

Ocena wzrostu i stabilności genetycznej agrestu (*Ribes grossularia* L.) rozmnażanego *in vitro* oraz *ex vitro*

Assessment of growth and genetic stability of gooseberry (*Ribes grossularia* L.) propagated *in vitro* and *ex vitro*

Danuta Kucharska^{id}, Danuta Wójcik^{id}, Aleksandra Trzewik^{id}

Instytut Ogródnictwa, Zakład Biologii Stosowanej, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3 96-100 Skierniewice
✉ e-mail: danuta.kucharska@inhort.pl

Celem badań była ocena fenotypowa i genetyczna roślin 15 genotypów agrestu, rozmnożonych *in vitro* oraz *ex vitro* przez sadzonki zielne, uprawianych drugi rok warunkach polowych. Silniej rosły krzewy rozmnożone *in vitro*. Ich wysokość i liczba pędów były istotnie większe dla 11 genotypów, a szerokość dla 12 genotypów agrestu. Krzewów, na których pojawiły się owoce było znacznie więcej u roślin mnożonych tradycyjnie. Przeprowadzono analizę stabilności genetycznej klonów pochodzących z kultur *in vitro* pięciu odmian agrestu. Analizowano 13-15 roślin z *in vitro* oraz rośliny mateczne. Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wahała się od 33 do 108. Najwyższą całkowitą liczbę produktów amplifikacji uzyskano w wyniku reakcji AFLP dla roślin 'Hinnonmaki Rot' (300), a najmniejszą dla odmiany 'Hinsel' i 'Resika' (262). Zmienność genetyczna w roślinach agrestu *in vitro* wahała się od 1,03% dla 'Captivator' do 10,3% w przypadku 'Hinsel'. Stabilność genetyczną oceniano także przy użyciu markerów ISSR. Wykorzystano rośliny 5 genotypów pochodzące z rozmnażania tradycyjnego oraz *in vitro*. Uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji, z czego 2,8% było polimorficznych. Wielkość otrzymanych produktów wynosiła od 250 do 2900 pz, w zależności od startera i odmiany. Analiza ISSR-PCR wskazała na różny stopień polimorfizmu – od 0 dla 'Hinnonmaki Rot' i 'Resica' do 11,6% dla odmiany 'Hinsel'.

Słowa kluczowe: AFLP, agrest, DNA, ISSR, kultury *in vitro*, polimorfizm

The aim of the study was to evaluate phenotypically and genetically, 15 gooseberry genotypes plants propagated *in vitro* and *ex vitro* by cuttings grown in the second year in field conditions. The outcome of this was that *in vitro* propagated shrubs were shown to grew more strongly. Their height and the number of shoots were significantly higher for the 11 genotypes and a width of 12 genotypes for gooseberry. However, fruit abundance was greater in much more traditionally multiplied plants. Beyond the aforementioned, Genetic stability analysis of clones derived from *in vitro* cultures of five gooseberry varieties was performed. Herein, 13-15 plants with *in vitro* and mother plants were analyzed. The number of products generated by the AFLP primer pairs ranged from 33 to 108. The highest total number of amplification products was obtained as a result of the AFLP reaction for the plants 'Hinnonmaki Rot' (300), and the lowest for the varieties 'Hinsel' and 'Resika' (262). Genetic variability in gooseberry *in vitro* plants ranged from 1.03% for 'Captivator', to 10.3% for 'Hinsel'. Genetic stability was also assessed using ISSR markers. Plants of five genotypes derived from conventional and *in vitro* reproduction were used. Accordingly, a total of 2294 amplification products were obtained, of which 2.8% were polymorphic. The size of the obtained products was from 250 to 2900 bp, depending on the starter and variety. ISSR-PCR analysis showed different degrees of polymorphism - from 0 for the 'Hinnonmaki Rot' and 'Resica' to 11.6% for the 'Hinsel' variety.

Key words: AFLP, gooseberry, DNA, ISSR, *in vitro* cultures, polymorphism

Wstęp

W badaniach prowadzono obserwacje i ocenę fenotypową roślin agrestu rozmnożonych *in vitro* oraz *ex vitro*, rosnących w doświadczeniu odmianowo – porównawczym, w warunkach polowych. Analizowano również zmienność somaklonalną 5 genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP oraz jednorodność genetyczną sadzonek *in vitro* i rozmnożonych tradycyjnie z zastosowaniem markerów ISSR.

Material i Metody

Material badawczy stanowiły rośliny 8 odmian i 7 klonów hodowlanych agrestu, rozmnożone *in vitro* oraz *ex vitro* przez sadzonki zielne, rosnące 2 rok w doświadczeniu odmianowo – porównawczym w układzie bloków losowych, w 3 powtórzeniach, po 5 roślin na poletku. Mierzono wysokość, szerokość, liczbę nowych pędów oraz pojawianie się owoców. Dane parametrów wzrostu poddano analizie statystycznej

przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (Statistica 13.1), oddzielnie dla każdego genotypu oraz parametru i porównano za pomocą testu Tukeya przy $p = 0.05$.

Przeprowadzono analizę zmienności genetycznej odmian agrestu: 'Captivator', 'Hinnonmaki Rot', 'Hinsel', 'Invicta' i 'Resika'. Dla każdej z odmian analizie poddano 13–15 roślin rozmnożonych *in vitro* oraz rośliny mateczne. Badanie zmienności genetycznej przeprowadzono z wykorzystaniem techniki AFLP według Zabeau i Vos (1993), w dwóch powtórzeniach.

Przeprowadzono także ocenę jednorodności genetycznej sadzonek wegetatywnych i mikro-rozmnażanych dla wymienionych odmian. Analizy prowadzono z wykorzystaniem markerów ISSR. Z każdej odmiany agrestu pobrano młode liście z 10 sadzonek wegetatywnych i 10 sadzonek pochodzących z kultur *in vitro*. Do izolacji genomowego DNA użyto ok. 100 mg utartej tkanki roślinnej. Izolacje prowadzono w dwóch powtórzeniach, przy pomocy komercyjnych zestawów: DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), NucleoSpin® 96 Plant kit (Macherey-Nagel) i DNA Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.). Uzyskane preparaty

DNA analizowano spektrofotometrycznie Epoch (BioTek) i obliczono stężenie genomowego DNA oraz wartość współczynnika 260/280 nm, pozwalającego na ocenę czystości preparatów, które wykorzystano w analizie ISSR-PCR. Amplifikację DNA dla każdego genotypu przeprowadzono dwukrotnie z każdym z 5 wybranych starterów. Oceniono całkowitą liczbę produktów ISSR-PCR, obecność i liczbę produktów polimorficznych oraz obliczono poziom polimorfizmu w badanych genotypach.

Wyniki

Parametry wzrostu 15 ocenianych genotypów agrestu wskazują, że silniej rosły krzewy rozmnożone *in vitro* (tab. 1). Wysokość oraz liczba pędów krzewów z *in vitro*, w porównaniu do rozmnażanych przez sadzonki zielne, były istotnie większe w roślinach 11 genotypów, a szerokość krzewów była istotnie większa w roślinach 12 genotypów. Procent krzewów z owocami był wyższy u roślin *ex vitro* dla 11 genotypów agrestu.

Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wahała się od 33 do 108, średnio wynosiła 52,2. Najwyższą całkowitą liczbę produktów amplifikacji uzyskano dla roślin 'Hinnonmaki

Tabela 1
Table 1

Wysokość, szerokość, liczba pędów i procent roślin z owocami u krzewów agrestu rozmnożonych *in vitro* oraz *ex vitro* (n=15).

Height, width, number of shoots and percentage of plants with fruit in gooseberry bushes propagated *in vitro* and *ex vitro* (n=15).

Genotyp Genotype	Wysokość [cm] Height [cm]		Szerokość [cm] Width [cm]		Liczba pędów [szt.] Number of shoots [pcs.]		Rośliny z owocami [%] Plants with fruits [%]	
	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>
	Biały Triumf	*26,9 b	19,9 a	30,6 b	18,3 a	6,2 a	6,9 a	0
Captivator	46,3 a	48,1 a	54,7 b	49,8 a	14,0 b	7,7 a	86,7	93,3
Hinnonmaki Rot	36,1 a	36,2 a	51,9 a	53,7 a	14,2 b	10,7 a	53,3	100
Hinsel	51,3 b	37,5 a	43,3 a	54,3 b	9,8 a	11,3 a	6,7	53,3
Invicta	38,2 b	30,9 a	44,1 b	37,7 a	10,1 a	7,9 a	20,0	66,6
Kamieniar	31,6 b	25,0 a	37,1 b	25,6 a	10,1 b	5,7 a	13,3	60,0
Pax	32,2 a	31,7 a	42,3 b	31,3 a	11,1 b	5,5 a	0	26,6
Resika	47,6 a	52,6 b	39,7 a	46,7 b	12,1 b	7,5 a	0	53,3
AGR-2/2	37,1 b	30,1 a	45,5 b	37,5 a	16,0 b	6,1 a	20,0	41,7
AGR-2/33	37,8 b	24,5 a	49,0 b	25,5 a	12,8 b	4,3 a	60,0	23,1
AGR-86	48,9 b	30,6 a	60,5 b	47,8 a	12,7 b	7,0 a	20,0	0
AGR-101	52,0 b	22,5 a	68,5 b	25,9 a	24,9 b	4,0 a	33,3	57,1
AGR-102	41,7 b	26,4 a	60,7 b	28,3 a	15,9 b	5,0 a	26,6	44,4
AGR-108	52,2 b	37,6 a	47,8 b	33,2 a	10,2 a	8,0 a	0	0
AGR-117	60,8 b	38,8 a	74,1 b	44,7 a	14,5 b	8,5 a	6,7	0

*Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie $p=0,05$ wg testu Tukeya

*means followed by the same letter, were not significantly acc. to Tukey's test.

Rot' (300), a najmniejszą dla odmian 'Hinsel' i 'Resika' (262). Zmienność genetyczna analizowana metodą AFLP w roślinach z *in vitro* różniła się dla poszczególnych odmian i wahała się od 1,03% dla odmiany 'Captivator' do 10,3% w przypadku odmiany 'Hinsel', w przypadku tej odmiany reakcje AFLP-PCR ze wszystkimi 5 parami starterów generowały produkty polimorficzne. Dla pozostałych

odmian produkty polimorficzne uzyskano w reakcji z 2–3 parami starterów (tab. 2, rys. 1).

Uzyskano DNA o stężeniu od 7,8 do 55,1 ng/μl i wartości współczynnika 260/280 nm od 1,61 do 2,00. W wyniku analizy ISSR-PCR z pięcioma starterami dla 5 badanych genotypów uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji (tab. 3), z czego 64 (2,8%) produktów było polimorficznych.

Tabela 2
Table 2

Analiza markerów AFLP w roślinach 5 odmian agrestu pochodzących z kultur *in vitro* oraz roślin matecznych.

Analysis of AFLP markers in plants of 5 gooseberry cultivars obtained from *in vitro* and donor plants.

Odmiana Cultivar	Startery Primers	Liczba produktów amplifikacji Number of amplification products		Polimorfizm % Polymorphism %
		Całkowita Total	Polimorficznych Polymorphic	
'Captivator'	Pst-AT/Mse-CG	71	0	0
	Pst-TA/Mse-GA	103	2	1,94
	Pst-AGC/Mse-CT	37	0	0
	Pst-CAG/Mse-TG	43	0	0
	Pst-GTC/Mse-AC	37	1	2,70
Ogółem: Total:		291	3	1,03
'Hinsel'	Pst-AT/Mse-CG	60	10	16,66
	Pst-TA/Mse-GA	62	3	4,83
	Pst-AGC/Mse-CT	47	8	17,02
	Pst-CAG/Mse-TG	56	4	7,14
	Pst-GTC/Mse-AC	37	2	5,40
Ogółem: Total:		262	27	10,30
'Hinnonmaki Rot'	Pst-AT/Mse-CG	59	0	0
	Pst-TA/Mse-GA	108	0	0
	Pst-AGC/Mse-CT	38	0	0
	Pst-CAG/Mse-TG	58	1	1,72
	Pst-GTC/Mse-AC	37	3	8,10
Ogółem: Total:		300	4	1,33
'Invicta'	Pst-AT/Mse-CG	58	1	1,72
	Pst-TA/Mse-GA	79	1	1,03
	Pst-AGC/Mse-CT	41	1	2,43
	Pst-CAG/Mse-TG	68	0	0
	Pst-GTC/Mse-AC	42	0	0
Ogółem: Total:		288	3	1,04
'Resika'	Pst-AT/Mse-CG	54	1	1,85
	Pst-TA/Mse-GA	36	0	0
	Pst-AGC/Mse-CT	33	4	12,2
	Pst-CAG/Mse-TG	92	0	0
	Pst-GTC/Mse-AC	47	2	4,25
Ogółem: Total:		262	7	2,67

Tabela 3

Table 3

Analiza markerów ISSR w roślinach 5 odmian agrestu pochodzących z kultur *in vitro*, *ex vitro* oraz roślin matecznych.

Analysis of ISSR markers in plants of 5 gooseberry cultivars obtained from *in vitro*, *ex vitro* and donor plants.

Odmiana Cultivar	Starter Primer	Wielkość produktów(pz) The size of products (bp)	Liczba produktów amplifikacji Number of amplification products		Polimorfizm % Polymorphism %
			Ogółem Total	Polimorficzne Polymorphic	
'Captivator'	822	650 – 1300	63	0	0
	825	280 – 1200	112	7	6,4
	830	500 – 1000	105	0	0
	848	500 – 1000	84	0	0
	849	500 – 2900	147	0	0
'Hinnonmaki Rot'	823	450 – 1100	84	0	0
	825	280 – 1300	126	0	0
	834	280 – 1050	105	0	0
	840	450 – 1500	105	0	0
	853	700 – 1400	63	0	0
'Hinsel'	825	250 – 1300	105	4	3,8
	834	500 – 1200	67	5	7,5
	848	500 – 2500	75	17	22,7
	849	400 – 1380	95	11	11,6
	853	400 – 1500	64	10	15,6
'Invicta'	821	550 – 2000	47	5	10,6
	825	250 – 1200	90	5	5,6
	834	260 – 750	42	0	0
	849	400 – 2000	168	0	0
	853	600 – 1500	84	0	0
'Resika'	821	350 – 2000	105	0	0
	822	650 – 1250	63	0	0
	825	250 – 1300	84	0	0
	834	500 – 1200	126	0	0
	849	500 – 1200	84	0	0

Wielkości otrzymanych produktów amplifikacji wahały się w granicach 250 – 2900 pz, w zależności od startera i odmiany. Zastosowane startery różniły się w ilości generowanych produktów PCR, ich liczba w odmianie 'Invicta' wahała się od 42 dla startera 834 do 168 dla startera 849. Analiza ISSR-PCR wskazała na różny stopień polimorfizmu od jego braku, w przypadku odmian 'Hinnonmaki Rot' i 'Resika', do 11,6% dla odmiany 'Hinsel' (tab. 3, rys. 2, 3).

Dyskusja

Parametry wzrostu krzewów odmian i klonów hodowlanych agrestu, w drugim roku wegetacji w warunkach polowych, potwierdzają wpływ sposobu wegetatywnego rozmnażania agrestu przy użyciu sadzonek zielnych lub *in vitro* ma wpływ na wzrost, pokrój i wigor roślin, a także szybkość

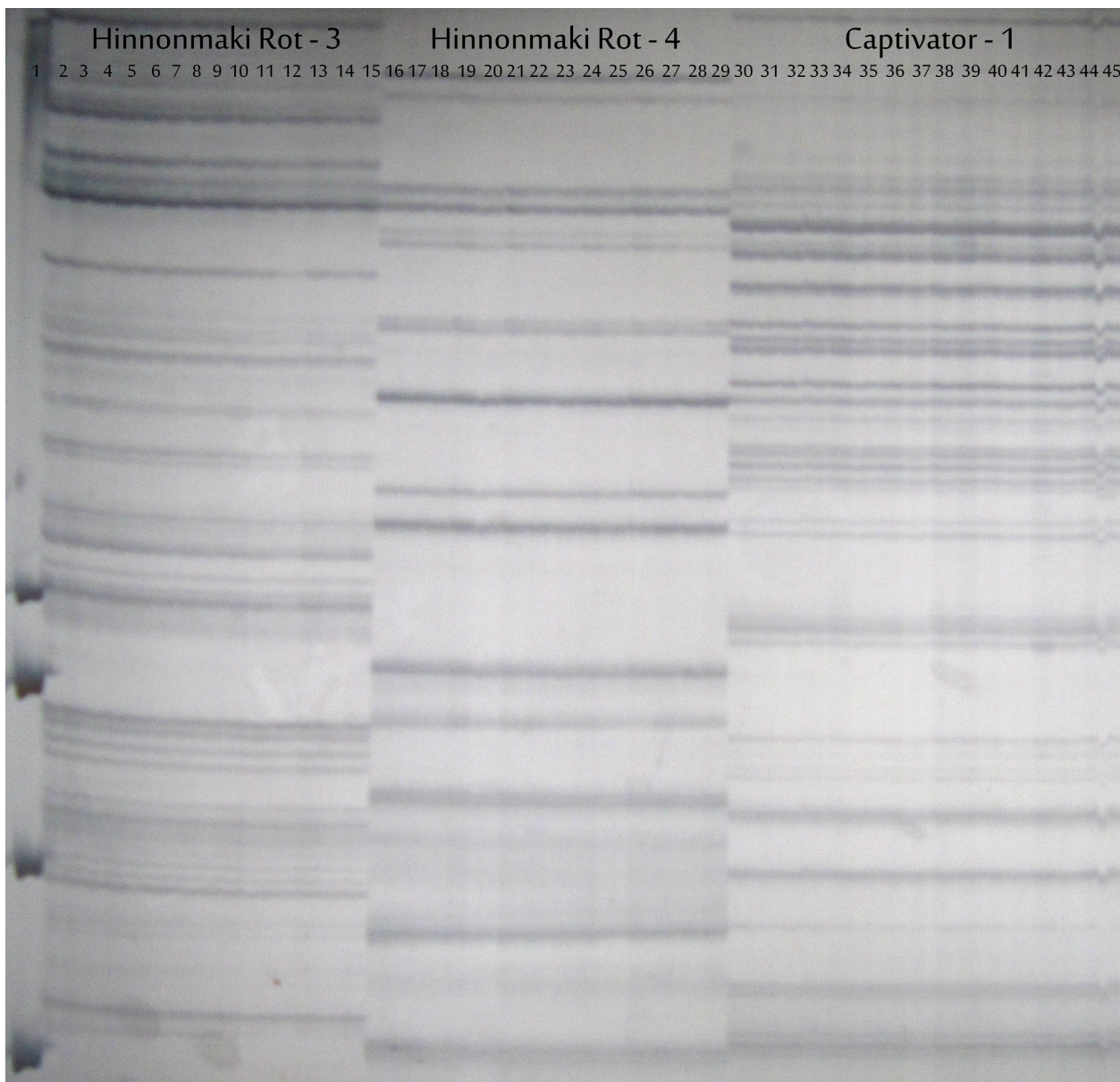
wchodzenia w fazę owocowania. Z wielu doniesień wiadomo, że rośliny pochodzące z kultury *in vitro* mają większy wigor i bardziej dynamiczny przyrost biomasy (Dubois i in. 1988; Howard i in. 1989; Drew i Smith 1990). Potwierdziły to także nasze obserwacje, w których wysokość, szerokość oraz liczba pędów krzewów agrestu rozmnażanych *in vitro* były istotnie większe w porównaniu do krzewów rozmnażanych przez sadzonki zielne dla większości genotypów. Nasze obserwacje o bujniejszym wzroście agrestu z *in vitro* są pionierskie i potwierdzają doniesienia dotyczące wzrostu innych roślin jagodowych mnożonych *in vitro*.

Opublikowano wiele doniesień dotyczących zastosowania technik *in vitro* do namnażania różnych gatunków roślin z rodzaju *Ribes* (Podwyżsyńska i in. 2006, Sedlák i Paprštejn 2012, Podwyżsyńska i Pluta 2019). Tylko kilka z nich dotyczy

możliwości efektywnego mnożenia *in vitro* agrestu (Welander 1985, Wainwright i Flegmann 1986, Reed i Hummer 2002). Kucharska i in. (2020) opisują znaczenie metatopoliny (m-T), zastosowanej zamiast benzyloaminopuryny (BAP), w opracowaniu skutecznej i efektywnej metody mikrorozmnażania 14 genotypów agrestu.

W kulturach *in vitro* roślin jagodowych utrzymywanych przez dłuższy czas często zdarza się

pojawianie zmienności somaklonalnej. Markery molekularne uzyskane przy pomocy technik takich jak: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD), amplifikacja z udziałem arbitralnych starterów PCR (AP-PCR), fingerprinting, proste sekwencje powtarzalne (SSR) a także polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (AFLP) są wykorzystywane jako narzędzia



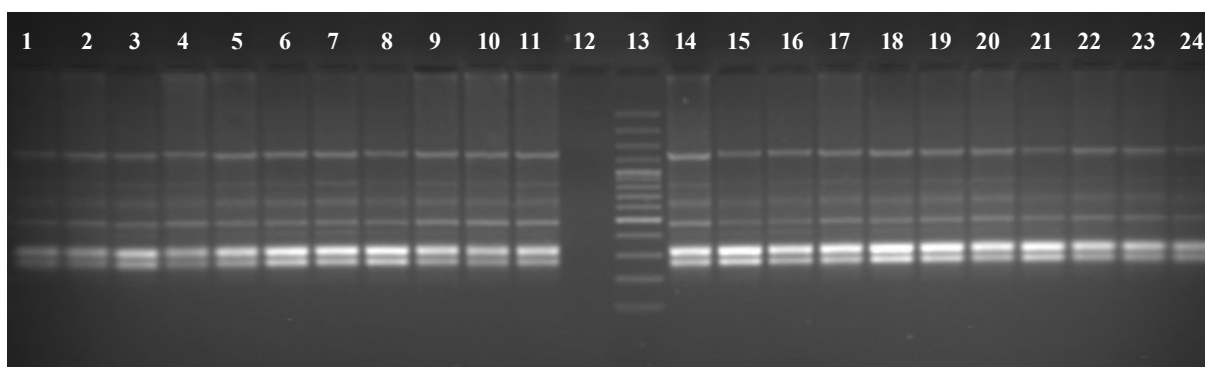
Rys. 1. Fragment elektroforegramu produktów AFLP-PCR; 1 – marker wielkości DNA 50 pz (50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); 2-15 – reakcja DNA roślin odmiany Hinnonmaki Rot ze starterami Pst-AGC/Mse-CT (2-14 – rośliny z kultur *in vitro*, 15 - roślina mateczna); 16-29 - reakcja DNA roślin odmiany Hinnonmaki Rot ze starterami Pst-CAG/Mse-TG (16-28 – rośliny z kultur *in vitro*, 29 - roślina mateczna); 30-45 - reakcja DNA roślin odmiany Captivator ze starterami Pst-AT/Mse-CG (30-44 – rośliny z kultur *in vitro*, 45 - roślina mateczna)

Fig. 1. Fragment of electrophoretic banding pattern of AFLP-PCR; 1 – 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 2-15 – reaction of DNA of Hinnonmaki Rot plants with Pst-AGC/Mse-CT primers (2-14 – *in vitro*-derived plants, 15 - donor plant); 16-29 - reaction of DNA of Hinnonmaki Rot plants with Pst-CAG/Mse-TG primers (16-28 – *in vitro*-derived plants, 29 - donor plant); 30-45 - reaction of DNA of Captivator plants with Pst-AT/Mse-CG primers (30-44 – *in vitro*-derived plants, 45 - donor plant)

do badania zmienności somaklonalnej, ale także do identyfikacji genotypów, badania tożsamości odmianowej oraz określania pokrewieństwa w obrębie wielu gatunków roślin sadowniczych, w tym z rodzaju *Ribes* (Lanham i Brennan 2001, Brennan i in. 2008, Cavanna i in. 2009). W naszych badaniach zdecydowaliśmy się zastosować technikę AFLP ponieważ została ona uznana za najefektywniejszą w detekcji polimorfizmu DNA u agrestu (Lanham i Brennan, 1999a) oraz jest szeroko stosowana w przypadku u innych gatunków (Bahulikar i in. 2004, Meudt i Clarke 2007, Kumar i in 2013, Costa i in. 2016).

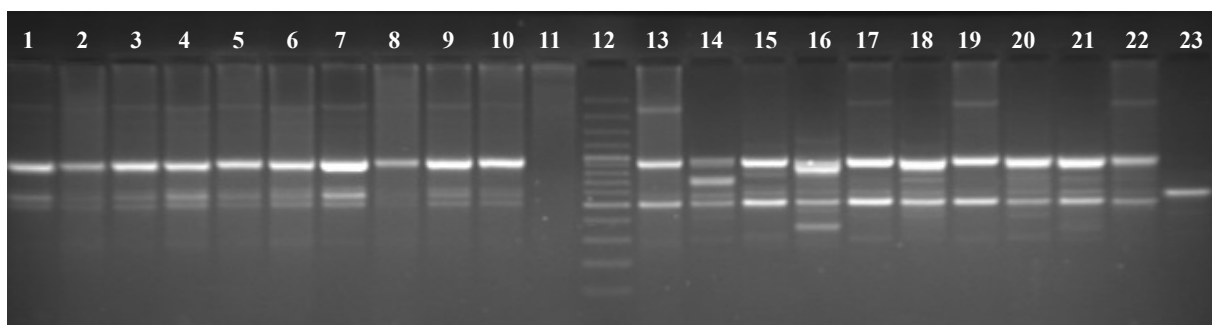
Markery oparte na DNA uzyskanym w reakcjach RAPD oraz ISSR-PCR były stosowane do scharakteryzowania genotypów skolekcjonowanych

w banku genów i używanych w programach hodowlanych IO takich roślin jak: truskawki, jabłonie, porzeczka czerwona i czarna oraz agrest (Korbin i in. 2002). W badaniach nad polimorfizmem 12 odmian agrestu Lanham i Brennan (1999a, 1999b, 2001) wykazali, że użycie starterów ISSR nie pozwoliło na odróżnienie od siebie 3 odmian. W naszych pracach zastosowane startery ISSR pozwoliły na odróżnienie 5 badanych genotypów agrestu. Największy polimorfizm uzyskano dla odmiany 'Hinsel', w której każdy z pięciu testowanych starterów wykazywał obecność produktów polimorficznych (tab. 3, rys. 3). Tak duża zmienność odmiany 'Hinsel', w porównaniu to innych badanych genotypów, świadczy o jej niestabilności genetycznej.



Rys. 2. Elektroforegram produktów PCR z zastosowaniem startera 825 dla odmiany Hinnonmaki Rot, ścieżka 1 i 14: roślina mateczna, 2–11: sadzonki z kultur *in vitro*, 12: kontrola negatywna, 13: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 14–24 sadzonki wegetatywne

Fig. 2. Electrophoretic banding pattern of PCR products using primer 825 for cultivar Hinnonmaki Rot, lane 1 and 14: donor plant, 2–11: seedlings from cultures *in vitro*, 12: negative control, 13: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 14–24 vegetative seedlings



Rys. 3. Elektroforegram produktów PCR z zastosowaniem startera 848 dla odmiany Hinsel, ścieżka 1–10: sadzonki z kultur *in vitro*, 11: kontrola negatywna, 12: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 13: roślina mateczna, 14–23 sadzonki wegetatywne

Fig. 3. Electrophoretic banding pattern of PCR products using primer 848 for cultivar Hinsel, lane 1–10: seedlings from cultures *in vitro*, 11: negative control, 12: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 13: donor plant, 14–23: vegetative seedlings

Wnioski

1. Wysokość, szerokość oraz liczba pędów krzewów *in vitro*, w porównaniu do rozmnażanych *ex vitro*, były istotnie wyższe dla większości ocenianych genotypów agrestu.
2. Potwierdzono skuteczność techniki AFLP w detekcji stopnia zmienności somaklonalnej u agrestu, generowanej w procesie rozmnażania *in vitro*.
3. Odmiany 'Captivator', 'Invicta', 'Hinnonmaki Rot' i 'Resika' wykazują stabilność genetyczną w kulturach *in vitro*. Zastosowanie opracowanej metody mikrorozmnażania agrestu pozwala uzyskać rośliny jednorodnie genetycznie.
4. Odmiana 'Hinsel' charakteryzuje się wyższym stopniem zmienności w kulturach *in vitro*.

Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie rozporządzenia MRiRW z dnia 29 lipca 2015 r. (Dz. U. poz. 1170, z późn. zm.). Zadanie nr 79

Literatura

- Bahulikar R.A., Stanculescu D., Preston C.A., Baldwin I.T. 2004. ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, in SW Utah. *BMC Ecol.* 4: 12.
- Cavanna M., Marinoni D.T., Beccaro G.L., Bounous G. 2009. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm. *Genome* 52(10): 839-848.
- Costa R., Pereira G., Garrido I., Tavares-deSousa M.M., Espinosa F. 2016. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and classify orchard-grass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations. *PLoS ONE* 11(4): e0152972. doi:10.1371/journal.pone.0152972.
- Drew R.A., Smith M.K. (1990): Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Austr. J. Exp. Agric.*, 30: 569-574.
- Dubois L.A.M., Roggermans J., Soyeurt G., de Vries D.P. (1988): Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated *in vitro* and *in vivo* by softwood cuttings. *Sci. Hortic.*, 55: 293-299.
- Howard B.H., Jones O.P., Vasek J. (1989): Long-term improvement in the rooting of plum cuttings following apparent rejuvenation. *J. Hort. Sci.*, 64: 147-156.
- Korbin M., Kuras A., Żurawicz E. 2002. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7(2B): 785-94.
- Kucharska D., Orlikowska T., Maciorowski R., Kunka M., Wójcik D., Pluta S. 2020. Application of meta-topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*). *Sci. Hort.*, 272: 109529. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109529>
- Kumar A., Misra P., Dube A. 2013. Amplified fragment length polymorphism: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites. *Parasitol. Res.* 112: 457-466.
- Lanham P.G., Brennan R.M. 1999a. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. *J. Hort. Sci. Biotech.* 74(3): 361-366.
- Lanham P.G., Brennan R.M. 1999b. Genetic characterisation of *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* and *Ribes grossularia*. *Acta Hort.* 505: 385-392.
- Lanham P.G., Brennan R.M. 2001. Genetic diversity in *Ribes*. *Acta Hort.* 546: 135-137.
- Meudt H.M., Clarke A.C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12(3): 106-117.
- Podwyszyńska M., Niedoba K., Korbin M., Marasek A. 2006. Somaclonal variation in micropropagated tulips determined by phenotype and DNA markers. *Acta Hort.* 714: 211-220.
- Podwyszyńska M., Pluta S. 2019. *In vitro* tetraploid induction of the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and preliminary phenotypic observations. *Zemdirbyste-Agriculture*, 106(2), 151-158.
- Reed B.M., Hummer K.E. 2002. Cryopreservation of *Ribes*. W: Towill L.E., Bajaj Y.P.S. (red.), *Cryopreservation of Plant Germplasm II. Biotech. in Agriculture and Forestry* 50: 323-343.
- Sedlák J., Paprštejn F. 2012. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars. *Hort. Sci.* 39: 21-25.
- Wainwright H., Flegmann A.W. 1986. Studies on the micropropagation of *Ribes* species. *Acta Horticulturae* 183: 315-322.
- Welander M. 1985. Micropropagation of gooseberry, *Ribes grossularia*. *Sci. Hort.* 26(3): 267-272.
- Zabeau M., Vos P., 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7, Publication number 0 534 858 A1.