

Stanisław Spasibonek

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Nowy mutant rzepaku ozimego o podwyższonej zawartości kwasów palmitynowego i stearynowego w oleju nasion

New winter oilseed rape mutant with increased palmitic and stearic acid content in seeds oil

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, mutageniza chemiczna, skład kwasów tłuszczowych, kwas palmitynowy, kwas stearynowy

Key words: winter oilseed rape, *Brassica napus* L., chemical mutagenesis, fatty acid composition, palmitic acid, stearic acid

W pracach mających na celu uzyskanie większej zmienności w składzie kwasów tłuszczowych oleju nasion rzepaku (*Brassica napus* L.) zastosowano mutagenizację chemiczną. Nasiona linii o typowym dla rzepaku ozimego podwójnie ulepszonym składzie kwasów tłuszczowych, tj. 4,7% kwasu palmitynowego, 1,5% kwasu stearynowego, 67,1% kwasu oleinowego, 16,8% kwasu linolowego i 8,6% kwasu linolenowego traktowano metanosulfonianem etylu (EMS). W pokoleniu M_2 po traktowaniu mutagenem wyselekcjonowano zmutowaną roślinę 1292/98i o wysokiej zawartości kwasów nasyconych. U znalezionej mutanta w pokoleniu M_3 nastąpił wzrost zawartości kwasów: palmitynowego do 11,5% oraz stearynowego do 6,8%. Otrzymany mutant stanowi nowe źródło zmienności genetycznej, które będzie można wykorzystać w hodowli odmian o podwyższonej zawartości kwasów nasyconych.

Research works were conducted on inducing mutations in composition of fatty acid in seed oil of winter rapeseed (*Brassica napus* L.). The seeds of double low winter oilseed rape line with typical fatty acid composition in oil: 4.7% of palmitic acid, 1.5% of stearic acid, 67.1% of oleic acid, 16.8% of linoleic acid and 8.6% of linolenic acid were treated with ethyl methanesulphonate (EMS). In M_2 generation after mutagen treatment mutated line 1292/98i with high saturated fatty acid content in the seed oil was selected. The mutant has a palmitic acid content increased to 11.5% and stearic acid content increased to 6.8%. Obtained lines of mutant are a very important new source of genetic variability necessary for study and breeding of rapeseed varieties with increased saturated acid content.

Wstęp

Uprawiane obecnie polskie i zagraniczne odmiany rzepaku ozimego podwójnie ulepszonych dostarczają oleju o bardzo wysokiej wartości biologicznożywnościowej, którą zawdzięczają obecności kwasów tłuszczowych o różnym

stopniu nienasylenia. Znaczenie tłuszczów roślinnych zarówno w przemyśle spożywczym jak i w przemyśle chemicznym zależy w dużej mierze od zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych oraz proporcji pomiędzy kwasami nasyconymi a kwasami jedno- i wielonienasyconymi. Najkorzystniejszy skład kwasów tłuszczowych w olejach roślinnych wykorzystywanych do celów spożywczych musi być kompromisem pomiędzy wymogami żywieniowymi a żądaniami przemysłu spożywczego. Z punktu widzenia żywieniowego zawartość kwasów nasyconych powinna być możliwie najniższa i z tego względu olej rzepakowy zaliczany jest do najwartościowszych z wszystkich głównych roślin oleistych (Scarth, Mc Vetty 1999). Zawiera tylko około 4,5% kwasu palmitynowego ($C_{16:0}$) i około 1,5% kwasu stearynowego ($C_{18:0}$) (Krzymański, Downey 1969; Krzymański 1970a, 1993a).

Właściwości fizyczne kwasów tłuszczowych i ich pochodnych są zdeterminowane długością oraz stopniem nienasylenia łańcucha węglowodorowego (Heinz 1993). Nienasycone kwasy tłuszczowe wykazują niższe temperatury topnienia niż kwasy nasycone o tej samej liczbie atomów węgla. Krótsze łańcuchy kwasów tłuszczowych oraz większy stopień nienasylenia zwiększają ich płynność. Pozyskiwany z nasion rzepaku olej ciekły ma ograniczone zastosowanie, dlatego musi być poddawany procesowi utwardzania. Zabieg utwardzania stosowany jest po to, aby uzyskać z oleju ciekłego tłuszcz stały, potrzebny do wyrobu margaryn, tłuszczów cukierniczych, piekarskich i in. Najprostszy sposób utwardzania to mechaniczne mieszanie olejów z wysokotopniejącymi naturalnymi tłuszczami stałymi, pochodzącymi z roślin bogatych w nasycone kwasy tłuszczowe, między innymi z palmy oleistej lub kokosowej. Najczęściej stosowaną metodą utwardzania olejów jest poddawanie ich katalitycznemu uwodornianiu. Zabieg ten prowadzi do przyłączenia wodoru do podwójnych wiązań nienasyconych kwasów tłuszczowych i przekształca je w kwasy nasycone, co podnosi temperaturę topnienia tłuszczu. Procesowi przyłączenia wodoru towarzyszy tworzenie izomerycznych, nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie izomerów kwasu oleinowego $C_{18:1}$. Są to kwasy niespotykane w tłuszczach naturalnych, o przesuniętym wiązaniu podwójnym w łańcuchu, z których część przyjmuje konfigurację trans (Jakubowski, Braczkowski 1998). Tworzenie się niepożądanych izomerów trans kwasów tłuszczowych prawdopodobnie zwiększa ryzyko powstawania zakrzepów w tętnicy wieńcowej (Kinney 1996).

Poza priorytetowym kierunkiem uzyskania oleju o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego i obniżonej zawartości kwasu linolowego, kierunek prac nad uzyskaniem naturalnie utwardzonego oleju rzepakowego, tj. o wysokiej zawartości kwasów nasyconych, a szczególnie kwasu palmitynowego, mieści się w nurcie najnowszych światowych badań.

Celem niniejszej pracy było wywołanie mutacji działaniem metanosulfoniem etylu (EMS) na nasiona rzepaku oraz selekcja pożądaných mutantów poprzez badanie kolejnych pokoleń otrzymanych z roślin traktowanych mutagenem.

Material i metoda

Do badań nad indukowaną chemicznie mutagenezą przeprowadzonych jesienią 1998 roku użyto rodu hodowlanego podwójnie ulepszanego rzepaku ozimego PN 5282/98 wytworzonego w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu. Ród ten plonował w doświadczeniach polowych w roku 1998 na poziomie 119,3% wzorca, którym była odmiana Bor. Zawartość tłuszczu w nasionach wynosiła 49,8%, a udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju był typowy dla odmian podwójnie ulepszonych i wynosił: palmitynowego — 4,7%, stearynowego — 1,5%, oleinowego — 67,1%, linolowego — 16,8%, linolenowego — 8,6%. Ponadto ród ten charakteryzował się bardzo niską zawartością glukozyolanów, wynoszącą średnio 5,2 $\mu\text{M/g}$ nasion.

Do indukowania zmian mutacyjnych w składzie kwasów tłuszczowych oleju nasion rzepaku użyto substancji alkilującej metanosulfonianu etylu (EMS).

Nasiona rodu PN 5282/98 były wstępnie moczone w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej (20°C) przez dwanaście godzin. Po zdekantowaniu wody i osączeniu nasion na bibule zalano je 1% roztworem EMS. Roztwór EMS przygotowano w buforze fosforanowym o pH = 7. Nasiona pozostawały w roztworze mutagenu przez 8 godzin, w tym 2 godziny w temperaturze 4°C i 6 godzin w temperaturze pokojowej (około 23°C). Po zdekantowaniu roztworu mutagenu, nasiona wmywano przez 16 godzin pod bieżącą wodą wodociągową. Nasiona po powierzchniowym osuszeniu zostały wysiane bezpośrednio na poletkach doświadczalnych.

Nasiona poddawane mutagenezie oraz linie kontrolne rozmnażano każdorazowo w szkółkach selekcyjnych. W pierwszym etapie prowadzenia selekcji w sezonie wegetacyjnym 1998/99 w celu znalezienia pożądanych mutantów do oceny laboratoryjnej zebrano 374 roślin pokolenia M₁. Zebrane rozmnożenie roślin M₁ omłócono indywidualnie, a otrzymane nasiona pokolenia M₂ poddano selekcji wykorzystując do tego analizę składu kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.

U większości selekcionowanych pojedynków pokoleń M₂ – M₃ poza oznaczeniem zawartości kwasów tłuszczowych: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, linolenowego, eikozenowego i erukowego w oleju nasion prowadzono również laboratoryjną ocenę procentowej zawartości tłuszczu.

Skład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą chromatografii gazowej na chromatografie firmy Pye, model 104 z detektorem płomieniowo-jonizującym (Byczyńska i Krzymański 1969).

Analizę zawartości tłuszczu w nasionach wykonywano za pomocą szerokopasmowego analizatora magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) firmy Newport Instruments Ltd (Krzymański 1970b).

Analizę statystyczną wyników dla poszczególnych cech jakościowych z przebiegu selekcji mutantów wykonano korzystając z arkusza kalkulacyjnego Excel.

Wyniki i dyskusja

W wyniku dotąd prowadzonych prac badawczych w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR mających na celu uzyskanie większej zmienności w zawartości kwasów tłuszczowych jedno- ($C_{18:1}$) i wielonienasyconych ($C_{18:2} + C_{18:3}$) w oleju nasion rzepaku wykorzystywano mutagenезę indukowaną chemicznie otrzymując mutanty zawierające średnio 78% kwasu oleinowego oraz 12% sumy kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego). Zastosowane drastyczne warunki indukcji mutagenезy oraz jej wielokrotne powtarzanie, spowodowały nie tylko duże zmiany w zawartości kwasów 18-węglowych, ale również były przyczyną niekorzystnych deformacji morfologicznych i małej żywotności roślin, co bardzo wydłużało i utrudniało proces selekcji. Prowadzony chów wsobny przez siedem kolejnych pokoleń ustabilizował istotnie zmienione zawartości kwasów tłuszczowych, natomiast nie doprowadził do uzyskania linii o dobrych parametrach agronomicznych (Spasibionek i in. 2000).

W 1998 roku w celu wywołania nowych zmian mutacyjnych składu kwasów tłuszczowych zastosowano niższe stężenie metanosulfonianu etylu, wydłużając czas jego działania na nasiona. W zebranej dużej populacji 375 roślin pokolenia M_2 zawartość kwasu palmitynowego wyniosła średnio 5,0%, kwasu stearynowego 1,3%, kwasu oleinowego 67,1%, kwasu linolowego 16,6% i kwasu linolenowego 8,6%. Roślina 1292/98i jako jedyna spośród całej przebadanej populacji charakteryzowała się istotnie większą zawartością kwasu palmitynowego (do 7,3%). Dalszy istotny wzrost zawartości kwasów palmitynowego i stearynowego w następnym pokoleniu wskazuje, że wyselekcjonowano mutanta o zmienionych proporcjach nasyconych kwasów tłuszczowych w oleju nasion (tab. 1). Z pokolenia M_3 do dalszych badań wytypowano roślinę 81/8i o najlepszych parametrach, tj. najwyższej zawartości kwasu palmitynowego — 11,5% — oraz najwyższej zawartości kwasu stearynowego — 6,8% (rys. 1). Wartości współczynników zmienności wyniosły: dla kwasu palmitynowego — 35,2%, dla kwasu stearynowego — 74,9% (tab. 1). Zawartość tłuszczu w nasionach potomstwa wyselekcjonowanej linii mutanta wahała się od 40,1 do 46,7% (tab. 1).

W celu wyeliminowania wpływu warunków środowiska na syntezę kwasów tłuszczowych, uzyskane w badanych liniach zawartości kwasów tłuszczowych porównywano z rodem wyjściowym PN 5282/98 w każdym roku prowadzonej selekcji.

Większość prac związanych z hodowlą mutacyjną rzepaku koncentrowała się nad podwyższeniem zawartości kwasu oleinowego i obniżeniem zawartości kwasu linolenowego. Niewiele badań wykorzystujących mutagenезę poświęconych było zmianom składu nasyconych kwasów tłuszczowych w rzepaku. Schnurbusch i in. (2000) wykorzystując metanosulfonian etylu (EMS) wyselekcjonowali linię o podwyższonej do 9,2% zawartości kwasu palmitynowego w stosunku do linii rodzicielskiej (4,5% tego kwasu).

Tabela 1

Zróznicowanie składu kwasów tłuszczowych: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego i linolenowego w oleju nasion mutantu M-1292 w porównaniu z rodem kontrolnym PN 5282/98 w kolejnych latach badań — *Changes of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid content in oil seeds of mutant M-1292 in comparison with original material PN 5282/98 in successive years of tests*

C_{16:0} kwas palmitynowy — *palmitic acid* [%] C_{18:2} kwas linolowy — *linoleic acid* [%]

C_{18:0} kwas stearynowy — *stearic acid* [%] C_{18:3} kwas linolenowy — *linolenic acid* [%]

C_{18:1} kwas oleinowy — *oleic acid* [%] T — zawartość tłuszczu — *oil content* [% s.m. d.m.]

Pokolenie, rok badań <i>Generation, year of test</i>	Liczba roślin <i>No. of plants [n]</i>	Rodzaj kwasu <i>Fatty acid</i>	Oznaczone parametry <i>Parameters</i> [%]			Wariancja <i>Variance</i>	Współ- czynnik zmienności CoV
			średnia <i>mean</i>	min	max		
Ród poddany mutagenzie <i>The strain treated with mutagenesis PN 5282/98</i>	9	C _{16:0}	4,7	4,2	5,3	0,12	1,2
		C _{18:0}	1,4	1,2	1,9	0,05	0,8
		C _{18:1}	67,1	66,4	68,3	0,74	2,9
		C _{18:2}	16,8	15,7	18,5	0,84	3,1
		C _{18:3}	8,6	7,9	10,1	0,47	2,3
		T	48,7	46,5	50,2	2,67	5,4
Kontrola <i>Control 1999 PN 5282/98</i>	48	C _{16:0}	4,9	4,0	5,7	0,15	7,9
		C _{18:0}	1,2	0,7	1,7	0,06	19,0
		C _{18:1}	67,6	62,6	70,9	2,91	2,5
		C _{18:2}	17,0	13,4	20,6	2,88	10,1
		C _{18:3}	8,1	6,4	10,4	0,69	10,2
		T	49,3	47,2	50,9	1,21	2,2
M ₂ /1999 Cała populacja <i>All population</i>	375	C _{16:0}	5,0 *	4,1	7,3	0,34	11,6
		C _{18:0}	1,3 *	0,6	2,4	0,04	15,9
		C _{18:1}	67,1	55,2	71,9	3,93	3,0
		C _{18:2}	16,6	13,1	23,8	2,21	8,9
		C _{18:3}	8,6 **	5,4	13,1	1,07	12,0
		T	48,1 **	46,0	49,5	0,54	1,5
M ₂ /1999 Znaleziony mutant <i>Mutant of selected 1292/98i</i>	1	C _{16:0}	7,3 ** (**)	—	—	—	—
		C _{18:0}	1,2				
		C _{18:1}	67,7				
		C _{18:2}	13,8				
		C _{18:3}	8,6				
		T	48,1				

Ciąg dalszy tabeli 1

Kontrola <i>Control</i> 2001 PN 5282/98	36	C _{16:0}	5,2	4,4	5,9	0,40	7,7
		C _{18:0}	1,6	1,2	2,0	0,19	12,1
		C _{18:1}	61,0	57,4	64,8	1,94	3,2
		C _{18:2}	20,7	18,1	24,1	1,38	6,7
		C _{18:3}	10,0	8,5	11,3	0,62	6,1
		T	44,6	39,4	51,5	8,37	6,5
		M ₃ /2001 Potomstwo wybranej linii <i>Generatin line</i> <i>of selected</i> M-81	9	C _{16:0}	6,0	5,0	11,5
C _{18:0}	2,2 *			1,5	6,8	2,67	74,9
C _{18:1}	59,8 *			55,0	64,9	13,07	6,1
C _{18:2}	21,8 **			17,3	26,5	8,62	13,5
C _{18:3}	9,2 *			7,0	11,0	1,23	12,1
T	44,1			40,1	46,7	5,50	5,9
M ₃ /2001 Wybrana roślina <i>Plant of selected</i> 81/8i	1			C _{16:0}	11,5 ** (**)	—	—
		C _{18:0}	6,8 ** (*)				
		C _{18:1}	56,1 *				
		C _{18:2}	17,3 *				
		C _{18:3}	7,0 ** (*)				
		T	44,2				

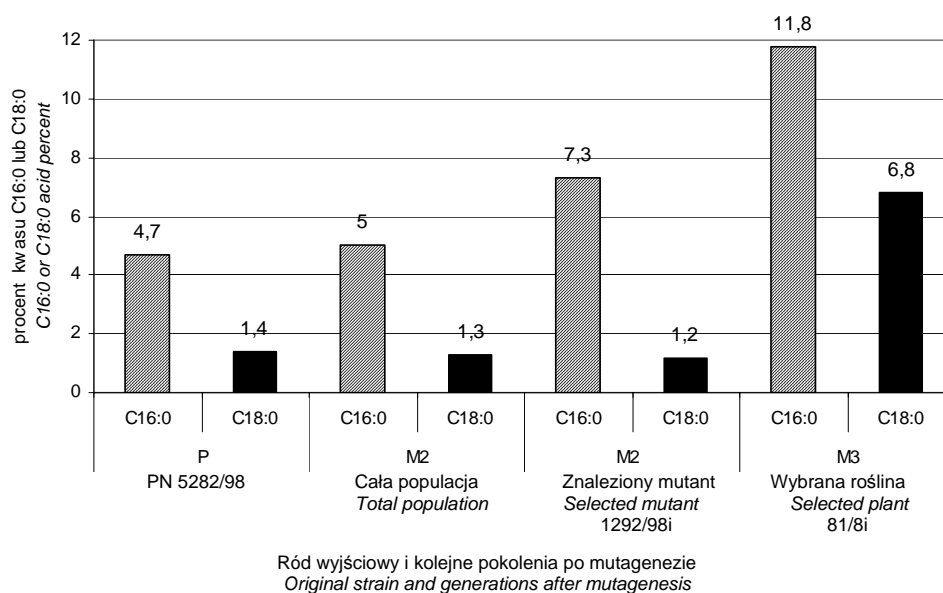
* — porównania dokonano między średnią rodu wyjściowego PN 5282/98 a średnią wszystkich badanych roślin w pokoleniu M₂ i M₃ po mutageniezie oraz ze zmutowaną rośliną — *comparison between mean value of original strain PN 5282/98 and mean value of all plants in M₂ and M₃ generations after mutagenesis or comparison with selected mutated plant*

(*) — porównania dokonano między średnią wszystkich badanych roślin w pokoleniu M₂ i M₃ po mutageniezie a zmutowanymi roślinami — *comparison between mean value of all plants in M₂ and M₃ generations after mutagenesis or comparison with selected mutated plants*

* — istotność na poziomie $\alpha = 0,05$ — *significant at level $\alpha = 0.05$*

** — istotność na poziomie $\alpha = 0,01$ — *significant at level $\alpha = 0.01$*

Mutagenieza odegrała istotną rolę w poszukiwaniu nowych źródeł genetycznej zmienności u słonecznika. Tą drogą udało się uzyskać linie słonecznika o zmniejszonej zawartości kwasów nasyconych, palmitynowego i stearynowego. Ivanov i in. (1988) działając na nasiona słonecznika promieniami γ uzyskali mutantą 275HP o podwyższonej zawartości kwasu palmitynowego, z 7% w materiale wyjściowym do 25,1% w omawianym mutancie. W pracach Osorio i in. (1995) wykorzystano chemiczną mutageniezę, działając na nasiona metanosulfonianem etylu (EMS) i azydkiem sodu (NaN₃), co spowodowało wyselekcjonowanie dwóch mutantów CAS-5 i CAS-4 o podwyższonej zawartości kwasu stearynowego, odpowiednio do 26 i 11,3%, gdy linia rodzicielska RDF-1-532 zawierała 5,5% tego kwasu. Następnie Osorio i in. (1995) poddawali napromieniowaniu promieniami X nasiona linii BSD-2-691, uzyskując mutantą CAS-5, w którym zawartość kwasu



Rys. 1. Zmiany zawartości kwasu palmitynowego $C_{16:0}$ i stearynowego $C_{18:0}$ w rodowodzie mutantu M-1292 w pokoleniach P, $M_1 - M_3$ — Changes of palmitic $C_{16:0}$ and stearic $C_{18:0}$ acid content in pedigree of mutant M-1292 in generations P, $M_1 - M_3$

palmitynowego wzrosła z 5,5 do 25,2%. Uzyskane mutanty słonecznika o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych posłużyły do dalszych badań mających na celu znalezienie sprzężeń genów z cechami podwyższonej zawartości kwasu palmitynowego i stearynowego. Perez-Vich i in. (1999) na podstawie analizy genetycznej znaleźli trzy geny $p1$, $p2$ i $p3$, które są zaangażowane w kontrolę wysokiej zawartości kwasu palmitynowego u mutantu słonecznika CAS-5. Szczegółowe badania tych autorów wykazały, że allele $p2$ i $p3$ były już obecne w linii wyjściowej BSD-2-691 użytej do mutagenyzy, natomiast allel $p1$ powstał w wyniku działania mutagenu.

Większość prac związanych z hodowlą mutacyjną lnu koncentrowała się nad obniżaniem zawartości kwasu linolenowego, natomiast Rowland i Bhatti (1990) poddali działaniu EMS nasiona odmiany McGregor o typowym dla lnu składzie kwasów tłuszczowych, tj.: palmitynowy 6,8%, stearynowy 3,7%, oleinowy 17,9%, linolowy 15,8% i linolenowy 54,5%. Uzyskali mutantu E-67 o podwyższonej zawartości kwasu palmitynowego do 28,4%.

Knapp i Tagliani (1991) poddawali mutageniezy nasiona dzikich gatunków roślin oleistych, między innymi *Cuphea viscosissima* Jacq., bogatej w kwas kaprylowy ($C_{8:0}$) i kaprynowy ($C_{10:0}$). Uzyskano mutantu charakteryzującego się drastycznym obniżeniem obu tych kwasów (kaprylowego z 20,7 do 0,5%, kaprynowego z 68,6 do 6,7%). W zamian wzrosły zawartości kwasu mirystynowego ($C_{14:0}$)

z 1,0 do 29,5%, palmitynowego z 1,7 do 25,3%, oleinowego z 1,6 do 14% oraz linolowego z 2,7 do 14,3%. Uzyskany drugi mutant charakteryzował się obniżoną zawartością kwasu kaprylowego z 19,8 do 3,9%; został on zastąpiony przez kwas laurynowy (C_{12:0}), którego zawartość wzrosła z 2,2 do 14,3%. Oba mutanty były wynikiem mutacji pojedynczych genów *mcm-1* i *cpy-1*.

Jak wynika z uzyskanych zmian składu kwasów tłuszczowych w hodowli roślin indukowanie mutacji jest ciągle efektywnym sposobem wzbogacania istniejącej zmienności genetycznej, wykorzystywanej dla ulepszania odmian (Micke i in. 1987). Wiele przykładów zastosowań udanych mutacji potwierdziło, że hodowla mutacyjna jest skutecznym i ważnym narzędziem postępu hodowlanego, również w przypadku roślin oleistych (Röbbelen 1990; Velasco i in. 1999).

Modyfikacje składu kwasów tłuszczowych można uzyskać nie tylko wykorzystując mutagenezę, ale również przez użycie antysensownego DNA. Ten sposób modyfikacji zastosowano w transgenicznym roślinie tytoniu z antysensownym DNA, blokującym ekspresję genu mikrosomalnej desaturazy ω -3 oraz zmieniając skład oleju rzepakowego przez wprowadzenie antysensownego DNA, wyłączającego ekspresję genu desaturazy stearylo-ACP, co spowodowało wzrost ilości kwasu stearynowego z 2 do 40% w nasionach *Brassica rapa* i *Brassica napus* (Knutzon i in. 1992; Hamada i in. 1996).

Wnioski

W wyniku traktowania nasion rzepaku ozimego mutagenem chemicznym, metanosulfonianem etylu znaleziono zmutowaną roślinę charakteryzującą się zwiększoną zawartością kwasów nasyconych: palmitynowego i stearynowego.

Otrzymany mutant stanowi nowe źródło zmienności genetycznej, które będzie można wykorzystać w hodowli odmian o podwyższonej zawartości kwasów nasyconych.

Otrzymany mutant stanowi również podstawę do dalszych badań mających na celu znalezienie markerów DNA sprzężonych z cechą podwyższonej zawartości kwasów nasyconych.

Conclusions

Mutated plant with increased saturated fatty acid content: palmitic acid content C_{16:0} and stearic acid content C_{18:0} were found as the result of mutagen, ethyl methanesulphonate (EMS) treatment of seeds of double low winter rapeseed.

The obtained mutant is a very important new source of genetic variability necessary for the study and breeding of rapeseed varieties with increased saturated acid content.

The obtained mutant can be used for further study aimed at finding DNA markers linked to the increased saturated fatty acid content.

Literatura

- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne*, XIII: 108-114.
- Hamada T., Kodama H., Nishimura M., Iba K. 1996. Modification of fatty acid composition by over- and antisense-expression of a microsomal ω -3 fatty acid desaturase gene in transgenic tobacco, *Transgenic Research*, 5: 115-121
- Heinz E. 1993. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipid Metabolism in Plants*, ed. T.S. Moore, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 34-89
- Ivanov P., Petakov D., Nikolova V., Pentchev E. 1988. Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. In: *International Sunflower Association (ed.), Proc. 12th Int. Sunflower Conf.*, Novi Sad, Yugoslavia, July 25-29, 1988: 463-465.
- Jakubowski A., Braczek M. 1998. Przemysłowe uwodornienie oleju rzepakowego w obniżonej temperaturze jako sposób ograniczenia izomeryzacji. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XIX: 231-246.
- Knutzon D.S., Thompson G.A., Radke S.E., Johnson W.B., Knauf V.C., Kridl J.C. 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2624-2628.
- Kinney A.J. 1996. Designer oils for better nutrition. *Nature Biotechnology*, 14: 946.
- Knapp S.J., Tagliani L.A. 1991. Two medium chain fatty acid mutants of *Cuphea viscosissima*. *Plant Breeding*, 106: 338-341.
- Krzymański J., Downey K.R. 1969. Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed (*Brassica napus*). *Can. J. Plant Sci.*, 49: 313-319.
- Krzymański J. 1970a. Genetyczne możliwości ulepszania składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. *Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 14 (2): 95-133.
- Krzymański J. 1970b. Oznaczanie zawartości tłuszczu i wody w nasionach oleistych metodą MNR. *Tłuszcze, Środki Piorące i Kosmetyki*, 14/4: 202-208.
- Krzymański J. 1993. Osiągnięcia i nowe perspektywy prac badawczych nad roślinami oleistymi w Polsce. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5/245: 7-14.
- Micke A., Donini B., Maluszynski M. 1987. Induced mutations for crop improvement – a review. *Trop. Agric. (Trinidad)*, 64: 259-278.
- Osorio J., Fernandez-Martinez J., Mancha M., Garces R. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci.*, 35: 739-742.
- Perez-Vich B., Garces R., Fernandez-Martinez J.M. 1999. Inheritance of high palmitic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-5. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 496-501.
- Rowland G.G., Bhatti R.S. 1990. Ethyl methanesulphonate induced fatty acid mutations in flax. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 213-214.

- Röbbelen G. 1990. Mutation breeding for quality improvement. A case of study for oilseed crops. *Mutation Breeding Review*, 6: 1-44.
- Scarth R., McVetty P. 1999. Designer oil canola a review of new food-grade *Brassica* oils with focus on high oleic, low linolenic types. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29 September 1999, CD ROM.
- Schnurbusch T., Möllers C., Becker H.C. 2000. A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content. *Plant Breeding*, 119: 141-144.
- Spasibonek S., Byczyńska B., Krzymański J. 2000. Mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszono o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI: 715-724.
- Velasco L., Perez-Vich B., Fernandez-Martinez J.M. 1999. The role of mutagenesis in the modification of the fatty acid profile of oilseed crops. *J. Appl. Genet.*, 40 (3): 185-209.