

## Определяне на S-алелна конституция и група за несъвместимост в някои местни генотипове череша отглеждани в Западна Сърбия

Сладжана Марич\*, Саня Радичевич, Небойша Милошевич, Ивана Глишич, Милена Джорджевич

*Изследователски институт по овощарство, 32000 Чачак, Република Сърбия*

## Determining S-Allelic Constitution and Incompatibility Group in Some Indigenous Sweet Cherry Genotypes Grown in West Serbia Region

Slađana Marić\*, Sanja Radičević, Nebojša Milošević, Ivana Glišić, Milena Đorđević

*Fruit Research Institute, 32000 Čačak, Republic of Serbia*

*\*E-mail: smaric@institut-cacak.org*

*Original scientific paper*

### РЕЗЮМЕ

Черешата е самостерилен овощен вид с гаметофитна система за несъвместимост (GSI), която се определя генетично от полиморфен локус (S), кодиращ поне два свързани гена, които определят фенотипите на плодника и полениите.

Следователно повечето генотипове на череша са самонесъвместими и много от тях са кръстосано несъвместими. Целта на настоящия труд бе да се определят S-алелните конституции и групите за несъвместимост в осем местни генотипове на череша, събрани в овощни градини на отделни производители в района на Чачак, т.е. селата Йездина (GT-3), Прислоница (GT-17, GT -18, GT-19, GT-20 и GT-21) и Любич (GT-22 и GT-23). Алелната

### SUMMARY

Sweet cherry is a self-incompatible fruit species and shows a gametophytic self-incompatibility (GSI) system, which is genetically determined by a polymorphic locus (S), encoding at least two linked genes that determine the pistil and pollen phenotypes.

Therefore, most sweet cherry genotypes are self-incompatible and many are cross-incompatible. The aim of this work was to identify the S-allelic constitutions and incompatibility groups in eight indigenous sweet cherry genotypes collected in orchards of individual growers in the region of Čačak, i.e. villages Jezdina (GT-3), Prislonica (GT-17, GT-18, GT-19, GT-20 and GT-21) and Ljubić (GT-22 and GT-23).

The allelic constitution of S-RNase gene

конституция на ген S-RNase във всеки генотип се определя чрез полимеразна верижна реакция (PCR) с консенсус и специфични за алела праймери.

Открити са осем алела ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ ,  $S_6$ ,  $S_9$  и  $S_{13}$ ), които създават седем S-генотипа [ $S_1S_2$  (GT-18),  $S_1S_4$  (GT-20 и GT-22),  $S_3S_5$  (GT-3),  $S_3S_6$  (GT-21),  $S_3S_9$  (GT-17),  $S_4S_5$  (GT-23) и  $S_4S_{13}$  (GT-19)]. Сред разкритите алели,  $S_4$  е най-често срещания (25%), следван от  $S_1$  и  $S_3$  (18.75% за всеки алел).

Въз основа на S-алелните конституции, местните черешови сортове са разпределени в следните групи на несъвместимост: I, V, VI, VII, IX, XVI и XLV. Получените резултати представляват важна информация за кръстосаната съвместимост на тези сръбски образци, която е много важна както за селекционерите на череши, така и за производителите.

**Ключови думи:** *Prunus avium* L., автохтонен генотип, S-генотип, гаметофитна самонесъвместимост

## УВОД

Черешата (*Prunus avium* L.) е икономически значим овощен вид в Република Сърбия, със средно годишно производство от 21 893 тона за периода 2010-2019г., според Организацията за прехрана и земеделие на Обединените нации.

Този овощен вид е културна форма на дива череша, която се различава по големина на плода и костилката. Морфологични и генетични изследвания разкриват, че черешата е присъствала в Европа през Римската епоха и Ранното средновековие (Rösch, 2008). В резултат на векове на естествен и човешки подбор, в цяла Европа са отгледани голям брой местни генотипове, адаптирани към различни агроекологични условия (Quero-García et al., 2019).

Обследвано е богатството на традиционната сръбска зародишна плазма от череша, заради факта, че

in each genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR) with consensus and allele-specific primers.

Eight alleles ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ ,  $S_6$ ,  $S_9$  and  $S_{13}$ ) that generated seven S-genotypes [ $S_1S_2$  (GT-18),  $S_1S_4$  (GT-20 and GT-22),  $S_3S_5$  (GT-3),  $S_3S_6$  (GT-21),  $S_3S_9$  (GT-17),  $S_4S_5$  (GT-23) and  $S_4S_{13}$  (GT-19)] were detected. Among the revealed alleles,  $S_4$  was the most frequent (25%), followed by  $S_1$  and  $S_3$  (18.75% to each allele). Based on the S-allelic constitution, the indigenous sweet cherry genotypes were assigned to the following incompatibility groups: I, V, VI, VII, IX, XVI and XLV. The obtained results represent crucial information on cross-compatibility of these Serbian accessions that is very important for both cherry breeders and growers.

**Key words:** *Prunus avium* L., autochthonous genotype, S-genotyping, gametophytic self-incompatibility

## INTRODUCTION

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is an economically important fruit species in the Republic of Serbia, with the average annual production of 21.893 tonnes for the period 2010-2019, according to Food and Agriculture Organization of the United Nations.

This fruit species is a domesticated form of wild cherry, which differs in the size of fruit and stone.

Morphological and genetic studies revealed that sweet cherry was present in Europe during Roman and early medieval times (Rösch, 2008).

As the result of centuries of natural and human selection across Europe, a large number of local genotypes adapted to different agro-ecological conditions have been raised (Quero-García et al., 2019).

The richness of Serbian traditional sweet cherry germplasm has been observed, as well as the fact that there is

съществува риск от генетична ерозия, тъй като много местни сортове съществуват като *in situ* единични екземпляри. През последното десетилетие са въведени няколко инициативи за събиране и оценка на автохтонни генотипове череша с добри стопански качества на национално и регионално ниво (включително Република Северна Македония, Румъния и Република България) (Gjamovski et al., 2016; Radicevic et al., 2019; Marić et al., 2018, 2019a; 2019b; 2020). Повечето от тези местни сортове са отглеждани за семейна консумация; техният произход е недокументиран, а имената объркани поради доста честото разпространение на омоними. Следователно е необходима точна идентификация на зародишната плазма.

Наскоро въведените съвременни чуждестранни сортове череша замениха традиционните сортове в Република Сърбия. Тази ситуация води до загуба на местни видове, които не се използват, което в крайна сметка може да доведе до загуба на местното разнообразие. От друга страна, генетичното богатство на зародишната плазма на сръбската череша все още е доста неизползвано, въпреки голямата разновидност по отношение на агропомологичните характеристики, оттук и техният потенциал като източник на полезни свойства, както за търговски, така и за селекционни цели.

Като пример за използване на местното разнообразие и селекция от естествената популация на череша е новосъздаденият сръбски сорт Canetova (Fotirić-Akšić et al., 2016).

Сладките череша са основно самонесъвместими, определени двойки са взаимно или едностранно кръстосано несъвместими, докато някои сортове са самосъвместими.

Този GSI механизъм позволява на стълбчето да разпознае и отхвърли

a risk of genetic erosion, since many landraces exist as *in situ* single exemplars.

During the last decade, several initiatives for the collection and evaluation of autochthonous sweet cherry genotypes with good agronomic properties at the national and regional (including Republic of North Macedonia, Romania and Republic of Bulgaria) levels have been put in place (Gjamovski et al., 2016; Radicevic et al., 2019; Marić et al., 2018; 2019a; 2019b; 2020).

Most of these landraces have been grown for familial consumption; their origin is undocumented and the names confusing, due to the fairly frequent incidence of homonyms and synonyms. Therefore, an accurate germplasm identification is required.

Recently introduced modern, foreign sweet cherry cultivars have replaced the traditional cultivars in the Republic of Serbia. This situation is leading to the loss of landraces that fall into disuse, which finally might result in losing local diversity.

On the other hand, the genetic richness of Serbian sweet cherry germplasm is still rather unused enough, despite the large variability in terms of agro-pomological properties, hence their potential as a source of useful traits for both commercial and breeding purposes.

As an example of using local diversity and selection from sweet cherry natural population is newly released Serbian cultivar Canetova (Fotirić-Akšić et al., 2016).

Sweet cherries are mainly self-incompatible, certain pairs are reciprocally or unilaterally cross-incompatible, whereas some cultivars are self-compatible.

This GSI mechanism is enabling styles to recognize and reject self-related

самосвързания прашец, включително прашеца на несъвместими сортове.

Разпознаването в GSI системата е генетично детерминирано от полиморфния локус (S), кодиращ поне два свързани гена (S-RNase и SFB), които контролират фенотиповете на плодника и прашеца (Kao and Tsukamoto, 2004). Следователно, само поленови тръбички, носещи S-хаплотип, различен от двата S-хаплотипа на стълбчето, могат да осигурят успешно кръстосано опрашване и оплождане, което гарантира изобилие от плоден завръз.

Сортовете от същия S-генотип са кръстосано несъвместими и принадлежат към една и съща група на несъвместимост (IG). За черешата, Vaughan et al. (2008) съобщават за 25 различни S-алела, сред които шест (приписани на S<sub>27</sub> до S<sub>32</sub>) са идентифицирани само в дивата череша в Западна Европа.

Неотдавнашен преглед на Schuster (2017) представлява компилацията от S-алелни конституции, разкрити в сладките череша, т.е. 1, 203 генотипа, които са причислени към 60 групи на несъвместимост, 25 генотипа, които принадлежат към група универсални донори (група на несъвместимост '0') и 72 самостоятелни съвместими генотипи (група 'SC'). В настоящия материал са идентифицирани 18 различни S-алела (S<sub>1</sub> до S<sub>7</sub>, S<sub>9</sub>, S<sub>10</sub>, S<sub>12</sub> до S<sub>14</sub>, S<sub>16</sub>, S<sub>18</sub>, S<sub>19</sub>, S<sub>21</sub>, S<sub>22</sub> и S<sub>24</sub>), докато Szikriszt et al. (2013) съобщават за нови алели (S<sub>37</sub> и вишна S<sub>34</sub>) в турски сортове и генотипове на череша, избрани от диви популации, растящи в района на Черно море.

Поради установения висок полиморфизъм, S-локустът е използван като генетичен маркер за идентификация на местни и чужди сортове (Marić and Radičević, 2014; Radičević et al., 2015) и изследване на генетичното разнообразие в Европа,

including the pollen of incompatible cultivars.

The recognition in GSI system is genetically determined by a polymorphic locus (S), encoding at least two linked genes (S-RNase and SFB) that control the pistil and pollen phenotypes (Kao and Tsukamoto, 2004).

Therefore, only pollen tubes carrying an S-haplotype differing from the two stilar S-haplotypes can provide a successful cross-pollination and fertilization that ensures abundant fruit set.

Cultivars of the same S-genotype are cross-incompatible and belong to the same incompatibility group (IG).

In sweet cherry, Vaughan et al. (2008) reported 25 different S-alleles, among which six (attributed to S<sub>27</sub> to S<sub>32</sub>) were identified only in wild cherry of Western Europe.

A recent review of Schuster (2017) represents the compilation of S-allelic constitutions revealed in sweet cherries, i.e. 1,203 genotypes that were assigned to 60 IGs, 25 genotypes that belong to a group of universal donors (incompatibility group '0') and 72 self-compatible genotypes (group 'SC').

In this material, 18 different S-alleles (S<sub>1</sub> to S<sub>7</sub>, S<sub>9</sub>, S<sub>10</sub>, S<sub>12</sub> to S<sub>14</sub>, S<sub>16</sub>, S<sub>18</sub>, S<sub>19</sub>, S<sub>21</sub>, S<sub>22</sub> and S<sub>24</sub>) were identified, while Szikriszt et al. (2013) reported new alleles (S<sub>37</sub> and the sour cherry S<sub>34</sub>) in Turkish sweet cherry landraces and genotypes selected from populations growing wild in the Black Sea area.

Owing to the revealed high polymorphism, the S-locus has been used as a genetic marker for domestic and foreign cultivar identification (Marić and Radičević, 2014; Radičević et al., 2015) and the study of genetic diversity in Europe and northern and western Asia,

северна и западна Азия, напр в Германия (Schuster, 2017), Италия (Marchese et al., 2017), Испания (Cachi and Wünsch, 2014), Турция (Ipek et al., 2011; Szikriszt et al. 2013), Хърватия (Ercisli et al., 2012), Украйна, Полша, Русия и Чехия (Lisek et al., 2015), Сърбия, Северна Македония и България (Marić et al., 2020). Въпреки че са наблюдавани високи нива на генетично разнообразие сред местните сортове, Mariette et al. (2010) посочват намаляване на разнообразието от диви до местни сортове до съвременни сортове череша.

За да се избегне загуба на Сръбски местен генетичен материал от череша, е необходимо да се продължи събирането и характеризирането на съществуващи местни сортове, с цел проследяване, документиране, запазване и насърчаване на използването на тези генотипове. Ето защо в настоящия труд са характеризирани за първи път S-генотипове и групи за кръстосана (не)съвместимост в осем местни вида череша, отглеждани в овощни градини на отделни производители в региона на Западна Сърбия.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал и изолиране на геномна ДНК

Взети са проби от овощни градини на индивидуални производители на осем местни генотипа череша (Таблица 1), съответстващи на местни сортове или много стари сортове с неизвестен произход, в региона на Западна Сърбия, по точно от селата Йездина, Прислоница и Любич в района на Чачак. Свежи листа от изследваните генотипи са събрани през пролетта, замразени са в течен азот и са съхранени при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Проби от замразени листа (частица с размер на капаче от Епендорф епруветка 2 ml) са смлени с четири сачмени лагера (2 mm

e.g. in Germany (Schuster, 2017), Italy (Marchese et al., 2017), Spain (Cachi and Wünsch, 2014), Turkey (Ipek et al., 2011; Szikriszt et al. 2013), Croatia (Ercisli et al., 2012), Ukraine, Poland, Russia and Czechia (Lisek et al., 2015), Serbia, North Macedonia and Bulgaria (Marić et al., 2020).

Although the high levels of genetic diversity among landraces were observed, Mariette et al. (2010) reported a decrease of diversity from wild to landrace to modern sweet cherry cultivars.

To avoid the loss of Serbian indigenous sweet cherry material, it is indispensable to continue with collection and characterization of the existing landraces, aiming to track, document, preserve and encourage the use of these genotypes.

Therefore in this work, we characterized for the first time S-genotypes and cross(in)compatibility groups in eight indigenous sweet cherry accessions grown in orchards of individual growers in the western Serbia region.

## MATERIAL AND METHODS

Plant material and isolation of genomic DNA

Eight indigenous sweet cherry genotypes (Table 1), corresponding to landraces or very old cultivars of unknown origin, were sampled in orchards of individual growers in the western Serbia region, i.e. three villages Jezdina, Prislonica and Ljubić in the region of Čačak.

Fresh leaves of the assessed genotypes were collected in the spring, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen leaf samples (a piece corresponded to the size of 2 ml Eppendorf tube lid) were ground with four ball-bearings (2 mm in diameter)

в диаметър) в Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Германия), като геномната ДНК е екстрахирана чрез СТАВ мини подготвителен метод (Doyle and Doyle, 1987), който включва следните стъпки:

i) предварително нагряване на буфер с цетилтриметиламониев бромид (СТАВ) (2% СТАВ, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH-8.0 и 2% PVP 40) с добавен  $\beta$ -меркаптоетанол (1% за череша) във водна баня при 65°C;

ii) добавяне на 750  $\mu$ l буфер на епруветка, инкубиране при 65°C за 3 минути и 10 минути въртене на максимална скорост в микроцентрифуга MiniSpin Plus (Eppendorf AG, Хамбург, Германия);

iii) двукратно повторение на стъпка хлороформ:изоамилов алкохол (24:1), което предполага добавяне на 750  $\mu$ l от сместа, смесване 3 минути чрез обръщане и 10 минути центрофугиране при максимална скорост;

iv) утаяване на ДНК с 450  $\mu$ l студен изопропанол (съхраняван при -20°C) от горната фаза на разтвора след предишно центрофугиране и 5 минути центрофугиране при максимална скорост;

v) измиване на утаена ДНК чрез добавяне на 500  $\mu$ l студен етанол (съхраняван при -20°C) и 5 минути центрофугиране при максимална скорост;

vi) разтваряне на изсушена ДНК в ТЕ буфер (10 mM Tris pH-8.0 и 1 mM EDTA) с RNase A (Invitrogen, Groningen, Холандия; включително инкубация при 37°C за 30 минути за смилане на РНК) и съхраняване на пробите при -20°C, докато се използва за PCR.

PCR анализ за генотипиране на S-RNase с консенсусни праймери

Приблизително 50-100 ng геномна ДНК се използва за PCR

in Mixer Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Germany) and genomic DNA was extracted according to the CTAB mini prep method (Doyle and Doyle, 1987) that included the following steps:

i) pre-heating the CTAB buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH-8.0 and 2% PVP 40) with added  $\beta$ -mercaptoethanol (1% for sweet cherry) in water bath on 65°C;

ii) adding 750  $\mu$ l of buffer per tube, incubation on 65°C for 3 min and 10 min spinning at maximum speed in MiniSpin Plus microcentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany);

iii) two times repetition of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) step which implied adding of 750  $\mu$ l of the mixture, mixing 3 min by inversion and 10 min spinning at maximum speed;

iv) precipitation of DNA with 450  $\mu$ l of cold isopropanol (kept at -20°C) from the top phase of solution after previous centrifugation and 5 min spinning at maximum speed;

v) washing of DNA pellet by adding 500  $\mu$ l of cold ethanol (kept at -20°C) and 5 min spinning at maximum speed;

vi) dissolving of dried DNA in TE buffer (10 mM Tris pH-8.0 and 1 mM EDTA) with RNase A (Invitrogen, Groningen, the Netherlands; including the incubation on 37°C for 30 min to digest RNA) and keeping the samples at -20°C until used for PCRs.

PCR analysis for S-RNase genotyping with consensus primers

Approximately 50-100 ng of genomic DNA was used for PCR

амплификация на втория интрон на *S-RNase* в 25 µl реактив, съдържащ 1× PCR реакционен буфер, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25× „Q разтвор“, 200 µM Pa.µM dNTPs, 200 µM Pa.µM F и PaConsII-R праймери и 1.25 U *Taq* ДНК полимераза (Qiagen GmbH, Hilden, Германия). PCR се провежда в Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf) термичен цикъл за 2 минути при 94°C, след това 10 цикъла от 10 секунди при 94°C, 2 минути при 58°C и 2 минути при 68°C, последвани от 25 цикъла от 10 секунди при 94°C, 2 минути при 58°C и 2 минути при 68°C, като всеки цикъл се добавя по 10 сек. към стъпката на удължаване (Sonneveld et al., 2003).

PCR продуктите се разделят върху 2% агарозен гел в система Biometra Horizon 11.14 (Analytik Jena GmbH, Йена, Германия) за около 4 часа при 70 V/cm, докато предната част на оцветителя (бромофенолово синьо) е приблизително 1 cm от края на гела; за оразмеряване на фрагментите се приема стъпка 1 Kb плюс ДНК по скала на (Invitrogen)

Визуализацията на ДНК лентите се извършва чрез оцветяване с етидиев бромид (0.5 µg/ml) и под ултравиолетова светлина на BIO-PRINT-1500/26M система за изображения (Vilber Lourmat, Collégien, Франция).

PCR анализ за генотипиране на *S-RNase* със специфични за алела праймери

PCR тестовете се извършват чрез използване на специфични за алела праймери за *S*<sub>1</sub> до *S*<sub>7</sub>, както и за алели *S*<sub>9</sub>, *S*<sub>10</sub> и *S*<sub>13</sub> (Sonneveld et al., 2001; 2003). PCR реакциите се провеждат в обем от 25 µl със 100 ng геномна ДНК, 1 × PCR реакционен буфер, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM от всяка dNTP, 0.1 µM от всеки праймер и 0.625 U *Taq* ДНК полимераза (Qiagen). PCR условията в Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf) са: 94°C за 2

amplification of the *S-RNase* second intron in a 25 µl reaction, containing 1× PCR reaction buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25× 'Q solution', 200 µM dNTPs, 0.2 µM PaConsII-F and PaConsII-R primers and 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

PCR was carried out in Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf) thermal cycler for 2 min at 94°C, then 10 cycles of 10 sec at 94°C, 2 min at 58°C and 2 min at 68°C, followed by 25 cycles of 10 sec at 94°C, 2 min at 58°C and 2 min at 68°C, with 10 s added each cycle to the extension step (Sonneveld et al., 2003).

The PCR products were separated on a 2% agarose gel in Biometra Horizon 11.14 system (Analytik Jena GmbH, Jena, Germany) for about 4 h at 70 V/cm until the bromophenol blue front was approximately 1 cm from the end of the gel; 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen) was included for sizing of fragments.

Visualization of DNA bands was performed by ethidium bromide (0.5 µg/ml) staining and under ultraviolet light of BIO-PRINT-1500/26M imaging system (Vilber Lourmat, Collégien, France).

PCR analysis for *S-RNase* genotyping with allele-specific primers

The PCRs were performed by using the allele-specific primers for *S*<sub>1</sub> to *S*<sub>7</sub>, as well as for *S*<sub>9</sub>, *S*<sub>10</sub> and *S*<sub>13</sub> alleles (Sonneveld et al., 2001; 2003).

PCR reactions were carried out in a 25 µl volume with 100 ng genomic DNA, 1× PCR reaction buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.1 µM of each primer and 0.625 U *Taq* DNA polymerase (Qiagen). PCR conditions in Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf) were: 94°C for 2 min,



минути, последвани от 35 цикъла от 94°C за 30 секунди, специфична температура на охлаждане за 30 секунди и 68°C за 1 минута, с крайна 5-мин. стъпка на удължаване при 72°C (Sonneveld et al., 2001). За гореспоменатите алели са използвани следните температури на охлаждане: 64°C за S<sub>1</sub>, 60°C за S<sub>2</sub>, 66°C за S<sub>3</sub>, 63°C за S<sub>4</sub>, 52°C за S<sub>5</sub>, 65°C за S<sub>6</sub> и S<sub>13</sub>, 59°C за S<sub>7</sub> и 61°C за S<sub>9</sub> и S<sub>10</sub> (Marić and Radičević, 2014; Marić et al., 2015; 2018). PCR продуктите се пускат върху 1.5% агарозен гел в продължение на 3 часа при 70 V/cm; откриването, визуализацията и оразмеряването са извършени съгласно методологията, описана в горния параграф. В допълнение, сортове череша с известни S-генотипове са използвани като стандарти.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Идентифицирането на S-алелите в оценените генотипове на череша е проведено на два етапа, т.е. първо амплификация с консенсусни праймери, специфични за вторите интрони на *S-RNase*, последвано от следващата стъпка, в която са използвани праймери, специфични за всеки алел.

Амплификацията на вторите интрони на *S-RNase* води до два PCR продукта, които съответстват на S-алелите на изследваните генотипове на череша. Размерът на PCR продукта за втория интрон варира от ~570 bp (алел S<sub>6</sub>) до ~2 200 bp [S<sub>2</sub> или S<sub>5</sub> (горна лента) или алел S<sub>7</sub>] (Фигура 1).

Това усилване позволи идентифициране на генотипове, носещи S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> (въпреки че и двете ленти на този алел са слаби) и S<sub>6</sub> алели, но дискриминацията на S<sub>1</sub> от S<sub>3</sub> и S<sub>13</sub>, след това S<sub>2</sub> от S<sub>7</sub> и S<sub>9</sub> от S<sub>10</sub> изисква допълнителен анализ (Таблица 1). Трудности при идентифицирането на тези алели чрез PCR тестове с PaConsII-F и PaConsII-R

followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, specific annealing temperature for 30 sec and 68°C for 1 min, with a final 5-min extension step at 72°C (Sonneveld et al., 2001).

For the aforementioned alleles, the following annealing temperatures were used: 64°C for S<sub>1</sub>, 60°C for S<sub>2</sub>, 66°C for S<sub>3</sub>, 63°C for S<sub>4</sub>, 52°C for S<sub>5</sub>, 65°C for S<sub>6</sub> and S<sub>13</sub>, 59°C for S<sub>7</sub> and 61°C for S<sub>9</sub> and S<sub>10</sub> (Marić and Radičević, 2014; Marić et al., 2015; 2018).

The PCR products were run on a 1.5% agarose gel for 3 h at 70 V/cm; detection, visualization and sizing were performed according to methodology described in the above paragraph.

In addition, sweet cherry cultivars of known S-genotypes were used as standards.

## RESULTS AND DISCUSSION

The identification of S-alleles in the assessed sweet cherry genotypes was conducted in two steps, i.e. firstly amplification with consensus primers specific for the second introns of *S-RNase*, followed by the next step in which primers specific to each allele were used.

The amplification of the second introns of *S-RNase* resulted in two PCR products, which corresponded to S-alleles of the assessed sweet cherry genotypes. The size of PCR product for the second intron ranged from ~570 bp (S<sub>6</sub> allele) to ~2.200 bp [S<sub>2</sub> or S<sub>5</sub> (top band) or S<sub>7</sub> allele] (Figure 1).

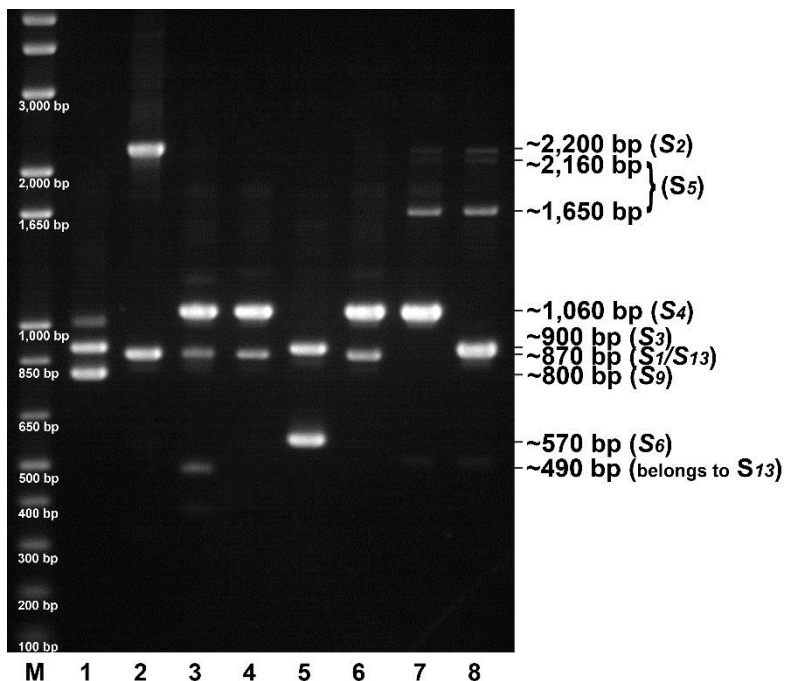
This amplification enabled identification of the genotypes carrying S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> (although both bands of this allele were weak) and S<sub>6</sub> alleles, but discrimination of S<sub>1</sub> from S<sub>3</sub> and S<sub>13</sub>, then S<sub>2</sub> from S<sub>7</sub> and S<sub>9</sub> from S<sub>10</sub> required additional analysis (Table 1).

Difficulties in identification of these alleles by PCRs with PaConsII-F and PaConsII-R primers were also reported by



праймери също са посочени от Sonneveld et al. (2003), Ipek et al. (2011), Ercisli et al. (2012), Lisek et al. (2015) and Marić et al. (2017).

Sonneveld et al. (2003), Ipek et al. (2011), Ercisli et al. (2012), Lisek et al. (2015) and Marić et al. (2017).



**Фиг. 1. PCR продукти на амплифициран фрагмент на *S-RNase*, получен с консенсусни праймери за втори интрон при осем автохтонни генотипа на череша: 1 – GT-17; 2 – GT-18; 3 – GT-19; 4 – GT-20; 5 – GT-21; 6 – GT-22; 7 – GT-23; 8 – GT-3; M – 1Kb плюс ДНК стълба**

**Fig. 1. PCR products of the *S-RNase* amplified fragment obtained with consensus primers for the second intron in eight autochthonous sweet cherry genotypes: 1 – GT-17; 2 – GT-18; 3 – GT-19; 4 – GT-20; 5 – GT-21; 6 – GT-22; 7 – GT-23; 8 – GT-3; M – 1Kb plus DNA ladder**

С цел да се потвърдят *S*-алелните конституции на изследваните генотипи на череша, геномният фрагмент на *S-RNase* е амплифициран с помощта на специфични праймери за алели *S*<sub>1</sub>, *S*<sub>2</sub>, *S*<sub>3</sub>, *S*<sub>4</sub>, *S*<sub>5</sub>, *S*<sub>6</sub>, *S*<sub>7</sub>, *S*<sub>9</sub>, *S*<sub>10</sub> и *S*<sub>13</sub>. След PCR тестове със специфични за алела праймери, получените ДНК фрагменти варират по размер от 300 bp (алел *S*<sub>5</sub>) до 960 bp (алел *S*<sub>3</sub>) (Фигура 2а–h; Таблица 1).

PCR тестовете със специфичен алел потвърждават наличието на

Aiming to confirm *S*-allelic constitutions of the assessed sweet cherry genotypes, the genomic fragment of *S-RNase* was amplified using the specific primers for the *S*<sub>1</sub>, *S*<sub>2</sub>, *S*<sub>3</sub>, *S*<sub>4</sub>, *S*<sub>5</sub>, *S*<sub>6</sub>, *S*<sub>7</sub>, *S*<sub>9</sub>, *S*<sub>10</sub>, and *S*<sub>13</sub> alleles.

After the PCRs with the allele-specific primers, the resulting DNA fragments ranged in size from 300 bp (*S*<sub>5</sub> allele) to 960 bp (*S*<sub>3</sub> allele) (Figure 2a–h; Table 1).

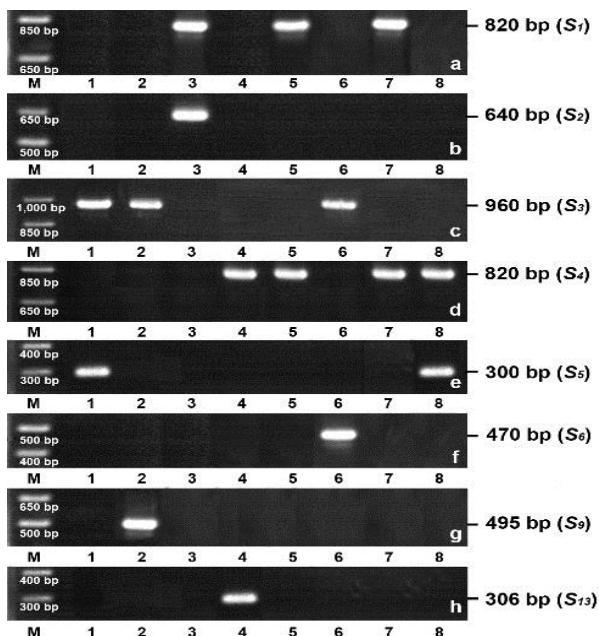
Allele-specific PCRs confirmed the presence of *S*<sub>4</sub>, *S*<sub>5</sub> and *S*<sub>6</sub> alleles in four,

алели  $S_4$ ,  $S_5$  и  $S_6$  съответно в четири, два и един генотипа (Фигура 2d–f).

Сходството в размера на продукта за алели  $S_1/S_3/S_{13}$ ,  $S_2/S_7$  и  $S_9/S_{10}$  изисква допълнителни PCR с праймери, специфични за тези алели.

two and one genotype, respectively (Figure 2d–f).

Similarity in product size for  $S_1/S_3/S_{13}$ ,  $S_2/S_7$  and  $S_9/S_{10}$  alleles required additional PCRs with primers specific for these alleles.



**Фиг. 2.** PCR продукти на амплифициран фрагмент на *S-RNase*, получени с праймери, специфични за алели  $S_1$  (a),  $S_2$  (b),  $S_3$  (c),  $S_4$  (d),  $S_5$  (e),  $S_6$  (f),  $S_9$  (g) и  $S_{13}$  (h) в осем местни генотипа череша: 1 – GT-3; 2 – GT-17; 3 – GT-18; 4 – GT-19; 5 – GT-20; 6 – GT-21; 7 – GT-22; 8 – GT-23; M – 1Kb плюс ДНК стълба

**Fig. 2.** PCR products of the *S-RNase* amplified fragment obtained with primers specific for alleles  $S_1$  (a),  $S_2$  (b),  $S_3$  (c),  $S_4$  (d),  $S_5$  (e),  $S_6$  (f),  $S_9$  (g) and  $S_{13}$  (h) in eight indigenous sweet cherry genotypes: 1 – GT-3; 2 – GT-17; 3 – GT-18; 4 – GT-19; 5 – GT-20; 6 – GT-21; 7 – GT-22; 8 – GT-23; M – 1Kb plus DNA ladder

Отсъствието на амплификация с  $S_1$  или  $S_3$ ,  $S_7$  и  $S_{10}$  алел-специфични праймери е друго потвърждение, че  $S_3$  или  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_9$  присъстват в оценения материал от сладка череша. В GT-19 открихме алел  $S_{13}$  (фрагмент от 306 bp, който корелира с този алел; Фигура 2h) и липса на ленти, които са специфични за  $S_1$  (Фигура 2a) и  $S_3$  алели (Фигура 2c). Размерът на PCR продуктите, които съответстват на идентифицираните *S*-алели в местния материал, съответстват на

The absence of amplification with  $S_1$  or  $S_3$ ,  $S_7$  and  $S_{10}$  allele-specific primers was another confirmation that  $S_3$  or  $S_1$ ,  $S_2$  and  $S_9$  were present in the assessed sweet cherry material. In GT-19, we found the allele  $S_{13}$  (fragment of 306 bp that correlated with this allele; Figure 2h) and absence of bands that were specific to  $S_1$  (Figure 2a) and  $S_3$  alleles (Figure 2c). The size of PCR products that corresponded to identified *S*-alleles in indigenous material were consistent with results of Sonneveld et al.

результатите на Sonneveld et al. (2001, 2003), които съобщават, че фрагмент от 820 bp, 640 bp, 960 bp, 820 bp, 300 bp, 470 bp, 495 bp и 306 bp корелира с алели S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub> и S<sub>13</sub> алели, съответно.

(2001, 2003), who reported that fragment of 820 bp, 640 bp, 960 bp, 820 bp, 300 bp, 470 bp, 495 bp and 306 bp correlated to S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub> and S<sub>13</sub> alleles, respectively.

**Таблица 1. Идентификация на S-RNase алели с консенсус и специфични за алела праймери в местни генотипи на череша, отглеждани в района на Чачак**  
**Table 1. Identification of S-RNase alleles with consensus and allele-specific primers in the indigenous sweet cherry genotypes grown in the region of Čačak**

| Геноти<br>Genotype | Произход<br>Origin | Ампли<br>фикация с<br>праймери<br>PaConsII-F/R<br>Amplification<br>with<br>PaConsII-F/R<br>primers |                                 | Ампликация със специфични за алела праймери<br>Amplification with allele-specific primers |                |                |                |                |                |                |                |                 |                 |   |
|--------------------|--------------------|--|---------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---|
|                    |                    | Алел<br>1<br>Allele<br>1   | Алел 2<br>Allele<br>2           | S <sub>1</sub>  | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>4</sub> | S <sub>5</sub> | S <sub>6</sub> | S <sub>7</sub> | S <sub>9</sub> | S <sub>10</sub> | S <sub>13</sub> |   |
| GT-3               | Jezdina            | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub>   | S <sub>5</sub>                  | -   |                | +              |                | +              |                |                |                |                 |                 |   |
| GT-17              | Prislonica         | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub>   | S <sub>9</sub> /S <sub>10</sub> | -   |                | +              |                |                |                |                |                | +               | -               |   |
| GT-18              | Prislonica         | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub>   | S <sub>2</sub> /S <sub>7</sub>  | +   | +              | -              |                |                |                |                | -              |                 |                 |   |
| GT-19              | Prislonica         | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub><br>/S <sub>13</sub>   | S <sub>4</sub>                  | -   |                | -              | +              |                |                |                |                |                 |                 | + |
| GT-20              | Prislonica         | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub>   | S <sub>4</sub>                  | +   |                | -              | +              |                |                |                |                |                 |                 |   |
| GT-21              | Prislonica         | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub>   | S <sub>6</sub>                  | -   |                | +              |                |                |                | +              |                |                 |                 |   |
| GT-22              | Ljubić             | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub>   | S <sub>4</sub>                  | +   |                | -              | +              |                |                |                |                |                 |                 |   |
| GT-23              | Ljubić             | S <sub>4</sub>   | S <sub>5</sub>                  |   |                |                | +              | +              |                |                |                |                 |                 |   |

S-алелната конституция на всеки генотип (два S-алела на генотип) се определя след комбиниране на резултатите от консенсуса и специфични за алела праймери (Таблица 2), което показва, че всички изследвани генотипи са диплоидни.

Въз основа на получените резултати, местните генотипи са причислени към следните седем групи на несъвместимост, посочени по-рано от Schuster (2012, 2017), т.е. I (GT-18), V (GT-23), VI (GT-21), VII (GT-3), IX (GT-20 и GT-22), XVI (GT-17) и XLV (GT-19).

Нашите резултати ще разширят тези групи на несъвместимост чрез включване на местни сръбски генотипи, особено XLV група. А именно, Schuster (2017) съобщава, че

The S-allelic constitution of each genotype (two S-alleles per genotype) was determined after combining the results of the consensus and the allele-specific primers (Table 2), indicating that all of the assessed genotypes were diploid.

Based on the obtained results, the indigenous genotypes were assigned to the following seven corresponding IGs, previously reported by Schuster (2012, 2017), i.e. I (GT-18), V (GT-23), VI (GT-21), VII (GT-3), IX (GT-20 and GT-22), XVI (GT-17) and XLV (GT-19).

Our results will extend these IGs by including indigenous Serbian genotypes, particularly XLV group. Namely, Schuster (2017) reported that among 1.203 sweet cherries that were

измежду 1.203 череши, които са причислени към 60 групи на несъвместимост, само четири сорта (Bladorozowa, Lamprästler, Marquardter Frühe и Pagliarella; два от тях са местни сортове череши) принадлежат към група XLV група.

assigned to 60 IGs, only four cultivars (Bladorozowa, Lamprästler, Marquardter Frühe and Pagliarella; two of them being local sweet cherry cultivars) belonged to XLV group.

**Таблица 2. S-алелна конституция и група на несъвместимост при изследвани местни генотипи череша**  
**Table 2. S-allelic constitution and incompatibility group of the assessed indigenous sweet cherry genotypes**

| Генотип<br>Genotype | S-алелни конституции<br>S-allelic constitution | Група на несъвместимост<br>Incompatibility group |
|---------------------|--|--|
| GT-3                | S <sub>3</sub> S <sub>5</sub>                  | VII  |
| GT-17               | S <sub>3</sub> S <sub>9</sub>                  | XVI  |
| GT-18               | S <sub>1</sub> S <sub>2</sub>                  | I  |
| GT-19               | S <sub>4</sub> S <sub>13</sub>                 | XLV  |
| GT-20               | S <sub>1</sub> S <sub>4</sub>                  | IX   |
| GT-21               | S <sub>3</sub> S <sub>6</sub>                  | VI   |
| GT-22               | S <sub>1</sub> S <sub>4</sub>                  | IX   |
| GT-23               | S <sub>4</sub> S <sub>5</sub>                  | V  |

В настоящото изследване са определени общо осем различни S-алела: S<sub>1</sub> до S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub> и S<sub>13</sub> в осем местни сръбски генотипа череши.

Следователно, S<sub>4</sub> (25%) е най-често срещания алел в този материал от череши, като се наблюдава относително по-висока честота на поява за алели S<sub>1</sub> и S<sub>3</sub> (18.75% за всеки алел), следван от S<sub>5</sub> (12.5%) и S<sub>2</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub> и S<sub>13</sub> (6.25% за всеки алел).

В последното проучване, Marić et al. (2020) посочват S-алелни конституции в 25 автохтонни генотипа, произхождащи от балканските страни (Сърбия, Северна Македония и България), както и че най-често срещания S-алел и алелна конституция са S<sub>3</sub> (38.60%) и съответно S<sub>3</sub>S<sub>12</sub> (24%). Като се имат предвид резултатите от Marić et al. (2020) за генотипите на сръбската череша и резултатите, получени в настоящия труд (Таблица 3); общо 22 генотипа; GT-9 е изключен от изчисляването на относителните

In the present study, a total of eight different S-alleles: S<sub>1</sub> to S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub> and S<sub>13</sub> in eight local Serbian sweet cherry genotypes were determined.

Therefore, the most frequent allele in this sweet cherry material was S<sub>4</sub> (25%) and a relatively higher frequency of occurrence was observed for alleles S<sub>1</sub> and S<sub>3</sub> (18.75% to each allele), followed by S<sub>5</sub> (12.5%) and S<sub>2</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>9</sub> and S<sub>13</sub> (6.25% to each allele).

In the latest study, Marić et al. (2020) reported S-allelic constitutions in 25 autochthonous genotypes originated in the Balkan countries (Serbia, North Macedonia and Bulgaria), as well as that the most frequent S-allele and allelic constitution were S<sub>3</sub> (38.60%) and S<sub>3</sub>S<sub>12</sub> (24%), respectively.

Considering the results of Marić et al. (2020) for the Serbian sweet cherry genotypes and the results obtained in this work (Table 3); in total 22 genotypes; GT-9 was excluded from the calculation of the relative occurrences of S-alleles, since the second allele was not

случаи на S-алели, тъй като вторият алел не е определен), най-често срещаният алел сред деветте идентифицирани ( $S_1$  до  $S_6$ ,  $S_9$ ,  $S_{12}$  и  $S_{13}$ ) е  $S_3$  (31.82%) и относително по-висока честота на поява (>10%) е наблюдавана за алели  $S_2$  и  $S_6$  (11.36 за всеки алел). Подобна честота за алел  $S_3$  (39%) сред осем идентифицирани алела ( $S_1$  до  $S_6$ ,  $S_9$  и  $S_{12}$ ) в 37 хърватски генотипа череша е посочен от Ercisli et al. (2012). Също така,  $S_3$  е най-често срещаният S-алел с висока честота (25–38%) в генотипи, произхождащи от Турция, Испания, Чехия и Италия (Ipek et al., 2011; Cachi and Wünsch, 2014; Lisek et al., 2015; Marchese et al., 2017). Сравнително еднакво разпространение на алели  $S_2$  и  $S_6$  и малко по-малко на алел  $S_9$  (9.09%) за сръбски генотипове череша са в съответствие с констатациите на Ercisli et al. (2012) в хърватската зародишна плазма, които посочват честота от 8% за тези алели. В допълнение, Ipek et al. (2011) установяват подобно разпространение на алели  $S_2$ ,  $S_6$  и  $S_9$  в зародишната плазма на турската череша (съответно 14.8%, 11.1% и 7.5%). Следователно, гореспоменатите резултати могат да бъдат свързани с исторически доказателства, тъй като географското разпределение на S-алелите може да показва общ произход или генетична връзка на генотипове, разпространени в по-близки райони (Cachi and Wünsch, 2014).

При генотиповете на сръбска череша се наблюдава относително по-висока честота за алел  $S_4$  (13.64%), което е в съответствие с появата на този алел (13.6%) в турската зародишна плазма (Ipek et al., 2011).

За разлика от тези резултати, Ercisli et al. (2012) и Marchese et al. (2017) посочват, че алел  $S_4$  е изключително рядък при хърватски и италиански местни сортове (2.5% и 1%, съответно).

determined), the most frequent allele among nine ( $S_1$  to  $S_6$ ,  $S_9$ ,  $S_{12}$  and  $S_{13}$ ) identified was  $S_3$  (31.82%) and a relatively higher frequency of occurrence (>10%) was observed for alleles  $S_2$  and  $S_6$  (11.36 to each allele).

Similar frequency for allele  $S_3$  (39%) among eight identified alleles ( $S_1$  to  $S_6$ ,  $S_9$  and  $S_{12}$ ) in 37 Croatian sweet cherry genotypes was reported by Ercisli et al. (2012). Also,  $S_3$  was the most frequent S-allele with high occurrence (25–38%) in genotypes originated from Turkey, Spain, Czechia and Italy (Ipek et al., 2011; Cachi and Wünsch, 2014; Lisek et al., 2015; Marchese et al., 2017).

A relatively uniform occurrence of alleles  $S_2$  and  $S_6$ , and slightly less of allele  $S_9$  (9.09%) for Serbian sweet cherry genotypes were consistent with findings of Ercisli et al. (2012) in Croatian germplasm, who reported the frequency of 8% for these alleles.

In addition, Ipek et al. (2011) found similar occurrence for alleles  $S_2$ ,  $S_6$  and  $S_9$  in Turkish sweet cherry germplasm (14.8%, 11.1% and 7.5%, resp.).

Therefore, aforementioned results may be associated with historical evidence, since the geographical distribution of S-alleles may indicate a common origin or genetic relationship of genotypes spread in closer areas (Cachi and Wünsch, 2014).

In Serbian sweet cherry genotypes, relatively higher frequency was observed for  $S_4$  allele (13.64%), which was in agreement with the occurrence of this allele (13.6%) in Turkish germplasm (Ipek et al., 2011).

Contrary to these results, Ercisli et al. (2012) and Marchese et al. (2017) reported that  $S_4$  allele was extremely rare in Croatian and Italian landraces (2.5% and 1%, resp.).

**Таблица 3. Брой идентифицирани пъти и честота на разпространение на S-RNase алели в 14 местни генотипа на сръбска череша, посочени от Marić et al. (2020) и осем генотипа, анализирани в настоящия труд**  
**Table 3. Number of times identified and frequency of the S-RNase alleles in 14 Serbian sweet cherry indigenous genotypes reported by Marić et al. (2020) and eight genotypes analysed in this work**

| S-RNase алел<br>S-RNase allele | Брой идентифицирани<br>пъти<br>Number of times indentified | Честота на алел S-RNase<br>(%)<br>S-RNase allele frequency<br>(%) |
|--------------------------------|--|---|
| S <sub>1</sub>                 | 4  | 9.09  |
| S <sub>2</sub>                 | 5  | 11.36   |
| S <sub>3</sub>                 | 14   | 31.82   |
| S <sub>4</sub>                 | 6  | 13.64   |
| S <sub>5</sub>                 | 3  | 6.82  |
| S <sub>6</sub>                 | 5  | 11.36   |
| S <sub>9</sub>                 | 4  | 9.09  |
| S <sub>12</sub>                | 2  | 4.55  |
| S <sub>13</sub>                | 1  | 2.27  |
| Total:                         | 44   | 100.00  |

Също така, разпространението на S<sub>1</sub> в сръбските генотипове (9.09%) е по-широко в сравнение с това, посочено за турски, хърватски и италиански зародишни плазми (2.5-3%; Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012; Marchese et al., 2017 г.). Този алел е много често срещан при генотипове, произхождащи от Чехия (25%) и Северна Испания (12%) (Cachi and Wünsch, 2014; Lisek et al., 2015). По отношение на S<sub>5</sub>, появата на този алел е сходна при сръбски (6.82%), хърватски (7%; Ercisli et al., 2012) и турски (5%; Ipek et al., 2011) генотипи и изключително рядко (1%) в италиански (Marchese et al., 2017) и испански (Cachi и Wünsch, 2014) местни сортове. Висока честота на алел S<sub>5</sub> (20,4%) е открита в украинската зародишна плазма, която според Lisek et al. (2015) значително разграничава тези сортове от онези, произхождащи от други региони на Европа. Алел S<sub>12</sub>, срещащ се с честота от 4.55% в сръбските генотипове, също е често срещан при генотипове, произхождащи от Хърватия (19%; Ercisli et al., 2012) и Турция (7,4%; Ipek et al., 2011), въпреки че този алел е

Also, S<sub>1</sub> occurrence in Serbian genotypes (9.09%) was higher in comparison to those reported in Turkish, Croatian and Italian germplasms (2.5-3%; Ipek et al., 2011; Ercisli et al., 2012; Marchese et al., 2017).

This allele was highly frequent in genotypes originated from Czechia (25%) and northern Spain (12%) (Cachi and Wünsch, 2014; Lisek et al., 2015). Regarding S<sub>5</sub>, the occurrence of this allele was similar in Serbian (6.82%), Croatian (7%; Ercisli et al., 2012) and Turkish (5%; Ipek et al., 2011) genotypes, and extremely rare (1%) in Italian (Marchese et al., 2017) and Spanish (Cachi and Wünsch, 2014) landraces.

The high frequency of S<sub>5</sub> allele (20.4%) was found in the Ukrainian germplasm, which according to Lisek et al. (2015) greatly differentiated these cultivars from the cultivars originating in other regions of Europe. The allele S<sub>12</sub>, occurring at a frequency of 4.55% in Serbian genotypes, was also common in genotypes native to Croatia (19%; Ercisli et al., 2012) and Turkey (7.4%; Ipek et al., 2011), though the rarity of this allele was observed in European accessions

наблюдаван рядко при европейски образци (Cachi and Wünsch, 2014; Marchese et al., 2017).

Настоящото проучване разкри наличието на алел  $S_{13}$  в сръбски местни генотипове череша, срещащи се с честота от 2.27%. Разпространението на  $S_{13}$  е подобно на това при 545 европейски сорта, посочени и компилирани от Schuster (2012) и 64 местни испански сорта (Cachi and Wünsch, 2014). Алел  $S_{13}$  не е открит в местните турски и хърватски генотипове (Ipek et al. 2011; Ercisli et al. 2012). Към днешна дата, по-високата честота за  $S_{13}$  (20%) е посочена в образци от череша, събрани в 12 италиански региона (Marchese et al., 2017). Този алел е особено интересен, тъй като интраалелните вариации на двата микросателита, разположени в първия и втория интрон на  $S_{13}$ -*RNase*, могат да позволят разграничаването на сладки, диви череша и вишни (Marchese et al., 2010).

Досега открихме девет ( $S_1$  до  $S_6$ ,  $S_9$ ,  $S_{12}$  и  $S_{13}$ ) различни алела в образци на сръбски череша. в повечето случаи, броят на идентифицираните алели в образци на череша варира от осем (Ercisli et al., 2012; Lisek et al., 2015) до десет (Ipek et al., 2011; Cachi and Wünsch, 2014a), докато най-големият брой на *S*-алели е разкрит в италианските местни сортове от Marchese et al. (2017), които посочват 17 алела ( $S_5$ ,  $S_7$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{14}$ ,  $S_{16}$ ,  $S_{17}$ ,  $S_{19}$  и  $S_{22}$  в допълнение към списъка с девет гореспоменати алела). Честотата на някои *S*-алели в определени зародишни плазми на череша досега не е обяснена, но съществуват предположения за такива неравномерни честоти на алели. А именно, някои алели могат да бъдат свързани с адаптационни свойства по отношение на агроекологичните условия или предизвикани от ефект на отклонение и основаване, както и

(Cachi and Wünsch, 2014; Marchese et al., 2017).

This study revealed the presence of  $S_{13}$  allele in Serbian indigenous sweet cherry genotypes, occurring at a frequency of 2.27%. The occurrence of  $S_{13}$  was similar to that in 545 European cultivars reported and compiled by Schuster (2012) and 64 local Spanish cultivars (Cachi and Wünsch, 2014).

The  $S_{13}$  allele was not found in the local Turkish and Croatian genotypes (Ipek et al. 2011; Ercisli et al. 2012).

To date, the higher frequency for  $S_{13}$  (20%) has been reported in sweet cherry accessions collected in 12 Italian regions (Marchese et al., 2017).

This allele is particularly interesting, since intra-allelic variations of the two microsatellites located in the first and the second introns of the  $S_{13}$ -*RNase* can enable the distinction of sweet, wild and sour cherries (Marchese et al., 2010).

So far, we have detected nine ( $S_1$  to  $S_6$ ,  $S_9$ ,  $S_{12}$  and  $S_{13}$ ) different alleles in Serbian sweet cherry accessions. Mostly, the number of identified alleles in sweet cherry accessions varied from eight (Ercisli et al., 2012; Lisek et al., 2015) to ten (Ipek et al., 2011; Cachi and Wünsch, 2014a), whilst the highest number of *S*-alleles was revealed in Italian landraces by Marchese et al. (2017), who stated 17 alleles ( $S_5$ ,  $S_7$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{14}$ ,  $S_{16}$ ,  $S_{17}$ ,  $S_{19}$  and  $S_{22}$  in addition to the list of nine aforementioned alleles).

The frequency of some *S*-alleles in certain sweet cherry germplasms has not been explained so far, but the speculation about such unequal allele frequencies exists.

Namely, some alleles may be linked to adaptation properties regarding agro-ecological conditions or caused by drift and founder effects, as well as an extra influence of selection related to a pleiotropic effect of *S*-genes or close



допълнително влияние на селекцията, свързано с плейотропния ефект на S-гени или тясна връзка с други важни гени (Kato и Mukai, 2004; Marchese и др. 2017). Тъй като черешата е дълготраен вид с голям физически размер, се очаква промяната в честотата на S-алелите да бъде бавна (Kato and Mukai, 2004).

Настоящото проучване осигурява продължение на идентифицирането на S-генотипа в зародишната плазма на сръбската череша, което ще бъде полезно за селекцията, избор на опрашители, изследвания на популациите и опазване на S-алелите.

### **ИЗВОДИ**

Идентифицирането на S-алелната конституция в местните генотипове, проведено в настоящото изследване, разширява съществуващите познания за честотата на разпространение на S-алели в зародишната плазма на сръбска череша. Следователно, определянето на S-генотипове и класифицирането на образците в групи на несъвместимост ще позволи те да бъдат използвани за по-нататъшно усъвършенстване от селекционерите и за директно използване от производителите в производството.

Очевидно колекциите на фермери представляват безценни ресурси за алелно разнообразие и следователно трябва да бъдат допълнително подкрепяни за дългосрочно запазване на зародишната плазма на черешата.

### **БЛАГОДАРНОСТИ**

Настоящото изследване е проведено с подкрепата на Министерството на образованието, науката и технологичното развитие на Република Сърбия, договор № 451-03-9/2021-14/200215.

linkage with another important genes (Kato and Mukai, 2004; Marchese et al. 2017).

Since sweet cherry is a long-lived species of large physical size, the change in S-allele frequency is expected to be slow (Kato and Mukai, 2004).

This study provides continuation of S-genotype identification in the Serbian sweet cherry germplasm that will be useful for crosses design, choosing pollenizers, population studies and conservation of S-alleles.

### **CONCLUSIONS**

The identification of S-allelic constitution in the indigenous genotypes conducted in our study extends the existing knowledge on the frequency of the occurrence of S-alleles in Serbian sweet cherry germplasm.

Therefore, determination of S-genotypes and classification of the accessions into incompatibility groups will allow them to be used for further improvement by breeders and for direct use by growers for production.

Evidently, on-farm collections represent invaluable resources for allelic diversity and therefore should be further supported for long-term preservation of sweet cherry germplasm.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was conducted under the support of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, contract No. 451-03-9/2021-14/200215.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Cachi, A. M. and A. Wünsch**, 2014. S-Genotyping of Sweet Cherry Varieties from Spain and S-Locus Diversity in Europe. *Euphytica*, 197, 229-236.
2. **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.
3. **Ercisli, S., M. Radunic, J. Gadze, A. Ipek, M. Skaljic and Z. Cmelik**, 2012. S-RNase Based S-Genotyping of Croatian Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Genotypes. *Scientia Horticulturae*, 139, 21-24.
4. **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 (D. Milatović, J. Milivojević, D. Nikolić, Ed.). Belgrade, Republic of Serbia. *Acta Horticulturae*, 1139, pp. 91-94.
5. **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 (D. Milatović, J. Milivojević, D. Nikolić, Ed.). Belgrade, Republic of Serbia. *Acta Horticulturae*, 1139, pp. 147-152.
6. **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.
7. **Kao, T. H. and T. Tsukamoto**, 2004. The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Plant Cell*, 16, 72-83.
8. **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.
9. **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.
10. **Marchese, A., R. Bošković, T. Caruso and K. R. Tobutt**, 2010. Intra-Allelic Variation of the *S*<sub>13</sub>-RNase Allele Distinguishes Sweet, Wild and Sour Cherry. *Tree Genetics and Genomes*, 6, 963-972.
11. **Marchese, A., D. Giovannini, A. Leone, R. Mafra, 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.
12. **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).
13. **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).
14. **Marić S., S. Radičević, M. Lukić, R. Cerović, S. A. Paunović**, 2017. Determination of S-Genotype in Apple and Sweet Cherry Cultivars Released at Fruit Research Institute, Čačak. *Genetika*, 49 (1), 127-138.
15. **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.

16. **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.
17. **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" (D. Kovacevic, Ed.), Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, pp. 493-499.
18. **Marić, S., S. Radičević, N. Milošević, M. Popovska, S. Malchev, I. Glišić and M. Đorđević**, 2020. An Overview of Self-Incompatibility (*S*) Genotypes of Autochthonous Sweet Cherries Grown in Balkan Region. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 23 (2), 168-181.
19. **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.
20. **Quero-García, J., A. Iezzoni, G. López-Ortega, C. Peace, M. Fouché, E. Dirlwanger and M. Schuster**, 2019. *Advances and Challenges in Cherry Breeding*. Burleigh Dodds, Cambridge, 34 p.
21. **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.
22. **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 (S. Ganchev, V. Bozhkova, Ed.). Plovdiv, Republic of Bulgaria. *Acta Horticulturae*, 1259, pp. 81-90.
23. **Rösch, M.**, 2008. New Aspects of Agriculture and Diet of the Early Medieval Period in Central Europe: Waterlogged Plant Material from Sites in South-Western Germany. *Vegetation History and Archaeobotany*, 17, 225-238.
24. **Schuster, M.**, 2012. Incompatible (*S*-) Genotypes of Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 148, 59-73.
25. **Schuster, M.**, 2017. Self-Incompatibility (*S*) Genotypes of Cultivated Sweet Cherries – An Overview 2017. OpenAgrar-Repositoryum. doi: 10.5073/20171213-111734.  
[https://www.openagrar.de/receive/openagrar\\_mods\\_00034381](https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00034381)
26. **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.
27. **Sonneveld, T., K. R. Tobutt and T. P. Robbins**, 2003. Allele-Specific PCR Detection of Sweet Cherry Self-Incompatibility (*S*) Alleles *S*<sub>1</sub> to *S*<sub>16</sub> Using Consensus and Allele-Specific Primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1059-1070.
28. **Szikriszt, B., A. Doğan, S. Ercisli, M.E. Akcay, A. Hegedús 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.

29. **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.