Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2020, 23 (2), 168-181
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Изследване на самонесъвместимост (*S*) в генотипи при местни видове череши, отглеждани в Балканския регион

Сладжана Марич[1]*, Саня Радичевич[1], Небойша Милочевич[1], Мелпомена Поповска[2], Светослав Малчев[3], Ивана Глишич[1], Милена Джорджевич[1]

[1]Изследователски институт по овощарство, "Краля Петра I" 9, 32000 Чачак, Република Сърбия
[2]Университет ,,Св. св. Кирил и Методий,, Аграрен институт - Скопие, бул. Александър Македонски, 1000 Скопие, Република Северна Македония
[3]Институт по овощарство, Остромила 12, 4004 Пловдив, Република България

An overview of self-incompatibility (*S*) genotypes of autochthonous sweet cherries grown in Balkan region

Slađana Marić[1]*, Sanja Radičević[1], Nebojša Milošević[1], Melpomena Popovska[2], Svetoslav Malchev[3], Ivana Glišić[1], Milena Đorđević[1]

[1]Fruit Research Institute, Kralja Petra I/9, 32000 Čačak, Republic of Serbia
[2]University 'Ss. Cyril and Methodius', Institute of Agriculture - Skopje, Blvd. Aleksandar Makedonski bb, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia
[3]Fruit Growing Institute, Ostromila 12, 4004 Plovdiv, Republic of Bulgaria
**E-mail: smaric@institut-cacak.org*

Original scientific paper

РЕЗЮМЕ

Определянето на *S*-алелни конституции на стари генотипове череши е важна стъпка в молекулярната характеристика, а също и от огромно значение за производителите и селекционерите, тъй като черешата проявява гаметофитна самосъвместимост, контролирана от многоалелния *S*-локус, който предотвратява самоопрашването. Целта на настоящото изследване е да се обобщят известните и да се разкрият нови данни за *S*-алелите в стари генотипове с произход от балканските страни – Република Сърбия (15 генотипа), Република Северна Македония (8 генотипа) и Република

SUMMARY

Determination of *S*-allelic constitutions of autochthonous sweet cherry genotypes is an important step in molecular characterization of this material and also of enormous significance for growers and breeders, since this fruit species exhibits a gametophytic self-incompatibility, controlled by the multi-allelic *S*-locus which prevents self-fertilisation. The aim of this work was to summarize known and to reveal new data of the *S*-alleles in autochthonous genotypes originated in the Balkan countries – Republic of Serbia (15 genotypes), Republic of North Macedonia (8 genotypes) and Republic of Bulgaria (2

България (2 генотипа). Чрез полимеразна верижна реакция (PCR) с консенсусни праймери за втория интрон (PaConsII-F/R) на *S-RNase* и специфични за алела праймери се разкриха осем алела, генериращи следните *S*-алелни конституции: S_1S_2 (един генотип), S_1S_5 (един генотип), S_2S_3 (пет генотипа), S_2S_4 (един генотип), S_3S_4 (два генотипа), S_3S_6 (два генотипа), S_3S_9 (два генотипа), S_3S_{12} (шест генотипа), S_6S_9 (два генотипа), S_4S_x (два генотипа) и S_5S_x (един генотип). Най-честите *S*-алелни и алелни конституции в настоящото проучване са S_3 и S_3S_{12} (38.6% и 24%, съответно). Въз основа на получените резултати изследваните генотипи са разпределени в девет несъвместими групи. Настоящото проучване представлява първият основен етап на характеризиране на автохтонни генотипи от череши, произхождащи от гореспоменатите страни, който трябва да бъде разширен чрез включване на нови местни сортове.

Ключови думи: *Prunus avium* L., местен генотип, *S*-алелна конституция, гаметофитна самонесъвместимост, Балкански полуостров

genotypes). The use of the polymerase chain reaction (PCR) with consensus primers for the second intron (PaConsII-F/R) of *S-RNase* and allele-specific primers revealed eight alleles that generated the following *S*-allelic constitutions: S_1S_2 (one genotype), S_1S_5 (one genotype), S_2S_3 (five genotypes), S_2S_4 (one genotype), S_3S_4 (two genotypes), S_3S_6 (two genotypes), S_3S_9 (two genotypes), S_3S_{12} (six genotypes), S_6S_9 (two genotypes), S_4S_x (two genotypes) and S_5S_x (one genotype). The most frequent *S*-allele and allelic constitution in this work were S_3 and S_3S_{12} (38.6% and 24%, resp.). Based on the obtained results, the assessed genotypes have been assigned to nine incompatibility groups. This study represents the first fundamental stage of characterization of autochthonous sweet cherry genotypes originating from aforementioned countries, which needs to be enlarged through inclusion of new landraces.

Key words: *Prunus avium* L., indigenous genotype, *S*-allelic constitution, gametophytic self-incompatibility, Balkan Peninsula

УВОД

Черешата (*Prunus avium* L.) е икономически важен овощен вид в страните на Балканския полуостров. Според Организацията по прехрана и земеделие на Организацията на обединените нации, средното годишно производство на череши (2014–2018) е 44 983 t, 22 044 t и 5 606 t съответно в Република България, Република Сърбия и Република Северна Македония. Webster (1996) и Quero-García et al. (2019) посочват, че този вид може да е възникнал в регион около Каспийско и Черно море, както и че редица местни генотипи, адаптирани към конкретни агроекологични условия, са резултат от разпространението му в Европа. Също така, Faust and Surányi (1997) посочват, че черешата се среща естествено в

INTRODUCTION

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is an economically important fruit species in the countries of the Balkan Peninsula. According to Food and Agriculture Organization of the United Nations, the average annual sweet cherry production (2014–2018) was 44,983 t, 22,044 t and 5,606 t in the Republic of Bulgaria, Republic of Serbia and Republic of North Macedonia, respectively. Webster (1996) and Quero-García et al. (2019) reported that this fruit species may have originated within a region around the Caspian (Sea) and the Black Sea, as well as that a number of local genotypes, adapted to particular agro-ecological conditions, resulted from its spreading across Europe. Also, Faust and Surányi (1997) pointed out that sweet cherry occurs

Европа и районите на Северна Африка. Тъй като произходът на старите генотипи е неизвестен и могат да възникнат случаи на омоними или синоними, е необходимо надеждно идентифициране. Това също представлява повтарящ се проблем при събирането и опазването на автохтонни генотипи череши по целия свят.

Черешовата зародишна плазма в балканските страни е адаптирана към различни и неподходящи среди; потенциално е снабдена с полезна генетична променливост (т.е. качество на плодовете, устойчивост), напр. Охридската област е типична зона за отглеждане на череши, чийто асортимент се основава предимно на автохтонните генотипи на висококачествени плодове, главно „Охридска долга Шишка" (Gjamovski et al., 2016). В допълнение, настоящата статия с полезните си характеристики може да разшири списъка с потенциални родителски сортове, които да бъдат използвани в селекционните програми, а също така може да бъде основният фактор за съживяване на основните македонски райони за отглеждане на череши. Fotirić-Akšić и др. (2016) отбелязват, че току-що пуснатият сръбски сорт череши „Канетова" произхожда от естествена популация. „Ранна Черна" е един от най-разпространените рано зреещи местни сортове череши в Република България, доста често използван като родител в рамките на развъдните програми (Malchev, 2016). Първият сорт череши, създаден в Институт по овощарство, Пловдив, Република България, е „Косара", получен от кръстоски на „Ранна Черна" × „Бигаро Бурла" (Malchev and Zhivondov, 2016; Marić et al., 2018).

При черешите, с много малко изключения, повечето генотипи са несъвместими и някои двойки генотипи са несъвместими за кръстосване (реципрочно или едностранно). Тази гаметофитна несъвместимост се контролира от мултиалелни два свързани гена от *S*-локус – *S-RNase* гени (Bošković and

naturally in Europe and areas of northern Africa. Since the origin of these old genotypes is mostly undocumented, and cases of homonyms or synonyms might occur, a reliable identification is required. This also represents a recurrent problem in the collection and conservation of autochthonous sweet cherry genotypes worldwide.

Cherry germplasm in the Balkan countries is adapted to different and inappropriate environments; it is potentially provided with useful genetic variability (i.e. fruit quality, resistance), e.g. the Ohrid region is a typical area for sweet cherry growing whose assortment is primarily based on the autochthonous genotypes of high quality fruits, mainly 'Ohridska Dolga Šiška' (Gjamovski et al., 2016). In addition, this material with useful traits can extend the list of potential parental cultivars to be used in breeding programmes and can also be the main factor for revitalizing major Macedonian sweet cherry growing regions.

Fotirić-Akšić et al. (2016) reported that newly released Serbian sweet cherry cultivar 'Canetova' originated from natural population. 'Ranna Tcherna' is one of the most widespread early ripening local sweet cherry cultivar in the Republic Bulgaria, quite often used as parent within breeding programmes (Malchev, 2016).

The first sweet cherry cultivar released at Fruit Growing Institute (FGI), Plovdiv, Republic of Bulgaria was 'Kossara', which was derived from the cross 'Ranna Tcherna' × 'Bigareau Burlat' (Malchev and Zhivondov, 2016; Marić et al., 2018).

In sweet cherry, apart from very few exceptions, most genotypes are self-incompatible and certain pairs of genotypes are cross-incompatible (reciprocally or unilaterally). This gametophytic self-incompatibility mechanism is controlled by the multiallelic two linked genes of *S*-locus – *S-RNase* (Bošković and Tobutt, 1996)

Tobutt, 1996) и *SFB* (Yamane et al., 2003), изразени съответно в стълбчето и тичинковия прашец. Продуктът на стълбчето (S-RNase) взаимодейства по алелно специфичен начин с поленовия продукт (SFB), за да инхибира растежа на прашниковата тръбичка в стълбчето о, съдържаща идентичен *S*-хаплотип. Към днешна дата са посочени 25 *S*-алела при черешата (Vaughan et al., 2008). Анализът на общо 1300 сорта череши разкри полиморфизъм (18 различни *S* - алела: S_1 до S_7, S_9, S_{10} , S_{12} до S_{14} , S_{16} , S_{18} , S_{19} , S_{21} , S_{22} и S_{24}), което позволява идентифициране на 60 групи за несъвместимост (ГН), група от '0' уникални *S*-генотипи и група от самосъвместими (СС) сорта (Schuster, 2017). Vaughan et al. (2008) съобщават за шест *S*-алела, идентифицирани само при дивата череша в Западна Европа, които са приписани на S_{27} на S_{32} алели. В допълнение, нов алел S_{37} и вишна S_{34}-алел са идентифицирани при турските череши и генотипи, избрани от диви популации в района на Черно море (Szikriszt et al., 2013). Поради прилагането алел-специфични PCR-базирани методи и постигнатия висок полиморфизъм, *S*-локусът се използва също като генетичен маркер за генотипиране и идентификация на местни и чуждестранни сортове череши в Изследователски институ по овощарство (FRI), Чачак, Република Сърбия (Marić and Radičević, 2014; Radičević et al., 2015). Освен това, *S*-генотипирането се е превърнало в полезен инструмент за оценка на разнообразието в местната зародишна черешова плазма в различни страни на Европа и Северна и Западна Азия, което разкрива високо ниво на генетично разнообразие сред местните сортове (Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012; Cachi and Wünsch, 2014a; Lisek et al., 2015; Schuster, 2017; Marchese et al., 2017).

Mariette et al. (2010) съобщават за намаляване на генетичното разнообразие от дивата природа до местни-

and *SFB* (Yamane et al., 2003) genes, expressed in the style and the pollen, respectively. The stylar product (S-RNase) interacts in an allele specific manner with the pollen product (SFB) to inhibit pollen tube growth in the styles containing an identical *S*-haplotype.

To date, 25 *S*-alleles have been reported in sweet cherry (Vaughan et al., 2008). The analysis of in total 1,300 sweet cherry cultivars revealed a polymorphism (18 different *S*-alleles: S_1 to S_7, S_9, S_{10}, S_{12} to S_{14}, S_{16}, S_{18}, S_{19}, S_{21}, S_{22} and S_{24}) that allowed identification of 60 incompatibility groups (IGs), a group of '0' of unique *S*-genotypes and a group of self-compatible (SC) cultivars (Schuster, 2017). Vaughan et al. (2008) reported six *S*-alleles identified only in wild cherry of Western Europe, which were attributed to S_{27} to S_{32} alleles. In addition, a new S_{37} allele and the sour cherry S_{34}-allele were identified in Turkish sweet cherry landraces and genotypes selected from populations growing wild in the Black Sea area (Szikriszt et al., 2013).

Due to the application of consensus/allele-specific PCR-based methods and obtained high polymorphism, the *S*-locus has also been used as a genetic marker for genotyping and identification of domestic and foreign sweet cherry cultivars at Fruit Research Institute (FRI), Čačak, Republic of Serbia (Marić and Radičević, 2014; Radičević et al., 2015). Additionally, *S*-genotyping has become a useful tool for diversity assessment in local sweet cherry germplasm in different countries of Europe and northern and western Asia, which revealed high levels of genetic diversity among landraces (Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012; Cachi and Wünsch, 2014a; Lisek et al., 2015; Schuster, 2017; Marchese et al., 2017).

However, Mariette et al. (2010) reported a reduction in genetic diversity from wild to landrace to modern sweet

те и съвременните сортове череши, както и че култивирането и селекцията имат две основни въздействия върху намаляването на разнообразието. Местните сортове череши като например италианската „Кронио“ и испанските „Кристобалина“ и „Талегал Ахин“ са източник на самосъвместимост, за която също са разработени ДНК маркери (Marchese et al., 2007; Cachi and Wünsch, 2014b).

Напоследък интересът към събирането и оценката на автохтонни генотипи на череши с добри агрономични свойства в Балканския регион и молекулярна характеристика на този материал са засилени в Института в Чачак, в сътрудничество с Аграрен институт "Св. св. Кирил и Методий", Скопие и Института в Пловдив (Marić et al., 2018, 2019a, 2019b; Radicevic et al., 2019).

Целта на настоящото проучване бе да се обобщят всички известни данни за *S*-алелите при автохтонните генотипи на череши в гореспоменатите балкански страни и да се отчетат нови данни за генотипа, които не са публикувани преди това. Получените резултати ще бъдат полезни както за селекционерите, така и за производителите, за да управляват по-добре този ценен автохтонен черешов материал.

cherry cultivars, as well as that domestication and breeding had two major impacts on a decrease of diversity. Sweet cherry landraces such as the Italian ‘Kronio’ and the Spanish ‘Cristobalina’ and ‘Talegal Ahin’ are the source of self-compatibility, for which DNA markers have also been developed (Marchese et al., 2007; Cachi and Wünsch, 2014b).

Recently, the interest in collection and evaluation of autochthonous sweet cherry genotypes with good agronomic properties in the Balkan region and molecular characterization of this material have been increased at the FRI, Čačak, in collaboration with University ‘Ss. Cyril and Methodius’, Institute of Agriculture, Skopje and FGI, Plovdiv (Marić et al., 2018, 2019a, 2019b; Radicevic et al., 2019).

The aim of this study was to summarize all known data on the *S*-alleles in autochthonous sweet cherry genotypes in the aforementioned Balkan countries and to report new genotype data which have not been previously published. Obtained results will be useful to both breeders and growers to better manage this valuable autochthonous cherry material.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал и извличане на ДНК

В настоящото проучване са използвани двадесет и пет автохтонни генотипа на череша (Таблица 1). проби от тези генотипове, съответстващи на местни разновидности или сортове с неизвестен произход са взети от овощни градини на отделни производители в Република Сърбия (региони Чачак и Белград) и Република Северна Македония (Охридска област), както и от черешова колекция на Института в Пловдив (Република България). Младите свежи листа от генотипите са събрани през пролетта, замразени са в течен азот и

MATERIAL AND METHODS

Plant material and DNA extraction

Twenty-five autochthonous sweet cherry genotypes (Table 1) were used in this study. These genotypes, corresponding to landraces or cultivars of unknown origin, were sampled in orchards of individual growers in the Republic of Serbia (the regions of Čačak and Belgrade) and the Republic of North Macedonia (the Ohrid region), as well as in the sweet cherry collection of FGI, Plovdiv (Republic of Bulgaria).

Young fresh leaves of the genotypes were collected in the spring, frozen in liquid

са съхранени при −80°C. Геномната ДНК е изолирана от листата съгласно метода на Doyle and Doyle (1987). Екстрахираната ДНК е разтворена в ТЕ буфер, третира се с RNase A (Invitrogen, Groningen, Холандия) и е държана при −20°C, докато е използвана за PCR.

PCR анализ за генотипиране на *S-RNase*

Идентифицирането на алелите *S-RNase* в автохтонни генотипи на череши се основава на метод, посочен от Sonneveld et al. (2001, 2003). PCR се извършват чрез използване на консенсусни праймерни двойки, специфични за вторите интрони на *S-RNase* (PaConsII-F / R, Sonneveld et al., 2003) и специфичните за алела праймери за S_1 до S_6 , както и за S_9 и S_{12} алели (Sonneveld et al., 2001, 2003). Температурите за нагряване за гореспоменатите *S*-алели са докладвани в проучванията на Marić and Radičević (2014) и Marić et al. (2015, 2018). Като еталонни генотипи са използвани сортове череши от известни *S*-алели.

Откриване и визуализация на ДНК фрагменти

PCR продуктите, получени с консенсусни праймери, се използват с 2% агарозен гел (70 V/cm за 4 h), докато продуктите на специфични за алела PCR с 1.5% агарозен гел (70 V/cm за 2-3 ч). Визуализацията на ДНК лентите е извършена чрез оцветяване с етидиев бромид и под ултравиолетова светлина на система за изображения BIO-PRINT-1500/26M (Vilber Lourmat, Collégien, Франция). За оразмеряване на фрагменти от ДНК се използва 1 Kb плюс ДНК стълбичка (Invitrogen, Groningen, Холандия).

nitrogen and stored at −80°C. Genomic DNA was isolated from leaves according to the method of Doyle and Doyle (1987). Extracted DNA was dissolved in TE buffer, treated with RNase A (Invitrogen, Groningen, the Netherlands) and kept at −20°C until used for PCRs.

PCR analysis for *S-RNase* genotyping

Identification of the *S-RNase* alleles in autochthonous sweet cherry genotypes was based on the method reported by Sonneveld et al. (2001, 2003). The PCRs were performed by using the consensus primer pairs specific for the second introns of the *S-RNase* (PaConsII-F/R, Sonneveld et al., 2003) and the allele-specific primers for S_1 to S_6, as well as for S_9 and S_{12} alleles (Sonneveld et al., 2001, 2003). Annealing temperatures for aforementioned *S*-alleles were reported in the studies by Marić and Radičević (2014) and Marić et al. (2015, 2018). Sweet cherry cultivars of known *S*-alleles were used as reference genotypes.

Detection and visualization of the DNA fragments

PCR products obtained with the consensus primers were run on a 2% agarose gel (70 V/cm for 4 h), whereas products of allele-specific PCRs on a 1.5% agarose gel (70 V/cm for 2-3 h). Visualization of DNA bands was performed by ethidium bromide staining and under ultraviolet light of BIO-PRINT-1500/26M imaging system (Vilber Lourmat, Collégien, French Republic). For sizing of DNA fragments, 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen, Groningen, the Netherlands) was used.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото проучване представя общ преглед на идентифицирането на *S-RNase* алели в 25 автохтонни генотипа от основните райони за отглеждане на череши в Република Сърбия, Република Северна Македония и Република

RESULTS AND DISCUSSION

This study presents an overview of *S-RNase* alleles identification in 25 autochthonous genotypes from the main sweet cherry growing regions of the Republic of Serbia, Republic of North Macedonia and Republic of Bulgaria (Table

България (Таблица 1). *S*-алелната конституция на всеки генотип се определя след комбиниране на резултатите, получени при PCR амплификация с консенсусни праймери за втория интрон на *S-RNase* (PaConsII-F/R) и праймерите, специфични за алели S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_9 и S_{12}. Сред оценените генотипи са определени следните *S*-алелни конституции: S_1S_2 ('Ранна черна'), S_1S_5 ('GT-1'), S_2S_3 ('GT-7', 'GT-14', 'GT-15', 'GT-16' and 'Кукленска белица'), S_2S_4 ('OCK-1'), S_3S_4 ('GT-10' и 'GT-12'), S_3S_6 ('GT-4' и 'GT-13'), S_3S_9 ('GT-8' and 'Охридска бърза'), S_3S_{12} ('GT-5', 'GT-6', 'ODŠ-O1', 'ODŠ-O2', 'ODŠ-S1' и 'ODŠ-S2'), S_6S_9 ('GT-2' и 'GT-11'), S_4S_x ('OCK-2' и 'Ohridska Crna') и S_5S_x ('GT-9'). *S*-генотип на бъл-гарския автохтонен сорт „Кукленска белица" е публикуван в този материал за първи път.

Като се имат предвид получените резултати, автохтонните генотипи са преписани на съответните им групи по несъвместимост, публикувани по-рано от Schuster (2012, 2017). Следователно ние определихме следните девет групи по несъвместимост: I, III, IV, VI, X, XIII, XIV, XVI и XXII (Таблица 1); резултатите от настоящото проучване ще разширят тези групи, като включват автохтонни балкански генотипи. Група XXII е най-разпространената ГН, включваща почти една четвърт (24%) от оценените генотипи. Три генотипа не са преписани към предварително идентифицираните ГН, тъй като вторият алел за 'OCK-2', 'Охридска черна' и ′ GT-9' не е определен. Единичната лента за тези генотипи върху агарозния гел (в позицията, съответстваща на алел S_4 за OCK-2' и 'Охридска черна', както и алел S_5 за GGT-9') може да означава или че и двата *S*-алела имат интрони със същия размер или праймерите не съответстват на последователността на втория алел (Marić et al., 2019a, 2019b). Следователно, допълнителният анализ ще се съсредоточи върху възможното идентифициране на втория *S*-алел

1). The *S*-allelic constitution of each genotype was determined after combining the results obtained upon PCR amplification with the consensus primers for the second intron of *S-RNase* (PaConsII-F/R) and the primers specific to alleles S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_9 and S_{12}. Among the assessed genotypes, the following *S*-allelic constitutions were determined: S_1S_2 ('Ranna Tcherna'), S_1S_5 ('GT-1'), S_2S_3 ('GT-7', 'GT-14', 'GT-15', 'GT-16' and 'Kuklenska Belica'), S_2S_4 ('OCK-1'), S_3S_4 ('GT-10' and 'GT-12'), S_3S_6 ('GT-4' and 'GT-13'), S_3S_9 ('GT-8' and 'Ohridska Brza'), S_3S_{12} ('GT-5', 'GT-6', 'ODŠ-O1', 'ODŠ-O2', 'ODŠ-S1' and 'ODŠ-S2'), S_6S_9 ('GT-2' and 'GT-11'), S_4S_x ('OCK-2' and 'Ohridska Crna') and S_5S_x ('GT-9'). The *S*-genotype for Bulgarian autochthonous cultivar 'Kuklenska Belica' is published in this paper for the first time.

Considering the obtained results, the autochthonous genotypes were assigned to their corresponding IGs, previously published by Schuster (2012, 2017). Therefore, we determined the following nine IGs: I, III, IV, VI, X, XIII, XIV, XVI and XXII (Table 1); the results of our study will extended these groups by including autochthonous Balkan genotypes. Group XXII was the most common IG, comprising nearly a quarter (24%) of the assessed genotypes. Three genotypes were not assigned to previously identified IGs, since the second allele for 'OCK-2', 'Ohridska Crna' and 'GT-9' was not determined. The single band for these genotypes on the agarose gel (on the position corresponding to allele S_4 for OCK-2' and 'Ohridska Crna', as well as allele S_5 for 'GT-9') could mean either that two *S*-alleles have the introns of the same size, or the primers do not match the sequence of the second allele (Marić et al., 2019a, 2019b).

Therefore, the additional analysis will focus on possible identification of the second *S*-allele of these genotypes through cloning and sequencing of the

от тези генотипове чрез клониране и секвениране на ДНК фрагментите.

DNA fragments.

Таблица 1. S-генотипи и групи по несъвместимост на автохтонни сортове череши

Table 1. *S*-genotypes and incompatibility groups of autochthonous sweet cherries

Произход Origin*	Генотип Name of genotype	*S-генотип* *S*-genotype	ГН IG	Справка за S-генотип Reference for *S*-genotype
RS	'GT-1'	S_1S_5	XIV	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-2'	S_6S_9	X	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-4'	S_3S_6	VI	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-5'	S_3S_{12}	XXII	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-6'	S_3S_{12}	XXII	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-7'	S_2S_3	IV	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-8'	S_3S_9	XVI	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-9'	S_5S_x	/	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-10'	S_3S_4	III	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-11'	S_6S_9	X	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-12'	S_3S_4	III	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-13'	S_3S_6	VI	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-14'	S_2S_3	IV	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-15'	S_2S_3	IV	Marić et al. (2019a)
RS	'GT-16'	S_2S_3	IV	Marić et al. (2019a)
MK	'ODŠ-O1'	S_3S_{12}	XXII	Marić et al. (2019b)
MK	'ODŠ-O2'	S_3S_{12}	XXII	Marić et al. (2019b)
MK	'ODŠ-S1'	S_3S_{12}	XXII	Marić et al. (2019b)
MK	'ODŠ-S2'	S_3S_{12}	XXII	Marić et al. (2019b)
MK	'OCK-1'	S_2S_4	XIII	Marić et al. (2019b)
MK	'OCK-2'	S_4S_x	/	Marić et al. (2019b)
MK	'Ohridska Brza'	S_3S_9	XVI	Marić et al. (2019b)
MK	'Ohridska Crna'	S_4S_x	/	Marić et al. (2019b)
BG	'Kuklenska Belica'	S_2S_3	IV	Настоящето проучване/This study
BG	'Ranna Tcherna'	S_1S_2	I	Marić et al. (2018)

*Държава според списък с кодове ISO 3166

*Country according ISO 3166 code list.

В настоящото проучване са определени общо осем различни *S*-алела: S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_9 и S_{12} в 25 местни сръбски, македонски и български генотипи от череши. Броят на идентифицираните и честота на *S-RNase* алелите в изследваната зародишна плазма от череши е показан в Таблица 2 (с изключение на три генотипа, за които вторият алел не е определен). Следователно, най-често срещания

In this study, a total of eight different *S*-alleles: S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_9 and S_{12} in 25 local Serbian, Macedonian and Bulgarian sweet cherry genotypes were determined. The number of times identified and frequency of the *S-RNase* alleles in the assessed cherry germplasm is shown in Table 2 (excluding three genotypes for which the second allele was not determined). Therefore, the most frequent allele in this material was

алел в този материал е S_3 (38.6%) и сравнително по-висока честота на срещане (>10%) е наблюдавана за алели S_2 и S_{12} (съответно 15,9% и 13,6%). Също така, Ercisli et al. (2012) откриват осем горепосочени *S*-алела в 37 хърватски генотипа на череши и съобщават подобни честоти за алели S_3 (39%) и S_{12} (19%). Географското разпространение на *S*-алелите може да показва общ произход или генетична връзка на генотипи, разпространени в по-близки райони, или възможна връзка на някои *S*-алели с адаптивни характеристики, свързани с климатичните условия в различни райони (Cachi and Wünsch, 2014a).

S_3 (38.6%) and a relatively higher frequency of occurrence (> 10%) was observed for alleles S_2 and S_{12} (15.9% and 13.6%, resp.). Also, Ercisli et al. (2012) found eight aforementioned *S*-alleles in 37 Croatian sweet cherry genotypes and reported similar frequencies for alleles S_3 (39%) and S_{12} (19%). The geographical distribution of *S*-alleles may indicate a common origin or genetic relationship of genotypes spread in closer areas or a possible association of certain *S*-alleles with adaptive traits correlated to climatic conditions in different areas (Cachi and Wünsch, 2014a).

Таблица 2. Брой идентифицирани честота на *S-RNase* алели при генплазма на автохтонни сортове череши представени в Таблица 1
Table 2. Number of times identified and frequency of the *S-RNase* alleles in the sweet cherry autochthonous germplasm presented in Table 1

S-RNase алел *S-RNase* allele*	Брой идентифицирани Number of times indentified	*Честота на S-RNase алел (%)* *S-RNase* allele frequency (%)
S_1	2	4.6
S_2	7	15.9
S_3	17	38.6
S_4	3	6.8
S_5	1	2.3
S_6	4	9.1
S_9	4	9.1
S_{12}	6	13.6
Total:	44	100.0

*Три генотипи са изключени (‘GT-9’, ‘OCK-2’ и ‘Охридска църна‘)

*Three genotypes were excluded (‘GT-9’, ‘OCK-2’ and ‘Ohridska Crna’)

S_3 е най-често срещаният алел на череша в Турция (29,6%; Ipek et al., 2011), Чехия (34,4%; Lisek et al., 2015), Италия (25%; Marchese et al., 2017), Испания (38%; Cachi and Wünsch, 2014a). Също така, Cachi and Wünsch (2014a) посочват, че сред 545 европейски сорта череши, докладвани и събрани от Schuster (2012) и 64 местни испански сорта, анализирани в тяхната работа, най-често срещаният алел е S_3 (приблизително 28%). Тъкмо обратното, алел S_{12} е много рядък при евро-

S_3 was the most frequent sweet cherry allele in Turkey (29.6%; Ipek et al., 2011), Czechia (34.4%; Lisek et al., 2015), Italy (25%; Marchese et al., 2017), Spain (38%; Cachi and Wünsch, 2014a). Also, Cachi and Wünsch (2014a) stated that among 545 European sweet cherry cultivars reported and compiled by Schuster (2012) and 64 local Spanish cultivars analyzed in their work, the most frequent allele was S_3 (approximately 28%). Contrary, S_{12} allele was very rare in the European cultivars (Cachi and

пейските сортове (Cachi и Wünsch, 2014a), но е често срещан при турски и хърватски генотипи (Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012). Имайки предвид нашите резултати, сравнително по-високата честота на алел S_{12} в балканските страни може да бъде свързана с тяхната дълга обща история. S_2 поява в нашето изследване (15,9%) е подобно на съобщеното в турската зародишна плазма (14,8%) от Ipek et al. (2011), докато честотата на този алел в хърватските ендемични растения е била 8% (Ercisli et al., 2012). Marchese et al. (2017) съобщават за рядкост на S_1, S_2 и S_4 алели в 186 местни череши от 12 италиански региона. Също така, Cachi and Wünsch (2014a) установяват, че алел S_2 е по-рядък в Западна Испания (1%) и не е открит в генотипи, произхождащи от източната и северната част на страната.

Алели S_6 и S_9, срещащи се с честота 9,1% в настоящото изследване, също се срещат често в хърватски (намира се в 8%; Ercisli et al., 2012) и турски (S_6 – 11,1%, S_9 – 7,5%; Ipek et al., 2011) генотипи на череша. Marchese et al. (2017) съобщава, че S_6 е един от най-често срещаните *S*-алела в италианската зародишна плазма (19%), докато S_9 е по-рядък (4%). Подобни резултати са публикувани от Cachi и Wünsch (2014a), които отчитат честота от 26% за алел S_6 при испански местни сортове и по-ниска честота за S_9 (8% в северната част и по-малко от 3% в западната и източната част на страната). Сравнително висока честота на алел S_9 (20.4%) е наблюдавана при генотипи с произход от Украйна (Lisek et al., 2015). Относно S_4 , срещащ се с честота от 6,8% в настоящото проучване, този алел е изключително рядък в италианските (1%) и хърватските (2,5%) местни сортове (Ercisli et al., 2012; Marchese et al., 2017). По-висока честота за S_4 е открита в испански (от северна част), чешки и турски генотипи (съответно 23%, 21,9% и 13,6%; Cachi and Wünsch, Wünsch, 2014a), but is commonly found in Turkish and Croatian genotypes (Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012). Considering our results, a relatively higher frequency of S_{12} allele in the Balkan countries may be associated with their long common history. S_2 occurrence in our study (15.9%) was similar to that reported in Turkish germplasm (14.8%) by Ipek et al. (2011), while the frequency of this allele in Croatian landraces was 8% (Ercisli et al., 2012).

Marchese et al. (2017) stated the rarity of S_1, S_2 and S_4 alleles in 186 local sweet cherry accessions from 12 Italian regions. Also, Cachi and Wünsch (2014a) found that S_2 allele was less frequent in the Western Spain (1%) and was not found in the genotypes originated from the eastern and northern parts of this country.

The alleles S_6 and S_9, occurring at a frequency of 9.1% in our study, were also common in Croatian (being found in 8%; Ercisli et al., 2012) and Turkish (S_6 – 11.1%, S_9 – 7.5%; Ipek et al., 2011) sweet cherry genotypes. Marchese et al. (2017) reported that S_6 was one of the most frequent *S*-allele in the Italian germplasm (19%), while S_9 was less frequent (4%). Similar results were published by Cachi and Wünsch (2014a), who reported the frequency of 26% for allele S_6 in Spanish landraces, and lower frequency for S_9 (8% in northern part, and less than 3% in the western and eastern parts of the country). A relatively high occurrence of the allele S_9 (20.4%) was observed in genotypes originated from Ukraine (Lisek et al., 2015). Regarding S_4, occurring at a frequency of 6.8% in our study, this allele was extremely rare in the Italian (1%) and Croatian (2.5%) landraces (Ercisli et al., 2012; Marchese et al., 2017).

A higher frequency for S_4 was found in Spanish (from northern part), Czech and Turkish genotypes (23%, 21.9% and 13.6%, resp.; Cachi and Wünsch, 2014a;

2014a; Lisek et al., 2015; Ipek et al., 2011), наблюдавано е също така, че алели S_1, S_3, S_4 и S_6 се срещат много често при сортове от Северна и Централна Европа, докато алели S_3,S_6 и S_{22} в Южна Европа (Cachi and Wünsch, 2014a). Появата на S_1 (4,6%) е малко по-честа в сравнение с тези, посочени в турски и хърватски генотипи (2,5%) от Ipek et al. (2011) и Ercisli et al. (2012) съответно, както и в италианската зародишна плазма (3%), посочена от Marchese et al. (2017). По-голямото разпространение на S_1 е наблюдавано в генотипи, произхождащи от Чехия (25%) и Северна Испания (12%) (Cachi and Wünsch, 2014a; Lisek et al., 2015). Настоящето изследване разкри ниска честота на алел S_5 (2,3%), която е малко по-ниска в сравнение с появата на същия алел в турски (5%) и хърватски (7%) зародишни плазми (Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012). S_5 е изключително рядко срещан в италианските местни сортове (1%; Marchese et al., 2017), както и в испански генотипи, произхождащи от западната част на страната (1%), докато не бе открит и в северната и източната част (Cachi and Wünsch, 2014a). Lisek et al. (2015) съобщават за висока честота на S_5 в украинската зародишна плазма (20.4%), което значително отличава тези сортове от сортовете с произход от други региони на Европа.

Настоящото изследване и проучването на Ercisli et al. (2012) разкриват осем *S*-алела: S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_9 и S_{12}. Ipek et al. (2011) в допълнение към изброените осем откриват десет различни алела, S_7 и S_{10}. Също така, осем алела са докладвани от Lisek et al. (2015), но S_{13} е установен вместо S_{12}. Алел S_{12} също не е открит в испанската зародишна плазма, а Cachi and Wünsch (2014a) посочват десет идентифицирани алела, а именно S_{13}, S_{16} и S_{22} в допълнение към списъка на горе-споменатите алели. Най-високият полиморфизъм на S локус е наблюдаван в

Lisek et al., 2015; Ipek et al., 2011), and it was also observed that alleles S_1, S_3, S_4 and S_6 were highly frequent in cultivars from northern and central Europe, while alleles S_3, S_6 and S_{22} in southern Europe (Cachi and Wünsch, 2014a).

S_1 occurrence (4.6%) was a little bit higher compare to those reported in Turkish and Croatian genotypes (2.5%) by Ipek et al. (2011) and Ercisli et al. (2012) respectively, as well as in Italian germplasm (3%) reported by Marchese et al. (2017). The higher occurrence of S_1 was observed in genotypes originated from Czechia (25%) and northern Spain (12%) (Cachi and Wünsch, 2014a; Lisek et al., 2015). Our study revealed a low frequency of allele S_5 (2.3%), which was slightly lower in comparison with the occurrence of this allele in Turkish (5%) and Croatian (7%) germplasms (Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012). S_5 was extremely rare in the Italian landraces (1%; Marchese et al., 2017), as well as in Spanish genotypes originated from the western part of the country (1%), while it was not found in the northern and eastern parts (Cachi and Wünsch, 2014a). Lisek et al. (2015) reported the high frequency of S_5 in the Ukrainian germplasm (20.4%), which greatly differentiates these cultivars from the cultivars originating in other regions of Europe.

Our research and study of Ercisli et al. (2012) revealed eight *S*-alleles: S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_9 and S_{12}. Ipek et al. (2011) found ten different alleles, S_7 and S_{10} in addition to the eight listed. Also, eight alleles were reported by Lisek et al. (2015), but S_{13} was detected instead of S_{12}. The allele S_{12} was not found in the Spanish germplasm either, and Cachi and Wünsch (2014a) stated ten identified alleles, namely S_{13}, S_{16} and S_{22} in addition to the list of aforementioned alleles.

The highest polymorphism of *S*-loci was observed in Italian landraces; Marchese

италианските местни сортове; Marchese et al. (2017) съобщават за 17 алели, S_5', S7, S_{10}, S_{13}, S_{14}, S_{16}, S_{17}, S_{19} и S_{22} в допълнение към списъка с осемте алела. Все още няма отговор защо някои алели са често срещани в някои зародишни плазми на череши, докато други са редки; обаче, Marchese et al. (2017) разискват, че някои алели могат да бъдат свързани с характеристики на адаптиране към конкретни агроекологични условия или могат да бъдат резултат от ефекта на наблюдателя и селекционните събития (Kato and Mukai, 2004).

et al. (2017) reported 17 alleles, *S_5'*, *S_7*, *S_{10}*, *S_{13}*, *S_{14}*, *S_{16}*, *S_{17}*, *S_{19}* and *S_{22}* in addition to the list of eight alleles.

There is no answer yet why some alleles are frequent in certain sweet cherry germplasms whilst other are rare; however, Marchese et al. (2017) speculated that some alleles may be linked with traits of adaptation to particular agro-ecological conditions or could be the result of a founder effect and selection events (Kato and Mukai, 2004).

ИЗВОДИ

Прегледът, представен в настоящото изследване, е първият основен етап на характеризиране на автохтонния материал и трябва да бъде подобрен с някои нови данни за *S*-алели на череши за района на Балканите. За да се избегне загубата на настоящия материал е от съществено значение да се събират и изследват посочените генотипи, за да се позволи тяхното запазване в колекциите от череши. В допълнение, цялата нова информация е много важна за селекционните изследвания и за подходящ избор на опрашители в овощните градини с цел ефективно производство на черешови плодове.

CONCLUSIONS

The overview presented in this study is the first fundamental stage of characterization of autochthonous material and needs to be further improved with some new *S*-alleles data on sweet cherries in the Balkan region.

To avoid the loss of this material, it is essential to collect and evaluate these genotypes to allow their conservation in sweet cherry collections.

In addition, all new information is very important for the breeding research and for appropriate choice of pollenizers in the orchard aiming to the efficient production of sweet cherry fruits.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящето изследване е проведено с подкрепата на Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, договор No. 451-03-68/2020-14/200215 (включващ проект № 31064, озаглавен „Развитие и запазване на генетичния потенциал на плодовете в умерена климатична зона“.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was conducted under the support of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, contract No. 451-03-68/2020-14/200215 (including project No. 31064, titled ‘Development and preservation of genetic potential of temperate zone fruits’)..

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bošković, R. and K. R. Tobutt**, 1996. Correlation of Stylar Ribonuclease Zymograms with Incompatibility Alleles in Sweet Cherry. *Euphytica*, 90, 245-250.
2. **Cachi, A. M. and A. Wünsch**, 2014a. *S*-Genotyping of Sweet Cherry Varieties from Spain and *S*-Locus Diversity in Europe. *Euphytica*, 197, 229-236.

3. **Cachi, A. M. and A. Wünsch**, 2014b. Characterization of Self-Compatibility in Sweet Cherry Cultivars by Crossing Experiments and Molecular Genetic Analysis. *Tree Genetics and Genomes*, 10, 1205-1212.
4. **Doyle, J. J. and J. L. Doyle**, 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
5. **Ercisli, S., M. Radunic, J. Gadze, A. Ipek, M. Skaljac and Z. Cmelik**, 2012. *S*-RNase Based *S*-Genotyping of Croatian Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Genotypes. *Scientia Horticulturae*, 139, 21-24.
6. **Faust, M. and D. Surányi**, 1997. Origin and Dissemination of Cherry. In: Horticultural Reviews, Volume 19 (J. Janick, ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 263-317.
7. **Fotirić-Akšić, M., T. Nikolić, G. Zec, R. Cerović, M. Nikolić, V. Rakonjac and D. Nikolić**, 2016. 'Canetova', a New Sweet Cherry Cultivar from Serbia. In: Proceedings of Third Balkan Symposium on Fruit Growing, Republic of Serbia, Acta Horticulturae, 1139, pp. 91-94.
8. **Gjamovski, V., M. Kiprijanovski and T. Arsov**, 2016. Morphological and Pomological Characteristics of Some Autochthonous Sweet Cherry Cultivars in the Republic of Macedonia. In: Proceedings of Third Balkan Symposium on Fruit Growing, Republic of Serbia, Acta Horticulturae, 1139, pp. 147-152.
9. **Ipek, A., H. Gulen, M. E. Akcay, M. Ipek, S. Ergin and A. Eris**, 2011. Determination of Self-Incompatibility Groups of Sweet Cherry Genotypes from Turkey. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 253-260.
10. **Kato, S. and Y. Mukai**, 2004. Allelic Diversity of *S-RNase* at the Self-Incompatibility Locus in Natural Flowering Cherry Populations (*Prunus lannesiana* var. *speciosa*). *Heredity*, 92, 249-256.
11. **Lisek, A., E. Rozpara, A. Głowacka, D. Kucharska and M. Zawadzka**, 2015. Identification of *S*-Genotypes of Sweet Cherry Cultivars from Central and Eastern Europe. *Horticultural Science (Prague)*, 42(1), 13-21.
12. **Malchev, S.**, 2016. Research of Selected Hybrids and New Cultivars in Sweet Cherry Breeding. Dissertation, Plovdiv, Bulgaria.
13. **Malchev, S. and A. Zhivondov**, 2016. Breeding Programme for Developing New Sweet Cherry Cultivars in the Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria. *Agricultural Science and Technology*, 8(4), 289-291.
14. Marchese, A., R. I. Bošković, T. Caruso, A. Raimondo, M. Cutuli and K. R. Tobutt, 2007. A New Self-Compatibility Haplotype in the Sweet Cherry 'Kronio', S_5', Attributable to a Pollen-Part Mutation in the *SFB* gene. *Journal of Experimental Botany*, 58(15/16), 4347-4356.
15. **Marchese, A., D. Giovannini, A. Leone, R. Mafrica, M. Palasciano, C. Cantini, C. Di Vaio, F. R. De Salvador, G. Giacalone, T. Caruso and F. P. Marra**, 2017. *S*-Genotype Identification, Genetic Diversity and Structure Analysis of Italian Sweet Cherry Germplasm. *Tree Genetics and Genomes*, 13, 93.
16. **Marić, S. and S. Radičević** , 2014. Application of PCR Method in Determination of *S*-Genotype in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) at Fruit Research Institute – Čačak. *Journal of Pomology*, 48(185/186), 29-37 (Sr).
17. **Marić, S., S. Radičević, R. Cerović and D. Vranić** , 2015. Determination of *S*-Allelic Constitution in Some Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *Journal of Pomology*, 49(189/190), 43-48 (Sr).
18. **Marić, S., S. Radičević, S. Sirbu, A. Zhivondov, R. Cerović and N. Milošević**, 2018. *S*-genotyping of Some Sweet Cherry Cultivars Released Within Breeding

Programmes in the Balkan Region. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 72(2), 103-108.
19. **Marić, S., S. Radičević, N. Milošević, M. Fotirić Akšić, R. Cerović, I. Glišić and M. Đorđević**, 2019a. *S-RNase* Allele Identification and Incompatibility Group Assignment in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Autochthonous Genotypes. *Journal of Pomology*, 53(205/206), 45-52.
20. Marić, S., S. Radičević, M. Popovska, V. Gjamovski and N. Milošević, 2019b. Identification of *S*-alleles in Some Indigenous Sweet Cherry Genotypes Grown in Ohrid Region. In: Book of Proceedings of X International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2019", Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, pp. 493-499.
21. Mariette, S., M. Tavaud, U. Arunyawat, G. Capdeville, M. Millan and F. Salin, 2010. Population Structure and Genetic Bottleneck in Sweet Cherry Estimated with SSRs and the Gametophytic Self-Incompatibility Locus. *BMC Genetics*, 11, 77.
22. **Quero-García, J., A. Iezzoni, G. López-Ortega, C. Peace, M. Fouché, E. Dirlewanger and M. Schuster**, 2019. Advances and Challenges in Cherry Breeding. Burleigh Dodds, Cambridge.
23. **Radičević, S., S. Marić and R. Cerović**, 2015. *S*-Allele Constitution and Flowering Time Synchronization – Preconditions for Effective Fertilization in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Orchards. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(6), 10997-11006.
24. **Radičević, S., S. Marić, R. Cerović, N. Milošević and S. M. Paunović**, 2019. *In situ* Characterization of Some Sweet and Sour Cherry Autochthonous Genotypes in West Serbia Region. In: Proceedings of III International Symposium on Horticultural Crop Wild Relatives, Republic of Bulgaria, Acta Horticulturae, 1259, pp. 81-90.
25. **Schuster, M.**, 2012. Incompatible (*S*-) Genotypes of Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 148, 59-73.
26. **Schuster, M.**, 2017. Self-Incompatibility (*S*) Genotypes of Cultivated Sweet Cherries – An Overview 2017. In: OpenAgrar-Repositorium.
27. **Sonneveld, T., T. P. Robbins, R. Bošković and K. R. Tobutt**, 2001. Cloning of Six Cherry Self-Incompatibility Alleles and Development of Allele-Specific PCR Detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 1046-1055.
28. **Sonneveld, T., K. R. Tobutt and T. P. Robbins**, 2003. Allele-Specific PCR Detection of Sweet Cherry Self-Incompatibiliy (*S*) Alleles S_1 to S_{16} Using Consensus and Allele-Specific Primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1059-1070.
29. **Szikriszt, B., A. Doğan, S. Ercisli, M.E. Akcay, A. Hegedűs and J. Halász**, 2013. Molecular Typing of the Self-Incompatibility Locus of Turkish Sweet Cherry Genotypes Reflects Phylogenetic Relationships Among Cherries and Other *Prunus* Species. *Theoretical and Applied Genetics*, 9,155-165.
30. **Vaughan, S. P., R. I. Bošković, A. Gisbert-Climent, K. Russell and K. R. Tobutt**, 2008. Characterisation of Novel *S*-alleles from Cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics and Genomes*, 4, 531-541.
31. **Webster, A. D.**, 1996. The Taxonomic Classification of Sweet and Sour Cherries and a Brief History of Their Cultivation. In: Cherries: Crop Physiology, Production and Uses (A. D. Webster and N. E. Looney, eds.). CAB Int., Wallingford, UK, pp. 3-24.
32. **Yamane, H., K. Ikeda, K. Ushijama, H. Sassa and R. Tao**, 2003. A Pollen-Expressed Gene for a Novel Protein with an F-Box Motif that is Very Tightly Linked to a Gene for *S*-RNase in Two Species of Cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium. Plant* and *Cell Physiology*, 44(7), 764-769.