

Nuove tecniche e obiettivi nel miglioramento genetico del ciliegio

José Quero García*

UMR 1332 BFP, INRA, Università di Bordeaux, Francia

Cherry breeding in the world: current analysis and future perspectives

Abstract. Modern cherry breeding is relatively recent, as compared to other major crops. Nevertheless, in the last 30 years, numerous cultivars have been released, which has contributed to a significant increase in cherry production. The most important public breeding programs launched during the XXth century remain still active and new programs emerge in countries such as Chile, China or Spain. More recently, private actors are playing an increasingly important role, in particular those located in California, which conduct breeding preferentially for early-maturing and low-chilling cultivars. Nevertheless, cherry production faces significant threats, either related to the consequences of the global climate change (and in particular to the global warming) or to the emergence of new pest and diseases (such as for example the fly *Drosophila suzukii*). Hence, breeder have to incorporate new traits into their selection schemes, on top of the traditional and unavoidable ones, such as productivity, fruit size and firmness, tasting quality, etc. However, because of specific characteristics and of the length of the juvenility period, breeding has been traditionally limited to a rather narrow genetic base. Thus, it might not be straightforward to find interesting alleles in the breeder' portfolios for traits of adaptability to biotic and abiotic stresses. For this reason, the preservation and characterization of germplasm resources should be considered as an urgent priority. With the recent technological developments in the area of molecular biology and bioinformatics, the use of DNA-based information, through molecular marker-assisted selection approaches, has become a reality for cherry breeder. Although important research efforts are still needed in order to disentangle the genetic determinism of the main traits of agronomic interest, these methodologies allow already significant reductions in the breeding costs. In this paper, the major goals and methodologies currently considered by sweet cherry breeder will be reviewed, and perspectives with regards to new directions and needs will be briefly developed.

Key words: sweet cherry, breeding, genitor, phenotypic and genotypic selection.

Introduzione

La produzione mondiale di ciliegio dolce (*Prunus avium*) e ciliegio acido (*Prunus cerasus*) ha raggiunto 3,3 milioni di tonnellate durante la stagione commerciale 2018-2019 (Aprile 2018 - Marzo 2019) (USDA Foreign Agriculture Service, Settembre 2018). Sebbene non sia sempre facile differenziare tra le due specie, si può generalmente affermare che il ciliegio dolce rappresenta almeno 2,2 milioni di tonnellate. Recentemente si è registrato un leggero aumento nella produzione globale, risultato dell'arrivo del ciliegio su nuovi mercati, come Cile e Cina. Dall'altro lato, la produzione in paesi come Francia o Germania è fortemente diminuita (Bujdosó e Hrotkó, 2017).

In termini di miglioramento genetico, il ciliegio dolce è una specie molto attiva e citando Sansavini e Lugli (2008), 230 cultivar sono state rilasciate sul mercato durante il periodo 1991-2004. Quindi, a parte i numerosi programmi pubblici di miglioramento genetico che rimangono attivi da molte decadi, nuovi attori stanno emergendo, in particolare dal settore privato. I programmi di miglioramento genetico più importanti sono stati descritti recentemente da Quero-García *et al.* (2017a). Questi autori hanno presentato una selezione di cultivar di importanza sia mondiale che locale e/o semplicemente promettenti, ottenute sia da strutture pubbliche che private.

Per queste ragioni, la situazione del ciliegio dolce può essere considerata con ottimismo. Ciò nonostante, i breeder ed i genetisti dovrebbero rimanere particolarmente in allerta per fronteggiare le nuove minacce che potrebbero molto velocemente mettere a repentaglio la produzione di questo frutto altamente apprezzato, ma allo stesso tempo molto fragile. Infatti, l'arrivo, 10 anni fa, di un insetto invasivo come la *Drosophila suzukii* negli Stati Uniti e in Europa ha già impattato terribilmente sulla produzione di ciliegio in numerosi paesi. Altre malattie come la *Xylella fastidiosa* non rappresentano ancora un problema serio per il ciliegio ma rimangono temi di preoccupazione. Inoltre, le conseguenze dei cambiamenti climatici sono già visibili in molte aree vocate e chi si occupa di miglioramento genetico dovrà integrare sempre più rapidamente questo nuovo contesto.

* jose.quero-garcia@inra.fr

Questo articolo si concentra sugli aspetti pratici e strategici più importanti nel miglioramento genetico del ciliegio dolce, coprendo in dettaglio i principali obiettivi e le metodologie attualmente considerate dai breeder che si occupano di ciliegio dolce. Una sezione finale sarà dedicata alle nuove prospettive di medio e lungo termine.

Obiettivi attuali del miglioramento genetico del ciliegio dolce

I principali scopi del miglioramento del ciliegio dolce sono stati descritti precedentemente (Fogle, 1975; Bargioni, 1996; Brown *et al.*, 1996; Sansavini e Lugli, 2008; Kappel *et al.*, 2012; Quero-García *et al.*, 2017a; Dondini *et al.*, 2018; Quero-García *et al.*, in stampa). In questa sezione, saranno discussi in maniera preliminare, i caratteri principali attraverso la loro classificazione in ordine di importanza.

Senza dubbio, come per qualsiasi altra coltura agraria, la *produttività* rappresenta un carattere fondamentale per la sostenibilità economica di un cerasicoltore. Tuttavia, il prezzo pagato per kg dipenderà in primis dal *calibro* del frutto. Idealmente, una moderna cultivar di ciliegio dolce dovrebbe essere altamente e regolarmente produttiva, producendo allo stesso tempo frutti di ottime dimensioni. E' importante pertanto richiamare il fatto che la produttività e la dimensione del frutto dipenderanno anche dalle pratiche agronomiche, quali la fertilità del suolo, la forma di allevamento, la portatura dell'albero, l'utilizzo di fito-regolatori di crescita, la scelta del portinnesto, ecc. Nonostante questo, gli ibridi che producono frutti con un peso inferiore agli 8 grammi vengono scartati sistematicamente nella maggioranza dei programmi di miglioramento genetico. Inoltre, la regolarità di produzione, che indica la quantità di frutta raccolta nel tempo, sta diventando sempre più importante nel contesto dei moderni frutteti intensivi, che sono forniti di complesse strutture di protezione contro gli stress biotici ed abiotici, rappresentando un grande investimento iniziale per i frutticoltori. Un modo per minimizzare i rischi di irregolarità di produzione è quello di piantare solamente cultivar auto-fertili, dato che la sincronizzazione della fioritura tra la cultivar bersaglio ed il suo impollinatore non è sempre facile da garantire (per una sintesi della biologia florale del ciliegio dolce, ed in particolare del suo sistema di incompatibilità gametofitica, si rimanda a Herrero *et al.*, 2017).

La terza caratteristica più importante, dopo produttività e calibro, è la *durezza* del frutto. Infatti, essa è correlata positivamente con la shelf-life in post-raccolta, ed è un carattere chiave per le produzioni orien-

tate all'esportazione. E' un carattere molto apprezzato anche dai consumatori, in particolare quando associata ad altri attributi positivi come la freschezza, la croccantezza, la succosità, ecc.

La *qualità sensoriale* sta diventando sempre più strategica per poter differenziare il prodotto, in un mercato che è già saturo a causa di un elevato numero di cultivar. Tuttavia, questo carattere viene valutato scrupolosamente solo nelle ultime fasi della selezione genetica. Un esempio di programma che ha recentemente messo una forte enfasi sulla qualità sensoriale è quello dell'Università di Bologna, con le sue cultivar serie 'Sweet' (Lugli *et al.*, 2012).

Tra gli stress abiotici, la *tolleranza alle spaccature* del frutto indotte dalla pioggia è stata per lungo tempo un carattere fondamentale per i breeder di ciliegio dolce. Oggigiorno, molti frutticoltori impiantano nuovi frutteti sotto protezioni anti-pioggia, o in strutture confinate come tunnel e serre; questo è possibile grazie all'avvento di portainnesti nanizzanti di nuova generazione, ed in parte è anche dovuto alla diffusione recente di insetti, come l'arrivo della *Drosophila suzukii*. Tuttavia, i frutti provenienti da cultivar sensibili (come "Brooks") possono spaccarsi anche sotto queste strutture protettive, in condizioni di assenza di pioggia ma con la presenza di un'elevata umidità. Per questa ragione, le cultivar tolleranti alle spaccature del frutto sono ancora altamente apprezzate e necessarie per i produttori. Dato che quello delle spaccature è un fenomeno molto complesso (per una revisione dell'argomento si rimanda a Knoche e Winkler, 2017), non esistono ancora protocolli fenotipici affidabili per una precisa caratterizzazione della suscettibilità/tolleranza nelle diverse cultivar. Infatti, i breeder possono valutare questo carattere solo con l'accumulo di numerosi anni di osservazioni, e ovviamente, in zone dove le precipitazioni sono frequenti durante il periodo di raccolta.

La *resistenza alle gelate invernali* è sempre stato un carattere importante nei paesi nordici e dell'Europa centrale, zone in cui il ciliegio dolce si trova coltivato ai margini della sua tradizionale area di distribuzione della specie. Al contrario, la *tolleranza alle alte temperature* sta attirando negli ultimi anni un'attenzione sempre maggiore. In primis, la produzione di ciliegio in molte aree tradizionali sta diventando problematica a causa dell'aumento delle temperature autunnali ed invernali, che provoca un mancato raggiungimento del fabbisogno in freddo per la fioritura. Secondo, c'è un crescente interesse nell'espandere le aree di produzione verso regioni/stati con clima mite, allo stesso modo in cui è stato fatto, più di un secolo fa, per altre colture Rosacee, come melo e

pescio. Il secondo carattere più importante che è direttamente legato ad un aumento delle temperature primaverili ed estive è la suscettibilità/tolleranza alla *formazione di frutti doppi*. Quando, nelle nuove gemme che si sviluppano, avviene la differenziazione a fiore, in genere dopo la raccolta, le temperature sopra i 30°C provocano il raddoppiamento dei primordi del pistilli. Nella primavera successiva, i fiori con due pistilli verranno impollinati e formeranno un frutto doppio, che in molti casi non ha un valore commerciale (Wenden *et al.*, 2017).

Tradizionalmente, il ciliegio dolce è una specie molto meno sensibile agli insetti ed alle malattie di altre colture appartenenti alla famiglia delle Rosacee come melo, pesco o albicocco. Ciò nonostante, con l'implementazione di frutteti ad alta densità, una domanda che ci si pone è se le malattie saranno più severe su questi alberi, in qualche modo "indeboliti" artificialmente. La seconda ragione che potrebbe alimentare l'interesse nella ricerca di nuove risorse di *tolleranza/resistenza alle malattie*, è la crescente preoccupazione sociale sui rischi ambientali e per la salute associati all'uso di pesticidi. Ad oggi, solo programmi specifici hanno lavorato sistematicamente sui caratteri di tolleranza/resistenza alle malattie fungine ed alle batteriosi, di cui i più importanti sono stati rispettivamente il cancro batterico causato da *Pseudomonas* spp., il colpo di fuoco in fioritura ed il marciume marrone causato da *Monilinia* spp.

Altri obiettivi importanti per i breeder che si occupano di ciliegio sono l'*estensione del periodo di maturazione* o l'*adattamento alla raccolta meccanica*. Per quanto riguarda il primo punto, i breeder europei ed americani hanno guardato per molto tempo alle cultivar che raggiungevano una maturazione precoce (o comunque maturavano prima di "Burlat"), mostrando una migliore qualità della frutta in termini di calibro, durezza e tolleranza alle spaccature.

Materiali e metodi

La stessa bibliografia citata per la definizione dei principali obiettivi del miglioramento genetico del ciliegio dolce può essere consultata per la descrizione delle metodologie. Una volta che gli obiettivi del programma di miglioramento sono stati stabiliti, sono necessarie due operazioni principali: la creazione di nuovi ibridi, fornendo dati quantitativi sui risultati di numerosi programmi di miglioramento, e la selezione degli ibridi superiori

Ibridizzazione

La biologia florale nel ciliegio dolce, come in altre

specie fruttifere, è un processo biologico molto complicato, altamente influenzato da numerosi fattori genetici ed ambientali. Abbiamo richiamato l'importanza dei caratteri legati all'adattabilità alle elevate temperature, sia durante l'estate (fase di differenziazione a fiore nelle gemme), che durante l'autunno/inverno (fase di endo-dormienza). Però, perfino quando le condizioni ambientali sono ottime fino alla fine del periodo di eco-dormienza, altri fattori possono ancora influenzare drasticamente la fecondazione. Questi sono in relazione con la ricettività dello stigma, la crescita del tubo pollinico, le interazioni tra polline e pistillo e la fertilità dell'ovulo (Herrero *et al.*, 2017).

La maggior parte dei breeder generano famiglie segreganti F1 attraverso l'ibridizzazione tra genitori intercompatibili. Le cultivar auto-fertili sono quelle più spesso usate come genitori paterni, dato che essi vengono considerati come donatori universali e quindi possono impollinare qualsiasi cultivar. Però, poiché queste cultivar sono solitamente altamente produttive, potrebbe essere più appropriato usarle come genitore materno. In questo caso, i fiori devono essere evirati (attraverso la rimozione delle antere) prima dell'impollinazione. Quando cultivar auto-incompatibili vengono impiegate come genitori materni, è necessaria l'esclusione degli impollinatori attraverso l'uso di sacchi o reti anti-insetto.

Per essere in grado di generare variabilità, i breeder non solo conducono impollinazioni controllate ma lasciano avvenire anche impollinazioni casuali ("aperte"). Questo permette loro di testare, con previe conoscenze degli attributi agronomici dei genitori materni, se un'alta percentuale di discendenti sarà ottenuta da numerosi impollinatori, che è tradizionalmente chiamata nella genetica quantitativa, "Abilità di combinazione generale" (ACG). Quando vengono fatti incroci controllati, al contrario, i breeder cercano di sfruttare il valore riproduttivo delle combinazioni parentali accoppiate, che viene chiamato "abilità di combinazione specifica" (ACS). Gli incroci controllati possono essere ottenuti con l'impollinazione manuale, come spiegato prima, o con l'uso di insetti impollinatori. Nel secondo caso, esistono due possibilità: nella prima, i breeder possono usare strutture isolate dove due genitori vengono isolati e l'impollinazione viene assicurata dall'uso di bombi; la seconda, è che la frutta possa essere raccolta da alberi di due cultivar in aree isolate, in cui l'impollinazione sia assicurata da api e bombi selvatici. Una terza possibilità, non ancora molto studiata, nel miglioramento del ciliegio dolce è quella chiamata poli-incrocio. In questo caso, i breeder scelgono numerose cultivar inter-

compatibili, che vengono poste in strutture confinate con bombi. Per ogni semenzale generato, il breeder non saprà qual'è il genitore paterno, ma sarà sicuro che questo genitore può appartenere solo ad un certo gruppo di genitori potenziali. In questo contesto, usando i marcatori molecolari, un breeder potrebbe riuscire a determinare la paternità di tutti i suoi ibridi e quindi potrebbe alla fine produrre un sottoinsieme di incroci controllati, stimando la ACS. D'altra parte, senza l'uso di marcatori molecolari, gli ibridi derivati da un genitore materno, forniranno una visione ristretta dell'ACG. Tutte queste possibilità sono riassunte nelle figure 1 e 2.

Uno dei principali vantaggi degli incroci controllati, rispetto all'impollinazione aperta, è che si possono incrociare cultivar che altrimenti non sarebbe possibile inter-incrociare in natura perchè i loro periodi di fioritura non sono in sincronia. In generale, quando i breeder incrociano cultivar con fioritura precoce e tardiva, raccolgono il polline dalle cultivar precoci e lo usano per impollinare quelle tardive. Questo si verifica anche se le cultivar a fioritura precoce hanno anche una maturazione precoce, tipo la Burlat. Infatti, questo tipo di cultivar produce in generale semi con embrioni non sviluppati che richiedono l'uso di tecni-

che di "embryo rescue" (recupero in vitro). In ogni caso, quando la cultivar tardiva è meno produttiva (o fertile) di quella precoce (per esempio, 'Regina' o 'Fertard' rispetto a 'Lapins' o 'Bellisse'), la seconda verrà usata come genitore materno. In questo caso, il polline della cultivar con fioritura tardiva può essere raccolto durante gli anni precedenti, mantenuto in freezer (a -20°C) ed usato l'anno dopo per impollinare la cultivar a fioritura precoce. Quando vengono usate strutture confinate e bombi, la sincronizzazione della fioritura può essere ottenuta in due diversi modi. Se vengono usati alberi in vaso, le cultivar a fioritura precoce possono essere poste in una doppia parete di refrigerazione per rallentare la transizione dall'endodormienza alla fioritura. La seconda opzione è quella di velocizzare la transizione a fiore delle cultivar tardive, mettendo le pianta in vaso in camere di crescita, serre ecc.

La scelta di queste diverse tecniche dipenderà dagli obiettivi del miglioramento e delle risorse economiche a disposizione dei breeder. L'impollinazione manuale è economica e flessibile. Quando sono disponibili ricche collezioni di cultivar, può essere sfruttato un alto livello di diversità genetica. Essa necessita però di personale qualificato nel manipolare il polline, per effettuare l'evirazione delle antere e le pratiche di impollinazione. Tuttavia, il tasso di successo dell'impollinazione manuale è abbastanza basso, non prevedibile e casuale nel ciliegio dolce; quindi, una situazione tipica è che quando un genetista produce 20 incroci, solo una piccola parte di questi avrà successo nel produrre grandi famiglie. Per questa ragione, i breeder hanno la necessità di combinare l'impollinazione manuale con l'uso di bombi o, quando possibile, di sfruttare zone isolate, grazie alle collaborazioni con frutticoltori o con stazioni sperimentali. Questi due tipi di strategie possono essere utilizzate anche quando un genetista ha raccolto informazioni sul valore di un incrocio specifico e voglia ripeterlo, con l'intento di produrre centinaia di parentali. Come per l'impollinazione aperta, dovrebbe esserci un modo semplice ed economico per selezionare un primo set di genitori da un'ampia collezione, basata sul loro ACG.

Germinazione dei semi

Nel determinare il successo di un programma di miglioramento genetico, la germinazione nel ciliegio dolce può essere critica quanto la fase di allegagione dei frutti. Le procedure dettagliate si possono trovare leggendo Iezzoni *et al.* (2017) ed esiste molta bibliografia in merito ai protocolli in uso per l'"embryo rescue" in vitro. Esistono diverse possibilità per la

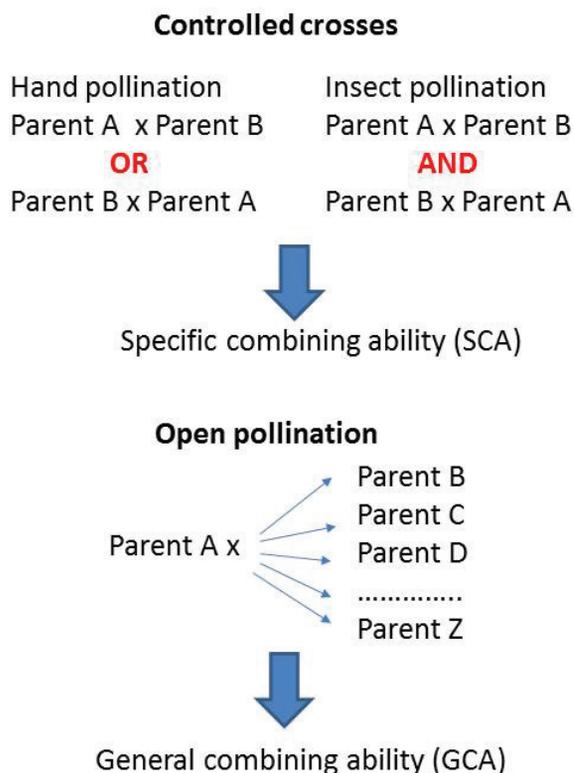


Fig. 1 - Rappresentazione schematica delle possibilità che hanno i genetisti in termini di ibridizzazione: incroci controllati ed impollinazione aperta.

Fig. 1 - Schematic representation of the breeders possibilities in terms of hybridization: controlled crosses and open pollination

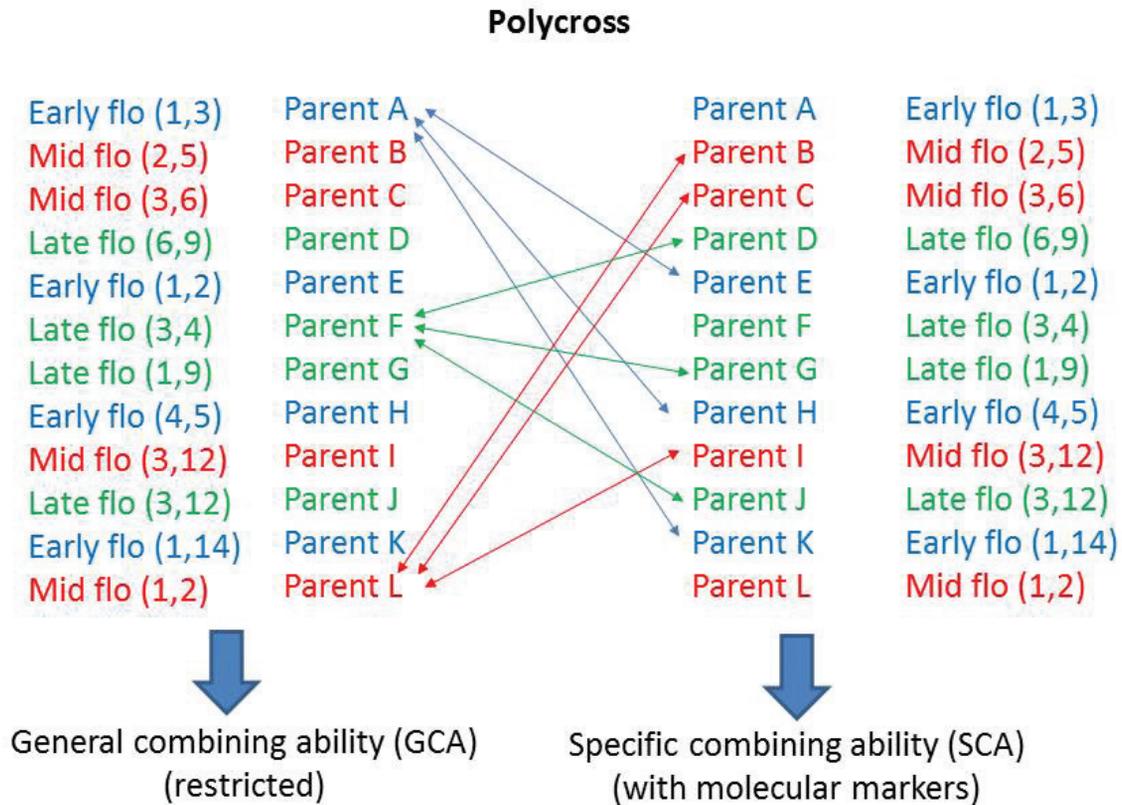


Fig. 2 - Rappresentazione schematica delle possibilità che hanno i genetisti in termini di ibridizzazione: i poli-incroci. Gli alleli scelti casualmente nel sistema di auto-incompatibilità gametofitica sono indicati tra parentesi. E' indicata una sola possibilità per un genitore di ogni classe (a fioritura precoce, media o tardiva).

Fig. 2 - Schematic representation of the breeders possibilities in terms of hybridization: polycross. Randomly chosen alleles of the gametophytic self-incompatibility (GSI) system are indicated into parenthesis. Only the possibilities for one parent of each class (early, mid or late flowering) are indicated.

germinazione dei semi a seconda degli obiettivi e delle risorse di ogni programma. Quindi, il breeder che si focalizza sull'impollinazione aperta e riesce a creare grandi quantità di semi potrebbe usare il metodo della stratificazione non sterile per superare la dormienza dell'endocarpo, senza la necessità di rompere ogni endocarpo. Quando i breeder concentrano la maggior parte dei loro sforzi negli incroci controllati e quindi producono un numero più basso di semi rispetto ad un contesto di impollinazione aperta, si raccomanda di rimuovere l'endocarpo manualmente per accelerare e migliorare l'uscita dalla dormienza imposta. Infine, quando i semi sono raccolti da cultivar molto precoci, come 'Burlat', 'Earlise', 'Early Star', ecc., la tecnica dell'"embryo rescue" permetterà una percentuale più alta di germinazione di embrioni non sviluppati. Ciò nonostante, il tasso di successo della coltura embrionale è estremamente variabile da un anno all'altro e in base alle cultivar usate (Balla e Brozik, 1996).

I dati quantitativi sulla variabilità di allegazione dei frutti e della germinazione dei semi non sono molto abbondanti in letteratura, ma molti programmi di miglioramento hanno pubblicato i dati. Nel 2008,

Gradinariu *et al.* ha descritto i risultati dell'attività di miglioramento genetico presso la stazione di ricerca frutticola di Iasi, in Romania, coprendo un largo periodo di tempo, dal 1981 al 2004. Da 706.365 fiori impollinati, sono stati raccolti 133.150 frutti ibridi, con un tasso di allegazione del 18,8%. In ogni caso, solo 13.453 semi erano vitali, con un raccolto finale di 6.493 sementali, che rappresenta un tasso di successo globale (dal fiore alla piantina) del 0,91%. La variabilità negli anni è stata relativamente alta per l'allegazione, con un massimo del 35,7% ed un minimo di 5,8%. Il tasso globale di successo è risultato compreso tra 0 e 2,9%. Considerando tutti i frutti raccolti, il tasso di germinazione medio è stato del 5%, con un massimo di 25,2% ed un minimo di 0%.

López-Corrales *et al.* (2014) hanno pubblicato i risultati del programma di miglioramento genetico recentemente iniziato a Jerte Valley, Extremadura, in Spagna, differenziando tra i vari incroci individuali fatti nel periodo 2006-2008. Partendo da 36.906 fiori impollinati, sono stati raccolti 6.334 frutti, il che rappresenta un tasso di allegazione medio del 17,2%. Tra tutti i frutti raccolti, il 90,4% conteneva embrioni vitali ed il tasso medio di germinazione ottenuto è

stato del 31,9%. Il tasso di successo globale (dal fiore al semenzale) è stato del 4,9%. Nei vari anni considerati, l'allegagione è stata compresa tra il 13,5 ed il 20,6% mentre il tasso di germinazione è stato particolarmente basso nel 2006 (1%), se confrontato con le annate 2007 e 2008 (44,7 e 46,9%, rispettivamente). Gli autori non precisano se ci furono problemi tecnici nel 2006, non proponendo quindi una spiegazione per un così basso livello di germinazione. Come per i parentali materni usati, l'allegagione è stata altamente variabile, con valori compresi tra lo 0 ed il 41,6%, ed altrettanto per il tasso di germinazione, che ha presentato valori da 0 a 62,6%. Interessante notare come il 98,7% dei semenzali prodotti derivasse da tre cultivar: 'Ambrunés', 'Hudson' e 'Pico Colorado', che erano coinvolte nel 47% di tutte le combinazioni. La cultivar 'Hudson' è apparsa in Jerte Valley come un buon parentale, con il tasso di allegagione e quello di germinazione sopra il 40%. Questo risultato potrebbe spiegare la differenza complessiva nel tasso globale di successo tra questo programma e quello svolto a Iasi, in Romania.

All'istituto INRA di Bordeaux, i dati raccolti negli ultimi 11 anni, riferiti ad una nuova fase del programma di miglioramento genetico, sono stati di recente analizzati e sintetizzati (risultati non pubblicati). Per quanto riguarda l'impollinazione manuale, i risultati vengono presentati in tabella 1. La percentuale di allegagione varia da 0 a 8,2%, con una media di 4,7%, mentre il tasso di germinazione mostra una variabilità molto più alta, con valori compresi tra 6,3 e 71,9%, ed un valore medio di 21%. Complessivamente, il tasso globale di successo (dal fiore al frutto) è mediamente uguale a 1%, variando tra 0,3% e 2,6%. Quindi, il programma all'INRA ha avuto un tasso di allegagione

significativamente più basso se comparato con quelli di Romania (Iasi) o Spagna (Jerte Valley); in ogni caso, il tasso di germinazione è risultato più alto di quello ottenuto in Romania, concludendo con un tasso globale di successo molto simile tra i due programmi. Sono stati impiegati ventidue parentali materni, che hanno mostrato alta variabilità in termini di tasso di allegagione e di germinazione, con uno spettro tra 0 - 19,1% e 0,3 - 84,9%, rispettivamente. Una possibile spiegazione per il tasso di allegagione mediamente più basso osservato all'INRA, se paragonato ad altri programmi, potrebbe derivare da un numero non equo di fiori impollinati tra i parentali materni. Infatti, le cultivar 'Fertard', 'Regina' e 'Fermina' hanno rappresentato il 24,3, 21,1 e 14,7% di tutti i fiori impollinati, e la percentuale di frutti allegati in queste cultivar è stato del 1,96, 4,3 e 1,8%, rispettivamente. Questo risultato non è troppo sorprendente, dato che è ben noto come queste cultivar mostrino problemi di fertilità ed irregolarità di produzione, parzialmente dovuti al loro alto fabbisogno in freddo prima della fioritura. Fortunatamente, 'Fertard' ha mostrato percentuali di germinazione molto alte, vicino al 66%, compensando il basso livello di allegagione osservato. Come per il programma della Jerte Valley, la dimensione delle famiglie presso INRA-Bordeaux è risultato estremamente variabile, con solo il 31% delle famiglie formate da più di 50 semenzali.

L'alta variabilità e l'imprevedibilità osservata nei programmi di miglioramento genetico su ciliegio dolce, in termini di tassi di allegagione e di germinazione, è una delle principali ragioni per cui la maggior parte dei programmi produce un numero di ibridi per anno relativamente modesto, se paragonato con altre colture fruttifere, come il melo o il pesco. Tra tutti i

Tab. 1 - Risultati statistici derivanti da incroci da impollinazione manuale fatti presso INRA-Bordeaux dal 2008 al 2018.

Tab. 1 - Statistical results deriving from manual pollination crossings made at INRA-Bordeaux from 2008 to 2018.

Anno	N. di incroci	N. di fiori	N. frutti raccolti	N. di semenzali	% Allegagione	% Germinazione	% Successo
2008	29	42346	2019	128	4.8	6.3	0.3
2009	39	55682	2044	157	3.7	7.7	0.28
2010	18	44140	2370	730	5.4	30.8	1.65
2011	15	20299	1129	142	5.6	12.6	0.7
2012	2	5361	0	0	0	-	0
2013	4	8296	182	93	2.2	51.1	1.12
2014	6	11068	89	64	0.8	71.9	0.58
2015	22	16751	1380	441	8.2	32	2.63
2016	12	15382	407	260	2.6	63.9	1.69
2017	10	23894	1232	255	5.2	20.7	1.07
2018	13	22896	1636	355	7.1	21.7	1.55
Totale / Media	170	266115	12488	2625	4.7	21	0.99

programmi di miglioramento descritti da Sansavini e Lugli (2008), solo 12 hanno fornito i dati sul numero di piantine prodotte per anno, riportando valori nel range tra 80 e 1000. Perciò, molti programmi di miglioramento varietale, sia privati che pubblici, gestiscono la produzione attuale in modo da produrre svariate migliaia di ibridi per anno (Courtney, 2016; Quero-García *et al.*, 2017a).

Come già menzionato, alcuni incroci producono un numero molto più elevato di ibridi rispetto ad altri. D'altra parte, numerosi caratteri agronomici importanti sono presenti solo in poche cultivar. Questo è il caso delle cultivar auto-fertili (cultivar 'Stella' e suoi discendenti, come 'Lapins' o 'Sweetheart') o di quelle tolleranti alle spaccature (cultivar 'Regina' o 'Fermina'). Inoltre, i breeder hanno compreso velocemente che le numerose combinazioni avevano portato ad una percentuale molto alta di ibridi con caratteri indesiderati, in particolare frutti piccoli e teneri, e che quindi le loro ambizioni iniziali erano state ristrette a quegli incroci che avevano raccolto una percentuale accettabile di ibridi di buona qualità. Recenti studi genetici (vedi sezione 3.4) hanno confermato la dominanza degli alleli indesiderati che influenzano il peso dei frutti o la durezza della polpa (Zhang *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2018), spiegando la situazione. Nel loro insieme, questi fattori determinano la ristrettezza della base genetica tradizionalmente usata dai breeder di ciliegio. Anderson (1998) riporta come ogni programma di miglioramento genetico utilizzi, in media, dai quattro ai sei parentali principali, mentre Choi e Kappel (2004) hanno descritto l'endogamia e la co-ancestralità dei programmi di miglioramento genetico in Nord America. Il fatto che la base genetica delle moderne cultivar commerciali sia stretta non dipende solo dall'utilizzo di un numero ridotto di parentali. Può anche essere legato al peso che i breeder hanno dato a certi obiettivi; per esempio, durante la prima fase del programma di miglioramento all'INRA, i breeder precedenti avevano dato molta priorità alla produzione di ibridi con frutti grandi e duri e quindi la cultivar 'Fercer', che è stata la prima a presentare questi attributi all'INRA, è il parentale della maggior parte delle nuove cultivar sviluppate alla stazione di ricerca (Quero-García *et al.*, 2017b).

Selezione fenotipica

Sebbene ogni programma di miglioramento genetico utilizzi i suoi specifici protocolli di fenotipizzazione, esistono dei protocolli resi pubblici (Chavoshi *et al.*, 2014).

Nella prima fase di selezione, la fenotipizzazione è basata su osservazioni in campo e non su misurazioni

quantitative di laboratorio. Nella maggior parte dei programmi, i seguenti caratteri vengono tenuti in considerazione: periodo di fioritura e di maturazione, precocità di produzione, produttività, calibro dei frutti, durezza, aspetto (inclusa la mancanza di difetti) e qualità sensoriale. Per certi programmi, la tolleranza o resistenza a stress biotici ed abiotici viene già valutata qualitativamente in questa fase, includendo test in condizioni controllate. Per condurre la prima selezione degli ibridi, sono necessari un minimo di due anni di osservazioni, sebbene in realtà vengano spesso usati tre anni.

Nella seconda fase, le selezioni più performanti vengono innestate su uno o più portainnesti per essere valutate in una o in più aree. Per questo sono necessarie un minimo di due repliche per ibrido, sebbene più grande sarà il numero di repliche, più precise saranno le valutazioni fenotipiche. Allo stesso modo, la scelta di siti molto diversi in termini di suolo, clima, pressione dei patogeni ecc, permetterà ai breeder di determinare velocemente la plasticità fenotipica o, come viene chiamata nella genetica quantitativa, le interazioni genetiche con l'ambiente (GxA) delle loro selezioni. In questo stadio, il raccolto sarà valutato in maniera più precisa per essere in grado di effettuare stime di produttività, mentre in laboratorio saranno quantitativamente valutati il peso e le dimensioni del frutto ed anche la durezza della polpa, come pure altri parametri chiave della qualità come il contenuto in zuccheri ed acidi.

A seconda della strategia di ogni programma di miglioramento genetico o del valore degli ibridi più promettenti selezionati nella seconda fase, un secondo giro di prove multi-sito può essere implementato. In alternativa il materiale selezionato può essere piantato direttamente in prove pre-commerciali.

La giovanilità sarà sempre un ostacolo all'ottenimento di risultati rapidi nel miglioramento del ciliegio dolce. Per accorciare questa fase, i breeder hanno varie opzioni. La più diretta è l'uso di portainnesti fortemente nanizzanti in grado di portare frutti già due o tre anni dopo l'impianto in campo. Tuttavia, questo aumenta considerevolmente il costo del programma di miglioramento genetico. Un'opzione più economica potrebbe essere quella di adottare pratiche agronomiche per ridurre il vigore degli ibridi innestati sulle loro stesse radici, ad esempio inducendo una rapida ramificazione laterale, incurvando i rami ecc. Un altro modo per velocizzare il programma di miglioramento è di incrementare l'ereditarietà dei caratteri studiati, cioè di migliorare la qualità della fenotipizzazione, riducendo quindi l'impatto della varianza ambientale. Questo può essere ottenuto inne-

stando due piantine per ogni selezione, anziché una. Se si usano portainnesti molto nanizzanti, lo spazio assegnato a due piante potrebbe essere equivalente a quello di un'astone su franco (sulle sue radici). Di nuovo, questo aumenterà comunque i costi visto che dovranno essere comprate il doppio delle piante portainnesto. Infine, una terza opzione per abbassare i costi è quella di ridurre l'area usata per la selezione. Nel primo programma di miglioramento genetico lanciato in Cile (E. Gratacos, comunicazione personale), sono stati innestati sullo stesso portainnesto fino a tre genotipi. Questa strategia richiede alta tecnicità e speciale cura nell'etichettatura dei rami. Dall'altra parte, la valutazione di ogni ibrido sarà basata solo su una frazione di albero e su un numero relativamente limitato di frutti.

Selezione genotipica

Negli ultimi 20 anni, la selezione molecolare assistita (MAS) è diventata uno strumento altamente promettente per i breeder di ciliegio dolce. La recente rivoluzione ha portato alle tecnologie per il sequenziamento di nuova generazione (NGS) permettendo un'estremamente rapida diminuzione dei costi di sequenziamento. Quindi, il genoma del ciliegio dolce è stato di recente completamente sequenziato (Shirasawa *et al.*, 2017). Inoltre, oggi è molto più facile generare migliaia di marker polimorfici, chiamati SNP (Peace *et al.*, 2012), a basso costo, che sono di conseguenza usati per studiare le regioni del genoma che controllano la variazione di importanti caratteri di interesse agronomico.

Nonostante questo, la scoperta di tali regioni, come pure lo sviluppo delle strategie MAS, è sempre un processo laborioso. La metodologia più comune è la mappatura dei QTL ('Quantitative Trait Loci') nelle famiglie segreganti, derivate da incroci biparentali. Primo, la genotipizzazione di tutta la progenie permette la costruzione di mappe genetiche. Secondo, con la fenotipizzazione della stessa progenie e l'analisi congiunta dei dati genotipici e fenotipici, i QTL sono rilevati e mappati sui cromosomi dei parentali, o su "linkage groups" (LG). In generale, la fenotipizzazione deve essere effettuata per svariati anni al fine di validare la stabilità di un dato QTL. Una volta che i ricercatori sono sicuri della significatività ed utilità dei loro QTL, per ultimo deve essere validato in altri background genetici prima che i marker diagnostici possano essere condivisi diffusamente tra i breeder. Il parametro più importante nella localizzazione dei QTL è la percentuale di variazione fenotipica del carattere, che viene spiegata dal QTL stesso. Però è anche fondamentale che questo QTL sia localizzato in

maniera relativamente precisa, in termini di intervallo statistico di confidenza.

I risultati della mappatura genetica e dello studio della localizzazione dei QTL sono stati recentemente revisionati (Quero-García *et al.*, 2017a; Dondini *et al.*, 2018; Quero-García *et al.*, in stampa) e solo gli studi più rilevanti in termini di scoperte di QTL e di implementazione degli approcci MAS sono citati in questo lavoro. Il ciliegio dolce è caratterizzato in larga parte da caratteri poligenici, con solo pochi caratteri di interesse controllati da un singolo locus, al contrario di quanto è stato osservato su pesco. Oggi, solo l'autofertilità ed il colore del frutto sono stati descritti come monogenici e sono usati nei programmi MAS di routine (Haldar *et al.*, 2010; Sooriyapathirana *et al.*, 2010; Sandefur *et al.*, 2016).

Per quel che riguarda i caratteri più complessi e quelli ereditati quantitativamente, gli studi si sono focalizzati in primis sulla data di fioritura (incluso i fabbisogni in freddo ed in caldo) e sul periodo di maturazione (Dirlewanger *et al.*, 2012; Castède *et al.*, 2014), sul calibro (Zhang *et al.*, 2010; Rosayara *et al.*, 2013, de Franceschi *et al.*, 2013), sulla durezza del frutto (Campoy *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2018), sulla tolleranza alle spaccature (Quero-García *et al.*, 2014; Quero-García *et al.*, 2017b) e sull'acidità del frutto (Quero-García *et al.*, in stampa). I QTL più interessanti sono rappresentati in figura 3. Due cromosomi, o "linkage groups" (LG) 2 e 4, sono evidenziati come alcuni dei QTL più significativi, per i caratteri di importanza agronomica; essi sono stati trovati in questi LG che sono hotspot di ricombinazione e perciò sono state soggette a selezione intensiva (Cai *et al.*, 2017).

Ad oggi, i QTL più importanti in termini di MAS sono quelli localizzati sul LG 2, mostrando, a seconda della famiglia e dell'anno considerato, fino al 30% della varianza fenotipica sul peso del frutto. Quindi, questo QTL è stato messo in relazione alla domesticazione, ed è stato visto come le cultivar commerciali più moderne contengano sia i due alleli favorevoli (omozigosi) oppure uno favorevole ed uno sfavorevole (eterozigosi) (Peace, 2011). Sebbene molti altri QTL influenzino il diametro del frutto, sembra molto probabile che un ibrido che possieda un allele sfavorevole al QTL su LG2 non produrrà frutti estremamente grandi, diciamo, più grandi di 10-12 g. Per questa ragione, è molto importante per i breeder eliminare, durante la fase in serra, i semenzali contenenti le combinazioni alleliche sfavorevoli.

Una revisione delle numerose applicazioni del miglioramento DNA-informato delle Rosacee è stato recentemente pubblicato da Peace (2017). A parte i

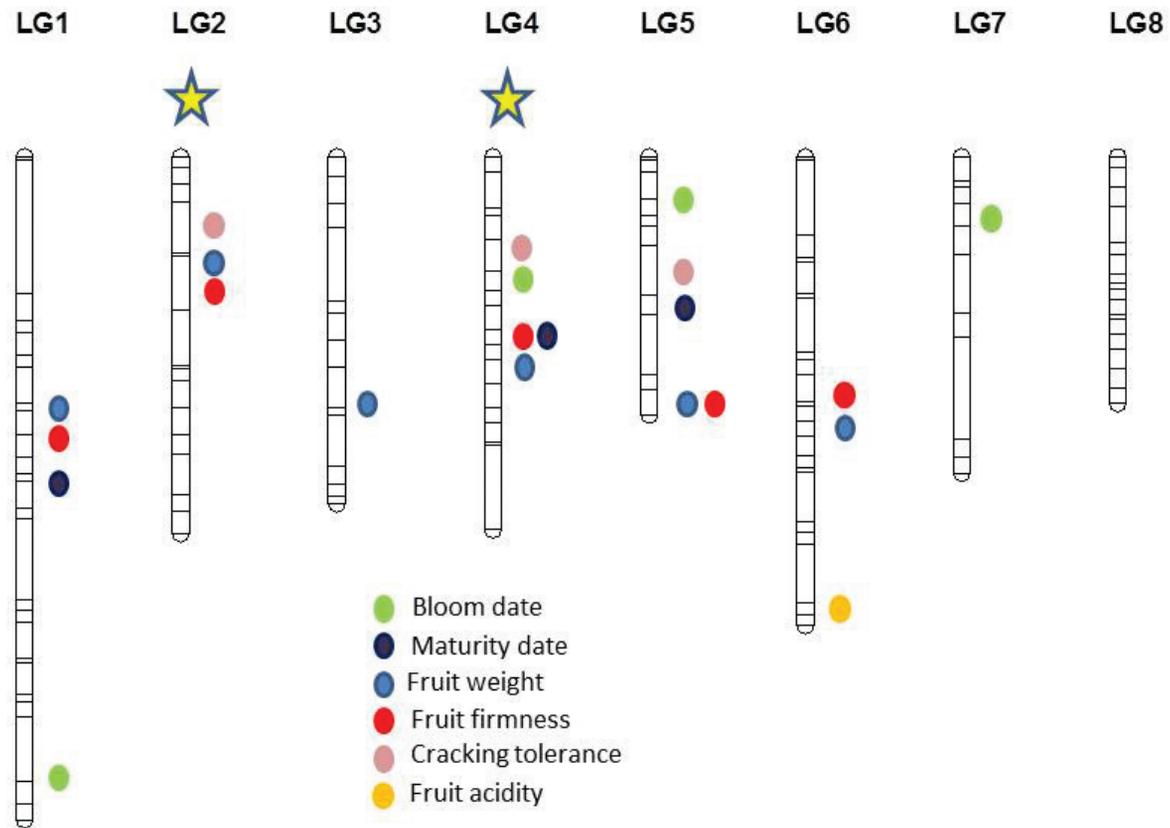


Fig. 3 - Posizioni genomiche approssimative dei QTL rilevati per le più importanti caratteristiche agronomiche in ciliegio dolce (LG: linkage group).

Fig. 3 - Approximate genomic position of the QTLs detected for the most important agronomic traits in sweet cherry (LG: Linkage group).

classici approcci MAS, altre applicazioni che sono state recentemente implementate su ciliegio dolce sono la determinazione di “Genome wide breeding value” del germoplasma attraverso numerosi caratteri (Piaskowski *et al.*, 2018) - e la previsione della data di maturazione in ambienti diversi (Hardner *et al.*, 2019). Per quel che riguarda i MAS nel ciliegio dolce, è stato stimato un risparmio di 80.000 dollari, grazie all’eliminazione di almeno metà delle 3000 piantine testate nel 2010 e 2011 nel programma della Washington State University (WSU). Alla WSU, il MAS interessa di routine i seguenti caratteri: colore del frutto, peso del frutto, data di maturazione ed autofertilità. Per ora, all’INRA-Bordeaux, i MAS sono stati applicati solo al carattere del peso del frutto. Una valutazione economica dei risparmi generati dall’attività del MAS non è ancora stata condotta, ma il 51% dei semenzali creati entro il periodo 2012-2016 sono stati eliminati da 11 famiglie (per i MAS, sono state considerate solo le famiglie con più di 100 semenzali). Complessivamente, sono state abbattute 949 semenzali da un totale di 1860, con tasso di selezione (in questo caso “selezione negativa” o in altre parole “tasso di eliminazione”) variabile dal 38 al 67%.

Prospettive future

Come per tutte le colture caratterizzate da sforzi prolungati nel tempo nel campo del miglioramento genetico e della selezione, l’importanza delle risorse genetiche diventerà sempre maggiore per i breeder di ciliegio dolce. Sebbene questa specie sia relativamente “rustica”, nelle cultivar moderne non ci sono abbastanza alleli favorevoli per i caratteri di adattamento contro gli stress biotici ed abiotici. Per questo motivo, i breeder danno molta importanza alle collezioni genetiche presenti nei diversi paesi. In ogni caso, c’è molto spazio per migliorare la gestione di queste collezioni ed è necessaria una collaborazione internazionale più forte per valutare efficientemente la diversità genotipica e fenotipica, come pure una promozione dello scambio di materiali. Uno degli obiettivi della COST Action FA1104 (www.bordeaux.inra.fr/cherry) è stato quello di sviluppare questo tipo di collaborazioni. Perciò, questa rete ha contribuito al lancio di un piccolo progetto finanziato dal ECPGR (European Cooperative Program for Plant Genetic Resources, denominato EuCherry), EuCherry, che ha permesso di analizzare con 14 marcatori molecolari (SSR, o microsatelliti) una collezione di 324 cultivar (sia cul-

tivar “moderne commerciali” che “locali”) da 18 stati. Inoltre, 3 breeder da Germania, Spagna e Italia hanno partecipato nel 2014 ad una missione con l’obiettivo di raccogliere frutti di ciliegio dolce ed acido dall’Azerbaijan, nella presunta area di origine di questa specie (López-Ortega, 2015). E’ comunque chiaro che i breeder di ciliegio dolce che usano vecchie varietà, o perfino materiale selvatico “mazzards”, avranno la necessità di condurre molteplici re-incroci prima di potersi liberare del carico genetico di questi materiali. Per questa ragione, potrebbe essere molto conveniente organizzare le attività di miglioramento genetico in modo che le così dette “attività pre-incrocio” siano condotte da istituzioni pubbliche mentre il miglioramento genetico commerciale classico sia compiuto soprattutto da compagnie private. Questa è la strategia impostata attualmente all’INRA per le specie fruttifere con programmi di ricerca attivi (melo, pero, pesco, albicocco, ciliegio dolce, portainnesti di *Pyrus* e *Prunus*), in stretta collaborazione con i suoi principali partner privati, CEP Innovation e Novadi.

Nel campo della genomica dell’approccio MAS, c’è ancora molta strada da compiere in termini di caratterizzazione dei QTL ma, ancora più importante, in termini di lavoro di traduzione dai genetisti ai breeder. Questo sarà possibile solo quando i breeder (sia da istituzioni pubbliche che private) saranno convinti che valga la pena investire in questo campo. Le ricerche devono essere quindi condotte anche per l’implementazione pratica, logistica ed economica di questi programmi. Ad oggi, l’unico programma che ha seriamente adottato i MAS, come strumento principale, sistematico e strategico per il miglioramento genetico, è quello condotto alla WSU. Per quanto riguarda le attività di ricerca, molti gruppi focalizzano la loro attenzione al miglioramento della rilevazione e caratterizzazione dei QTL, con una varietà di approcci. Per esempio, all’INRA-Bordeaux, sono state sviluppate strategie di mappatura molto dettagliate, lavorando con una famiglia di 1400 genotipi discendenti da un incrocio tra ‘Regina’ e ‘Garnet’, in grado di separare chiaramente i QTL vicini entro le regioni hotspot come quella nei LGs 2 o 4.

Nel campo della selezione fenotipica, sono stati fatti sforzi di ricerca molto inferiori rispetto a quelli nell’area della genomica. Nonostante questo, tecniche come la NIRS (*Near-infrared spectrophotometry* - spettrofotometria dell’infrarosso vicino) sono state testate per facilitare elevate capacità di fenotipizzazione dei caratteri complessi, come la durezza dei frutti, il contenuto in zuccheri ed in acidi (Quero-García *et al.*, in stampa). Le tecniche basate sull’acquisizione di

immagini, sia attraverso l’uso di camere che di droni devono ancora essere ampiamente testate. Potrebbero essere particolarmente utili nei caratteri correlati alla fenologia, alla resistenza alle malattie o alla tolleranza alle spaccature. Un altro fattore che migliorerà molto l’efficienza di un programma di miglioramento genetico, sarà quello di avere, il prima possibile, una solida capacità di valutazione del livello di adattabilità ad un determinato ambiente (attraverso la stima delle interazioni GxA) dei nuovi ibridi selezionati. Mentre la maggior parte dei programmi di miglioramento valuta gli ibridi selezionati, dopo la prima fase di valutazione, in diverse località, è meno comune trovare prove che replicano direttamente tutti gli ibridi iniziali e li piantano in diversi ambienti. Un’alternativa, ed un’opzione meno costosa, che è stata per esempio migliorata dall’INRA nel programma di miglioramento su melo (François Laurens, comunicazione personale) è di dividere una famiglia in lotti con ugual numero di semenzali e piantarle in diverse località. Ovviamente, questo è fattibile e consigliabile quando le famiglie sono grandi; quindi, potrebbe essere una strategia interessante quando si lavora con l’impollinazione aperta e si cerca la valutazione del GCA. Siccome questo tipo di prova con repliche può essere molto costosa, sarebbe ottimo se i breeder potessero appoggiarsi a una rete di collaborazioni, in cui le loro selezioni migliori potrebbero essere testate nei campi sperimentali di altri breeder. Nel contesto europeo, questo potrebbe permettere di testare ibridi in condizioni estremamente variabili. Questo tipo di iniziativa è oggi sotto discussione nell’ambito del gruppo di lavoro sul ciliegio dolce e acido di EUFRIN (European Fruit Research Institutes Network) e potrebbe essere presto applicata.

In conclusione, date le difficoltà e le preoccupazioni affrontate dai breeder di ciliegio dolce, tre obiettivi dovrebbero essere definitivamente ottenuti: primo, un’intensificazione della collaborazione tra breeder, tra genetisti e tra genetisti e breeder, entro e tra gli stati; secondo, il rafforzarsi dei collegamenti tra le istituzioni di ricerca pubbliche ed i breeder privati, ma anche frutticoltori, vivaisti ed in generale, tutti gli attori coinvolti nel settore cerasicolo; terzo, una maggiore organizzazione e strutturazione del settore del ciliegio dolce, in particolare nell’Unione Europea.

Ringraziamenti

Il lavoro di ricerca e di miglioramento condotto all’INRA-Bordeaux sul ciliegio dolce è una missione collettiva compiuta dal gruppo A3C (‘Adaptation of Sweet Cherry to Climate Change’) nel UMR BFP,

con il prezioso aiuto del personale dalla UEA (Fruit Tree Experimental Unit). Le attività di miglioramento genetico sono portate avanti attraverso una cooperazione bilaterale con un consorzio di vivaisti, CEP Innovation. Un ringraziamento speciale va anche ai numerosi breeder e colleghi per le discussioni e collaborazioni produttive, in particolare a Amy Iezzoni, Cameron Peace, Mirko Schuster e Gregorio López-Ortega.

Riassunto

Il miglioramento genetico del ciliegio dolce è relativamente recente, se confrontato con altre colture di maggiore importanza. Nonostante ciò, negli ultimi 30 anni, sono state rilasciate numerose cultivar, il che ha contribuito ad un aumento significativo della produzione di ciliegie. Il più importante programma di miglioramento genetico pubblico partito nel XX secolo rimane tutt'ora attivo e nuovi programmi si stanno sviluppando in paesi come Cile, Cina o Spagna. Più recentemente, anche il settore privato ha iniziato a giocare un ruolo sempre più importante, in particolare in California dove si sta conducendo un programma di miglioramento mirato allo sviluppo di cultivar a maturazione precoce e con un basso fabbisogno in freddo. Nonostante questo, la produzione di ciliegie deve affrontare sfide molto significative, sia in relazione alle conseguenze del cambiamento climatico, su scala mondiale (in particolare a causa del riscaldamento globale) che all'emergenza di nuovi parassiti e malattie (ad esempio la mosca della frutta, *Drosophila suzukii*). I breeder devono quindi aggiungere nuovi caratteri all'interno degli schemi di selezione, oltre a quelli tradizionali ed inevitabili come la produttività, il diametro dei frutti, la durezza, la qualità aromatica, ecc. Tuttavia, a causa di caratteristiche specifiche ed alla lunghezza del periodo di giovanità della pianta, il miglioramento genetico è stato tradizionalmente limitato ad una base genetica piuttosto ristretta. Potrebbe quindi non essere semplice trovare alleli interessanti per caratteri di adattabilità agli stress biotici ed abiotici nel portfolio dei breeder. Per questa ragione, la preservazione e la caratterizzazione delle risorse di germoplasma dovrebbe essere considerata una priorità urgente. Con i recenti sviluppi tecnologici nell'area della biologia molecolare e della bioinformatica, l'uso delle informazioni basate sul DNA, attraverso un approccio di selezione assistita dei marker molecolari, è diventata una realtà per i genetisti che si occupano di ciliegio. Sebbene sforzi importanti nella ricerca siano ancora necessari per sbrogliare la determinazione genetica dei principali caratteri

di interesse agronomico, queste metodologie consentono già una riduzione significativa nei costi di miglioramento. In questo articolo sono riportati i principali obiettivi e le metodologie attualmente utilizzate dai breeder che si occupano di ciliegio; successivamente vengono brevemente affrontate le diverse prospettive riguardanti le nuove direzioni da intraprendere e le presenti necessità.

Parole chiave: ciliegio dolce, miglioramento genetico, selezione fenotipica e genotipica.

Bibliografia

- ANDERSON, R.L. 1998. *Current status of sweet cherry breeding*. Acta Horticulturae 468, 35-44.
- BALLA, I., BROZIK, S. 1996. *Embryo culture of sweet cherry hybrids*. Acta Horticulturae 410, 385-386.
- BARGIONI, G. 1996. *Sweet cherry scions. Characteristics of the principal commercial cultivars, breeding objectives and methods*. In Webster, A.D. and Looney, N.E. (eds.) *Cherries: Crop physiology, production and uses*, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 73-112.
- BROWN, S.K., IEZZONI, A.F., FOGLE, H.W. 1996. *Cherries*. In: Janick, J. and Moore, J.N. (eds) *Fruit Breeding, Vol. I. Tree and Tropical Fruits, vol. 1*, John Wiley & Sons, New York, U.S.A, pp. 213-255.
- BUJDOŚ, G., HROTKÓ, K. 2017. *Cherry Production*. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 1-13.
- CAI, L., VOORRIPS, R.E., VAN DE WEG, E., PEACE, C., IEZZONI, A. 2017. *Genetic structure of a QTL hotspot on chromosome 2 in sweet cherry indicates positive selection for favorable haplotypes*. *Molecular Breeding* 37: 85.
- CAI, L., QUERO-GARCÍA, J., BARRENECHE, T., SASKI, C., IEZZONI, A. 2018. *Identification and validation of a QTL for fruit firmness on linkage group 4 in three sweet cherry populations*. 9th International Rosaceae Genomics Conference, 26-30 June, Nanjing, China (Poster).
- CAMPOY, J.A., LE DANTEC, L., BARRENECHE, T., DIRLEWANGER, E., QUERO-GARCÍA, J. 2015. *New insights into fruit firmness and weight control in sweet cherry*. *Plant Molecular Biology Reporter* 22, 783-796.
- CASTÈDE, S., CAMPOY, J.A., QUERO-GARCÍA, J., LE DANTEC, L., LAFARGUE, M., BARRENECHE, T., WENDEN, B., DIRLEWANGER, E. 2014. *Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in Prunus avium: flowering date dissected into chilling and heat requirements*. *New Phytologist* 202,703-715.
- CHAVOSHI, M., WATKINS, C., ORAGUZIE, B., ZHAO, Y., IEZZONI, A., ORAGUZIE, N. 2014. *Phenotyping protocol for sweet cherry (Prunus avium L.) to facilitate an understanding of trait inheritance*. *Journal of the American Pomological Society* 68, 125-134.
- CHOI, C., KAPPEL, F. 2004. *Inbreeding, coancestry, and founding clones of sweet cherries from North America*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129, 535-543.
- COURTNEY, R. 2016. *Breeder continue effort to develop early cherry varieties*. *Good Fruit Grower*.
- DE FRANCESCHI, P., STEGMEIR, T., CABRERA, A., VAN DER KNAPP, E., ROSYARA, U., SEBOLT, A., DONDINI, L., DIRLEWANGER, E., QUERO-GARCÍA, J., CAMPOY, J., IEZZONI, A. 2013. *Cell number regulator genes in Prunus provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry*. *Molecular Breeding* 32, 311-326.

- DIRLEWANGER, E., QUERO-GARCÍA, J., LE DANTEC, L., LAMBERT, P., RUIZ, D., DONDINI, L., ILLA, E., QUILOT-TURION, B., AUDERGON, J.-M., TARTARINI, S., LETOURMY, P. ARÜS, P. 2012. *Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three Prunus species: peach, apricot and sweet cherry*. Heredity 109, 280-292.
- DONDINI, L., LUGLI, S., SANSVINI, S. 2018. *Cherry breeding: sweet cherry (Prunus avium L.) and sour cherry (Prunus cerasus L.)*. In Al-Khayri et al. (eds.) *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*, Springer Nature, pp. 31-88.
- FOGLE, H.W. 1975. *Cherries*. In Janick, J., Moore, J.N. (eds.) *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, pp. 348-366.
- GRADINARIU, G., PETRE, L., CORNEANU, G., ISTRATE, M., CORNEANU, M., GRADINARIU, F., BUDAN, S. 2008. *New sources of germplasm used in sweet cherry breeding at Iasi Fruit Research Station, Romania*. Acta Horticulturae 795, 141-145.
- HALDAR, H., HAENDIGES, S., EDGE-GARZA, D., ORAGUZIE, N., OLMSTEAD, J., IEZZONI, A., PEACE, C. 2010. *Applying genetic markers for self-compatibility in the WSU Sweet Cherry Breeding Program*. Acta Horticulturae 859, 375-380.
- HARDNER, C.M., HAYES, B.J., KUMAR, S., VANDERZANDE, S., CAI, L., PIASKOWSKI, J., QUERO-GARCÍA, J., CAMPOY, J.A., BARRENECHE, T., GIOVANNINI, D., LIVERANI, A., CHARLOT, G., VILLAMIL-CASTRO, M., ORAGUZIE, N., PEACE, C. 2019. *Prediction of genetic value for sweet cherry fruit maturity among environments using a 6K SNP array*. Horticulture Research 6:6.
- HERRERO, M., RODRIGO, J., WÜNSCH, A. 2017. *Flowering, Fruit Set and Development*. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 14-35.
- IEZZONI, A., WÜNSCH, A., HÖFER, M., GIOVANNINI, D., JENSEN, M., QUERO-GARCÍA, J., CAMPOY, J.A., VOKURKA, A. BARRENECHE, T. 2017. *Biodiversity, Germplasm Resources and Breeding Methods*. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 36-59.
- KAPPEL, F., GRANGER, A., HROTKÓ, K., SCHUSTER, M. 2012. *Cherry*. In Badenes, M.L. and Byrne, D.H. (eds.) *Fruit Breeding, Handbook of Plant & Breeding 8*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, pp. 459-504.
- KNOCH, M., WINKLER, A. 2017. *Rain-Induced Cracking of Cherries*. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 140-165.
- LÓPEZ-CORRALES, M., MATEOS, J.R., ALARCÓN, M.V., BAÑÜLS, P., PÉREZ, F., SERRADILLA, M.J., MANZANO, M.A. 2014. *Sweet cherry (Prunus avium L.) breeding program in Southern Spain*. Acta Horticulturae 1020, 53-56.
- LÓPEZ-ORTEGA G. 2015. *Field explorations of natural populations of sweet and sour cherries in Azerbaijan*. Proceedings of the EU COST action FA1104 Sustainable production of high-quality cherries for the European market. COST meeting Dresden, Germany, July 2015. https://www.bordeaux.inra.fr/cherry/docs/dossiers/Activities/Short%20Term%20Scientific%20Missions/STSM%20Scientific%20Report_Lopez-Ortega%202.pdf
- LUGLI, S., CORREALE, R., GRANDI, M. 2012. *Serie Sweet: belle fuori, buone dentro*. Frutticoltura – Supplemento al n. 11, pp. 1-17.
- PEACE C. 2011. *A success story in Rosaceae marker-assisted breeding: larger fruit for sweet cherry. What can we learn?* Community breeder' Page, RosBREED Quarterly Newsletter 2(4):7.
- PEACE C. 2017. *DNA-informed breeding of rosaceous crops: Promises, progress, and prospects*. Horticulture Research 4:17006.
- PEACE, C., BASSIL, N., MAIN, D., FICKLIN, S., ROSYARA, U.R., STEGMEIR, T., SEBOLT, A., GILMORE, B., LAWLEY, C., MOCKLER, T.C., BRYANT, D.W., WILHELM, L., IEZZONI, A. 2012. *Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry*. PLoS One 7(12): e48305.
- PIASKOWSKI, J., HARDNER, C., CAI, L., IEZZONI, A., ZHAO, Y., PEACE, C. 2018. *Genomic heritability estimates in sweet cherry indicate nonadditive genetic variance is relevant for industry-prioritized traits*. BMC Genomics 19:23.
- QUERO-GARCÍA, J., FODOR, A., REIGNIER, A., CAPDEVILLE, G., JOLY, J., TAUZIN, Y., FOUILHAUX, L., DIRLEWANGER, E. 2014. *QTL detection of important agronomic traits for sweet cherry breeding*. Acta Horticulturae 1020, 57-64.
- QUERO-GARCÍA, J., SCHUSTER, M., LÓPEZ-ORTEGA, G., CHARLOT, G. 2017A. *Sweet Cherry Cultivars and Improvement*. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 60-94.
- QUERO-GARCÍA, J., CAMPOY, J.A., CASTÈDE, S., PITIOT, C., BARRENECHE, T., LERIGOLEUR-BALSEMIN, E., WENDEN, B., LE DANTEC, L., DIRLEWANGER, E. 2017B. *Breeding sweet cherries at INRA-Bordeaux: from conventional techniques to marker-assisted selection*. Acta Horticulturae 1161, 1-14.
- QUERO-GARCÍA, J., IEZZONI, A., LÓPEZ-ORTEGA, G., PEACE, C., FOUCHÉ, M., DIRLEWANGER, E., SCHUSTER, M. 2019. *Advances and challenges in cherry breeding*. In Lang, G. (ed.) *Achieving sustainable cultivation of temperate zone tree fruits and berries*, Burleigh Dodds Science Publishing Limited (In press).
- ROSYARA, U., BINK, C.A.M., VAN DE WEG, E., ZHANG, G., WANG, D., SEBOLT, A., DIRLEWANGER, E., QUERO-GARCÍA, J., SCHUSTER, M., IEZZONI, A. 2013. *Fruit size QTL identification and the prediction of parental QTL genotypes and breeding values in multiple pedigreed populations of sweet cherry*. Molecular Breeding 32, 875-887.
- SANDEFUR, P., ORAGUZIE, N., PEACE, C. 2016. *A DNA test for routine prediction in breeding of sweet cherry fruit color, Pav-Rf-SSR*. Molecular Breeding 36, 33 DOI 10.1007/s11032-016-9458-y.
- SANSVINI, S., LUGLI, S. 2008. *Sweet cherry breeding programs in Europe and Asia*. Acta Horticulturae 795, 41-58.
- SHIRASAWA, K., ISUZUGAWA, K., IKENAGA, M., SAITO, Y., YAMAMOTO, T., HIRAKAWA, H., ISOBE, S. 2017. *The genome sequence of sweet cherry (Prunus avium) for use in genomics-assisted breeding*. DNA Research 24(5), 499-508.
- SOORIYAPATHIRANA, S.S., KHAN, A., SEBOLT, A.M., WANG, D., BUSHAKRA, J.M., LIN-WANG, K., ALLAN, A.C., GARDINER, S.E., CHAGNE, D., IEZZONI, A.F. 2010. *QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (Prunus avium L.)*. Tree Genetics and Genomes 6, 821-832.
- WENDEN, B., CAMPOY, J.A., JENSEN, M., LÓPEZ-ORTEGA, G. 2017. *Climatic Limiting Factors: Temperature*. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 166-188.
- ZHANG, G., SEBOLT, A.M., SOORIYAPATHIRANA, S.S., WANG, D., BINK, M.C.A.M., OLMSTEAD, J.W., IEZZONI, A.F. 2010. *Fruit size QTL analysis in an F₁ population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry*. Tree Genetics & Genomes 6, 25-36.