 : 2. Spośród źródeł pochodzenia roślinnego, olej rzepakowy otrzymywany z odmian podwójnie ulepszonych stanowi najlepsze źródło NNKT, przed lnem, pachnotką oraz soją (Simopoulos 2000). W przypadku, gdy olej rzepakowy przeznaczony jest do spożycia jako olej sałatkowy (bez konieczności uprzedniej obróbki technologicznej) pożądana jest zawartość kwasu linolenowego na poziomie od 10 do 14%, a więc taka jak występuje u odmian podwójnie ulepszonych. Jednak, gdy olej wykorzystywany jest do smażenia lub do produkcji margaryn, podczas obróbki termicznej wykazuje niestabilność smakowo-zapachową. Wymaga również stosowania dużych ilości katalizatora oraz stwarza możliwość powstawania toksycznych izomerów „trans-” w procesie utwardzania tłuszczów. Dlatego dla potrzeb obróbki technologicznej w przemyśle spożywczym wymagana jest obniżona zawartość kwasu linolenowego w oleju do około 3% (Scarth i McVetty 1999).

Dla potrzeb technologii oraz przemysłu chemicznego, kosmetycznego i farmaceutycznego korzystna jest wysoka zawartość kwasu erukowego lub oleinowego (ponad 80%). Coraz powszechniej olej rzepakowy stosowany jest w technologii do produkcji biokomponentów biopaliw (Altin i in. 2001). W tym celu wymagana jest podwyższona zawartość kwasu oleinowego (powyżej 80%), przy obniżonej

Tabela 2
 Modyfikacje zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym w zależności od sposobu jego wykorzystania
Modifications of particular fatty acids content in rapeseed oil with respect to the means of its application

Kwasy tłuszczowe występujące w oleju rzepakowym <i>Fatty acids present in rapeseed oil</i>	Przybliżona zawartość kwasów tłuszczowych <i>Fatty acids content [%]</i>		Wymagane modyfikacje dla celów spożywczych <i>Modifications needed for food applications [%]</i>		Wymagane modyfikacje dla celów przemysłowych <i>Modifications needed for industry applications [%]</i>	
	odmiany wysokoerukowe <i>high-erucic cultivars</i>	odmiany odmiany podwójnie ulepszone <i>double low cultivars</i>	olej sałatkowy <i>salad oil</i>	olej smażalniczy, tłuszcze piekarnicze <i>frying oil, shortenings</i>	przemysł <i>industry</i>	produkcja biopaliwa <i>biofuel production</i>
Suma nasyconych kwasów tłuszczowych <i>Total saturated fatty acids</i>	4	4-6	<7	> 8	< 8	< 6
Kwas erukowy <i>Erucic acid</i>	50-60	0-2	0	0	> 80	> 80
Kwas oleinowy <i>Oleic acid</i>	12	56-68	61	67-75	> 75	> 75
Kwas linolowy <i>Linoleic acid</i>	13	18-22	22-26	15-22	26	15-22
Kwas linolenowy <i>Linolenic acid</i>	9	10-13	11	4	4	4

zawartości kwasu linolenowego (ok. 3% i mniej); kwas ten jest przyczyną psucia się oleju podczas składowania oraz utleniania w trakcie estryfikacji metylowej, prowadzonej przy produkcji biopaliwa.

Należy jednak zwrócić uwagę na sposób wykorzystania oleju, jak i śruty poekstrakcyjnej lub wytlóków z odmian niskolinolenowych. Olej dla celów spożywczych ze względów dietetycznych, jak wspomniano, powinien charakteryzować się stosunkiem kwasu linolowego do kwasu linolenowego nie szerszym niż 2 : 1. Olej pozostaje także w śrucie poekstrakcyjnej i wytlókach, które są wykorzystywane jako pasze dla zwierząt hodowlanych. Jego właściwy skład ma także wpływ na wartość dietetyczną produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego (Simopoulos 2000).

Możliwość zastosowania olejów roślinnych do różnych celów w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz w technologii, powoduje rozwój badań mających na celu modyfikację składu i zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym (Murphy 1996). Prace prowadzone z zastosowaniem metod hodowli jakościowej roślin umożliwiają selekcję i hodowlę roślin o ściśle określonych cechach. Modyfikacje zawartości i składu kwasów tłuszczowych w materiałach hodowlanych dokonywane są na drodze krzyżowań genotypów o różnych proporcjach kwasów tłuszczowych, jak również mutagenezy oraz inżynierii genetycznej. Wprowadzenie nowych genotypów do odmian hodowlanych wymaga prowadzenia hodowli rekombinacyjnej, której towarzyszy selekcja roślin w oparciu o analizy cech jakościowych.

Metody analizy zawartości kwasów tłuszczowych w hodowli jakościowej rzepaku

Analiza fenotypu

W celu selekcji odmian o określonym składzie i zawartości kwasów tłuszczowych stosuje się chromatograficzną analizę kwasów tłuszczowych pochodzących z nasion (Byczyńska i Krzymański 1969; Krzymański 1970). Aby uzyskać informacje o danym genotypie we wczesnych stadiach rozwoju roślin próbowano analizować zawartość kwasów tłuszczowych w pyłku. Jednak wyniki analizy pyłku nie są adekwatne do zawartości kwasów tłuszczowych w dojrzałych nasionach, z których otrzymuje się olej (Evans i in. 1987).

Stosowana metoda umożliwia badanie wyłącznie cech fenotypowych, które jak wykazały badania (Bartkowiak-Broda i Krzymański 1983) ulegają modyfikującemu wpływowi środowiska. Stąd obiektywna ocena zawartości kwasów tłuszczowych metodą analizy chromatograficznej jest utrudniona; cecha ta szczególnie zależy od takich czynników, jak temperatura oraz światło. Przykładowo, rośliny

hodowane i selekcyjonowane w szklarni, po przeniesieniu do warunków polowych wykazują często odmienne własności. Ponadto analiza fenotypu nie pozwala na odróżnienie homo- od heterozygoty. Proces selekcyjny jest więc wydłużony, bardziej prac- i czasochłonny.

Analiza genotypu

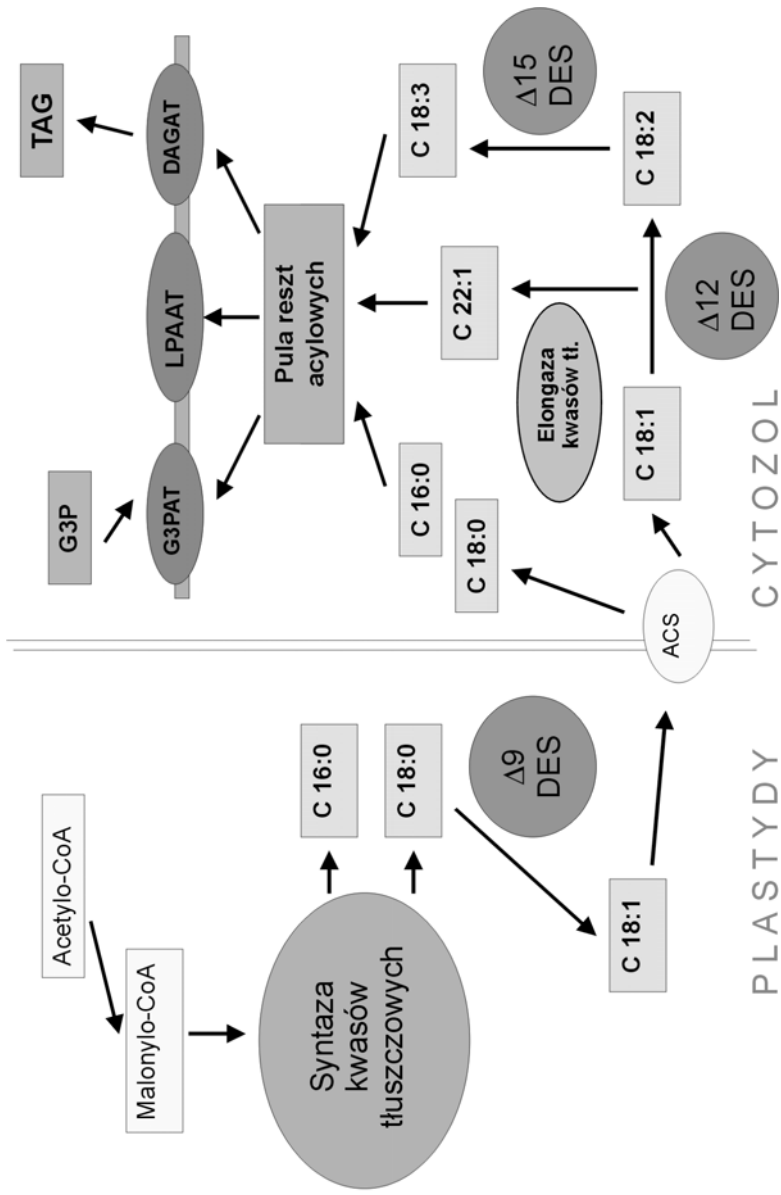
Coraz szersze zastosowanie w programach hodowlanych znajdują markery DNA (Krzymański 1997). Selekcja przy użyciu markerów (ang. MAS — marker assisted selection) dokonywana jest w oparciu o sprzężenie pomiędzy markerem a *locus* odpowiedzialnym za dziedziczenie danej cechy (Ribaut i in. 1997). Metody oparte na analizach DNA umożliwiają bezpośrednie określenie genotypu na próbkach, które mogą być pobrane z różnych części roślin, znajdujących się w różnych fazach rozwojowych, z pominięciem zmienności niedziedzicznej (Krzymański 1997). Dlatego markery DNA stanowią dogodne narzędzie selekcji i znajdują coraz szersze zastosowanie (Tanksley i in. 1989). Ponadto niektóre markery, np. — typu RFLP, AFLP, markery mikrosatelitarne (SSR) oraz markery allelo-specyficzne umożliwiają odróżnienie homo- od heterozygoty (Kesseli i in. 1992).

W programach hodowlanych rzepaku również są stosowane markery DNA. Prowadzone są prace mające na celu znalezienie istotnych dla selekcji markerów cech użytkowych, jak również skonstruowanie map genetycznych w oparciu o różnego typu markery DNA (Bartkowiak-Broda 1997).

Biosynteza tłuszczów zapasowych w komórkach roślinnych

W przypadku poszukiwania metod modyfikacji składu i zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych, stanowiących materiał zapasowy nasion roślin oleistych, jak również w celu opracowania specyficznych markerów, analiza metabolicznego szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych w komórkach roślinnych umożliwia określenie enzymów regulatorowych, kluczowych dla ekspresji danej cechy jakościowej. W wielu laboratoriach na świecie prowadzone są badania w tym zakresie (Töpfer i in. 1995; Słabas i in. 2002; O'Hara i in. 2002).

W komórkach roślinnych synteza *de novo* kwasów tłuszczowych przebiega wyłącznie w stromie plastydów. Powstają tam głównie kwasy o długości łańcuchów wynoszącej 16 atomów węgla (kwas palmitynowy — rys. 1c) i 18 (kwas stearynowy — rys. 1d). W obrębie plastydów zachodzi również tworzenie pierwszego wiązania podwójnego (Δ -9; synteza kwasu oleinowego rys. 1e). Dalsze etapy modyfikacji reszt kwasów tłuszczowych, jak również tworzenie triacylogliceroli (TAG) zachodzą w cytozolu (rys. 2).



Rys. 2. Schemat biosyntezy kwasów tłuszczowych w komórkach roślinnych — Schematic diagram of the biosynthesis of storage lipids in plant cells
 CoA – koenzym A; G3P – glicerotrifosforan; G3PAT – acylotransferaza G3P; TAG – triacyloglicerol; ACS – syntaza acylo-CoA;
 LPAAT – acylotransferaza kwasu lizofosfatydowego; DAGAT – acylotransferaza diacyloglicerolu; Δ9 DES – desaturaza kwasu stearynowego;
 Δ12 DES – kwasu oleinowego; Δ15 DES – kwasu linolowego [wg Töpfer i in. 1995]
 CoA – koenzym A; G3P – glicerol-3-phosphate; G3PAT – G3P acyltransferase; TAG – triacylglycerol; ACS – acyl CoA synthetase;
 LPAAT – lysophosphatidic acid acyltransferase; DAGAT – diacylglycerol acyltransferase; Δ9 DES – Δ9-stearoyl-ACP desaturase;
 Δ12 DES – Δ12-oleate desaturase; Δ15 DES – Δ15 linolate desaturase [by Töpfer et al. 1995]

Pierwszym etapem ograniczającym szybkość biosyntezy kwasów tłuszczowych w plastydach jest formowanie malonylo-CoA (malonylo-koenzymu A) z acetylo-CoA oraz reszty HCO_3^- . Proces ten, zależny od ATP, katalizowany jest przez karboksylazę acetylo-CoA (E.C. 6.4.1.2). Następnie zachodzi sukcesywne wydłużanie łańcuchów o kolejne dwa atomy węgla. Proces ten katalizowany jest przez kompleks enzymatyczny określany jako syntaza kwasów tłuszczowych (ang. FAS — fatty acid synthase) typu II. Poszczególne enzymy tego kompleksu stopniowo dołączają dwie jednostki węglowe, pochodzące z malonylo-CoA, do rosnącego łańcucha acylowego, przyłączonego do cząsteczki białka przenoszącego grupy acylowe (ang. ACP — acyl carrier protein). Kwasy tłuszczowe utworzone w plastydach (palmitynowy, stearynowy i oleinowy) są odłączane od ACP. Reakcja ta jest katalizowana enzymatycznie przez tioesterazę — hydrolazę oleiloacylo-ACP (E.C. 3.1.2.14). U niektórych gatunków roślin tioesterazy są enzymami kluczowymi, kontrolującymi długość łańcuchów kwasów tłuszczowych krótszych niż 18 atomów węgla. Reszty acylowe są stopniowo eksportowane do cytozolu, a następnie przekształcane w estry acylo-CoA przez enzym — syntazę acylo-CoA, zlokalizowaną w zewnętrznej otoczce plastydów.

Dalsze etapy wydłużania łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz ich modyfikacji zachodzą w cytozolu, na zewnętrznej błonie siateczki śródplazmatycznej. Triacyloglicerole są tworzone poprzez stopniową acylację glicerolo-3-fosforanu (G3P). Acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa katalizuje utworzenie kwasu lizofosfatydowego, który może być przekształcony do fosforanu diacyloglicerolu przez acylotransferazę kwasu lizofosfatydowego (LPAAT, E.C.2.3.1.51); jest to enzym specyficzny substratowo. Na przykład u rzepaku jest on najbardziej efektywny dla kwasów nienasyconych o 18 atomach węgla, natomiast nie włącza on kwasu erukowego oraz kwasów tłuszczowych o średnich łańcuchach węglowych w pozycję drugą (*sn-2*) podczas syntezy triacylogliceroli. Fosforan diacyloglicerolu jest przekształcany z udziałem fosfatazy w diacyloglicerol, który następnie może być przekształcony w triacyloglicerol (poprzez acylotransferazę diacyloglicerolu — DAGAT, E.C. 2.3.1.20), albo może być wykorzystany do syntezy lipidów membranowych. Triacyloglicerole są przechowywane w ciałach tłuszczowych.

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe są produkowane przez desaturazy związane z błonami. Kwas linolowy (rys. 1f) powstaje w wyniku desaturacji kwasu oleinowego, z udziałem desaturazy określanej jako $\Delta 12$ DES. Kwas linolenowy (rys. 1g) natomiast — wskutek desaturacji kwasu linolowego, z udziałem desaturazy $\Delta 15$ DES, określanej również jako desaturaza FAD-3 (ang. fatty acid desaturase) (Barret i in. 1999). U rzepaku i innych gatunków rodzaju *Brassica*, bogatych w kwas erukowy (rys. 1h), odrębny szlak prowadzi do erukoilo-CoA, poprzez dwuetapową elongację oleoilo-CoA (Töpfer i in. 1995) (rys. 2).

Próby modyfikacji składu i zawartości kwasów tłuszczowych w oleju nasion rzepaku

Nasycone kwasy tłuszczowe

— kwas stearynowy, palmitynowy, mirystynowy i laurynowy

Obecnie, olej rzepakowy pochodzący z odmian podwójnie ulepszonych zawiera najniższą ilość nasyconych kwasów tłuszczowych, którymi są kwas palmitynowy i stearynowy (ok. 6% — tab. 2). Jest to cecha korzystna ze względów dietetycznych, gdy olej rzepakowy wykorzystywany jest jako olej salatkowy (tab. 2). Wykazano, że kwasy: laurynowy (rys. 1a) i mirystynowy (rys. 1b) (nie występujące naturalnie w oleju rzepakowym) oraz palmitynowy (rys. 1c) należą do grupy nasyconych kwasów tłuszczowych powodujących wzrost poziomu cholesterolu we krwi, przyczyniając się do rozwoju choroby wieńcowej. Kwas stearynowy (rys. 1d) natomiast nie wywołuje takiego efektu (Eskin i in. 1996). Ze względów komercyjnych dąży się do dalszego obniżenia sumy nasyconych kwasów tłuszczowych — do wartości poniżej 4%, z zastosowaniem metod hodowli rekombinacyjnej oraz mutagenyzy (Scarath i McVetty 1999; Raney i in. 2003).

W przypadku, gdy olej uzyskany z nasion rzepaku jest przetwarzany i wymaga procesu utwardzania, korzystna jest podwyższona zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych. Taki olej stanowiłby alternatywę dla tłuszczów zwierzęcych oraz dla tłuszczów uzyskiwanych z roślin tropikalnych (Scarath 1999). Próbowano uzyskać substytut dla masła kakaowego poprzez podwyższenie zawartości kwasu stearynowego w oleju rzepakowym. W 1992 r. Knutzon i in. (w: Töpfer i in. 1995) obniżyli aktywność desaturazy $\Delta 9$ DES (rys. 2), poprzez represję genu tego enzymu, z zastosowaniem antysensowego cDNA. DNA komplementarny (cDNA) dla sekwencji kodującej $\Delta 9$ DES *Brassica rapa* został poddany, w odwrotnej orientacji, organo-specyficznej ekspresji w nasionach rzepaku, pod kontrolą promotora genu napiny. Spowodowało to znaczny spadek ilości tej desaturazy, wywołując zmniejszenie ilości kwasu oleinowego. W efekcie, w uzyskanych roślinach transgenicznych kwas stearynowy stanowił do 40% zawartości kwasów tłuszczowych. W innych badaniach osiągnięto wzrost zawartości kwasu stearynowego do 11% poprzez transformację genem tioesterazy, specyficznej dla długich łańcuchów u soi (Töpfer i in. 1995). Skrzyżowanie tej linii z linią transgeniczną produkującą 13% kwasu stearynowego dało w efekcie formę produkującą około 45% kwasu stearynowego.

Do ponad 20% podwyższono zawartość kwasów palmitynowego i stearynowego w transgenicznych roślinach rzepaku transformowanych genem acetylotransferazy z *Phaseolus vulgaris* (Töpfer i in. 1995). Natomiast poprzez transformację genem acetylotransferazy z *Cuphea lanceolata* uzyskano rzepak syntetyzujący także kwas mirystynowy i charakteryzujący się wysoką zawartością

kwasów nasyconych; zawartość kwasu mirystynowego i palmitynowego wynosiła około 43% (Rudloff i in. 1999). Uzyskano także transgeniczne rośliny rzepaku syntetyzujące kwas laurynowy (rys. 1a) (38%), wprowadzając gen tioesterazy acylo-ACP z *Umbellularia californica*. Olej taki znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym, chemicznym i kosmetycznym (tab. 1) (Töpfer i in. 1995).

Kwas oleinowy

Jednonienasycony kwas tłuszczowy o osiemnastu atomach węgla — kwas oleinowy (rys. 1e) stanowi ponad 60% zawartości kwasów tłuszczowych w oleju uzyskiwanym z podwójnie ulepszonych odmian rzepaku ozimego (tab. 2). Olej z tych odmian ma charakter uniwersalny i znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym — jako olej sałatkowy, smażalniczy, tłuszcz piekarniczy oraz w przemyśle chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym i technologii (tab. 1). W przypadku, gdy olej poddawany jest działaniu wysokiej temperatury (smażenie), jak również podczas obróbki technologicznej (utwardzanie, estryfikacja metylowa), wymagane jest podwyższenie zawartości kwasu oleinowego w oleju — do około 75% — dla celów spożywczych i powyżej 80% dla celów przemysłowych i technologicznych. Taka modyfikacja powoduje wzrost stabilności oleju.

Aby uzyskać wzrost zawartości kwasu oleinowego stosowano metodę mutagenyzy i hodowli rekombinacyjnej. Uzyskano w ten sposób genotypy *Brassica napus* zawierające powyżej 80% zawartości kwasu oleinowego, przy obniżonej zawartości kwasu linolowego i linolenowego (Wong i in. 1991). W Polsce, w Zakładzie Roślin Oleistych (ZRO) Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR) w Poznaniu, metodą mutagenyzy chemicznej uzyskano wysokooleinowe genotypy (ok. 80%), które są wprowadzane do hodowli (Spasibionek i in. 2000).

Przy realizacji projektów badawczych wykorzystuje się także metody inżynierii genetycznej. W wyniku zastosowania strategii „anty-sensu” uzyskano rośliny, których nasiona zawierały około 83% kwasu oleinowego. Zablockowano ekspresję desaturazy kwasu oleinowego ($\Delta 12$ DES — rys. 2), poprzez transformację roślin genem tej desaturazy, w odwrotnej orientacji. Skrzyżowanie tej linii z mutantem (zawierającym około 78% kwasu oleinowego) pozwoliło uzyskać rośliny zawierające 88% kwasu oleinowego (Töpfer i in. 1995). Rośliny wyjściowe zawierały około 60% tego kwasu. Podobne efekty uzyskano wykorzystując efekt kosupresji — transformując rośliny genem desaturazy $\Delta 12$ DES (Stoutjesdijk i in. 1999).

Kwas linolenowy

Zaletą oleju rzepakowego jest występowanie kwasu linolenowego (rys. 1g), niezbędnego w diecie człowieka, stanowiącego prekursor istotnych dla organizmu metabolitów (Fosatti 1994). Olej rzepakowy odmian podwójnie ulepszonych zawiera około 11% kwasu linolenowego; mniej niż olej nasion soi, więcej natomiast niż olej oliwek i olej palmowy (Scarth i McVetty 1999).

Jednak, ze względu na niestabilność oleju o wysokiej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, programy hodowli rzepaku w świecie są ukierunkowane na obniżanie, do około 3%, zawartości kwasu linolenowego w nasionach rzepaku.

Ponad 25 lat temu uzyskano mutanta rzepaku jarego o obniżonej zawartości kwasu linolenowego — w wyniku poddania odmiany „Oro” chemicznej mutageniezie (Rakow 1973; Röbbelen i in. 1975). Uzyskany mutant (M11) został użyty do krzyżowań z liniami hodowlanymi *B. napus*. Otrzymano w ten sposób odmiany o niskiej zawartości kwasu linolenowego — „Stellar” (Scarth i in. 1988) oraz „Apollo” (Scarth i in. 1994). Olej uzyskiwany z nowych odmian jest bardziej stabilny i trwały (Scarth i McVetty 1999). Dlatego prowadzone są prace mające na celu wprowadzenie tej cechy do odmian hodowlanych rzepaku. Na świecie prace hodowlane nad wprowadzeniem cechy niskiej zawartości kwasu linolenowego do istniejących już stabilnych, podwójnie ulepszonych odmian rzepaku prowadzone są przez firmy hodowlane: Ag Seeds (Australia), Cargill (Francja i Kanada), Danisco Seeds (Dania), Limagrain (Kanada), University of Manitoba (Kanada), Norddeutsche Pflanzenzüchtung (NPZ, Niemcy), AAFC Saskatoon (Kanada), University of Guelph (Kanada), University of Helsinki oraz Boreal Plant Breeding (Finlandia). Uzyskane genotypy zawierają ok. 7% kwasu linolenowego (Scarth i McVetty 1999).

W Polsce, w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu, prowadzone są prace, których celem jest uzyskanie odmian podwójnie ulepszonych, o obniżonej zawartości kwasu linolenowego. Obejmują one, między innymi, wprowadzanie cechy obniżonej zawartości kwasu linolenowego do ozimych odmian podwójnie ulepszonych („00”) poprzez krzyżowanie z jarymi odmianami niskolinolenowymi „Stellar” i „Apollo”. Uzyskane stabilne genotypy (linie wsobne do pokolenia F_8 — ang. near isogenic lines — NILs) zawierają około 3% kwasu linolenowego. Ponadto podejmowano próby uzyskania nowych mutacji drogą mutagenyzy fizycznej poprzez naświetlanie promieniami X oraz działanie mutagenami chemicznymi, jak metanosulfonian etylu (EMS). Mutanty uzyskane wskutek działania promieniami X okazały się niezdolne do życia, natomiast mutagenyza chemiczna (działanie EMS) pozwoliła uzyskać rośliny nadające się do dalszej hodowli (Spasibionek i in. 1998; Spasibionek i in. 2000).

Analiza jakościowa nasion rzepaku pochodzących z genotypów o zmodyfikowanej zawartości kwasów tłuszczowych opierała się, jak dotąd, głównie na badaniach metodami biochemicznymi. Jednak, jak zaznaczono powyżej, ich stosowanie pozwala jedynie na ocenę fenotypu. Wraz z rozwojem metod i technik biologii molekularnej, pracom hodowlanym zaczyna coraz powszechniej towarzyszyć selekcja z zastosowaniem markerów molekularnych. Szczególnie w przypadku selekcji odmian o zróżnicowanej zawartości kwasu linolenowego zastosowanie markerów staje się bardzo pomocne (Sommers i in. 1998). W wielu ośrodkach na

świecie prowadzone są badania mające na celu opracowanie markerów DNA specyficznych dla cechy zawartości kwasu linolenowego. Sklonowano i zsekwencjonowano cDNA desaturazy kwasów tłuszczowych FAD3 rzepaku ozimego (Arondel i in. 1992). Znalezione markery typu RFLP oraz RAPD (Tanhuanpää i in. 1995), jak również SCAR, sprzężone z zawartością kwasu linolenowego (Hu i in. 1999). Scharakteryzowano także *loci* sprzężone z zawartością kwasu linolenowego z zastosowaniem markerów typu RAPD (Jourden i in. 1996a) oraz RFLP (Thormann i in. 1996). Sukcesem badawczym było znalezienie markerów DNA specyficznych dla alleli genu FAD3, występujących w odmianach jarych typu Stellar i Apollo. Zostały one opatentowane i są dostępne za opłatą licencyjną (Barret i in. 1999). Również w ZRO IHAR w Poznaniu prowadzone są badania mające na celu zastosowanie markerów DNA sprzężonych z niską zawartością kwasu linolenowego w rekombinantach uzyskanych w wyniku krzyżowań linii podwójnie ulepszonych rzepaku ozimego z odmianami Stellar i Apollo (Mikołajczyk i in. 1999) oraz opracowanie markerów DNA specyficznych dla uzyskanych niskolinolenowych mutantów.

Kwas erukowy

Kwas erukowy (rys. 1h) jest jednonienasyconym kwasem tłuszczowym należącym do grupy tzw. kwasów tłuszczowych o bardzo długim łańcuchu (ang. VLCFA — very long chain fatty acids). Występuje naturalnie w wysoko-erukowych (ang. HEAR — high erucic acid rapeseed) odmianach rzepaku, gdzie stanowi około 50% ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych u form ozimych, a około 40% u form jarych (tab. 2). Stosowany jest jako dodatek do smarów i rozpuszczalników, środek zmiękczający tkaniny oraz pochodna amidowa w syntezie polimerów (Töpfer i in. 1995), a także może być stosowany jako materiał wyjściowy do produkcji tworzyw sztucznych, odpornych na wysoką temperaturę. Jednak możliwości te nie są wykorzystywane, ponieważ 50% zawartości tego kwasu w oleju rzepakowym stanowi o nieopłacalności procesów technologicznych. Gdyby zawartość kwasu erukowego wynosiła ponad 90% w oleju, wtedy znalazłby on szerokie zastosowanie w przemyśle oraz w technologii. Podejmowano próby modyfikacji zawartości kwasu erukowego w oleju nasion rzepaku z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej. Transformacja roślin rzepaku o wysokiej zawartości kwasu erukowego (HEAR) konstruktem zawierającym gen LPAAT (rys. 2) z *Lymnanthes douglasii* L. — rośliny wytwarzającej trierucynę (9% ogólnej zawartości triacylogliceroli) umożliwiła uzyskanie roślin rzepaku zawierających trierucynę. Jednak ogólny poziom kwasu erukowego u tych transformantów nie przekroczył poziomu roślin nietransformowanych. Nieco lepsze efekty uzyskano w przypadku, gdy najpierw blokowano endogenną LPAAT z zastosowaniem strategii „anty-sensu”, a potem wprowadzano LPAAT egzogenną (Lühs i in. 1999).

Dla celów spożywczych natomiast wymagane jest wyeliminowanie kwasu erukowego z oleju, ponieważ jest on szkodliwy. W przypadku hodowli odmian bezerukowych, metody analizy chromatograficznej zawartości kwasów tłuszczowych są dogodne i skuteczne; odmiany zeroerukowe są jednocześnie homozygotami. Natomiast podczas selekcji odmian wysokoerukowych sytuacja jest bardziej złożona, ponieważ cecha ta kontrolowana jest przez dwa geny, więc jednoznaczna identyfikacja homozygot jest niemożliwa z zastosowaniem jedynie klasycznych metod selekcji — w oparciu o analizy cech fenotypowych. Dlatego poszukiwano markery DNA, które umożliwiłyby rozróżnienie homo- od heterozygoty. Analizowano pokolenie linii podwojonych haploidów uzyskane z krzyżowania odmian wysoko- i niskoerukowych. Z wykorzystaniem markerów typu RAPD określono dwie grupy — dwa *loci*: E1 oraz E2, sprzężone z cechą wysokiej zawartości kwasu erukowego (Jourden i in. 1996b; Thormann i in. 1996)

Podsumowanie

- Olej rzepakowy stanowi cenne źródło kwasów tłuszczowych znajdujących szerokie zastosowanie w żywieniu człowieka i zwierząt, w przemyśle spożywczym, chemicznym, farmaceutycznym, kosmetycznym oraz do produkcji biopaliwa. W zależności od sposobu wykorzystania, wymagana jest różna zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym.
- Wyznaczenie celów i kierunków hodowli jakościowej odmian rzepaku ozimego o zróżnicowanym składzie i zawartości kwasów tłuszczowych wydaje się być priorytetowym zadaniem, kluczowym dla wielu dziedzin.
- Jednym z zadań hodowli jakościowej jest uzyskanie genotypów charakteryzujących się zróżnicowanym składem i zawartością kwasów tłuszczowych w oleju otrzymanywanym z nasion rzepaku.
- Ważne jest, aby procesowi selekcyjnemu towarzyszyła analiza genotypów z zastosowaniem markerów molekularnych. Opracowanie markerów użytecznych w hodowli jakościowej jest procesem kompleksowym. Analiza szlaków metabolicznych, prowadzących do powstania określonych kwasów tłuszczowych umożliwia ukierunkowanie badań, mających na celu znalezienie markerów specyficznych dla danego genu. Mogą one stanowić skuteczne i efektywne narzędzie selekcji.

Summary

- Oil obtained from rapeseed is a valuable source of fatty acids used for human nutrition and livestock feeding as well as a raw material in industry (food, chemicals, pharmaceuticals, cosmetics) and also in technology — for biofuel production. There is a need for differentiation of fatty acids content and composition in rapeseed oil with respect to its application.
- Assignment of the main tasks and directions of the rapeseed quality breeding concerning the differentiation of fatty acids content and composition seems to be important and crucial for several scopes.
- One of the aims of rapeseed quality breeding is the obtaining of the genotypes with specific, differentiated fatty composition in rapeseed oil.
- It is important for the selection process to be accompanied by the analysis of genotypes with the use of molecular markers. The development of specific markers used in marker assisted selection is an intricate process. The analysis of metabolic pathways involved in fatty acids synthesis could be very helpful in establishing the crucial points of its regulation and thereby for the designation of further investigations connected with the development of specific markers.

Literatura

- Aronel V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H.M., Somerville C.R. 1992. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science*, 258: 1353-1355.
- Altin R., Çetinkaya S., Yücesu H.S. 2001. The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines. *Energy Conversion and Management*, 42: 529-538.
- Barret P., Delourme R., Brunel D., Jourden C., Horvais R., Renard M. 1999. Low linolenic acid level in rapeseed can be easily assessed through the detection of two single base substitution in *FAD3* genes. Proc. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29.09.1999, CD ROM.
- Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. 1983. Inheritance of C-18 fatty acids composition in seed oil of zero erucic winter rape *Brassica napus* L. 6th International Rapeseed Conference Paris 17-19 Mai 1983 (1): 477-482.
- Bartkowiak-Broda I. 1997. Markery molekularne w hodowli rzepaku. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVIII (2): 581-585.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze jadalne*, XIII: 108-114.
- Eskin N.A.M., Macdonald B.E., Przybylski R., Malcomson L.J., Scarth R., Mag T., Ward K., Adolphe D. 1996. Canola Oil. Chapter 1 in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Fifth edition. Vol. 2. *Edible Oil and Fat Products: Oils and Oilseeds*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1-95.

- Evans D.E., Rothnie N.E., Palmer M.V., Burke D.G., Sang J.P., Knox R.B., Williams E.G., Hilliard E.P., Salisbury P.A. 1987. Comparative analysis of fatty acids in pollen and seed of rapeseed. *Phytochemistry*, 26 (7): 1895-1897.
- Fitzpatrick K., Scarth R. 1998. Improving the health and nutritional value of seed oils. P.B.I. Bulletin. NRC-CRC, January: 15-19.
- Fosatti P. 1994. Les huiles de poisson: actualites scientifiques et medicales. *OCL*, 1 (3): 178-180.
- Haley S.D., Afandor L.K., Miklas P.N., Stavely J.R., Kelly J.D. 1994. Heterogenous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localisation. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 337-342.
- Harwood J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301: 7-56.
- Hu J., Li G., Struss D., Quiros C.F. 1999. SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed, *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 118: 145-150.
- Jourdren C., Barret P., Horvais R., Delourme R., Renard M. 1996a. Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica*, 90: 351-357.
- Jourdren C., Barret P., Horvais R., Foisset N., Delourme R., Renard M. 1996b. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic acid level in rapeseed. *Molecular Breeding*, 2: 61-71.
- Kesseli R.V., Paran I., Michelmore R.W. 1992. Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers. In: *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series*, 1 Nov. 1992, Minneapolis, Minnesota. Edited by: Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science. American Genetic Association, 31-37.
- Krzymański J. 1970. Genetyczne możliwości ulepszenia składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. *Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 14 (2): 95-133.
- Krzymański J. 1984. Hodowlane możliwości ulepszenia zawartości oleju i białka w nasionach rzepaku. *Wyniki badań nad rzepakiem ozimym 1983. IHAR Radzików*: 104-111.
- Krzymański J. 1997. *Hodowla jakościowa roślin. W: Hodowla Roślin. Materiały z I Krajowej Konferencji, Poznań, 19-20 listopada 1997*: 333-337.
- Lühs W.W., Voss A., Sevis F., Friedt W. 1999. *Molecular Genetics of Erucic Acid Content in the Genus Brassica. Proc. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29.09. 1999, CD ROM*.
- Mikołajczyk K., Spasibonek S., Krzymański J. 1999. Poszukiwanie markerów DNA sprzężonych z cechą obniżonej zawartości kwasu linolenowego w materiałach hodowlanych rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XX (2): 414-421.
- Murphy D.J. 1996. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Tibtech*, 14: 206-213.
- O'Hara P., Slabas A., Fawcett T. 2002. Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. *Plant Physiology*, 129: 310-320.
- Rakow G. 1973. Selektion auf Linol- und Linolensauergerhalt in Rapsamen nach mutagener Behandlung. *Z. Pflanzenzüchtung*, 69: 62-82.
- Rakow G., Raney J.P. 2003. Present status and future perspectives of breeding for seed quality in *Brassica* oilseed crops. *Proc. 11th International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark, 6-10 July 2003*, 181-185.
- Raney J.P., Olson T.V., Rakow G. 2003. Reduction in saturated fat content of *Brassica napus* canola through interspecific crosses and mutagenesis. *Proc. 11th International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark, 6-10 July 2003*, 190-192.

- Ribaut J.-M., Hu X., Hoisington D., González-de-León D. 1997. Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection-backcross scheme. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 15 (2): 154-162.
- Roy N.N., Tarr A.W. 1987. Prospects for the development of rapeseed (*Brassica napus* L.) with improved linoleic and linolenic acid content. *Plant Breeding*, 98: 89-96.
- Röbbelen G., Nitsch A. 1975. Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acids in rapeseed (*B. napus* L.) I. Selection and description of new mutants. *Z. Pflanzenzüchtung*, 75: 93-105.
- Rudloff E., Jürgens H.U., Ruge B., Wehling P. 1999. Selection in transgenic lines of oilseed rape (*Brassica napus* L.) with modified seed oil composition. Proc. 10th Int Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29.09.1999, CD ROM.
- Scarth R., McVetty P.B.E. 1999. Designer oil Canola – a review of a new food-grade *Brassica* oils with focus on high oleic, low linolenic types. Proc. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29.09.1999, CD ROM.
- Scarth R., McVetty P.B.E., Rimmer S.R., Stefansson B.R. 1988. 'Stellar' low linolenic-high linoleic acid summer rape. *Can. J. Plant Sci.*, 68: 509-511.
- Scarth R., Rimmer S.R., McVetty P.B.E. 1994. Apollo low linolenic acid summer rape. *Can. J. Plant Sci.*, 75: 203-204.
- Simopoulos A.P. 2000 Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*, 79: 961-970.
- Slabas A.R., White A., O'Hara P., Fawcett T. 2002. Investigations into the regulation of lipid biosynthesis in *Brassica napus* using antisense down-regulation. *Biochemical Society Transactions*, 30: 1056-1059.
- Sommers D.J., Friesen K.R.D., Rakow G. 1998. Marker assisted selection of low linolenic acid in oilseed species. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 897-903.
- Spasibionek S., Byczyńska B., Krzymański J. 1998. Wpływ środowiska na zmiany składu kwasów tłuszczowych w oleju mutantu 1207 rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XIX (2): 627-632.
- Spasibionek S., Byczyńska B., Krzymański J. 2000 Mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszonych o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI (3): 715-724.
- Stoutjesdijk P.A., Hurlstone C., Singh S.P., Green A.G. 1999. Genetic Manipulation for Altered Oil Quality in *Brassicas*. Proc. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29.09.1999, CD ROM.
- Tanhuanpää P.K., Vilkki J.P., Vilkki H.J. 1995. Association of a RAPD marker with linolenic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome*, 38: 414-416.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology*, 7: 257-264.
- Thormann C.E., Romero J., Mantet J., Osborn T.C. 1996. Mapping loci controlling concentrations of erucic and linolenic acids in seed oil of *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 897-903.
- Töpfer R., Martini N., Schell J. 1995. Modification of plant lipid synthesis. *Science*, 268: 681-686.
- Wong R., Patel J.D., Grant I., Parker J., Charne D., Elhalwagy M., Sys E. 1991. The development of high oleic canola. GCIRC 1991 Congress, Saskatoon, Canada, A16: 53.