

Karolina Wielgus^{1,2}, Grażyna Mańkowska¹

¹ Instytut Włókien Naturalnych w Poznaniu, Zakład Biotechnologii i Biologii Molekularnej

² Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biotechnologii

Ocena zdolności pylników wybranych odmian lnu oleistego (*Linum usitatissimum* L.) do tworzenia kalusa

Estimation of the ability of anthers from different linseed cultivars (*Linum usitatissimum* L.) for callus induction

Słowa kluczowe: pylniki, kalus, len oleisty

Len (*Linum usitatissimum* L.) jest chętnie wykorzystywany jako roślina modelowa w badaniach z zakresu biotechnologii roślin obejmujących zagadnienia biochemiczne, regenerację roślin w kulturach *in vitro* oraz interakcję między rośliną a patogenem. Możliwości przemysłowego wykorzystania oleju lnianego oraz rosnące w ostatnich latach zainteresowanie jego spożyciem stawia len wśród ważnych roślin oleistych. Długi czas konieczny do otrzymania genetycznie ustabilizowanych linii lnu metodami tradycyjnej hodowli można skrócić wykorzystując w programach hodowlanych kultury pylnikowe. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu rodzaju pożywki na zdolność pylników różnych genotypów lnu oleistego do tworzenia kalusa. Pylniki 13 odmian hodowano na dwóch zestalonych pożywkach, różniących się między sobą zawartością glukozy i sacharozy. Obserwowano zróżnicowaną zdolność testowanych genotypów do tworzenia kalusa na obu pożywkach. Stwierdzono istotny statystycznie wpływ zarówno pożywki, jak i genotypów na zdolność tworzenia kalusa przez testowane odmiany. Średnio większy potencjał kalusowania obserwowano na pożywce zawierającej wyłącznie sacharozę. Największą zdolność do tworzenia kalusa obserwowano u odmiany Hella (51%) na pożywce SH₂₂. Odmiany Olinette i Abby wykazały zdolność do tworzenia kalusa na pożywce zawierającej zarówno glukozę, jak i sacharozę (15,4 i 6,7%), natomiast nie tworzyły kalusa na pożywce z sacharozą. Odmiany Maxi Gold i Pacyfic wykazały zdolność do tworzenia kalusa na pożywce zawierającej wyłącznie sacharozę (10 i 7,1%), natomiast nie tworzyły kalusa na pożywce z glukozą i sacharozą. Na żadnej z pożywek nie obserwowano tworzenia się kalusa u odmiany Peak.

Key words: anther, callus, linseed

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is commonly used as a model plant in biotechnological research including studies on biochemical tests, *in vitro* regeneration of plant and interaction between plants and pathogens. Possibilities of industrial application of flax oil as well as growing interest in oil consumption make flax an important oil plant. Substantial time needed to obtain genetically stable lines by traditional breeding methods can be shortened by using anther culture in breeding process. Androgenesis is currently the most successful method of obtaining haploid material and homozygous lines for breeding purposes and molecular analysis, yet its efficiency remains very low. The study aimed at comparing the response of different oil flax genotypes during anther culture and at the assessment of the effect of medium on anthers capability to form callus. Anthers of 13 varieties were

grown on two kinds of solid medium, differing in sucrose and glucose content. Varied capability of callus formation of tested varieties was observed for both media. Statistically significant effect of both the medium and the genotype on anther culture potential was observed for the tested varieties. The potential was higher in case of the medium containing only sucrose. The cultivar Hella gave the maximum (51%) callus induction rate on the medium SH_{2/2}. Cultivars Olinette and Abby produced callus on medium with sucrose and glucose (15.4, 6.7%) but did not produce any callus on medium containing only sucrose. On the other hand cultivars Maxi Gold and Pacific produced callus on medium with glucose (10, 7.1%) but did not produce any callus on medium containing sucrose and glucose. In case of Peak cultivar production of callus on any medium was not observed.

Wstęp

Rodzaj len (*Linum*) należy do rodziny lnowatych (*Linaceae*), obejmuje około 200 gatunków, z których tylko jeden, zwany lnem siewnym lub pospolitym (*Linum usitatissimum* L.), jest gatunkiem uprawnym (Woyke 1997). Len wywodzi się z terenów śródziemnomorskich i południowo-zachodniej Azji i jest jedną z najstarszych roślin uprawnych. Dowody archeologiczne wskazują na uprawę lnu już 6000 lat p.n.e. Len wielokrotnie wymieniany jest w Biblii, białe płótno lniane ma nawet znaczenie symboliczne, oznaczające doskonałość i życie wieczne. Początkowo len ceniony był jako ważna roślina włóknodajna, z czasem zaczęto wykorzystywać jego nasiona do produkcji oleju. Obecnie uprawiane są odmiany lnu włóknistego i oleistego (Millam i in. 2005). W porównaniu do lnu włóknistego len oleisty ma bardziej rozgałęzioną, krótszą i cieńszą łodygę, lecz produkuje więcej torebek nasiennych zawierających większe nasiona (Nichterlein 2003). Len oleisty jest ważną rośliną oleistą w wielu krajach, zwłaszcza w regionach o klimacie umiarkowanym. Uprawy o największym znaczeniu gospodarczym i przemysłowym znajdują się w Argentynie, Indiach, Chinach, Kanadzie, USA i Rosji. Wysoka zawartość kwasu α -linolenowego (powyżej 50%) oraz obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych powoduje, że olej lniany jest podatny na utlenianie, co umożliwia jego przemysłowe wykorzystanie w malarstwie, lakiernictwie i produkcji linoleum. Len oleisty jest również cennym źródłem roślinnych kwasów tłuszczowych z rodziny omega-3, co powoduje rosnące spożycie oleju lnianego w czasach widocznego zainteresowania zdrowym sposobem odżywiania się (Millam i in. 2005). Len jest gatunkiem diploidalnym ($2n = 30$), samopylnym (obcopenność stanowi 5–10%). Odmiany uprawne lnu są jednorodne (Evtimova i in. 2005). Otrzymanie genetycznie ustabilizowanych linii lnu i nowych odmian metodami tradycyjnej hodowli jest procesem trwającym nawet 10–15 lat. Wykorzystanie podwojonych haploidów w procesie hodowlanym umożliwia skrócenie czasu koniecznego do uzyskania nowej odmiany. Haploidy lnu oleistego można otrzymać w wyniku poliembrionii bądź za pomocą hodowli w warunkach *in vitro* metodą kultur pylnikowych lub izolowanych mikrospor. Poliembrionia jest zjawiskiem dziedzicznym, opisano genotypy, u których ilość bliźniaczych zarodków sięga 8%. Częstość poliembrionii

wzrosła do 30% dzięki zastosowaniu właściwych krzyżówek i selekcji (Nichterlein 2003). Kultury pylnikowe i kultury izolowanych mikrospor umożliwiają wzrost wydajności otrzymywania roślin haploidalnych. Możliwość otrzymania w stosunkowo krótkim czasie linii homozygotycznych jest ważna nie tylko dla programów hodowli nowych odmian lnu, ale również w badaniach markerów molekularnych (Millam i in. 2005).

W niniejszej pracy porównywano reakcję różnych genotypów lnu oleistego w trakcie kultur pylnikowych i oceniano wpływ rodzaju pożywki na zdolność pylników do wytwarzania kalusa.

Material i metody

Material roślinny

Material roślinny stanowiły nasiona 13 odmian lnu oleistego, wybrane z zasobów Banku Genów przy Instytucie Włókien Naturalnych w Poznaniu. Testowano następujące odmiany: Szafir, Linola, Martin, Kreola, Olinette, Opal, Hella, Norlin, Maxi Gold, Abby, Pacyfic, Royale, Peak.

Kultury pylnikowe

W celu izolacji pylników zbierano pąki kwiatowe z roślin dawców w początkowym okresie kwitnienia. Pąki sterylizowano przez 15 min. za pomocą 2% podchlorynu sodu rozcieńczonego wodą (1:2 v/v), a następnie trzykrotnie płukano sterylną wodą. Pylniki izolowano w warunkach sterylnych, wykładano na pożywkę Sh₂ lub Sh_{2/2} (tab. 1), a następnie umieszczano w ciemności, w temperaturze 20°C (Rutkowska-Krause i in. 2003, Rutkowska-Krause 1999). Po upływie dwóch tygodni pylniki przenoszono do pomieszczenia hodowlanego z fotoperiodem 16/8 godzin (dzień/noc). Kalus przenoszono na nową pożywkę co 14 dni. Po upływie 4–6 tygodni oceniano zdolność badanych genotypów do wytwarzania kalusa. Kalus przekładano odpowiednio na pożywkę Sh₂ lub Sh_{2/2}, a następnie na pożywkę ½ MS. Zabieg powtarzano kilkakrotnie, aż do uzyskania pędów i pączków, które w celu regeneracji korzeni przekładano na pożywkę Sh50 (Rutkowska-Krause i in. 2003). Ukorzenione rośliny sadzono w sterylnym podłożu i hodowano w temperaturze 18–20°C. Przez okres jednego do dwóch tygodni rośliny przykrywano szklanym naczyniem, aby ograniczyć parowanie wody.

Tabela 1

Składniki uzupełniające pożywkę Murashige i Skoog
Supplements added to Murashige and Skoog medium

Składniki <i>Supplements</i>	Nazwa pożywki i stężenie składnika [mg·l ⁻¹] <i>Supplement Media designations and concentrations [mg·l⁻¹]</i>		
	Sh ₂	Sh _{2/2}	Sh ₅₀
Sacharoza — <i>Sucrose</i>	25000	20000	20000
Glukoza — <i>Glucose</i>	25000	–	–
BAP — 6-benzylaminopuryna <i>6-Benzyl-aminopurine</i>	1	1	0,02
IAA — kwas indolilo-3-octowy <i>Indole-3-acetic acid</i>	–	–	–
NAA — kwas α-naftalenoctowy <i>α-Naphthalene-acetic acid</i>	0,05	0,05	0,001

Rutkowska-Krause 1999; Rutkowska-Krause i in. 2003

Analiza statystyczna

W celu sprawdzenia istotności wpływu genotypu i pożywki na zdolność pylników testowanych odmian lnu oleistego na kalusowanie wykonano analizę wariancji na poziomie istotności 0,05 i test wielokrotnych porównań Tukeya. Wyniki analizy statystycznej są przedstawione w tabelach (tab. 2 i 3) i na rysunkach (rys. 1–3).

Wyniki

W celu opracowania wydajnego systemu regeneracji lnu oleistego w kulturach pylnikowych rozpatrywano wpływ genotypów testowanych odmian oraz wpływ pożywki na zdolność pylników do wytwarzania kalusa. Obserwowano również zdolność poszczególnych odmian na ich zdolność do regeneracji.

Wpływ odmiany na zdolność pylników do tworzenia tkanki kalusowej

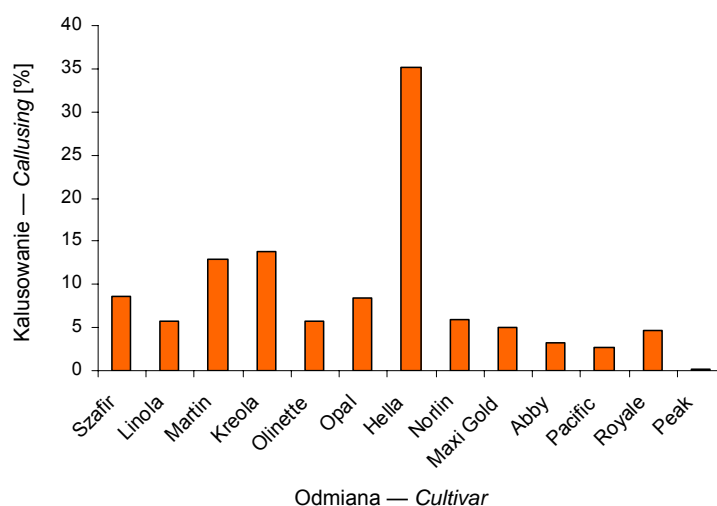
Zdolność pylników do tworzenia tkanki kalusowej oceniano poprzez wyłączenie pylników danej odmiany na dwie pożywki i obserwację tworzenia tkanki kalusowej. Badaniem objęto 13 odmian lnu oleistego: Szafir, Linola, Martin, Kreola, Olinette, Opal, Hella, Norlin, Maxi Gold, Abby, Pacyfic, Royale, Peak. Testowane odmiany wykazały bardzo zróżnicowany potencjał do tworzenia kalusa w kulturach pylnikowych. Stwierdzono istotnie statystycznie różnice pomiędzy odmianami (tab. 2).

Tabela 2

Analiza wariancji wpływu badanych odmian lnu oleistego na zdolność pylników do tworzenia kalusa — *Analysis of variance for effect of linseed tested cultivars on anther ability to create callus*

Źródło zmienności <i>Source of variability</i>	Suma kwadratów <i>Sum of square</i>	Stopnie swobody <i>Degrees of freedom</i>	Średni kwadrat <i>Mean square</i>	F	p
Wyraz wolny <i>Absolute term</i>	0,441400	1	0,441400	850,4966**	0
Odmiana — <i>Cultivar</i>	0,633680	12	0,052807	101,7488**	0
Błąd — <i>Error</i>	0,013494	26	0,000519		

Najwyższy procent kalusowania obserwowano u odmiany Hella natomiast pylniki odmiany Peak nie tworzyły kalusa na żadnej z pożywek (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ testowanej odmiany na zdolność pylników do kalusowania — *The effect of tested cultivars on anther ability to create callus*

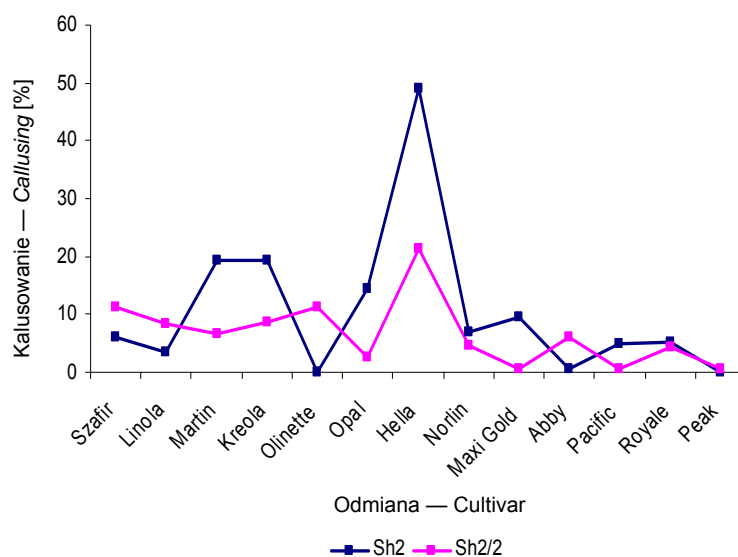
Wpływ pożywki na zdolność pylników do tworzenia tkanki kalusowej

Jednocześnie obserwowano wpływ zastosowanej pożywki na zdolność pylników do tworzenia tkanki kalusowej. Badaniem objęto 13 odmian lnu oleistego: Szafir, Linola, Martin, Kreola, Olinette, Opal, Hella, Norlin, Maxi Gold, Abby, Pacific, Royale, Peak. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w indukcji i przyroście tkanki kalusowej tych samych genotypów hodowanych na różnych pożywkach (tab. 3, rys. 2).

Tabela 3

Analiza wariancji wpływu badanych odmian lnu oleistego oraz pożywki na zdolność pylników do tworzenia kalusa — *Analysis of variance for effect of linseed tested cultivars and medium on anther ability to create callus*

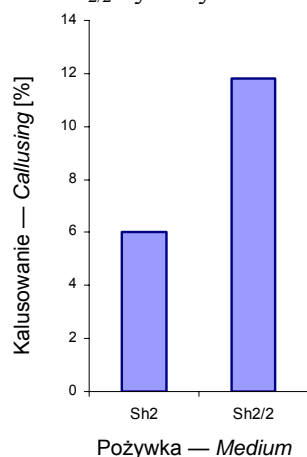
Źródło zmienności <i>Source of variability</i>	Suma kwadratów <i>Sum of square</i>	Stopnie swobody <i>Degrees of freedom</i>	Średni kwadrat <i>Mean square</i>	F	p
Wyraz wolny <i>Absolute term</i>	0,520303	1	0,520303	1167,355**	0
Odmiana — <i>Cultivar</i>	0,555325	10	0,055532	124,593**	0
Pożywka — <i>Medium</i>	0,052793	1	0,052793	118,446**	0
Odmiana × żywka <i>Cultivar × medium</i>	0,165115	10	0,016512	37,045**	0
Błąd — <i>Error</i>	0,019611	44	0,000446		



Ryc. 2. Wpływ testowanej odmiany i rodzaju pożywki na zdolność pylników do kalusowania — *The effect of tested cultivars and medium on anther ability to create callus*

Pylniki odmian Maxi Gold i Pacific nie tworzyły kalusa na pożywce Sh₂, natomiast tworzyły kalus na pożywce Sh_{2/2} z wydajnością odpowiednio 10% i 7%. Wzrost wydajności kalusowania na pożywce Sh_{2/2} obserwowano również u kolejnych siedmiu odmian: Szafir (o 5%), Linola (o 5%), Martin (o 15%), Kreola (o 13%), Opal (o 11%), Hella (o 28%) i Norlin (o 2%). Tymczasem pylniki odmian

Olinette i Abby nie wykazały zdolności do tworzenia kalusa na pożywce $Sh_{2/2}$ natomiast tworzyły kalus na pożywce Sh_2 z wydajnością 14 i 6,7%. Średnio wydajność kalusowania pylników wszystkich badanych odmian lnu oleistego na pożywce $Sh_{2/2}$ była wyższa o 5,8% niż na pożywce Sh_2 (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ rodzaju pożywki na zdolność pylników badanych odmian lnu oleistego do kalusowania — *The effect of medium on anther ability to create callus*

Ocena zdolności wybranych odmian lnu oleistego do regeneracji z kalusa uzyskanego w kulturach pylnikowych

Zdolność regeneracji odmian lnu oleistego określano poprzez ilość zregenerowanych roślin w stosunku do ilości pylników, z których otrzymano zregenerowane rośliny. Wartość wyrażano w procentach. Badaniem objęto 13 odmian lnu oleistego: Szafir, Linola, Martin, Kreola, Olinette, Opal, Hella, Norlin, Maxi Gold, Abby, Pacific, Royale, Peak. Zregenerowane rośliny uzyskano tylko dla trzech odmian: Szafir (12%), Linola (1,7%) i Hella (1,2%) (tab. 4).

Tabela 4

Wydajność regeneracji lnu oleistego w kulturach pylnikowych
Efficiency of linseed regeneration in anther culture

Odmiana <i>Cultivar</i>	Ilość pylników <i>No. of anthers</i>	Liczba i procent kalusujących pylników <i>No. and percentage of callusing anthers</i>	Liczba i procent pylników, z których otrzymano zregenerowane rośliny <i>No. and percentage of anthers regenerated plants</i>	Liczba zregenerowanych roślin <i>No. of regenerated plants</i>
Szafir	245	15 (6%)	3 (1,2%)	36
Linola	245	8 (3%)	3 (1,2%)	5
Hella	185	36 (19,5%)	2 (1%)	3

Dyskusja

Już od 20 lat len jest przedmiotem wielu badań stosowanych i podstawowych, które umożliwiły znaczny postęp w zakresie biotechnologii i biologii komórki roślinnej. Hodowla *in vitro* lnu ma długą tradycję jednak wiedza na temat czynników wpływających na organogenezę i embriogenezę lnu jest nadal niewystarczająca. Do chwili obecnej opisano regenerację lnu z kalusa wytwarzanego przez hypokotyl, cotyledon i liście; zarodków zygotycznych, mikrospor, kultur pylnikowych i protoplastów (Evtimova i in. 2005, Millam i in. 2005). Prawdopodobnie najbardziej wartościową metodą kultur tkankowych roślin będzie wykorzystanie materiału haploidalnego w procesach hodowlanych oraz bardziej zaawansowane wykorzystanie analizy markerów molekularnych jako metody przesiewowej. Dzięki wykorzystaniu podwojonych haploidów czas konieczny do otrzymania genetycznie stabilnych linii można skrócić do jednego pokolenia. Haploidy lnu można otrzymać w procesie androgenyzy i w kulturach izolowanych mikrospor. Jednak proces regeneracji roślin haploidalnych jest złożony i ma na niego wpływ wiele czynników. Czynniki te były badane od początku lat 90-tych ubiegłego wieku przez wiele grup badawczych na całym świecie. Koncentrowano się głównie na określeniu wpływu genotypu, pożywki i sposobie przygotowania pylników. Chen i współpracownicy wykazali zależność pomiędzy genotypem lnu włóknistego a zdolnością pylników do produkcji kalusa (Chen i in. 1999). W niniejszej pracy stwierdziliśmy wyraźny wpływ odmiany na zdolność pylników lnu oleistego do tworzenia tkanki kalusowej. Najlepszą pod względem zdolności pylników do indukcji kalusa okazała się odmiana Hella, dla której średni procent kalusowania wynosił 36%. Najmniej przydatną w kulturach pylnikowych jest odmiana Peak, z której pylników nie uzyskano kalusa. Dla pozostałych jedenastu odmian średni procent kalusowania jest zróżnicowany i sięga od 14% dla odmiany Kreola do 2,5% dla odmiany Pacific. Biorąc pod uwagę wpływ genotypu na kalusowanie w kulturach pylnikowych należy zwrócić szczególną uwagę na wybór odpowiedniej odmiany do planowanych doświadczeń.

W procesie hodowli lnu w warunkach *in vitro* bardzo duże znaczenie ma rodzaj zastosowanej pożywki. Skład pożywki pod względem wykorzystywanego źródła węgla i składu regulatorów wzrostu roślin był również przedmiotem wielu badań. Chen i Dribnenki zwracają uwagę na pozytywny wpływ wysokiej zawartości K^+ i Mg^{2+} na wydajność procesu androgenyzy (Chen i Dribnenki 2002). W tej samej pracy opisują również wpływ węglowodanów na przebieg androgenyzy. Stwierdzają pozytywny wpływ 9% laktozy na indukcję kalusa u wszystkich testowanych odmian. Natomiast jej wpływ na regenerację pędów niektórych odmian był pozytywny, dla innych negatywny. Zastosowanie 9% maltozy zwiększyło indukcję kalusa, lecz nie miało pozytywnego wpływu na regenerację pędów. Rutkowska-Krause i współpracownicy badali wpływ regulatorów wzrostu na in-

dukcję i wzrost kalusa oraz regenerację lnu włóknistego w kulturach pylnikowych. W doświadczeniu wykorzystali dwie pożywki Sh₂ (MS + 1 mg·l⁻¹ BAP + 0,05 mg·l⁻¹ NAA) i Sh₃ (MS + 0,1 mg·l⁻¹ BAP + 0,5 mg·l⁻¹ NAA + 0,3 mg·l⁻¹ IAA). Niezależnie od testowanej odmiany procent kalusujących pylników na pożywce Sh₂ wynosił 5,8%, natomiast na Sh₃ 11,7%. Jednak zregenerowane rośliny (2%) otrzymano wyłącznie na pożywce Sh₂ (Rutkowska-Krause i in. 2003). W tej samej pracy autorzy stwierdzili, że najbardziej korzystną kombinacją węglowodanów jest zawartość 2,5% sacharozy i 2,5% glukozy w pożywce, natomiast maltoza nie jest właściwym źródłem węgla. W niniejszej pracy zastosowano pożywkę Sh₂ opisaną wcześniej przez Rutkowską-Krause i współpracowników oraz pożywkę Sh_{2/2} zawierającą sacharozę, lecz pozbawioną glukozy (tab. 1). Dla wszystkich odmian za wyjątkiem odmiany Peak otrzymano tkankę kalusową (rys. 1). Wydajność kalusowania dla poszczególnych odmian była zróżnicowana i w znacznym stopniu zależała od zastosowanej pożywki (rys. 2). Na pożywce zawierającej sacharozę i glukozę obserwowano indukcję tkanki kalusowej i jej proliferację z pylników odmian Abby i Olinette, podczas gdy hodowla tych odmian na pożywce Sh_{2/2} nie dała odpowiedzi w postaci indukcji kalusa. Jednak dla pozostałych jedenastu odmian taka kombinacja węglowodanów okazała się niekorzystna i spowodowała wyraźny spadek indukcji kalusa. Z pylników dwóch odmian: Maxi Gold i Pacific w ogóle nie otrzymano kalusa na pożywce Sh₂, natomiast na pożywce Sh_{2/2} tworzyły one kalus z wydajnością odpowiednio 10 i 7%.

Przedmiotem obserwacji niniejszej pracy była również regeneracja roślin lnu oleistego w kulturach pylnikowych (tab. 4). Zregenerowane rośliny otrzymano jedynie z kalusa pylników trzech z 13 odmian objętych badaniem. Najwyższy procent regeneracji otrzymano dla pylników odmiany Szafir (12%) wyłożonych na pożywkę Sh_{2/2}. Zdecydowanie niższą wydajność regeneracji roślin obserwowano dla odmiany Linola (1,7%) i odmiany Hella (1,2%). Należy zauważyć, że pylniki odmiany Hella charakteryzował najwyższy procent kalusowania spośród wszystkich odmian. Na pożywce Sh₂ otrzymano 21% kalusujących pylników, natomiast na pożywce Sh_{2/2} 49%. Nie znalazło to jednak odzwierciedlenia w liczbie zregenerowanych roślin, których nie otrzymano na pożywce Sh_{2/2}, natomiast trzy otrzymano na pożywce Sh₂.

Wnioski

Na podstawie wyników wykonanych badań należy stwierdzić, że potencjał pylników odmian lnu oleistego do tworzenia kalusa jest istotnie zależny od odmiany oraz zastosowanej pożywki. Zasadniczo wyższy procent kalusowania obserwowano na pożywce zawierającej wyłącznie sacharozę jako źródło węgla, jednak wśród testowanych odmian były takie, u których kalus rozwijał się tylko na

pożywcze zawierającej zarówno sacharozę, jak i glukozę. Wysoki procent kalusowania nie określa pełnej wydajności regeneracji roślin lnu oleistego. Dalsze badania będą także zmierzały do oceny cytologicznej powstałego kalusa i zregenerowanych roślin.

Literatura

- Chen Y., Dribnenki P. 2002. Effect of the genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Rep.*, 21 (3): 204-207.
- Chen Y., Kenaschuk E., Dribnenki P. 1999. Response of flax genotypes to doubled haploid production. *Plant Cell Tiss. Org.*, 57: 195-198.
- Evtimova M., Vlahova M., Atanasov A. 2005. Flax improvement by biotechnology means. *JNF*, 2: 17-34.
- Millam S., Obert B., Pretova A. 2005. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 93-103.
- Nichterlein K. 2003. Anther culture of linseed (*Linum usitatissimum* L.). W: Doubled haploid production in crop plants. *Praca zbiorowa*. Kluwer Academic Publishers, s. 249.
- Rutkowska-Krause I. 1999. Podstawy metodyczne wykorzystania haploidyacji w kulturach in vitro do postępu w hodowli nowych odmian lnu włóknistego (*Linum usitatissimum* L.). *Rozprawa doktorska*.
- Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. 2003. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Rep.*, 22: 110-116.
- Woyke T. 1997. Rośliny włókniste. W: Szczegółowa uprawa roślin rolniczych. Red. A. Dubas i S. Gładysiak Wyd. AR Poznań, s. 221.