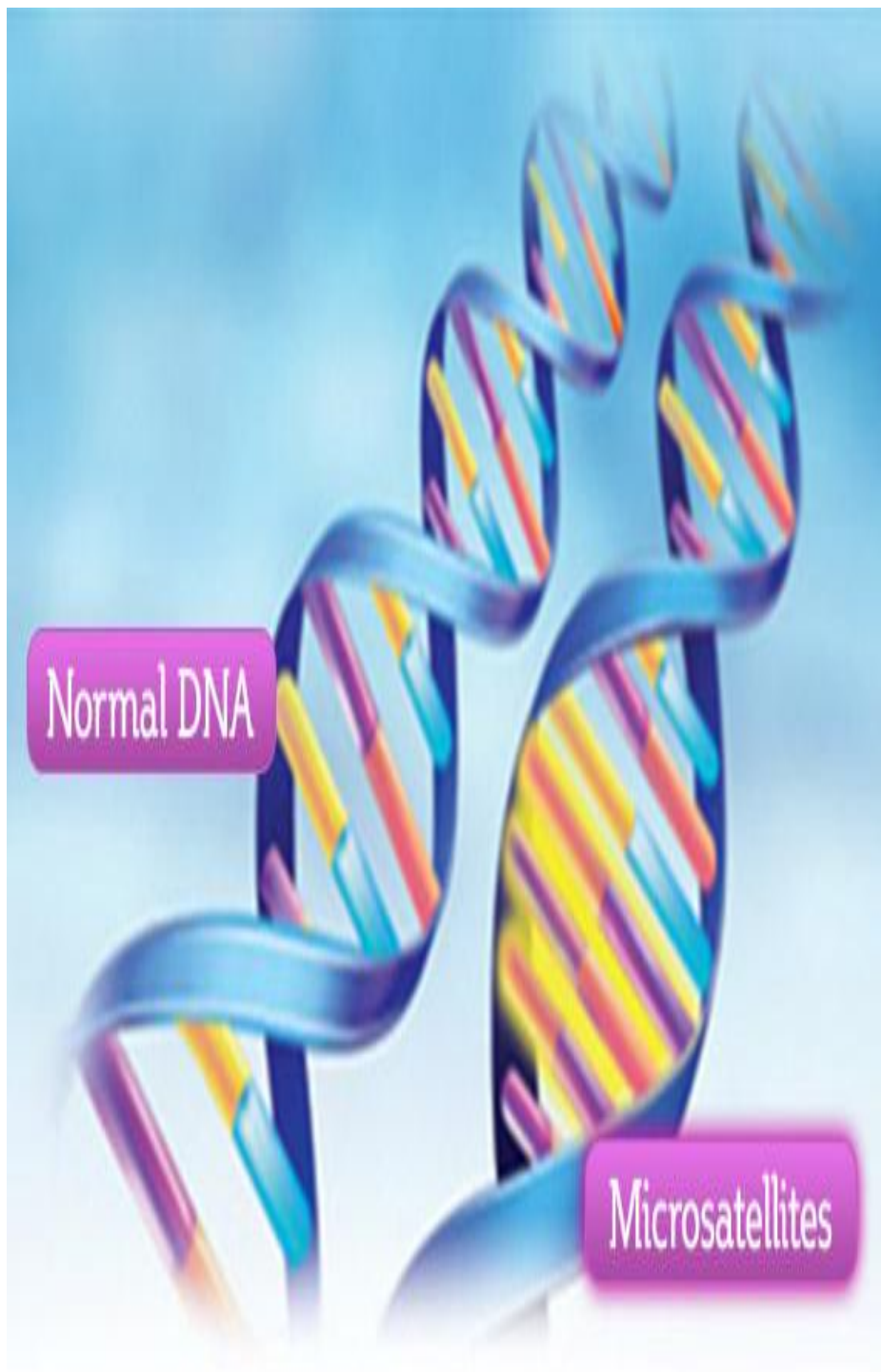




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΠΡΙΑΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΩΡΩΝ



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΘΗΝΑ 2010

Επιβλέπων Καθηγητής
κ. Χατζόπουλος Πολυδεύκης

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

- 1. κ. Χατζόπουλος Πολυδεύκης*
 - 2. κ. Μηλιώνη Δήμητρα*
 - 3. κ. Ρήγας Σταμάτης*
-

Αφιερωμένο στη γιαγιά και στον παππού...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη αποτελεί μέρος μιας συνεργασίας μεταξύ των εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας του Γ.Π.Α και Ιστοκαλλιέργειας του Ι.Γ.Ε Κύπρου. Κατά συνέπεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διευθυντές των δύο αυτών εργαστηρίων, κ. Χατζόπουλο Πολυδεύκη και κ. Μηνά Γιώργο αντίστοιχα, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με αυτό το αντικείμενο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον κ. Χατζόπουλο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και για την υπομονή που έδειξε μέχρι να διεκπεραιωθεί το πειραματικό μέρος όπως και η συγγραφή της πτυχιακής αυτής μελέτης. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Λειτουργό Θεωρητικών Ερευνών Α' (Δεντροκομία/Αμπελουργία) στο ΙΓΕ Κύπρου κ. Σαββίδη Σάββα, για το χρόνο που αφιέρωσε και για τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου.

Από το προσωπικό του εργαστηρίου οφείλω να ευχαριστήσω την επίκουρο καθηγήτρια κ. Μηλιώνη Δήμητρα για την πολύτιμη βοήθειά της (κυρίως στο ξεκίνημά μου), τον υπεύθύνό μου κ. Μπανίλα Γιώργο για το χρόνο που αφιέρωσε όσο ήταν ενεργό μέλος του εργαστηρίου, τον μεταδιδασκτορικό Πράσινο Κώστα για τις συμβουλές, βοήθεια και προθυμία να λύσει τις όποιες απορίες μου. Επίσης, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Μακαρίτη Ιφιγένεια και Αθανασιάδη Άμι για τη βοήθειά και συμπαράστασή τους όσο μοιραζόμασταν τον ίδιο πάγκο εργασίας αλλά και αργότερα ενώ είχαν εκπληρώσει τις υποχρεώσεις τους στο εργαστήριο και τον τότε μεταπτυχιακό φοιτητή και τώρα διδακτορικό Δάρα Γεράσιμο για τη βοήθειά του.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου για την κατανόηση που έδειξε και για τη υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, το φιλικό μου περιβάλλον που μου συμπαραστάθηκε και τέλος τον αρραβωνιαστικό μου που με ανέχτηκε και με στήριξε.

Κλείνοντας, θα ήθελα να αναφέρω ότι θεωρώ πολύ τυχερό τον εαυτό μου για την ευκαιρία που είχα να ασχοληθώ έστω και λίγο με αυτό το εργαστήριο καθώς και για το γεγονός ότι όσο καιρό ήμουν στο εργαστήριο συναναστράφηκα με πολύ κόσμο και έχω να θυμάμαι πάρα πολύ καλές στιγμές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αμπέλι θεωρείται μία από τις οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες στον κόσμο και γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η ταξινόμηση των ποικιλιών του. Ο μεγάλος όμως αριθμός όχι μόνο των ποικιλιών αλλά και των ειδών αμπελιού, όπως και ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού του, καθιστά τη διάκριση και ταξινόμηση των ποικιλιών δύσκολη. Τα κλασσικά αμπελογραφικά συστήματα ταξινόμησης που έχουν χρησιμοποιηθεί δεν μπορούν να αποδώσουν πλήρως τα χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός των συνώνυμων και ομώνυμων ποικιλιών. Από τα τέλη της δεκαετίας του '70 άρχισαν να χρησιμοποιούνται βιοχημικές μέθοδοι διαχωρίζοντας τις πρωτεΐνες με ηλεκτροφόρηση και αργότερα αναπτύχθηκαν και μοριακές μέθοδοι διευκολύνοντας ακόμα περισσότερο τη διάκριση των ποικιλιών με τη χρήση μοριακών δεικτών. Σε συνδυασμό με τα κλασσικά συστήματα ταξινόμησης είναι εφικτή μια ολοκληρωμένη εικόνα για τα χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας. Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη αναφέρεται στη γενετική ταυτοποίηση 17 ποικιλιών αμπέλου και 5 υποκειμένων με τη χρήση 12 μικροδορυφορικών δεικτών. Οι οκτώ έδωσαν πολύ καλό πρότυπο ζωνών και με τον VVMD5 δεν επετεύχθη ενίσχυση μέσω της PCR. Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία διακυμάνθηκε από 0.818 (VVMD6) μέχρι 0.935 (UCH12) (υψηλή γονιδιακή ποικιλότητα) και η παρατηρηθείσα από 0.273 (VVMD27) μέχρι 0.850 (VVS4). Η πιθανότητα ταυτότητας (pI) διακυμάνθηκε από 0.017 (ssrVrZAG79) μέχρι 0.084 (VVMD6). Ο αριθμός των αλληλομόρφων που παρατηρήθηκε με κάθε μοριακό δείκτη κυμάνθηκε από 12 (VVMD6) μέχρι και 21 (ssrVrZAG79), αριθμοί που καθιστούν τους συγκεκριμένους δείκτες υψηλά πολυμορφικούς και κατά συνέπεια αξιόπιστους για την σαφή διάκριση των ποικιλιών. Οι σχέσεις των ποικιλιών αναπαρίστανται σε 3 φυλεγενετικά δέντρα.

ABSTRACT

The vine is considered one of the economically important cultures in the world and for this reason the classification of its varieties is essential. However, the large number of varieties and species of vine and its high degree of polymorphism, renders the discrimination and classification of varieties. The ampelography classification that has been used cannot attribute completely the characteristics of each variety, therefore the number of synonym and homonym varieties is large. From the late '70s, biochemical methods have made their appearance. Electrophoresis was used for the separation of proteins. Recently, molecular methods were developed attaining an easier and better discrimination of varieties considering the molecular markers as the basic tool. Combined the molecular tools with ampelography give a better understanding of variety relationships and classification. The present postgraduate thesis studies the genetic identification of vine varieties with the use of microsatellite markers. Twelve different microsatellite loci have been amplified through PCR (Polymerase Chain Reaction) in order to evaluate the genetic variability and cultivar relatedness in a collection of 17 cultivars of *Vitis vinifera* and 5 rootstocks. Eight of the microsatellites had a good resolution. No amplification was established with the microsatellite loci VVMD5. The observed heterozygosity (H_o) varied from 0.27 (VVMD27) up to 0.85 (VVS4) and the expected (H_e) from 0.82 (VVMD6) to 0.93 (UCH12). The number of alleles per locus ranged from 12 (VVMD6) to 21 (ssrVrZAG79) and the probability of Identity (p_I) ranged from 0.017 to 0.084. These data indicate that the microsatellites were highly informative. Three dendrograms are presented as well.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	1
Η ΑΜΠΕΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ.....	2
ΣΗΜΕΡΑ.....	3
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.....	4
ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ.....	5
ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	7
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ.....	9
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	12
ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.....	14
• Βιοχημικές μέθοδοι.....	14
• Μοριακές μέθοδοι.....	18
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ PCR.....	23
• RFLP.....	23
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ PCR	
• Τεχνική PCR.....	25
ΔΕΙΚΤΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ PCR ΜΕ ΤΥΧΑΙΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ.....	26
• RAPD.....	26
• AFLP.....	30
ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ PCR ΜΕ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΕΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	32
• Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.....	32
ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΙ.....	33
• Φυσικοχημικές και γενετικές ιδιότητες των μικροδορυφόρων	34
• Περιορισμοί των μικροδορυφορικών δεικτών.....	34

• Αξιοποίηση Μικροδορυφόρων Στο <i>Vitis</i>	35
• Ταυτοποίηση Ποικιλιών και Υποκειμένων Αμπέλου με Μικροδορυφόρους.....	36
• Συνώνυμα.....	38
• Κλώνοι.....	39
• Μικροδορυφόροι Οργανιδίων.....	40
SNPs.....	41
ΕΞΕΛΙΓΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ.....	41
• CAPS.....	41
• SCAR.....	42
• RAMP.....	42
• SRAP.....	42
• TRAP.....	42
• SSCP.....	43
• RNA based molecular markers.....	43
• Transposable elements based molecular markers.....	43
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	44
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	44
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA.....	44
ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA - ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ.....	46
PCR.....	47
• ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ DNA.....	49
• ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ.....	49
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	53
• Υλικά.....	54

• Διαλύματα.....	54
• Δείκτες.....	57
• Παρασκευή πηκτής.....	57
• Ηλεκτροφόρηση.....	59
• Σημειώσεις.....	60
ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ.....	61
• Διαλύματα.....	62
• Διαδικασία.....	63
• Σημειώσεις.....	63
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	64
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ LADDER ΠΟΥ ΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΕΙ ΜΙΚΡΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ	65
• Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	65
• Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων.....	67
• Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού.....	68
• PCR sequencing με ddNTPs και χρώση με νιτρικό άργυρο.....	69
○ Διαδικασία.....	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
ΔΟΚΙΜΕΣ PCR ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ DNA.....	73
ΔΟΚΙΜΕΣ PCR ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ....	73
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	73
• Θεωρία φυλογενετικών δέντρων.....	74
• UPGMA.....	76
• Φωτογραφίες πηκτής πολυακρυλαμίδης.....	77
• Μήκη αλληλομόρφων.....	89
• Φυλογενετικά δέντρα.....	90

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	98
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	103
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	113
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121

ΚΑΤΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Η καταγωγή και η ιστορία του φυτού της αμπέλου χάνεται στα βάθη των αιώνων. Παρά τα πολυάριθμα ευρήματα, τις αναφορές στα κείμενα αρχαίων συγγραφέων, τις παραστάσεις των αγγείων και τις άλλες μαρτυρίες, δεν μπορούμε να ισχυριστούμε με βεβαιότητα ότι η ιστορία του αμπελιού έχει γραφτεί πλήρως.

Η τέχνη της αμπελουργίας εικάζεται ότι ξεκίνησε με την αγροτική επανάσταση το 5000 π.Χ. και ότι η άμπελος στην άγρια μορφή της εμφανίστηκε πριν από 7500 χρόνια περίπου, ως θάμνος αναρριχώμενος σε δασικές και παραποτάμιες περιοχές. Πριν ακόμη τη μεγάλη περίοδο των παγετώνων, όπως μαρτυρούν ευρήματα, υπήρχαν αμπέλια ακόμη και στις πολικές περιοχές. Κατά την περίοδο των παγετώνων το αμπέλι άρχισε να εκτοπίζεται από τις βόρειες με ψυχρό κλίμα περιοχές, και η ανάπτυξή του περιορίστηκε σ' αυτές με εύκρατο κλίμα, κατάλληλες κλιματολογικά, κυρίως στην περιοχή του Καυκάσου, που θεωρείται και η πατρίδα του, αλλά επίσης και στη Μεσοποταμία. Οι δύο αυτές περιοχές μαζί με την αρχαία Αίγυπτο πρέπει να θεωρηθούν οι κοιτίδες της αμπελουργίας και, φυσικά, οι πατρίδες του κρασιού.

Οι πρώτοι αμπελοκαλλιεργητές θεωρείται ότι ήταν οι Άριοι (πρόγονοι των Ινδών που ζούσαν στην περιοχή Καυκάσου-Κασπίας), οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Αργότερα η τέχνη της αμπελουργίας πέρασε στους Αιγυπτίους, τους λαούς της Παλαιστίνης-Φοινίκης και τους κατοίκους της Μ. Ασίας και του ελλαδικού χώρου. Η λέξη οίνος, που φαίνεται πως έχει φοινικική ρίζα, διατηρήθηκε έτσι, και όπως η καλλιέργεια της αμπέλου, πέρασε αργότερα στην Ιταλία, στη Γαλλία (οίνος, vino, vin), Ισπανία και σ' όλες τις χώρες γύρω απ' τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα, όπου η αμπελουργία πήρε τη σημερινή της πρόοδο και εξέλιξη (Κούσουλας, 1995).

Συγκεκριμένα, γύρω στο 600 π.Χ., οι Φοίνικες διέδωσαν την καλλιέργεια του αμπελιού στη Γαλλία και την περίοδο της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας το αμπέλι φτάνει στη Βρετανία. Το 13ο αιώνα μ.Χ. οι Άραβες προωθούν την καλλιέργεια του αμπελιού στην Ισπανία και Πορτογαλία και μέχρι το 17ο αιώνα το αμπέλι ήταν γνωστό σε όλη σχεδόν την Ευρώπη. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν Ευρωπαϊκά αμπέλια στην Αμερική, αλλά καταστράφηκαν μετά από μεγάλη επιδημία φυλλοξήρας, ενός εντόμου του εδάφους που προσβάλλει τις ρίζες του φυτού με αποτέλεσμα αυτό να ξεραίνεται. Συνέπεια αυτού ήταν να καλλιεργηθούν άγριες ποικιλίες ντόπιων αμπελιών ανθεκτικών στο έντομο, οι

οποίες στις αρχές του 18ου αιώνα έφτασαν να καλλιεργούνται στην Αγγλία και στη Γαλλία. Όμως τα αμπέλια αυτά προσβλήθηκαν από διάφορες άλλες ασθένειες που κατέστρεψαν το 70% των καλλιεργειών. Η λύση δόθηκε με τον εμβολιασμό άγριων αμερικάνικων αμπελιών και τη δημιουργία ανθεκτικών υβριδίων.

Η άμπελος μεταφέρθηκε στον αρχαίο ελλαδικό χώρο, από την Αίγυπτο στη Μινωική Κρήτη ενώ κατά μία άλλη άποψη, η καλλιέργεια της αμπέλου και ο οίνος ήταν δώρα του θεού Διονύσου και διαδόθηκαν στον αρχαίο ελλαδικό χώρο από τη Θράκη (Αναγνωστόπουλος, 2003).

Οι χώρες παραγωγής οίνου χωρίζονται σε δύο ομάδες. Σ' αυτές που το αμπέλι καλλιεργήθηκε σχετικά πρόσφατα, τους τελευταίους δύο αιώνες, και σ' εκείνες που η ιστορία και παρουσία τους μέσα στο χρόνο είναι άμεσα συνδεδεμένες με το προϊόν αυτό. Αναμφισβήτητα η Ελλάδα ανήκει στην παραδοσιακή αμπελουργική ζώνη μιας και από την εποχή του χαλκού όπως μαρτυρούν ιστορικές πηγές, το κρασί κατείχε εξέχουσα θέση στη ζωή του λαού της χώρας αυτής (λατρεία του θεού Διόνυσου, Λήναια). (Ζαρμπούτης και Τσιβεριώτου, 2003)

Κάπου μεταξύ Ευξείνου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος **Άμπελος η οиноφόρος** (*Vitis vinifera*), που καλλιεργείται σήμερα και το όνομα αυτό δόθηκε από τον Διοσκουρίδη τον 1ο αιώνα μ.Χ. και μετά αποδόθηκε στα λατινικά ως *Vitis vinifera* L. (Σταυρακάκης *et al.*, 2001)

Η ΑΜΠΕΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

Η καλλιέργεια της αμπέλου στην Κύπρο είναι ένα τόσο αρχαίο επάγγελμα όσο αρχαία είναι τα βασίλεια της Αμαθούντας και του Κουρίου και βαθιές οι ρίζες των ανθρώπων της.

Είναι ένα πολύ γνωστό γεγονός, επιβεβαιωμένο από διάφορες ιστορικές αναφορές, ότι η Κύπρος παράγει κρασί για περισσότερο από 4.000 χρόνια. Οι αρχαίοι, λάτρεις της φύσης και της ομορφιάς, διάλεξαν το γνωστότατο κρασοπαραγωγό νησί της Κύπρου σαν κέντρο λατρείας της Αφροδίτης, θεάς της γονιμότητας και του έρωτα, καθώς και του Διόνυσου, Θεού του κρασιού.

Ο γεωγράφος Στράβωνας στο βιβλίο 14 αναφέρεται στα ωραία κυπριακά κρασιά, ο φυσιολόγος Πλίνιος στο βιβλίο 14, κεφάλαιο 7 περιλαμβάνει το όνομα της Κύπρου σε

μια λίστα παραγωγών χωρών ακριβών κρασιών. Ο Άγιος Γρηγόριος μιλά για την αφθονία των κυπριακών κρασιών και ο Απόνιος αναφέρεται στα μεγάλα τσαμπιά των κυπριακών σταφυλιών.

Στις περιοχές γύρω από τα πιο πολλά χωριά της επαρχίας Λεμεσού το αμπέλι βρήκε ένα φιλόξενο περιβάλλον. Το ήπιο κλίμα και κατάλληλο έδαφος, η ατμοσφαιρική υγρασία και ηλιοφάνεια κατά την περίοδο του τρυγητού και οι διάφορες ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην περιοχή, συνθέτουν τον αμπελουργικό χάρτη και προσδιορίζουν το ποιοτικό δυναμικό της αμπελουργικής περιοχής. (Ζαρμπούτης, 2003). Οι άνθρωποι καλλιεργούσαν το αμπέλι με αγάπη και αφοσίωση και μετά από πολύχρονη πείρα παρασκεύαζαν από τον καρπό του, κρασιά, τα οποία είχαν μεγάλη ζήτηση στις τότε γνωστές ξένες και εγχώριες αγορές.

Ιστορικά η Λεμεσός ήταν το κέντρο παραγωγής και εμπορίας κρασιού στην Κύπρο. Σχεδόν όλες οι εξαγωγές κρασιού και οινοπνευματωδών γίνονταν από την αρχή μέσω του λιμανιού της Λεμεσού. Στη Λεμεσό βρίσκεται επίσης και η περιοχή παραγωγής της κουμανδαρίας, κρασί το οποίο φέρει το όνομα της περιοχής προέλευσης του. Ο τρόπος παρασκευής της κουμανδαρίας είναι σήμερα ο ίδιος όπως εδώ και πολλούς αιώνες πριν. Στην επαρχία Λεμεσού βρίσκονται ακόμη και οι δύο γνωστότατες περιοχές παραγωγής επιτραπέζιων σταφυλιών ποιότητας, τα κρασοχώρια και η Πιτσιλιά.

Ο Ξεναγόρας χρησιμοποιεί την ονομασία Ασπελία (πιθανόν πρόκειται για τα αμπέλια) όπως και ο Πλίνιος, μιας και η Κύπρος φημιζόταν για τα κρασιά και τα σταφύλια της. Ο Πλίνιος, κάνει ευνοϊκή αναφορά στην αμπελοκαλλιέργεια ενώ σε φιλολογικά κείμενα, το κρασί της Κύπρου περιβάλλεται από πολύ κολακευτικά επίθετα, γι' αυτό και θεωρείται παραλλαγή της προσωνομίας *Αμπελία*.

ΣΗΜΕΡΑ

Η άμπελος έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε κάθε είδους κλιματικές συνθήκες, επειδή είναι ανθεκτική τόσο στη ξηρασία όσο και στα ψυχρά και υγρά κλίματα. Για το λόγο αυτό η αμπελοκαλλιέργεια έχει ευρύτατα αναπτυχθεί σε όλο τον κόσμο και σε γεωγραφικό πλάτος που κυμαίνεται από τις 35° έως τις 50° μοίρες. Είναι χαρακτηριστικό ότι στις χώρες που βρίσκονται κοντά και γύρω στη λεκάνη της Μεσογείου είναι συγκεντρωμένο περίπου το 90% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης

έκτασης και παραγωγής. Αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι και στις χώρες της Λατινικής Αμερικής, όπου το αμπέλι πρόσφατα καλλιεργείται, οι εκτάσεις ήδη είναι σημαντικές και η Αργεντινή με τη Χιλή είναι σοβαρές ανταγωνίστριες χώρες (Κούσουλας, 1995). Τα πιο γνωστά αμπελουργικά προϊόντα είναι τα επιτραπέζια σταφύλια, το κρασί (επιτραπέζιοι, επιδόρπιοι και αφρώδεις οίνοι), οι σταφίδες, ο χυμός σταφυλιού και το σταφύλι κονσέρβα. Στην Κύπρο εκτός από τα πιο πάνω προϊόντα, παραδοσιακά αμπελουργικά προϊόντα είναι ο σιουσιούκος, ο παλουζές και το κρασί Κουμανδαρία.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

Η οικογένεια των Αμπελίδων (Vitaceae ή Ampelidaceae) ανήκει στην τάξη των Ραμνωδών (Rhamnales) και στο φύλο των Terebinthales-Rubiales. Περιλαμβάνει διάφορα γένη, των οποίων τα φυτά είναι θαμνώδη, συνήθως αναρριχώμενα, με έλικες απλές ή διακλαδιζόμενες (Σταυρακάκης, 2000).

Η συστηματική των Αμπελίδων παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα όχι μόνο για τα είδη εντός των γενών, αλλά ακόμα και για αυτόν τον αριθμό των γενών. Κατά τον Planchon (1887), η οικογένεια των Αμπελίδων περιλαμβάνει δέκα γένη, με 600 περίπου είδη. Ο Suessenguth (1953) αναγνωρίζει δώδεκα γένη, ενώ οι Galet και Constantinescu (1968) τα ανεβάζουν στα δεκατέσσερα (Σταυρακάκης, 2000).

Την Αμπελουργία ενδιαφέρει το γένος *Vitis* στο οποίο υπάγονται τα είδη και οι ποικιλίες που καλλιεργούνται και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων. Το είδος που έχει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι το *vinifera*, η ονομαζόμενη Αμπελος η οινοφόρος ή Ευρωπαϊκή άμπελος (Ευρώπη, Δυτική Ασία, Β. Αφρική). Όσον αφορά στον αριθμό των ειδών του γένους *Vitis* υπάρχουν διαφορετικές απόψεις. Το γένος *Vitis* υποδιαιρείται σε δύο υπογένη, το *Muscadinia* και το *Euvitis* (Σταυρακάκης, 2000).

Στο υπογένος *Euvitis* ανήκει το είδος *Vitis vinifera*, του οποίου οι καλλιεργούμενες ποικιλίες, περίπου 6.000, χρησιμοποιούνται αποκλειστικά σχεδόν για την παραγωγή πάσης φύσης αμπελουργικών προϊόντων. Σε αυτό το υπογένος υπάγονται και τα διάφορα είδη της βορειοαμερικανικής ηπείρου, από τα οποία άλλα (τα λιγότερα) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή οίνου ή νωπών σταφυλιών και άλλα για την παραγωγή αμπελοπολλαπλασιαστικού υλικού (υποκείμενα ανθεκτικά στη ριζόβια μορφή

φυλλοξήρας, στα άλατα και στους νηματώδεις). Υπάρχουν επίσης και αυτόχθονα είδη της Ασίας που καλλιεργούνται σε μικρές εκτάσεις (Νταβίδης, 1977).

Το υπογένος *Muscadinia* περιλαμβάνει τρία είδη: *Vitis Rotundifolia*, *V. Munsoniana* και *V. Popenoei* της Β. Αμερικής και του Μεξικού όπου καλλιεργούνται σε περιορισμένη κλίμακα (Σταυρακάκης, 2000). Από αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρώτο, εξαιτίας της αντοχής του στους εχθρούς και στις ασθένειες της αμπέλου, κυρίως απέναντι στους νηματώδεις, ιδιότητες που το καθιστούν χρήσιμο σε προγράμματα βελτίωσης (Διαμαντόπουλος, 2006).

Η Άμπελος η οиноφόρος περιλαμβάνει κατά τον De Lattin (1939) τρία υποείδη: *Vitis vinifera silvestris* (Άγρια οиноφόρος), *V. v. caucasica*, (Καυκασιανή οиноφόρος), *V. v sativa* (Ημερη ή καλλιεργούμενη). Σήμερα όμως, θεωρείται, αν και οι γνώμες δίστανται, ότι η *V. v. silvestris* και η *V. v sativa* δεν είναι διαφορετικά υποείδη, αλλά διάφορες μορφές του ίδιου κλώνου (Σταυρακάκης, 2000).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ

Η εισβολή της φυλλοξήρας και οι άλλες κρυπτογαμικές ασθένειες που τη συνοδεύουν, υποχρέωσαν τους επιστήμονες και καλλιεργητές να βρουν τρόπους αποφυγής των τεράστιων ζημιών που προκαλούν. Γι' αυτό και αναζήτησαν υποκείμενα ανθεκτικά, τα οποία εμβολιαζόμενα με εμβόλια ευρωπαϊκής αμπέλου, να αντέχουν στην τόσο καταστροφική προσβολή. Τα ανθεκτικά στη ριζόβια μορφή φυλλοξήρας υποκείμενα αμπέλου, έχουν ή επιζητούν να έχουν ορισμένες ιδιότητες ώστε να προσαρμόζονται στα διάφορα εδαφικά και κλιματικά περιβάλλοντα και να συμβιώνουν αρμονικά με τις ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου μετά τον εμβολιασμό. Οι ιδιότητες αυτές είναι :

- Αντοχή στη φυλλοξήρα
- Αντοχή στους νηματώδεις
- Αντοχή στον περονόσπορο και στο ωίδιο
- Αντοχή στο ανθρακικό ασβέστιο
- Αντοχή στη ξηρασία και άλατα

Τα κυριότερα αμερικάνικα είδη αμπέλου που χρησιμοποιούνται ως βάση για υποκείμενα είναι τα: *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*, *Vitis labrusca* και *Vitis rotundifolia*. Οι κυριότεροι αμερικάνικοι κλώνοι που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα είναι οι Riparia Gloire de Montpellier και Rupestris du Lot. Ανάλογα με τα είδη της διασταύρωσης τα υποκείμενα χωρίζονται σε ομάδες. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται μερικά υποκείμενα και οι ομάδες στις οποίες ανήκουν.

ΟΜΑΔΑ RIPARIA X RUPESTRIS	
3309C	<i>Riparia tomentoux X Rubestris Martin</i>
3306C	<i>Riparia tomentoux X Rubestris Martin</i>
196/17	(<i>Vitis vinifera</i> 'Mourvèdre' x <i>Vitis rupestris</i> '1202 Couderc') x <i>Vitis riparia</i> 'Gloire'
ΟΜΑΔΑ BERLANDIERI X RUPESTRIS	
Υποομάδα Richter	
R57	Berlandieri Resseguier NoI X Rubestris Martin
R99	Berlandieri Las Sorres X Rubestris du Lot
R110	Berlandieri Resseguier No2 X Rubestris Martin
Υποομάδα Σικελικών	
140Ru	Berlandieri Resseguier No I X Rubestris du Lot
P775	Berlandieri Resseguier No2 X Rubestris
P1103	Berlandieri Resseguier No2 X Rubestris du Lot
ΟΜΑΔΑ VINIFERA X BERLANDIERI	
41B	Chasselas X Berlandieri
333EM	Cabernet Sauvignon X Berlandieri
ΟΜΑΔΑ RIPARIA X BERLANDIERI	
420A, 5BB, 161-49C	Riparia X Berlandieri
SO ₄	Riparia X Berlandieri, επιλογή Oppnheir No 4
Ferkal	BC1 (Berlandieri X Colombard) X 333EM
R31	Berlandieri Resseguier No2 X MOVO Mexicana

ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η μακραίωνη καλλιέργεια της αμπέλου, η μεγάλη γεωγραφική της εξάπλωση, η φυσική επιλογή, η διασταύρωση μεταξύ των ποικιλιών, ο έντονος πολυμορφισμός της, η δημιουργία νέων ποικιλιών από τον άνθρωπο, αλλά και οι καινούργιοι χαρακτήρες που ανέπτυξαν όσες ποικιλίες ξενιτεύτηκαν, έδωσαν στα χέρια των ανθρώπων της αμπελοργίας ένα πολύτιμο και σχεδόν ανεξάντλητο υλικό (Νταβίδης, 1982). Ο αριθμός των ποικιλιών του είδους *vinifera* είναι εξαιρετικά μεγάλος. Οι Viala και Vemorel (1909) αναφέρουν στην αμπελογραφία τους περισσότερα από 24.000 ονόματα ή συνώνυμα του *Vitis vinifera* που πιθανόν να αντιστοιχούν σε 8.000-9.000 ποικιλίες (Σταυρακάκης, 2000). Σ' ένα έργο τους επτά τόμων περιγράφουν ένα σημαντικό αριθμό ειδών και ποικιλιών αμπέλου, χωρίς όμως ν' ακολουθήσουν κάποιο σύστημα κατάταξης, ενώ συμπεριέλαβαν και ένα αμπελογραφικό λεξικό όπου αναφέρουν τις ποικιλίες και τα συνώνυμά τους (Δρακόπουλος, 2000).

Είναι φανερό, ότι ο μεγάλος αριθμός των ποικιλιών και των ειδών κάνουν δύσκολο το έργο τόσο της διάκρισης, όσο και της ταξινόμησης. Ο Βιργίλιος έγραψε ότι «όποιος θα ήθελε να υπολογίσει τον αριθμό των ειδών της αμπέλου, θα ήθελε επίσης να γνωρίζει και τον αριθμό των κόκκων της άμμου που κυλάει ο Ζέφυρος στις ακτές της Λιβύης» (Γεωρ. II 105).

Η διάκριση και η ταξινόμηση των ποικιλιών αμπέλου δυσχεραίνεται περισσότερο από την ύπαρξη των συνωνύμων, δηλαδή την απόδοση μιας ποικιλίας με περισσότερα του ενός ονόματα ή από των ομωνύμων· διαφορετικών ποικιλιών με ένα κοινό όνομα, το οποίο συνοδεύεται από το τοπωνύμιο της περιοχής που καλλιεργείται η ποικιλία.

Στην αμπελοργική πράξη είναι απαραίτητη η γνώση των ποικιλιών και γι' αυτόν το λόγο πάρα πολλοί αμπελογράφοι και συστηματικοί ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό και την ταξινόμησή τους. Από το 1777 που ξεκίνησαν οι πρώτες προσπάθειες από τον Helbling (Molon, 1906), μέχρι και σήμερα, έχουν αναφερθεί και προταθεί περισσότερα από εκατό συστήματα αμπελογραφικής περιγραφής και ταξινόμησης των ποικιλιών αμπέλου τα οποία βασίζονται στη μορφολογία των οργάνων, τους αμπελογραφικούς χαρακτήρες, τα διάφορα φαινολογικά στάδια και τη γεωγραφική κατανομή των ποικιλιών (Αναγνωστόπουλος, 2003).

Η Αμπελογραφική μεθοδολογία για την επίτευξη του σκοπού της χρησιμοποιεί τρεις τρόπους, την αμπελογραφική περιγραφή, τη συγκριτική αμπελογραφία και την πειραματική αμπελογραφία. (Νταβίδης, 1982):

1. **Αμπελογραφική περιγραφή** : αποβλέπει στην ταξινόμηση των ποικιλιών βάσει εξωτερικών χαρακτήρων των οργάνων (μορφολογία) και έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό αυτών.

2. **Συγκριτική αμπελογραφία** : ασχολείται με τη μελέτη των προβλημάτων των συνωνύμων καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου σε διάφορους τόπους και με την έρευνα της κλωνικής σύνθεσης των πληθυσμών αυτών.

3. **Πειραματική αμπελογραφία** : ασχολείται με την έρευνα και επίλυση των προβλημάτων προέλευσης των ποικιλιών, χρησιμοποιώντας γενετικές και φυτογεωγραφικές μεθόδους και ιστορικά δεδομένα.

Η ποικιλία αμπέλου, με την αμπελογραφική έννοια, είναι διαφορετική από τη βοτανική ποικιλία. Κατά την κλασική αμπελογραφία, συνιστά πληθυσμό ατόμων που έχουν τον ίδιο γονότυπο και πολλαπλασιάζονται αγενώς (καλλιεργούμενη ποικιλία, cultivar), ενώ από το 1951 με απόφαση της διεθνούς αμπελογραφικής επιτροπής του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (Office International de la Vigne et du Vin-O.I.V.), καθιερώθηκε ως αντικείμενο της αμπελογραφικής περιγραφής ο κλώνος (πληθυσμός ατόμων που προέρχονται με αγενή πολλαπλασιασμό από ένα αρχικό φυτό και έχουν τον ίδιο γονότυπο) (Σταυρακάκης, 2000). Η μεταπήδηση αυτή από την αμπελογραφία των κλώνων ήταν απαραίτητη, γιατί με την πάροδο του χρόνου οι καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπέλου εμφάνισαν μεγάλη ετερογένεια και η περιγραφή τους κατέστη πρακτικώς ανέφικτη. Στην αμπελογραφία των κλώνων το δείγμα που επιλέγεται είναι μέσο αντιπροσωπευτικό και παρουσιάζει την παρατηρούμενη στα άτομα του κλώνου παραλλακτικότητα (Αμπαρτζίδα, 2006).

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

Η συστηματική κατάταξη των ποικιλιών αμπέλου κατά το βοτανικό πρότυπο, δηλαδή βάσει της κοινής προέλευσης, της οργανικής εξέλιξης και της φυλογενετικής σχέσης αυτών, δεν είναι δυνατή λόγω των κενών που υπάρχουν στην παλαιοντολογία, τη φυτογεωγραφία και τη γενετική του είδους (Νταβίδης, 1982).

Μέχρι το 19^ο αιώνα η περιγραφή των ποικιλιών αμπέλου ήταν περιληπτική και θεωρούσαν ότι η περιγραφή της ώριμης σταφυλής μπορούσε να οδηγήσει στον προσδιορισμό της ποικιλίας. Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα άρχισε η λεπτομερέστερη περιγραφή των ειδών και ποικιλιών αμπέλου, λόγω της ανάγκης που δημιουργήθηκε για εντοπισμό των ανθεκτικών ειδών και ποικιλιών στη φυλλοξήρα. στο ωίδιο και στον περονόσπορο που έκαναν την εμφάνισή τους εκείνη την εποχή (Νταβίδης, 1982).

Το πρώτο σχέδιο ταξινόμησης των ποικιλιών της οινοφόρου αμπέλου έγινε από τον Hebling το 1777, ο οποίος τις κατάταξε σε τρεις ομάδες ανάλογα με το χρώμα των ραγών (λευκές, ροδόχρωμες και ερυθρές) και ακολούθως κάθε ομάδα σε δύο υποομάδες ανάλογα με το σχήμα των ραγών (στρογγυλές, επιμήκεις) (Σταυρακάκης, 2000).

Οι Helbling (1777), Frege (1804), Liegel (1825), Findelman (1837), Trummer (1841), Casparin (1846), Oberlin (1875), Pulliat (1897), Cosmo (1952) Λογοθέτης (1958) *et al.*, ταξινόμησαν τις ποικιλίες με βάση τα χαρακτηριστικά της ράγας κατά το στάδιο της βιοχημικής ωρίμανσης (Σταυρακάκης, 2000).

Οι Acerbi (1825), Milano (1829), Findelman (1836) και Liegel (1841) χρησιμοποίησαν το χρώμα των ραγών, τη γεύση του χυμού, το σχήμα του φύλλου και την πυκνότητα του σταφυλιού για να τις κατατάξουν σε τάξεις και κλάσεις. Στο παραπάνω σύνολο χαρακτήρων ο Rovascenda (1877) πρόσθεσε τους χαρακτήρες του χνοασμού των φύλλων και το χρώμα και χνοασμό της νεαρής βλάστησης. Οι Clemente (1807) και Dochnanl (1888) βασίστηκαν μεταξύ των άλλων κυρίως στην ύπαρξη χνοασμού στα φύλλα (Σταυρακάκης, 2000).

Η εποχή ωρίμανσης των σταφυλιών θεωρήθηκε ως σημαντικός χαρακτήρας και εκεί στήριξαν τα συστήματά τους οι De Casparin (1846), Lucas (1874), Pulliant (1888), Cosmo (1952), Λογοθέτης (1957). Ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος ωρίμανσης της ποικιλίας Chasselas dore (Σταυρακάκης, 2000).

Οι Metzger (1828), Rondriguez (1938) χρησιμοποίησαν ως σύστημα ταξινόμησης των ποικιλιών την Αμπελομετρία, ενώ οι Negrul (1939), Andrasovszky (1925), Pirovano (1943) στηρίχτηκαν στη γεωγραφική κατανομή των ποικιλιών (Σταυρακάκης 2000).

Κατά τον A. Negrul (1946), το είδος *vinifera* διαιρείται σε οικολογικό-γεωγραφικές ομάδες-φυλές. Στη Δυτική φυλή *Occidentalis* περιλαμβάνονται οι ποικιλίες οινοποιίας Δυτικής Ευρώπης και στην Ανατολική, την *Orientalis*, υπάγονται οι ποικιλίες επιτραπέζιων σταφυλιών που καλλιεργούνται στο Ιράν, Μέση Ανατολή, Αρμενία κλπ. Επίσης, στην Πόντια φυλή (*Pontika*), υπάγονται μεταξύ άλλων και οι ελληνικές ποικιλίες (Σταυρακάκης, 2000).

Τέλος, ο Galet (1952/7), προτείνει ένα σύστημα ταξινόμησης κατά το οποίο οι ποικιλίες χωρίζονται σε ομάδες με βάση μορφολογικούς χαρακτήρες της νεαρής βλάστησης, των βλαστών, των φύλλων και συμπληρωματικά των σταφυλιών και των ραγών. Οι μορφολογικοί αυτοί χαρακτήρες ελέγχονται ως προς τη συμπεριφορά τους με διασταυρώσεις. Η φαινοτυπική ταξινόμησή του μπορεί να θεωρηθεί βελτίωση της μεθόδου του Ravaz (1920), που αφορούσε την κατάταξη των ποικιλιών και νόθων των αμερικάνικων ειδών βασιζόμενος σε μορφολογικούς χαρακτήρες (αποκόλληση φλοιού, τύπος ελίκων, σχήμα και χνοασμός των φύλλων) (Σταυρακάκης, 2000).

Συνοπτικά, τα συστήματα ταξινόμησης που υπάρχουν είναι τα εξής :

- **Μορφολογική ταξινόμηση** : διάκριση σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των οργάνων των πρέμων.
- **Αμπελομετρική ταξινόμηση** : στηρίζεται στη μορφή του ελάσματος του φύλλου και στις γωνίες που σχηματίζουν οι κύριες και δευτερεύουσες νευρώσεις.
- **Φαινολογική ταξινόμηση** : στηρίζεται στα διάφορα φαινολογικά στάδια του κύκλου της αμπέλου, έναρξη και πλήρης έκπτυξη των λανθανόντων οφθαλμών, έναρξη ωρίμανσης, πλήρης ωρίμανση, έναρξη άνθησης κ.λ.π.
- **Γεωγραφική ταξινόμηση** : στηρίζεται στις κλιματικές απαιτήσεις των ποικιλιών και τη γεωγραφική τους κατανομή.
- **Φαινοτυπική ταξινόμηση** : διάκριση με βάση τους χαρακτήρες της αυξανόμενης κορυφής, των νεαρών φύλλων, του ποώδη βλαστού, των ανεπτυγμένων φύλλων, των σταφυλιών και των ραγών (Νταβίδης, 1982).

Στην Ελλάδα, η πρώτη προσπάθεια διάκρισης και ταξινόμησης των ποικιλιών αμπέλου γίνεται το 1878 από τον Γ. Ορφανίδη, ο οποίος υπολογίζει σε περισσότερες από πεντακόσιες τις ελληνικές ποικιλίες, τις οποίες κατατάσσει σε κλάσεις και τάξεις ανάλογα με το χρώμα και το σχήμα των ραγών (Σταυρακάκης, 2000).

Ο Ε. Πονηρόπουλος (1888) αναγνωρίζει περίπου διακόσιες ποικιλίες στην Ελλάδα και τις διακρίνει σε 'ποικιλίες οινοποιίας' (περίπου 30) και σε 'λοιπές ποικιλίες' (περίπου 170) (Σταυρακάκης, 2000).

Το 1938 ο Β. Κριμπάς προτείνει σύστημα ταξινόμησης των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου βασισμένος στη σχέση «μήκος ράγας προς μήκος γιγάρτου», χαρακτηρά σχετικά σταθερό σε σχέση με τους άλλους αμπελογραφικούς χαρακτήρες του φύλλου (σχήμα, χνοασμός, αριθμός λοβών), το σχήμα και το χρώμα των ραγών (Σταυρακάκης, 2000).

Η επόμενη προσπάθεια αμπελογραφικής περιγραφής έγινε από τους Λογοθέτη και Βλάχο (1960, 1963, 1965, 1967), οι οποίοι περιέγραψαν έναν αριθμό ποικιλιών βασισμένοι σε μορφολογικούς και φαινολογικούς χαρακτήρες σύμφωνα με το σχέδιο του Ο.Ι.Β. Το 1991, ο Βλάχος περιγράφει με τον ίδιο τρόπο μερικές από τις σπουδαιότερες ελληνικές ποικιλίες καθώς και τα σημαντικότερα είδη και υβρίδια αμερικάνικων αμπελιών που χρησιμοποιούνται ως αντιφυλλοξηρικά υποκείμενα (Δρακόπουλος, 2000).

Η αναγκαιότητα ύπαρξης ενός ενιαίου συστήματος αμπελογραφικής περιγραφής, ώθησε διάφορους διεθνείς οργανισμούς στην εκπόνηση πινάκων περιγραφής και βαθμολόγησης των χαρακτηριστικών της αμπέλου. Τέτοιοι είναι οι πίνακες που προέκυψαν από τη συνεργασία του Ο.Ι.Β. και του Ι.Ρ.Γ.Ρ. (International Board for Plant Genetic Resources), που περιλαμβάνουν 125 βασικά χαρακτηριστικά ποικιλιών αμπέλου καθώς και οι νεώτεροι πίνακες με τα 84 πιο απαραίτητα χαρακτηριστικά του Ο.Ι.Β. (1984). Η Dettweiler (1991) επίσης, κατέληξε σε μια λίστα με τα ελάχιστα απαραίτητα αμπελογραφικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνονται στην προαναφερόμενη λίστα του Ο.Ι.Β. Μ' αυτά τα συστήματα, κάθε χαρακτηριστικό που μελετάται βαθμολογείται ανάλογα μ' έναν κωδικό αριθμό με τον οποίο είναι εύκολη η καταγραφή του σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές καθώς και η αποκρυπτογράφηση του. Παράλληλα παρέχεται η δυνατότητα συγκριτικής μελέτης μεταξύ των ποικιλιών με

διάφορα στατιστικά προγράμματα.

Τα τελευταία χρόνια έγιναν προσπάθειες εφαρμογής στην Αμπελογραφία για τη διάκριση των ποικιλιών, διαφόρων βιοχημικών μεθόδων όπως ο διαχωρισμός των φλαβονοειδών και των καροτινοειδών με τη χρωματογραφική μέθοδο και των πρωτεϊνών με την ηλεκτροφορητική καθώς και μοριακών μεθόδων όπως την ανίχνευση πολυμορφισμών με τη χρήση μικροδορυφόρων.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

Μέχρι πρόσφατα η διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών στηριζόταν αποκλειστικά στις παραδοσιακές μεθόδους οι οποίες βασίζονται κατεξοχήν στην αμπελογραφική περιγραφή, δηλαδή στους αμπελογραφικούς χαρακτήρες των οργάνων του πρέμνου, στις ιδιότητες της ποικιλίας, στην καλλιεργητική συμπεριφορά και την οικονομική σημασία της ποικιλίας (This *et al.*, 2004). Όπως γίνεται φανερό προκύπτουν κάποιοι περιορισμοί ως προς την ακεραιότητα της κάθε μεθόδου.

- Για τη μορφολογική ταυτοποίηση των ποικιλιών, εξετάζονται ώριμα και ανεπτυγμένα φύλλα. Κατά συνέπεια οι σχετικές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν κατά τη βλαστική περίοδο, σε πλήρως ανεπτυγμένα πρέμνα.

- Το πολλαπλασιαστικό υλικό με το οποίο εμπορεύονται τα φυτά της αμπέλου είναι στη μορφή των κληματίδων, γεγονός που κάνει την άμεση ταυτοποίηση των ποικιλιών σχεδόν αδύνατη. Έτσι αν διαπιστωθούν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά όσον αφορά την ποικιλία, αυτό γίνεται συνήθως αντιληπτό έπειτα από αρκετά χρόνια. Αφού φυτευτεί δηλαδή πρώτα στον αμπελώνα και περάσουν 4-5 έτη, που θα εμφανιστούν τα τυπικά μορφολογικά γνωρίσματα των ενήλικων φυτών.

- Πρόβλημα υπάρχει ακόμα και στην περίπτωση των υποκειμένων και αυτό γιατί τα εμβολιασμένα υποκείμενα από τη στιγμή που θα φυτευτούν στον αμπελώνα, δεν πρόκειται ποτέ να αναπτύξουν τα φύλλα τους και έτσι η σωστή αμπελογραφική ταυτοποίησή τους είναι σχεδόν αδύνατη.

- Οι φαινότυποι των φυτών επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στη συγκεκριμένη περιοχή, τη θρεπτική κατάσταση του πρέμνου καθώς και από την υγεία του. Οι διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν ποικιλομορφία στα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάζει η Αμπελογραφία καθώς

και η ταυτοποίηση σε ιομένα και τροφοπενικά φυτά, είναι επιρρεπής σε λανθασμένα συμπεράσματα .

- Ο συνολικός αριθμός των ποικιλιών αμπέλου στις αμπελογραφικές συλλογές υπολογίζεται σε 15.000 και ο αριθμός των εν χρήσει ποικιλιών είναι πολύ μεγάλος. Ακόμα και αν τα φυτά είναι σε άριστη κατάσταση, είναι πολύ δύσκολο να διαφοροποιηθούν όλες οι ποικιλίες με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Sefc *et al.*, 2001).

- Επιπροσθέτως, οι ποικιλίες αμπέλου έχουν υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας. Οι ποικιλίες που είναι απλά ή πολλαπλά υβρίδια άλλων ποικιλιών, διατηρούν το γονότυπο τους μέσω του αγενούς πολλαπλασιασμού και εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις, γεγονός που συμβάλλει στην παρουσία μεγάλου αριθμού συνωνύμων, τύπων ή παραλλαγών. Σ' αυτό συμβάλλει και η μακράιωνη καλλιέργεια της αμπέλου (Σταυρακάκης, 2004).

Οι χαρακτήρες πάνω στους οποίους βασίστηκαν τα διάφορα συστήματα ταξινόμησης των ποικιλιών *vinifera*, παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα και επηρεάζονται έντονα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Είναι φανερό πως όσο τέλεια και αν είναι μια διχοτομική κλείδα, παρουσιάζει πάντα αδυναμίες γιατί βασίζεται σε μορφολογικούς, άρα μεταβλητούς, χαρακτήρες, που επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και προκαλούν φαινοτυπική διακύμανση. Επί πλέον η αυθαίρετη επιλογή των κριτηρίων καθιστά δύσκολη τη σύγκριση των διαφόρων συστημάτων ταξινόμησης και γι' αυτό κανείς δεν μπορεί να αποφανθεί ποιο σύστημα είναι καλύτερο (Σταυρακάκης και Λουκάς, 1985).

Επίσης, το γένος *Vitis* παρουσιάζει ειδικά προβλήματα ως προς την ταξινόμησή του, γιατί πολλά κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν σ' άλλα φυτά, όπως ο αριθμός των χρωμοσωμάτων, η στειρότητα των υβριδίων και η γεωγραφική κατανομή, δεν βρίσκουν σ' αυτό εφαρμογή. Το πρόβλημα εντοπίζεται κυρίως στο μεγάλο αριθμό των χρωμοσωμάτων (19 και 20) και στο μικρό τους μέγεθος, στη φυσική διασταύρωση μεταξύ των ειδών του γένους και στη μεγάλη ετεροζυγωτία που παρουσιάζει το γένος αυτό. Γι' αυτό και η ταξινόμηση της αμπέλου που βασίζεται σε καρυολογικές μελέτες, περιορίζεται στη διάκριση των ειδών του γένους με κριτήριο τον αριθμό των χρωματοσωμάτων, χωρίς να προχωρεί σε επίπεδο ποικιλιών (Σταυρακάκης, 1982).

Γι' αυτούς τους λόγους τα τελευταία χρόνια γίνεται εφαρμογή διαφόρων βιοχημικών

και μοριακών μεθόδων για τη διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών χωρίς όμως να έχουν αντικαταστήσει την κλασική αμπελογραφική περιγραφή. Αντίθετα, αποτελούν ένα επιπλέον εργαλείο στα χέρια του αμπελογράφου, που του επιτρέπουν να παρουσιάζει τα αποτελέσματά του με μεγαλύτερη σταθερότητα και αξιοπιστία (Διαμαντόπουλος, 2006). Οι μέθοδοι αυτοί διευκρινίζουν καλύτερα τις διαφορές τους σε επίπεδο γονοτύπων (Αναγνωστόπουλος, 2003).

ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Βιοχημικές μέθοδοι

Από τα τέλη της δεκαετίας του '70, άρχισαν να χρησιμοποιούνται οι βιοχημικές σημάνσεις για την επίλυση προβλημάτων διάκρισης και ταυτοποίησης των ποικιλιών αμπέλου.

Από τις βιοχημικές μεθόδους μεγάλη εφαρμογή γνώρισε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών των φυτικών ιστών με την ηλεκτροφορητική μέθοδο και των φλαβονοειδών και καροτινοειδών με τη χρωματογραφική μέθοδο. Σε σύγκριση με άλλες βιοχημικές σημάνσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια διάκρισης, οι ηλεκτροφορητικά ανιχνευόμενοι ενζυμικοί πολυμορφισμοί υπερέχουν σημαντικά επειδή μελετώντας τη σύσταση των πρωτεϊνών (τελικά προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων και επιτρέπουν τον προσδιορισμό της γενετικής σύνθεσης του οργανισμού), μπορούν ν' ανακαλυφθούν γενετικές ομοιότητες ή διαφορές μεταξύ των φυτών, αλλά και μεταξύ ειδών και ποικιλιών. Η χρήση γενετικών σημάνσεων προσφέρει το πλεονέκτημα του άμεσου προσδιορισμού της γενετικής σύνθεσης του οργανισμού, ανεξάρτητα των περιβαλλοντικών επιδράσεων με αποτέλεσμα να απαλλάσσει το μελετητή από κρίσεις βασισμένες σε φαινοτυπικούς χαρακτήρες (Σταυρακάκης, 1982).

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών στις ισοενζυμικές τους μορφές, αποτέλεσε ένα σημαντικό τρόπο γενετικής σήμανσης, διάκρισης και ταυτοποίησης πολλών ειδών φυτών και ανάμεσα σ' αυτά και η άμπελος, λόγω του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν μερικές από τις πρωτεΐνες του κάθε οργανισμού (Sefc *et al.*, 2001). Στην άμπελο έχουν προσδιοριστεί περίπου 20 ισοενζυμικοί πολυμορφισμοί (Reisch 1998).

Η χρησιμότητα των διαφόρων ενζυμικών συστηματικών για τη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου έχει επισημανθεί από αρκετούς επιστήμονες π.χ. Schaefer (1971), Σταυρακάκη και Λουκά (1984; 1985), Benin *et al.* (1988), Eiras-Dias *et al.* (1989, 1998), Calo *et al.* (1989), Nunez *et. al.* (2004).

Πρώτος ο Wolfe, το 1976, διέκρινε 60 ποικιλίες αμπέλου (ποικιλίες οινοποιίας και επιτραπέζιας χρήσης) χρησιμοποιώντας ώριμες ράγες (Σταυρακάκης, 1982) και επτά ισοενζυμικά συστήματα, από τα οποία μόνο τα τέσσερα ήταν πολυμορφικά (Μπινιάρη, 2000). Το 1981 οι Samman και Wallace και οι Ahmendullah και Wolfe, χρησιμοποίησαν ως ηλεκτροφορητικό υλικό τη γύρη για τη διάκριση διαφόρων ποικιλιών αμπέλου (κυρίως αμερικάνικων και γαλλικών) και βασίστηκαν σε πέντε ενζυμικά συστήματα (Σταυρακάκης, 1982), ενώ οι Subden *et al.*, το 1987, χρησιμοποιώντας ως πειραματικό υλικό τις κληματίδες, διαχώρισαν 27 καλλιεργούμενες ποικιλίες, οι οποίες ανήκουν σε τέσσερα διαφορετικά είδη του γένους *Vitis* (Μπινιάρη, 2000). Οι Boursiquot και Parra (1996) χρησιμοποίησαν τρία ισοενζυμικά συστήματα προκειμένου να ταυτοποιήσουν τριάντα ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα καθώς και ένα για 223 ποικιλίες της Ευρωπαϊκής αμπέλου και τις χώρισαν σε δέκα ομάδες ανάλογα με τον συντελεστή παραλλακτικότητας που υπολόγισαν.

Στον ελληνικό πειραματικό χώρο, οι ισοενζυμικοί πολυμορφισμοί χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της εντός και τη μεταξύ των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου και μερικών από τις ξενικές ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας ως υλικό τη γύρη και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αμύλου. Με τη χρήση 13 ενζυμικών συστημάτων, από τα οποία τα 11 ήταν πολυμορφικά, μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 40 ποικιλίες αμπέλου καθώς και ένα υποκείμενο, το 140 Ruggeri (140 Ru). Τα αποτελέσματα υπήρξαν ικανοποιητικά και αποδείχτηκε ότι η χρησιμοποίηση δύο ή τριών ενζυμικών συστημάτων είναι αρκετή για τη διάκριση των ποικιλιών αυτών. Χαρακτηριστική ήταν και η διαφοροποίηση του 140 Ru. Για ορισμένα από τα ενζυμικά συστήματα μελετήθηκε επί πλέον και η γενετική βάση του πολυμορφισμού από τα F1 υβρίδια διαφόρων ποικιλιών. (Σταυρακάκης, 1982).

Το 1984 οι Σταυρακάκης και Λουκάς, σύγκριναν τέσσερις ποικιλίες αμπέλου που ανήκουν στην ομάδα των «Αητονυχιών». Εκτός από τις ποικιλίες “Αητονύχι άσπρο Γαργαλιάνω” και “Αητονύχι μαύρο”, ο χαμηλός βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ

των υπολοίπων συνδυασμών των υπόψη ποικιλιών ανά δύο, δεν ενισχύει την άποψη ότι οι ποικιλίες αυτές διαφοροποιήθηκαν με τη συσσώρευση μεταλλαγών. Από τα δεδομένα προκύπτει επίσης ότι οι ποικιλίες “Αητονύχι άσπρο Γαργαλιάνων” και “Αητονύχι κόκκινο”, δεν είναι η μία γονεϊκή της άλλης, ενώ το ίδιο ισχύει και για τις ποικιλίες “Αητονύχι μαύρο” και “Αητονύχι κόκκινο”.

Με την ίδια μέθοδο επιχειρήθηκε από τους Λουκά και Σταυρακάκη, η διάκριση επτά καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου που ανήκουν στην ομάδα “Ασπρούδες”, τέσσερις της ομάδας “Ραζακί” και δύο της ομάδας “Αθήρια” με τη βοήθεια επτά ενζυμικών πολυμορφισμών. Από τη μελέτη του βαθμού γενετικής ομοιότητας ανά δύο καλλιεργούμενων ποικιλιών των ομάδων “Ασπρούδες” και “Ραζακί”, ενισχύθηκε η άποψη ότι οι ποικιλίες που μελετήθηκαν είναι διαφορετικές και ότι η πιθανότητα να προέρχεται η μία από την άλλη (για μερικές περιπτώσεις) μέσω μεταλλαγής, είναι πολύ μικρή. Τέλος, οι δύο ποικιλίες της ομάδας “Αθήρια” αποδείχτηκε ότι είναι διαφορετικές ποικιλίες (Σταυρακάκης, 1985).

Το 1988 ο Σταυρακάκης μελέτησε οχτώ ενζυμικά συστήματα στη γύρη έξι διαφορετικών “τύπων” της ποικιλίας Σουλτανίνα και παρατήρησε ότι παρουσίαζαν τους ίδιους ηλεκτροφορητικούς φαινοτύπους. Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι οι “τύποι” της αγίγαρτης Σουλτανίνας φαίνεται να προέρχονται από τον εγγίγαρτο “τύπο” Αγριοσουλτανί και ότι το τελευταίο είναι πολύ πιθανόν ο άμεσος πρόγονος της Σουλτανίνας.

Το 1990 με έξι ενζυμικούς πολυμορφισμούς παρατήρησε ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας ανά δύο των οκτώ ποικιλιών που ανήκουν στην ομάδα οινοποιίας “Μαυρούδια” παρουσιάζει σημαντική γενετική διαφοροποίηση και ταυτόχρονα με το γεγονός ότι δεν υπάρχουν κοινές ηλεκτροφορητικές ζώνες μεταξύ δύο ποικιλιών για ένα ή περισσότερα ενζυμικά συστήματα, ενισχύεται η υπόθεση ότι οι ποικιλίες αυτές αποτελούν απλά ή πολλαπλά υβρίδια άλλων ποικιλιών και επομένως δεν προέρχονται από μία βασική ποικιλία ως αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλαγών (Σταυρακάκης, 1990).

Ακόμα, έγινε συγκριτική μελέτη των συνωνύμων της οινοποιήσιμης ποικιλίας Σαββατιανό-Κουντούρα ασπρη, Δουμπρένα άσπρη, Σταματιανό, Περαχωρήτικο και Σακέικο-με εφτά ενζυμικά συστήματα και παρουσιάστηκαν ίδιοι ηλεκτροφορητικοί

φαινότυποι, οπότε πρόκειται για την ίδια ποικιλία. Φάνηκε επίσης ότι οι ποικιλίες Κουντούρα μαύρη και Δουμπρένα μαύρη είναι διαφορετικές (Σταυρακάκης, 1991).

Επίσης, διερευνήθηκε η γενετική ποικιλομορφία εντός της ποικιλίας Ασύρτικο καθώς και έγινε διάκριση των κυριοτέρων ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στη Σαντορίνη με τη χρησιμοποίηση των ισοενζυμικών πολυμορφισμών που ανιχνεύονται ηλεκτροφορητικά. Μελετήθηκαν οι ποικιλίες Αθήρι, Αηδάνι (λευκό), Πλατάνι και Ασύρτικο καθώς και οι πιθανές παραλλαγές Φλασκασύρτικα και Αρσενικά της ποικιλίας Ασύρτικο. Από τα δεδομένα των πέντε ενζυμικών συστημάτων που μελετήθηκαν, α) επιβεβαιώθηκε η γενετική ετερόγενεια μεταξύ των ποικιλιών, η διάκριση των οποίων είναι ευχερής με τη χρησιμοποίηση συνδυασμού δύο ή τριών ενζυμικών συστημάτων, β) βρέθηκε γενετική ποικιλομορφία μεταξύ της τυπικής ποικιλίας Ασύρτικο και της παραλλαγής Φλασκασύρτικα, γ) δε διαπιστώθηκε γενετική διαφοροποίηση μεταξύ της ποικιλίας Ασύρτικο και της παραλλαγής Αρσενικά, τουλάχιστον για τα ενζυμικά συστήματα που μελετήθηκαν. Κατά συνέπεια, με αυτά τα δεδομένα, το Ασύρτικο και τα Αρσενικά Ασύρτικα θεωρούνται μία ποικιλία που διακρίνεται από τα Φλασκασύρτικα που αποτελούν ξεχωριστή ποικιλία (Σταυρακάκης *et al.*, 1996).

Επιχειρήθηκε ακόμα η διερεύνηση του μηχανισμού κληρονομησης των ισοενζυμικών σημαντών και αποδείχτηκε ότι οι ποικιλίες αμπέλου στην πλειονότητά τους, είναι απλά ή πολλαπλά υβρίδια (Μπινιάρη, 2000).

Η ηλεκτροφορητική μέθοδος με την οποία ανιχνεύονται οι ενζυμικοί πολυμορφισμοί, περιλήφθηκε ήδη στο νέο πίνακα αμπελογραφικής περιγραφής, ως ένα ακόμα κριτήριο διάκρισης των ποικιλιών αμπέλου, χωρίς όμως να αποκλείει την αμπελογραφική μέθοδο.

Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η ηλεκτροφορητική μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί όταν συντρέχουν οι ακόλουθες προϋποθέσεις :

- Έλλειψη γενετικής ποικιλομορφίας εντός των καλλιεργούμενων ποικιλιών και ταυτόχρονα γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών, για ορισμένα τουλάχιστον από τα ενζυμικά συστήματα. Κάτω από την προϋπόθεση αυτή τα τελευταία μπορούν να χαρακτηριστούν σαν γενετικές σημάνσεις στη διάκριση των καλλιεργούμενων ποικιλιών.

- Σταθερότητα των ηλεκτροφορητικών ζωνών στο ηλεκτροφόρημα. Η σταθερότητα αυτή αναφέρεται τόσο στην απουσία ποιοτικών αλλαγών (εμφάνιση νέων ζωνών ή εξαφάνιση άλλων), όσο και ποσοτικών (διαφορετικός βαθμός έντασης των

ηλεκτροφορητικών ζωνών) στο ηλεκτροφόρημα. Έλλειψη σταθερότητας, οφειλόμενη σε οντογενετικό στάδιο ή στις συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται οι ιστοί, κάνει πρακτικά αδύνατη την εφαρμογή της μεθόδου.

Ενώ η χρησιμοποίηση των ενζυμικών πολυμορφισμών που ανιχνεύονται ηλεκτροφορητικά συμβάλλουν αποτελεσματικά στη μελέτη και ταυτοποίηση των ποικιλιών αμπέλου, παρ' όλα αυτά εμφανίστηκαν κάποια προβλήματα.

Ένα από αυτά αναφέρεται στο γεγονός ότι ένα μικρό κομμάτι του γονιδιώματος χρησιμοποιείται σαν δείγμα και ένα μέρος των γονιδίων μεταγράφεται και μεταφράζεται σε δεδομένη στιγμή στη ζωή του φυτού. Ακόμα, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία, η κατάσταση του φυτού και οι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την παρουσία των πρωτεϊνών ενός δεδομένου γονοτύπου. Επίσης, η πλήρη σύμπτωση των ισοενζυμικών ζωνών μεταξύ δύο ποικιλιών δεν σημαίνει ότι υπάρχει πάντοτε απουσία γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ αυτών, απλά δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί. Οι Marshall και Brown (1975) έδειξαν ότι μόνο το 25% των μεταλλάξεων, που προκαλούν αντικατάσταση βάσεων, οδηγούν σε αλλαγές του ηλεκτρικού φορτίου των πρωτεϊνικών μορίων και επομένως σε ηλεκτροφορητικά ανιχνεύσιμες διαφορές. (Μπινιάρη, 2000).

Όσον αφορά γενικά στις βιοχημικές μεθόδους, η ακρίβειά τους μειώνεται καθότι η ηλικία, η κατάσταση των πρέμων όπως και το περιβάλλον επηρεάζουν την παρουσία των πρωτεϊνών ενός δεδομένου γονοτύπου. Παρά το γεγονός ότι οι ισοενζυμικοί δείκτες είναι γενικά ευκολότεροι στην ανάλυσή τους σε σχέση με τους δείκτες DNA και θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογή εκεί όπου υπάρχει πολυμορφισμός τους, έχουν τεθεί σήμερα σε δευτερεύουσα μοίρα, κυρίως από την αλματώδη εξέλιξη των μοριακών δεικτών του DNA (Σωμαράκης, 2005).

Μοριακές μέθοδοι

Ο μεγάλος αριθμός ποικιλιών που παρατηρείται στο αμπέλι και η δυσκολία που παρουσιάζεται κατά την ταυτοποίηση αυτών με τη χρησιμοποίηση των κλασσικών πλέον μεθόδων –αμπελογραφία, αμπελομετρία-οι περιορισμοί των βιοχημικών μεθόδων καθώς και η εξέλιξη που υπήρξε τα τελευταία χρόνια στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας,

οδήγησαν στην εφαρμογή νέων μεθόδων προκειμένου να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν πιο ακριβής ταυτοποίηση της κάθε ποικιλίας.

Ένα πρόβλημα που παρουσιάστηκε στις πρώτες μοριακές μεθόδους, ήταν η απαραίτητη προϋπόθεση της περιγραφής των χαρακτηριστικών της κάθε ποικιλίας και κατά συνέπεια θα έπρεπε να γίνει η αμπελογραφική ή/και η αμπελομετρική περιγραφή κάθε μιας. Σ' έναν μεγάλο αριθμό ελληνικών ποικιλιών όμως, αυτές οι περιγραφές δεν έχουν γίνει ποτέ ή έγιναν πριν από αρκετά χρόνια και τα αποτελέσματά τους δεν είναι συγκρίσιμα (Δρακόπουλος, 2000).

Το επόμενο βήμα για τη διάκριση των ποικιλιών ήταν η ανάλυση σε επίπεδο DNA, από τη στιγμή που το DNA από ένα φυτό είναι το ίδιο σε όλα τα κύτταρα, σε κάθε ιστό και σε κάθε στάδιο ανάπτυξης του φυτού. (Αναγνωστόπουλος, 2003). Αν και πριν από κάποια χρόνια η απομόνωση του DNA από φυτικά κύτταρα ήταν μια σχετικά δύσκολη διαδικασία, σήμερα λαμβάνεται από κάθε διαθέσιμο είδος φυτικού ιστού, π.χ. κληματίδες, φύλλα, σταφύλια (Αβαγιαννέλη, 2005).

Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην ανάπτυξη των γενετικών δεικτών. Το σενάριο αυτό δεν είναι καινούργιο. Ο Μέντελ χρησιμοποίησε τον 19ο αιώνα στα πειράματά του γενετικούς δείκτες βασισμένους στο φαινότυπο. Οι περιορισμοί των δεικτών αυτών οδήγησαν στην ανάπτυξη άλλων πιο χρήσιμων και με πιο ευρεία χρήση δεικτών βασισμένοι στο DNA και είναι γνωστοί ως μοριακοί δείκτες (Agarwal *et al.*, 2008).

Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, μιας και αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA (Χατζόπουλος, 2001). Προσφέρουν ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων έναντι των συμβατικών εναλλακτικών που βασίζονται στο φαινότυπο και αυτό γιατί είναι ιστολογικά καθολικοί ανεξαρτήτως του σταδίου ανάπτυξης, διαφοροποίησης ή άμυνας του κυττάρου, δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον καθώς και από πλειοτροπικές και επιστατικές επιδράσεις (Agarwal *et al.*, 2008). Επειδή είναι γενετικά χαρτογραφημένοι χρησιμοποιούνται και για τη μελέτη της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών.

Χάρη στο επίτευγμα των μοριακών δεικτών, είναι τώρα δυνατόν να βγαίνουν άμεσα συμπεράσματα όσον αφορά στη γενετική ποικιλομορφία και στις σχέσεις μεταξύ οργανισμών στο επίπεδο DNA, χωρίς τις συγχέουσες επιδράσεις του περιβάλλοντος

και/ή τα σφαλμένα δεδομένα γενεαλογικών δέντρων. Γενετικές αναλύσεις σε πληθυσμούς και είδη φυτών και ζώων για ταξινομικές, εξελικτικές και οικολογικές μελέτες επωφελήθηκαν τρομερά από την ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών με μοριακούς δείκτες. Κάθε τεχνική στηρίζεται σε διαφορετικές αρχές αλλά η εφαρμογή τους έχει να κάνει με το να αναδεικνύουν την παγκόσμια ποικιλομορφία.

Για να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα, πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα :

- Να είναι πολυμορφικοί (ή η αν είναι δυνατόν ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο).
- Να παρέχουν συνεχή/διαρκή ευκρίνεια γενετικών διαφορών.
- Να δημιουργούν πολλαπλούς, ανεξάρτητους και αξιόπιστους δείκτες.
- Να συνδέονται με διακριτούς φαινοτύπους.
- Να μην απαιτούνται πληροφορίες για το γονιδίωμα ενός οργανισμού.
- Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλομόρφους.
- Να έχουν ψηλό συντελεστή κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
- Να είναι διάσπαρτοι σε όλο το γονιδίωμα και στην ιδανική περίπτωση να βρίσκονται σε ισοκατανομή
- Να είναι ανεξάρτητοι της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου του φυτού.
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα όταν τα φυτά αναπτυχθούν τόσο, ώστε ν' απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA (Χατζόπουλος, 2001).

Δυστυχώς καμία τεχνική με μοριακούς δείκτες είναι ιδανική για κάθε περίπτωση. Οι τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικά σημεία όπως στην αφθονία στο γονιδίωμα, στο επίπεδο του πολυμορφισμού που ανιχνεύεται, στην εξειδίκευση ως προς τον γενετικό τόπο, στην επαναληψιμότητα (reproducibility), στα τεχνικά μέσα και στο κόστος (Πίνακας 1) (Agarwal *et al.*, 2008)

Πίνακας 1 Σύγκριση διάφορων συχνά χρησιμοποιούμενων τεχνικών μοριακών δεικτών

	Αφθονία	Επαναλη- ψιμότητα	Βαθμός πολυμορφισμού	Εξειδίκευση γενετικού τόπου	Απαιτούμενος Τεχνικός εξοπλισμός	Απαιτούμενη Ποσότητα DNA	Εφαρμογή
RFLP	Υψηλή	Υψηλή	Μέτριος	Ναι	Υψηλός	Μεγάλη	Φυσική Χαρτογράφηση
RAPD	Υψηλή	Χαμηλή	Μέτριος	Όχι	Χαμηλός	Μικρή	Σήμανση γονιδίου
SSR	Μέτρια	Μέτρια	Μέτριος	Όχι	Μέτριος	Μικρή	Γενετική ποικιλομορφία SNP
SSCP	Χαμηλή	Μέτρια	Χαμηλός	Ναι	Μέτριος	Μικρή	χαρτογράφηση αλληλομόρφων
CAPS	Χαμηλή	Υψηλή	Χαμηλός	Ναι	Υψηλός	Μικρή	Σήμανση γονιδίου
SCAR	Χαμηλή	Υψηλή	Μέτριος	Ναι	Μέτριος	Μικρή	Φυσική χαρτογράφηση
AFLP	Υψηλή	Υψηλή	Μέτριος	Όχι	Μέτριος	Μέτρια	Σήμανση γονιδίου
IRAP/ REMAP	Υψηλή	Υψηλή	Μέτριος	Ναι	Υψηλός	Μικρή	Γενετική ποικιλομορφία
RAMPO	Μέτρια	Μέτρια	Μέτριος	Ναι	Υψηλός	Μικρή	Γενετική ποικιλομορφία

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism - Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA

RAPD Random Amplification of Polymorphic DNA - Τυχαίο Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism - Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων

IRAP/REMAP Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism/REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism

SSR Simple Sequence Repeats

SSCP Single-strand Conformation Polymorphism

CAPS Cleavage Amplified Polymorphic Sequence

SCAR Sequence Characterized Amplification Region

Κάποιοι μοριακοί δείκτες μπορεί να είναι χρήσιμοι επειδή είναι συν-επικρατείς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα εξέλιξης. Άλλοι, μπορούν να ανιχνεύσουν την 'ποικιλότητα' σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, ενώ άλλοι έχουν μεγαλύτερη επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηρίων (Μηνάς, 1999).

Σε γενικές γραμμές η επιλογή της τεχνικής θα πρέπει να εξασφαλίζει αξιοπιστία, ευκολία στην ανάλυση, στατιστική επεξεργασία και αποκάλυψη πολυμορφισμών (Agarwal *et al.*, 2008).

Ένας μοριακός δείκτης μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη ή ένα νουκλεϊνικό οξύ. Οι πρωτεϊνικές φύσεως είναι πρωτεΐνες είτε των σπόρων είτε της γύρης. Και τα δύο αυτά μέρη του φυτού αποτελούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών τόσο σε ποσότητα όσο και ποιότητα. Αποτελούν και τα δύο καθορισμένα σημεία της ανάπτυξης ενός φυτού και για αυτό οι τυχόν πρωτεΐνες που εξάγονται από αυτά μπορούν να αποτελέσουν συγκρίσιμο και επαναλήψιμο μέγεθος στις ποικιλίες ή τα είδη που μελετούνται.

Οι πρωτεϊνικοί δείκτες χρησιμοποιούν ισοένζυμα και αλλοένζυμα τα οποία είναι διαφορετικές μοριακές μορφές ενός ενζύμου που μοιράζονται μια καταλυτική δράση. Στα ισοένζυμα το ένζυμο κωδικοποιείται από περισσότερους από ένα γενετικούς τόπους ενώ στα δε αλλοένζυμα κωδικοποιείται από διαφορετικά αλληλόμορφα σε ένα γενετικό τόπο.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των πρωτεϊνικών δεικτών είναι η εξής :

- Εξαγωγή πρωτεϊνών
- Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση
- Οπτικοποίηση των πρωτεϊνών στην πηκτή με βάψιμο
- Ανάλυση των μοτίβων που διαμορφώνουν οι πρωτεϊνικές ζώνες

Οι τεχνικές των νουκλεοτιδικής φύσης μοριακών δεικτών μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: (1) τεχνικές μη βασισμένες σε PCR (polymerase chain reaction) ή τεχνικές υβριδισμού και (2) τεχνικές βασισμένες σε PCR.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ PCR

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (RFLP)

Η μεθοδολογία RFLP βασίζεται σε δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μοριακή βιολογία, στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και στη μεταφορά του DNA σε φίλτρα τα οποία υβριδίζουν μ' ένα σημασμένο τμήμα DNA κατά Southern.

Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το πολύπλοκο γονιδίωμα των οργανισμών σε διακριτά τμήματα συγκεκριμένου μεγέθους ελαττώνοντας την πολυπλοκότητα. Πολυμορφισμός παρατηρείται σ' ένα πρότυπο περιορισμένων τμημάτων DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού και επίσης μπορεί να συμβεί και από τη δημιουργία ή εξάλειψη μιας νέας θέσης αναγνώρισης από ένθεση ή απαλειφή περιοχών DNA. Όταν γονιδιωματικό DNA κόβεται μ' ένα ένζυμο περιορισμού τότε το πρότυπο των τμημάτων στην πηκτή αγαρόζης δεν είναι διακριτό αλλά διάχυτο. Το πρότυπο των πολυμορφικών ζωνών εμφανίζεται μετά από υβριδισμό με τον ανιχνευτή ραδιενεργά σημασμένο ή χημικά τροποποιημένο (Χατζόπουλος, 2001).

Οι δείκτες RFLP μεταξύ άλλων χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση ποικιλιών, τον προσδιορισμό του τόπου καταγωγής ενός συγκεκριμένου φυτού (είδος ή ποικιλία), καθώς επίσης και για την ανάπτυξη (διαμόρφωση) μοριακών δεικτών για τη χαρτογράφηση του γενετικού υλικού και την εύρεση γονιδίων που επηρεάζουν ποσοτικά χαρακτηριστικά των φυτών (Soller *et al.*, 1983). Έτσι, οι RFLP δείκτες μπορούν να θεωρηθούν ως 'γενετικοί τόποι' και ν' αξιοποιηθούν ως φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στους απογόνους διασταυρώσεων.

Η μεθοδολογία αυτή είναι αξιόπιστη και ανεξάρτητη από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και βρίσκει εφαρμογή σε αρκετά φυτικά είδη, μεταξύ των οποίων και η άμπελος (Σωμαράκης, 2005). Με την ανάλυση RFLP επιχειρήθηκε για πρώτη φορά η χρησιμοποίηση του DNA για τη μελέτη, ταυτοποίηση και διάκριση ειδών και ποικιλιών αμπέλου, με ικανοποιητικά αποτελέσματα (Μπινιάρη, 2000).

Οι Striem *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991; Bourquin *et al.*, 1991; 1992; 1993; Mauro *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1994, χαρτογράφησαν επιτυχώς ποικιλίες, υποκείμενα

και κλώνους της αμπέλου. Οι Bourquin *et al.*, (1992) χρησιμοποίησαν την ανάλυση RFLP, με DNA που απομονώθηκε από το ξύλο του φυτού, για να διακρίνουν 16 από τα πλέον σημαντικά υποκείμενα αμπέλου. Το 1995, οι Guerra και Meredith εκτός του ότι κατάφεραν να διακρίνουν και τα 9 υποκείμενα που ήθελαν να συγκρίνουν (υβρίδια Berlandieri x Riparia), επιβεβαίωσαν και τα αποτελέσματα των Walker και Liu (1995), οι οποίοι με ισοενζυμική ανάλυση βρήκαν ότι τα δύο από τα υποκείμενα παρουσίασαν τον ίδιο βαθμό γενετικής ομοιότητας (ίδιο γονότυπο). Οι Bowers και Meredith το 1996, χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή για να βρουν τη γενετική σχέση μεταξύ 33 ευρέως καλλιεργούμενων ποικιλιών του είδους *V. vinifera*. Οι Lin και Walker το 1997, διέκριναν οκτώ υποκείμενα αμπέλου, χρησιμοποιώντας όμως DNA που απομονώθηκε από το ξύλο. Οι Yamamoto *et al.*, (1998), χρησιμοποίησαν στην RFLP μέθοδο, τμήμα διαγονιδίου του rDNA για να αναλύσουν τις σχέσεις μεταξύ άγριων ποικιλιών της Κορέας, Ιαπωνίας και Κίνας και έδειξαν ότι όλα τα υπό εξέταση είδη και ποικιλίες του *Vitis* είχαν το δικό τους πρότυπο με κάποιες διαφορές ανάμεσα στα δείγματα.

Οι Gogorcena *et al.* (1993), δεν κατάφεραν να διακρίνουν με ευχέρεια 5 ποικιλίες του *V. vinifera* και 9 κλώνους της ποικιλίας Pinot noir, όπως και οι Bourquin *et al.* (1995), που ενώ ταυτοποίησαν 22 υποκείμενα αμπέλου, δεν κατάφεραν να διακρίνουν εννέα κλώνους του υποκειμένου 3309C.

Οι δείκτες είναι σχετικά αρκετά πολυμορφικοί, κληρονομούνται με συγκυρίαρχο τρόπο και έχουν υψηλό ρυθμό επαναληψιμότητας. Εξαιτίας της παρουσίας τους σε όλο το γονιδίωμα, της υψηλής τους κληρονομικότητας και της εξειδίκευσης του γονιδιακού τους τόπου, κατέχουν υψηλή θέση ανάμεσα στους άλλους δείκτες. Η μέθοδος αυτή έχει πολύ καλή επαναληψιμότητα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους αφού τα αποτυπώματα DNA μπορούν να αναλυθούν πολλές φορές με καθαρισμό της μεμβράνης και επανυβριδισμό (συνήθως οκτώ με δέκα φορές) με διαφορετικούς RFLP προαγωγείς (Agarwal *et al.*, 2008).

Παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα, η μέθοδος δεν εφαρμόστηκε ευρέως στη διάκριση ποικιλιών αμπέλου εξαιτίας των προβλημάτων που παρουσιάζει, όπως η δυσχέρεια στην εφαρμογή της (αναγκαία η χρησιμοποίηση ραδιενεργών σημασμένων ανιχνευτών για να γίνουν ορατά τα διαφορετικά τμήματα του DNA, που παράχθηκαν με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων) και η αναγκαιότητα της γνώσης της αλληλουχίας

του DNA (Μπινιάρη, 2000). Επίσης, επειδή η μεθοδολογία βασίζεται στον πολυμορφισμό των μοριακών δεικτών, σε ορισμένα είδη είναι δύσκολο να βρεθεί πολυμορφισμός μεταξύ ποικιλιών ή ατόμων του ίδιου είδους και πρέπει να γίνουν αρκετοί συνδυασμοί ανιχνευτή και περιοριστικού ενζύμου για να βρεθεί κάποιος πολυμορφισμός που μπορεί να αξιοποιηθεί. (Χατζόπουλος, 2001). Είναι μία μέθοδος χρονοβόρα, που απαιτεί μεγάλες ποσότητες καλής ποιότητας γονιδιωματικού DNA όπως και ακριβά και ραδιενεργά/τοξικά στοιχεία. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν στην επινόηση μιας άλλης σειράς μεθόδων, γνωστές ως τεχνικές που βασίζονται στη PCR (Agarwal *et al.*, 2008).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ PCR

Τεχνική PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μία απλή τεχνική για ενίσχυση επιθυμητής αλληλουχίας, ακόμα και απειροελάχιστης, σε εκατομμύρια φορές σε μερικές ώρες. Η διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια :

Στάδιο μετουσίωσης

- Διάσπαση υδρογονικών δεσμών με ανύψωση θερμοκρασίας και σχηματισμός μονόκλωνων αλυσίδων.

- Ένα έως μερικά λεπτά στους 94-96°

Στάδιο επανασύνδεσης

- Με μείωση θερμοκρασίας οι εκκινητές συνδέονται με τις αντίστοιχες συμπληρωματικές μονόκλωνες αλυσίδες

- Ένα έως μερικά λεπτά στους 50-65°.

Στάδιο επιμήκυνσης

- Η DNA πολυμεράση συνθέτει μία συμπληρωματική αλυσίδα της μήτρας DNA με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3'. Επιλέγεται τέτοια θερμοκρασία ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη ή κοντά στη μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου.

- Ένα έως μερικά λεπτά στους 72°

Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν ένα κύκλο και οι κύκλοι σε μία αντίδραση PCR είναι μέχρι 40 φορές. Το διάλυμα της αντίδρασης αποτελείται από τη μήτρα DNA, το μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), τους εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα με

χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και την DNA πολυμεράση Η κανονικοποίηση των συστατικών της αντίδρασης και των κύκλων της αντιγραφής είναι απαραίτητη για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Με την ανακάλυψη της PCR μεθόδου, έχει περιγραφεί λεπτομερώς ένας μεγάλος αριθμός προσεγγίσεων για μια σειρά μοριακών δεικτών βασισμένων στη PCR, και αυτό οφείλεται κυρίως στην απλότητα της μεθόδου και στη μεγάλη πιθανότητα επιτυχίας. Η χρήση τυχαίων εκκινητών ξεπέρασε τον περιορισμό της γνώσης της αλληλουχίας για PCR και έκανε πιο εύκολη την ανάπτυξη γενετικών δεικτών για πολλαπλές χρήσεις (Agarwal *et al.*, 2008). Οι τεχνικές που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία διαφέρουν ως προς το μήκος και αλληλουχία των εκκινητών, την αυστηρότητα των συνθηκών της PCR και τη μεθοδολογία διαχωρισμού και ανίχνευσης των τμημάτων (Karp and Edwards, 1997) και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο κατηγορίες :

- 1) σ'αυτές που στηρίζονται στην PCR με τυχαίους εκκινητές ή τεχνικές με μη-εξειδικευμένες αλληλουχίες (sequence non-specific techniques) και
- 2) σ'αυτές που στηρίζονται στη PCR με εξειδικευμένες στοχευμένες αλληλουχίες (sequence targeted PCR-based techniques) (Agarwal *et al.*, 2008).

1) ΔΕΙΚΤΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΤΗΝ PCR ΜΕ ΤΥΧΑΙΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ (ARBITRARILY PRIMED PCR-BASED MARKERS)

ΤΥΧΑΙΟ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟ DNA (RAPD)

Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση τυχαίων εκκινητών, κυρίως δεκαμερών, σε αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) με τη θερμοανθεκτική πολυμεράση *TaqI* και ένα μόνο εκκινητή ανά αντίδραση (Χατζόπουλος, 2001). Αντλεί (deduce) DNA πολυμορφισμούς που δημιουργούνται από επαναδιατάξεις ή διαγραφές στα ενδιάμεσα των δεσμευτικών άκρων των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών στο γονιδίωμα χρησιμοποιώντας μικρές τυχαίες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (μέχρι 10 βάσεις) (Agarwal *et al.*, 2008). Η μεθοδολογία αυτή είναι πολύ αποτελεσματική στη σύρωση πληθυσμών, στην εύρεση

ποικιλομορφίας της αλληλουχίας και στην εύρεση μοριακών δεικτών σε εξειδικευμένες περιοχές του γονιδιώματος χωρίς την ανάγκη λεπτομερούς γενετικού χάρτη (Χατζόπουλος, 2001).

Τα ενισχυμένα τμήματα δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζει ο εκκινητής με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια απόσταση 300 έως 3.000 βάσεις. Τα μονόκλωνα μόρια του γονιδιωματικού DNA, μετά από αποδιάταξη, υβριδίζουν κατά προτίμηση με τον εκκινητή λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής τους στο διάλυμα. Ακολούθως, η θερμοανθεκτική πολυμεράση, πολυμερίζει με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ όταν υπάρχει εκκινητής με ελεύθερο $3' - \text{OH}$ και μήτρα (μονόκλωνο DNA). Τα προϊόντα της ενίσχυσης του πολυμερισμού διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση συνήθως βρωμιούχου αιθιδίου.

Είναι δεδομένο ότι η μεθοδολογία απομόνωσης του DNA και οι συνθήκες κατά την αντίδραση του PCR παραμένουν σταθερές. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα διαχωρίζονται από την παρουσία ή απουσία ενός προϊόντος ενός συγκεκριμένου μεγέθους, με αποτέλεσμα να μπορούν να καταμετρηθούν πολλαπλές γενετικές θέσεις σε μια μόνο αντίδραση, με την προϋπόθεση ότι τα προϊόντα του πολυμερισμού να διαχωρίζονται σχετικά εύκολα, ως προς το μέγεθος, στην ηλεκτροφόρηση.

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι τέτοιες ώστε να μπορούν να εμφανιστούν μέχρι και 20 ζώνες. Η ικανότητα αυτή των RAPD να παράγουν πολλαπλές ζώνες χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή έχει σαν αποτέλεσμα την άμεση και ταχεία εξέταση και εκτίμηση πολλαπλών γενετικών τόπων με τη χρήση μόνο μερικών εκκινητών σε ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR. Είναι μια μεθοδολογία απλή, δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό, το κόστος δεν είναι ιδιαίτερα υψηλό και δεν είναι χρονοβόρα.

Η σταθερότητα των αποτελεσμάτων βασίζεται στην εφαρμογή αυστηρών συνθηκών ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA. Κατά συνέπεια το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι τα μη συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και αυτό γιατί το κάθε εργαστήριο χρησιμοποιεί α) διαφορετική μεθοδολογία κατά την απομόνωση του DNA β) διαφορετικές θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες στις αντιδράσεις PCR και γ) διαφορετικές PCR συσκευές (Χατζοπούλος, 2001).

Οι πρώτες εφαρμογές της μεθόδου στην άμπελο έγιναν το 1993 (Busher *et al.*;

Bourquin *et al.*; Jean-Jaques *et al.*). Με τη βοήθεια των RAPDs δείχθηκε ότι η ποικιλία Silvaner δεν είναι ένας από τους γεννήτορες της γερμανικής ποικιλίας Muller-Thurgau. Επικρατούσε η θεωρία ότι η ποικιλία Muller-Thurgau είναι αποτέλεσμα της διασταύρωσης Silvaner x Riesling αλλά με τη μέθοδο αυτή αποκλείστηκε η ποικιλία Silvaner ως η γεννήτορας. (Buscher *et al.*, 1994).

Παρόμοιες εργασίες έγιναν για την εύρεση της γενετικής σχέσης μεταξύ των ομάδων ποικιλιών Riesling (ομάδα Βουργουνδίας), των Pinot και των Chardonnay blanc, Chardonnay musqué (Tschammer και Zyprian, 1994).

Οι Grando *et al.*, (1995) επιχείρησαν να υπολογίσουν τη γενετική διαφορά μεταξύ ποικιλιών *vinifera* και του *V. vinifera* ssp. *silvestris*. Βρέθηκε μια υψηλή ομοιογένεια μεταξύ των καλλιεργούμενων ποικιλιών *vinifera* ενώ δε σημειώθηκε διαφορά μεταξύ των καλλιεργούμενων και αγρίων ειδών. Επίσης, το 1996, μελέτησαν τη σχέση μεταξύ άγριων αμπελιών, συμπεριλαμβανομένου και δύο ιαπωνικών ειδών.

Οι Bowers και Meredith το 1996 ανέφεραν τη χρήση των μεθόδων RFLP και RAPD για τη μελέτη συγγένειας μεταξύ δυτικών ποικιλιών του *V. vinifera* ενώ οι Yamamoto *et al.* (1998), χρησιμοποίησαν τη RAPD μέθοδο για την ανάλυση άγριων αμπελιών της Ανατολικής Ασίας όπως και καλλιεργούμενων ποικιλιών και μελέτησαν τη φαινετική τους σχέση. Ο διαχωρισμός άγριων και καλλιεργούμενων ποικιλιών ήταν σαφής όπως και μεταξύ ανατολικών και δυτικών ποικιλιών. Το σύμπλεγμα όμως των τελευταίων δύο ήταν διαχωρισμένο από αυτό των *V. labrusca* καλλιεργειών.

Ακόμα, είναι δυνατή η διάκριση και η ταυτοποίηση και εντός των ποικιλιών (Collins και Symons, 1993) Τη μεταξύ και εντός των ποικιλιών γενετική ποικιλομορφία, μελέτησαν με καλά αποτελέσματα οι Moreno *et al.*, το 1995. Μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί μεταξύ 31 δειγμάτων και διαχωρίστηκαν με βάση αξιόπιστες ζώνες όλες οι ποικιλίες και μερικοί από τους κλώνους. Επιβεβαιώθηκαν συνωνυμίες και διαπιστώθηκε και μία ομωνυμία. Οι Ye *et al.*, (1998) διαχώρισαν τις ποικιλίες και κλώνους που μελέτησαν σε δύο κυρίως ομάδες, *V. vinifera* L και *V. x Labruscana* Bailey. Δεν αποκαλύφθηκε όμως ποικιλομορφία μεταξύ γνωστών κλώνων του Chardonnay και του Pinot noir.

Η μελέτη ποικιλιών που ανήκουν στα υπογέννη Euvitis και Muscadinia έδειξε ότι ο πολυμορφισμός ήταν χαμηλότερος στις ποικιλίες που ανήκουν στο ίδιο υπογένος. Τα

αποτελέσματα της ανάλυσης DNA συμφωνούν με αυτά της ανάλυσης των ισοενζύμων, η οποία δείχνει ότι οι ποικιλίες των ειδών του *Muscadinia* παρουσιάζουν μικρό αριθμό αλληλομόρφων με τις ποικιλίες των ειδών του *Euvitis* (Qu *et al.*, 1996).

Όσον αφορά τα υποκείμενα της αμπέλου, οι This *et al.*, (1997) απομόνωσαν DNA από το ξύλο 30 υποκειμένων και χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές ταυτοποιήθηκαν 23 από τα 30 υποκείμενα ενώ με την προσθήκη ακόμη ενός εκκινητή ταυτοποιήθηκαν όλα τα υποκείμενα. Οι Bauer και Zyrpian (1997) χρησιμοποιώντας τις ειδικές αλληλουχίες των δεικτών, βρήκαν ότι τα πέντε υποκείμενα που χρησιμοποίησαν ήταν διαφορετικά μεταξύ τους, αν και τα τρία από αυτά (125AA, 5BB, SO4) προέρχονταν από τους ίδιους γονείς (*V. berlandieri* x *V. riparia*).

Το 2005 οι Benjak *et al.*, μελέτησαν τις γενετικές σχέσεις μεταξύ ποικιλιών από Κροατία, Ελλάδα και Τουρκία με τις μεθόδους RAPDs και SSRs. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους ανάλυσης. Η ανάλυση ομαδοποίησης στηριζόμενη σε dice genetic ομοιότητες έδειξε ότι δεν υπήρχαν συνώνυμα ανάμεσα στις υπό εξέταση ποικιλίες ενώ η AMOVA ανάλυση έδειξε ότι υπήρχε μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα μεταξύ των ελληνικών και κροατικών ποικιλιών.

Οι Herrera *et al.*, (2002) χρησιμοποιώντας τις μεθόδους RAPDs και ISSR-PCR μελέτησαν τη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ ποικιλιών *V. vinifera* από την κεντρική Χιλή.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε και για την ταυτοποίηση οκτώ ελληνικών ποικιλιών αμπέλου καθώς και για δύο “παραλλαγές” της ποικιλίας Ασύρτικο (Μπινιάρη *et al.*, 1996). Επίσης, βρέθηκε γενετική ετερογένεια μεταξύ δεκατριών τύπων ή παραλλαγών της ποικιλίας Ροδίτης (Σταυρακάκης και Μπινιάρη, 1998), όπως επίσης και μεταξύ των ποικιλιών της ομάδας των Μοσχάτων (Staurakakis και Biniari, 1998).

Η αντίδραση PCR με αυθαίρετους εκκινητές (Arbitrarily primed PCR/AP-PCR) και η μέθοδος ενίσχυσης αποτυπώματος DNA (DNA amplification fingerprinting/DAF) είναι δύο ανεξάρτητες τεχνικές, παραλλαγές της μεθόδου RAPD. Στην AP-PCR χρησιμοποιείται ένας εκκινητής (μήκους 10-15 νουκλεοτιδίων) και στην PCR οι δύο πρώτοι κύκλοι αφορούν επέκταση σε συνθήκες μη αυστηρές. Οι υπόλοιποι κύκλοι εκτελούνται με αυστηρές συνθήκες, αυξάνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης. Αυτή η παραλλαγή δεν χρησιμοποιήθηκε ευρέως γιατί ήταν απαραίτητη η χρήση

αυτοραδιογραφίας, ακόμα και μετά την απλοποίησή της καθώς τα κομμάτια DNA μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση αгарόζης. Στην τεχνική DAF χρησιμοποιείται για ενίσχυση της αλληλουχίας ένας αυθαίρετος εκκινητής με μήκος μικρότερο από δέκα νουκλεοτίδια και τα αμπλικόνια αναλύονται σε πολυακρυλαμίδη με χρώση νιτρικού αργύρου (Agarwal, *et al.*, 2008).

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ (AFLP)

Για να ξεπεραστεί το μειονέκτημα της επαναληψιμότητας της RAPD αναπτύχθηκε η τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων AFLP (Agarwal, *et al.*, 2008). Η μεθοδολογία βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά την πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος. Έτσι, οι πολυμορφισμοί ταυτοποιούνται με μεγάλη αποτελεσματικότητα λόγω των διαφορών που προκύπτουν στο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιορισμένων τμημάτων DNA σε μια αντίδραση PCR (Χατζόπουλος, 2001). Για μία προσέγγιση πιο υψηλής απόδοσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν φθορίζοντες εκκινητές (Agarwal, *et al.*, 2008).

Ο πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών με τη μέθοδο AFLP εντοπίζεται από την παρουσία ή απουσία κάποιας ζώνης που οφείλεται : α) στις διαφορές των θέσεων αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού (όπως συμβαίνει και στη μέθοδο RFLP), β) στις αλλαγές των βάσεων μέσω μεταλλάξεων κοντά στις θέσεις αναγνώρισης και διάκρισης λόγω των 'επιλεκτικών νουκλεοτιδίων' και γ) στις ενθέσεις ή ελλείψεις μέσα στα τμήματα που ενισχύονται. Η διάκριση των ετεροζυγωτών ατόμων όπως και στη τεχνική RAPD, είναι δυνατή με τη σύγκριση της έντασης της ζώνης (Χατζόπουλος, 2001).

Η τεχνολογία AFLP είναι ένα ακόμα εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό γενετικής ποικιλομορφίας και βιοποικιλομορφίας. Μπορούν να διακριθούν στενά συνδεδεμένα άτομα στο επίπεδο του υποείδους (Althoff *et al.*, 2007) και μπορούν όπως επίσης και να χαρτογραφηθούν γονίδια. Είναι δυνατόν να αποτυπωθεί DNA οποιασδήποτε φύσεως και χωρίς να είναι γνωστή η ακολουθία. Τα περισσότερα

κομμάτια AFLP αντιστοιχούν σε μοναδικές θέσεις στο γονιδίωμα και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ορόσημο σε γενετική και φυσική χαρτογράφηση. (Agarwal, *et al.*, 2008).

Οι μοριακοί δείκτες που παράγονται με AFLP είναι πολύ περισσότεροι απ' αυτούς που δημιουργούνται σε μια αντίδραση PCR (RAPD) και έχουν το χαρακτηριστικό της κυριαρχίας. Σε γενικές γραμμές, το επίπεδο πολυμορφισμού που ανιχνεύεται με τη μέθοδο αυτή, είναι χαμηλότερο από άλλες τεχνικές χαρτογράφησης όπως RFLP, μικροδορυφορικό DNA, αλλά παρ' όλα αυτά, η ικανότητα ανάλυσης ταυτόχρονα μεγάλου αριθμού πολυμορφικών τόπων επιβεβαιώνει την υψηλή και διαφωτιστική αξία της τεχνικής σε σύγκριση με άλλες μεθόδους χαρτογράφησης. Τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι επαναλήψιμα, όμως ολόκληρη η διαδικασία είναι σχετικά δύσκολη, τουλάχιστο στην αρχή, και το κόστος είναι υψηλό (Χατζόπουλος, 2001).

Με τη μέθοδο αυτή, οι Senci *et al.*, (1996), κατάφεραν να διαχωρίσουν δεκαεννιά κλώνους των ποικιλιών Sugniovese και Colorino. Οι Cervera *et al.* (1998), χρησιμοποίησαν τη μέθοδο των AFLPs για να χαρακτηρίσουν 67 διαφορετικά δείγματα από μία συλλογή της περιοχής Λα Ριόχα της Ισπανίας (D.O.Ca. Rioja). Κατάφεραν να εντοπίσουν ομώνυμες και συνώνυμες ποικιλίες όπως και να εντοπίσουν χαρακτηριστικά μοτίβα κλώνων, με διαφορετικούς οργανοληπτικούς και αγρονομικούς χαρακτήρες που ανήκουν στην ίδια ποικιλία. Επίσης, το 2009 οι Lopez *et al.*, διαφοροποίησαν κλώνους από επτά αυτόχθονες ποικιλίες, ενώ δε βρήκαν διαφορές μεταξύ κλώνων της ίδιας ποικιλίας. Για να ελέγξουν μία τροποποιημένη προσέγγιση της μεθόδου, χρησιμοποίησαν έξι εκκινητές και τα ίδια δείγματα. Αν και παρατηρήθηκαν μερικές scorable ζώνες, ένα μεγάλο ποσοστό ήταν πολυμορφικές επιτρέποντας το σαφή διαχωρισμό όλων των υπό εξέταση ποικιλιών. Επιπλέον, ταυτοποίησαν έντεκα ζώνες για συγκεκριμένες ποικιλίες με τις οποίες διέκριναν όλες τις ποικιλίες εκτός από μία. Αυτή η τροποποιημένη προσέγγιση τους επέτρεψε να παρατηρήσουν δια-ποικιλιακά τμήματα σε δύο ποικιλίες και είναι η πρώτη φορά που δημοσιοποιείται εφαρμογή αυτής.

2) ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΣΤΗΡΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗ PCR ΜΕ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΕΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Εξαιτίας των εξελίξεων όλων αυτών των υψηλής απόδοσης τεχνολογιών αλληλούχισης, διοχετεύτηκε μεγάλος όγκος πληροφοριών για τις αλληλουχίες DNA γονιδιωμάτων πολλών φυτικών ειδών. Με την προϋπόθεση να συσχετιστούν οι αλληλουχίες DNA με συγκεκριμένους φαινότυπους, έχουν σχεδιαστεί μοριακοί δείκτες με εξειδικευμένες αλληλουχίες (Agarwal *et al.*, 2008).

Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (sequences repeats)

Στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών εκτός από το ρυθμιστικό DNA που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, διακρίνουμε αλληλουχίες που επαναλαμβάνονται σε περισσότερα από ένα αντίγραφα. Αυτές οι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βρίσκονται τυχαία διασκορπισμένες στο γονιδίωμα των περισσότερων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών (Wang *et al.*, 1994). Οι Tautz *et al.* (1993), διέκριναν το επαναλαμβανόμενο DNA σε τρεις κατηγορίες :

Δορυφορικό DNA (satellite DNA)

- Βαθμός επανάληψης : 10^3 - 10^7 ανά γενετικό τόπο
- Μήκος επαναλαμβανόμενων κομματιών : δύο μέχρι μερικές χιλιάδες ζεύγη βάσεων (bp)
- Περιοχή εντοπισμού : Συνήθως στην ετεροχρωματίνη, κυρίως στα κεντρομερή

Μινιδορυφόροι (Minisatellites)

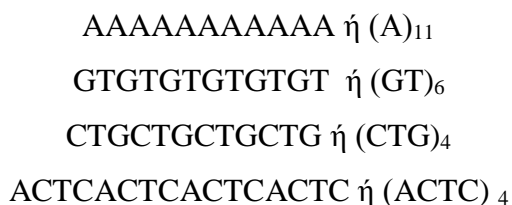
- Βαθμός επανάληψης : δύο έως μερικές εκατοτάδες ανά γενετικό τόπο
- Μήκος επαναλαμβανόμενων κομματιών : εννέα (ή λιγότερα) έως εκατό ζεύγη βάσεων
- Περιοχές εντοπισμού : Διασκορπισμένα αλλά συχνά συγκεντρωμένα στην περιοχή των τελομερών

Μικροδορυφόροι (Microsatellites)

- Βαθμός επανάληψης : πέντε έως εκατό (περίπου) ανά γενετικό τόπο
- Μήκος επαναλαμβανόμενων κομματιών : ένα έως έξι ζεύγη βάσεων
- Περιοχή εντοπισμού : Περισσότερο ή λιγότερο διασκορπισμένα στο γονιδίωμα. Συχνά σε μεταγραφόμενες περιοχές.

ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΙ

Η τυπική αλληλουχία των μικροδορυφόρων αποτελείται από πέντε έως εκατό επαναλαμβανόμενες, εν σειρά, μικρές, απλές αλληλουχίες που αποτελούνται από 1-6 νουκλεοτίδια



Ένα κοινό παράδειγμα είναι η επανάληψη (CA)_n όπου το n διαφέρει μεταξύ των αλληλομόρφων. Αυτοί οι δείκτες συχνά παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ένδο- και έσω-πολυμορφισμού, κυρίως όταν οι μικρές επαναλήψεις είναι μικρότερες από δέκα (Queller *et al.*, 1993). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και ως simple sequence repeats (SSRs), short tandem repeats (STRs) ή και variable number tandem repeats (VNTRs).

Οι μικροδορυφόροι βρίσκονται τυχαία διασκορπισμένοι μέσα στο γονιδίωμα των οργανισμών, κυρίως σε μη-κωδικές περιοχές του DNA και αντιπροσωπεύουν μία κύρια πηγή γενετικής παραλλακτικότητας (Schlotterer, 2000). Με την τεχνική της PCR, μπορούν να ενισχυθούν και να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες για μελέτες συγγένειας (Sefc *et al.*, 2001), διακύμανσης των πληθυσμών καθώς και για εξαγωγή εξελικτικών συμπερασμάτων (Goldstein, 1995b). Λόγω του ότι είναι συγκυρίαρχοι, σε αντίθεση με τους δείκτες της μεθόδου RAPDs, επιτρέπουν τη διάκριση των ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών ατόμων. Το προφίλ των μικροδορυφόρων αντιπροσωπεύεται με το μέγεθος των αλληλομόρφων που ανιχνεύονται στην εξεταζόμενη γενετική περιοχή και δίνεται σε ζεύγη βάσεων (Sefc *et al.*, 2001).

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη ταυτοποίηση ειδών και τη μελέτη γενετικών σχέσεων στα περισσότερα φυτικά και ζωικά είδη.

Φυσικοχημικές και γενετικές ιδιότητες των μικροδορυφόρων

Σύμφωνα με τον Goldstein (1995a), οι μικροδορυφόροι εμφανίζουν μεγάλο ρυθμό μεταλλάξεων αλλά δεν έχουν καμία επίδραση στο φαινότυπο του φυτού. Οι Levinson και Gutman (1987) μελέτησαν το φαινόμενο των μεταλλάξεων των μικροδορυφόρων και αναφέρουν ότι λαμβάνουν χώρα κατά τον διπλασιασμό του DNA.

Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που δημιουργεί διακύμανση στο μήκος των τόπων αυτών είναι το μη αναγνωρίσιμο, μη συμπληρωματικό “ζευγαρωμα” των δύο αλυσίδων κατά την αντιγραφή (slipped-strand mispairing). Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων προσθέτει ή αφαιρεί ένα μικρό αριθμό αλληλουχιών. Συνήθως προστίθενται μία ή δύο απλές αλληλουχίες (Moxon *et al*, 1999a;1999b; Goldstein *et al*, 1995a; Schlotterer *et al*, 1992; Tachida and Iizuka, 1992; Harding *et al.*, 1992).

Ένας άλλος μηχανισμός που σχετίζεται με τις μεταλλάξεις στους μικροδορυφόρους είναι οι ανασυνδυασμοί των μορίων DNA από άνισες χιασματυπίες κατά τη διάρκεια της μείωσης. Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί πιο δραστικές αλλαγές στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων περιοχών (Goldstein, 1995a).

Όσον αφορά στο ρυθμό μετάλλαξης των μικροδορυφόρων, έχει προταθεί ότι συσχετίζεται με το μέγεθος της επαναληπτικής ακολουθίας και τη σύνθεσή της. Οι Levinson και Gutman (1987) υποστηρίζουν ότι οι τετρανουκλεοτιδικές αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA είναι πιο ευμετάβλητες από τις δινουκλεοτιδικές.

Περιορισμοί των μικροδορυφορικών δεικτών

Ενώ οι μικροδορυφόροι έχουν αποδειχτεί αξιόπιστοι μοριακοί δείκτες και κυρίως για αναλύσεις πληθυσμών, παρ’ όλα αυτά έχουν κάποια μειονεκτήματα. Οι μικροδορυφόροι που σχεδιάστηκαν για συγκεκριμένα είδη μπορούν πολύ συχνά να εφαρμοστούν και σε στενά συνδεδεμένα είδη αλλά το ποσοστό των γενετικών τόπων που ενισχύονται με επιτυχία μειώνεται όσο αυξάνονται οι γενετικές αποστάσεις. Σε τέτοια είδη, οι σημειακές μεταλλάξεις στα σημεία που αποδιατάσσεται ο εκκινητής μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσία μηδενικών αλληλομόρφων και κατά συνέπεια και οι μικροδορυφόροι δεν ενισχύονται στην PCR (Dakin and Avise, 2004; Jarne and Lagoda, 1996).

Τα μηδενικά αλληλόμορφα μπορούν να συμβάλλουν σε διάφορα φαινόμενα. Οι διαφορές στις αλληλουχίες σε “πλευρικές περιοχές” μπορούν να οδηγήσουν σε μη κανονική αποδιάταξη των εκκινητών, κυρίως στο 3’ άκρο, απ’ όπου αρχίζει η επιμήκυνση. Η αποτυχία της PCR μπορεί να οφείλεται στην μη ενίσχυση κάποιων σημείων, ενώ άλλα να ενισχύονται πιο αποτελεσματικά και μπορεί στην πηκτή να εμφανιστούν ως ετεροζυγωτά ενώ στο γονιδίωμα να είναι ομοζυγωτά. Τα μηδενικά αλληλόμορφα προκαλούν σύγχυση στην ερμηνεία των συχνοτήτων των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων και έτσι καθιστούν την εκτίμηση των σχέσεων εσφαλμένη.

Ακόμα, γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά το ζευγάρωμα μπορούν να αλλάξουν τη συχνότητα των αλληλομόρφων με τον ίδιο τρόπο που επηρεάζουν τα μηδενικά αλληλόμορφα, μία μεγαλύτερη συχνότητα ομοζυγωτών που προκαλεί παρεκκλίσεις από το αναμενόμενο ισοζύγιο Hardy-Weinberg. Είναι πολύ σημαντικό να είναι σαφής η αιτία εμφάνισης περισσότερων ομοζυγωτών.

Οι μεταλλάξεις στα μικροδορυφορικά αλληλόμορφα συμβαίνουν όχι μόνο στα μεγαλύτερα σε μήκος αλληλόμορφα (περισσότερες βάσεις άρα και πιο πιθανόν να μη μεταφραστούν σωστά κατά την αντιγραφή), αλλά και στα μικρότερα. Τα μικρότερα έχουν την τάση να μεγαλώνουν και τα μεγάλα να μικραίνουν. Αν υπάρχει μεγάλη διαφορά μήκους σε ανεξάρτητα αλληλόμορφα, τότε πιθανόν να υπάρχει αυξημένη αστάθεια κατά τη διάρκεια του ανασυνδυασμού στη φάση της μείωσης. (Jarne and Lagoda, 1996)

Αξιοποίηση των μικροδορυφορικών δεικτών στο *Vitis*

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, που βρίσκονται σε περίσσεια στο γονιδίωμα της αμπέλου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για τη γενετική χαρτογράφηση της αμπέλου και την ταυτοποίηση των ποικιλιών του *Vitis vinifera*. Οι δείκτες αυτοί ανιχνεύουν υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας (69%-88%) μεταξύ των ατόμων της ίδιας ποικιλίας και μεγάλη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ποικιλιών.

Πρώτοι οι Thomas *et al.* (1993; 1994) ανακάλυψαν τη χρήση του επαναλαμβανόμενου DNA για την ταυτοποίηση των ποικιλιών της αμπέλου, και έδειξαν ότι τα μικροδορυφορικά αλληλόμορφα μπορούν να κληρονομηθούν κατά τον

συγκυρίαρχο Μενδελικό τρόπο, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητά τους για γενετική χαρτογράφηση και για γενετική συγγένεια (Sefc *et al.*, 2001).

Μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν σχεδιαστεί σε αρκετά εργαστήρια (Thomas and Scott, 1993; Bowers and Meredith, 1996; Sefc *et al.*, 1999; Bowers *et al.*, 1999b; Pellerone *et al.*, 2001; Lefort *et al.*, 2001; Merdinoglu *et al.*, 2005) και τα πειράματα αφορούσαν καλλιεργούμενες ποικιλίες από τις αντίστοιχες περιοχές (Αυστραλία, Καλιφόρνια, Κεντρική Ευρώπη, Καλαβρία και Σικελία). Οι Thomas *et al.*, (1994), σχεδίασαν και αυτοί κάποιους χρήσιμους SSR δείκτες. Ωστόσο, για να έχει μεγαλύτερη χρησιμότητα ο δείκτης στην κοινότητα της αμπελουργικής έρευνας, το 1997 έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μεγάλου αριθμού μικροδορυφορικών δεικτών για χαρτογράφηση του γονιδιώματος του *Vitis* από το *Vitis* Microsatellite Consortium (VMC). Αυτή η παγκόσμια συνεργασία είχε ως αποτέλεσμα το σχεδιασμό 333 καινούργιων δεικτών *Vitis* από μία εμπλουτισμένη γονιδιακή βιβλιοθήκη μικροδορυφόρων. Ο συνεταιρισμός σχεδίασε επίσης το ίδιο χρονικό διάστημα 700 μοναδικές DNA αλληλουχίες του γονιδιώματος του *Vitis vinifera* (Sefc, *et al.*, 2001). Όλες οι αλληλουχίες των δημοσιευμένων εκκινητών για SSR δείκτες αμπέλου είναι διαθέσιμες από την ελληνική βάση δεδομένων *Vitis* (Lefort και Roubelakis-Angelakis, 2000).

Ταυτοποίηση των ποικιλιών που ανήκουν στο *Vitis vinifera* και των υποκειμένων που ανήκουν στο είδος *Vitis* με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών

Η αρχική μελέτη των μικροδορυφόρων στην άμπελο από τους Thomas και Scott (1993) στο CSIRO Plant Industry της Αυστραλίας, αναφέρει την ταυτοποίηση 26 ποικιλιών του είδους *Vitis vinifera* και 6 επιπρόσθετων ειδών του γένους *Vitis* και έγινε η βάση για περαιτέρω εξελίξεις. Σιγά σιγά καταχωρήθηκαν πάνω από 80 γονότυποι και δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων με το προφίλ του μικροδορυφορικού DNA περίπου 200 γονοτύπων (Thomas *et al.*, 1994).

Οι ηλεκτροφορητικοί φαινότυποι που προκύπτουν από τη μικροδορυφορική ανάλυση μπορούν να εκφραστούν με τη μορφή μήκους σε ζεύγη βάσεων, συνεπώς η ερμηνεία τους είναι σχετικά εύκολη. Τα αποτελέσματα της μικροδορυφορικής ανάλυσης μπορούν να αναπαραχθούν και να συγκριθούν σε διαφορετικά εργαστήρια ή σε

διαφορετικές περιόδους αποδεικνύοντας με αυτό το τρόπο την αξιοπιστία της μεθόδου (Sefc *et al.*, 2001).

Εξαιτίας της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας της μικροδορυφορικής ανάλυσης, η εύρεση δύο ταυτόσημων γονότυπων δύο διαφορετικών ατόμων, αποτελεί απόδειξη ότι τα άτομα αυτά είναι η ίδια ποικιλία. Συνεπώς, η μικροδορυφορική ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει την ταυτότητα μιας ποικιλίας και για να ταυτοποιήσει μία άγνωστη ποικιλία συγκρίνοντας το γονότυπο της με αναφερόμενους γονότυπους από βάσεις δεδομένων (Sefc *et al.* 2001) .

Η εφαρμογή των μικροδορυφορικών δεικτών για τη διάκριση και ταυτοποίηση ποικιλιών και υποκειμένων της αμπέλου έχει περιγραφεί σε αρκετές εργασίες π.χ. Thomas and Scott, 1993; Thomas *et al.*, 1994; Cipriani *et al.*, 1994; Bowers *et al.*, 1996; Sefc *et al.*, 1998; Labra *et al.*, 2002, Ramezani *et al.*, 2009).

Οι Sefc *et al.*, (2000) μελετώντας ποικιλίες από διαφορετικές περιοχές της Ευρώπης, με βάση την παρατηρούμενη γενετική διαφοροποίηση, θεώρησαν ότι οι ποικιλίες πιθανόν να μπορούν να συσχετιστούν με την περιοχή προέλευσής τους σύμφωνα με τους γονότυπούς τους. Αυτό θα μπορούσε να επιτρέψει τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης ποικιλιών με άγνωστο υπόβαθρο. Στην πράξη, το εφάρμοσαν για ποικιλίες από περιοχές υψηλής διαφοροποίησης όπως Αυστρία και Πορτογαλία.

Οι Nunez *et al.*, (2004) δημιούργησαν μία βάση δεδομένων από ποικιλίες που καλλιεργούνται στην περιοχή “El Bierzio” της Ισπανίας και ταυτοποίησαν με μικροδορυφορικούς δείκτες το 98.6% των γονοτύπων που συλλέχθηκαν από την περιοχή αυτή.

Οι Masi *et al.*, (2004) μελέτησαν το μικροδορυφορικό προφίλ των ποικιλιών Sangiovese και Cabernet Sauvignon καθώς και των F₁ απογόνων που προήλθαν από τη διασταύρωση. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, η μικροδορυφορική ακολουθία των προϊόντων της PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της φύσης του πολυμορφισμού που ανιχνεύεται στις μικροδορυφορικές περιοχές του *Vitis vinifera*.

Οι Hvarleva *et al.*, (2004) μελέτησαν το γονιδίωμα ποικιλιών αμπέλου από τη Βουλγαρία αναλύοντας 74 ποικιλίες οινοποιίας και επιτραπέζιας χρήσης χρησιμοποιώντας εννέα μικροδορυφορικούς δείκτες. Ο υψηλός βαθμός γενετικής ποικιλομορφίας (78%) επέτρεψε την ακριβή ταυτοποίηση και διάκριση των ποικιλιών.

Επίσης, οι Hvarleva *et al.*, (2005), ταυτοποίησαν και διαχώρισαν τις 12 υπό μελέτη κυπριακές ποικιλίες.

Οι Pinto-Carnide *et al.*, (2003) ταυτοποίησαν 12 ποικιλίες αμπέλου από τη βόρεια Πορτογαλία ενώ οι Martin *et al.*, (2003) και Lopez *et al.*, (2009) ταυτοποίησαν αυτόχθονες ποικιλίες της Ισπανίας.

Οι Karatas *et al.*, (2007) με έξι μικροδορυφορικούς δείκτες προσπάθησαν να βρουν τις σχέσεις μεταξύ ομώνυμων ποικιλιών από διαφορετικές περιοχές της Ν.Α. Τουρκίας και βρήκαν ότι μεταξύ των περισσότερων ομώνυμων ποικιλιών υπήρχε μεγάλος βαθμός γενετικής ποικιλομορφίας.

Το 2005 οι Martinez *et al.*, χρησιμοποίησαν έξι μικροδορυφορικούς δείκτες για να εκτιμήσουν τη γενετική ποικιλομορφία και τις σχέσεις μεταξύ 25 αυτόχθονων ποικιλιών από το Περού και την Αργεντινή. Οι ποικιλίες ομαδοποιήθηκαν με βάση κοινά μορφολογικά και οινολογικά χαρακτηριστικά παρά με την γεωγραφική τους προέλευση.

Υπήρχαν και περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η χρήση DNA από ράγες, σταφίδες, ξύλο ή κρασί. Από τον ξυλώδη ιστό είναι αναγκαία η εξαγωγή DNA όταν το δείγμα υπό εξέταση είναι εμβολιασμένο υποκείμενο (Bourquin *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 1998).

Συνώνυμα

Η μικροδορυφορική ανάλυση μπορεί επιπρόσθετα να εφαρμοστεί και για την επιβεβαίωση των συνωνύμων, μπορούν δηλαδή να ανιχνευτούν ταυτόσημοι γονότυποι που είναι γνωστοί με διαφορετικά ονόματα. Η ταυτοποίηση ποικιλιών που παρουσιάζονται με διαφορετικά ονόματα, είναι μεγάλης σπουδαιότητας σε συλλογές γενετικού υλικού, όταν πρέπει να διατηρείται η μέγιστη γενετική ποικιλομορφία, ενώ ο αριθμός των ποικιλιών πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Για αρκετές ποικιλίες, συνώνυμα έχουν υποπτευθεί ή ληφθεί βάσει αμπελογραφικών παρατηρήσεων και μπορούν να επιβεβαιωθούν με τη μικροδορυφορική ανάλυση (Cipriani *et al.*, 1994; Botta *et al.*, 1995; Bowers *et al.*, 1996; Sefc *et al.*, 1998; Maletic *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 1999; Lefort *et al.*, 2000a; Crespan and Millani, 2001; Schneider *et al.*, 2001).

Η μελέτη των Hvarleva *et al.*, (2004) επιβεβαίωσε τα συνώνυμα Tamyanca, Μοσχάτο λευκό Ιταλίας και Μοσχάτο Κέρκυρας καθώς και τα Παμίδι και Pamid ενώ απέρριψε τα υποτιθέμενα συνώνυμα Manrud και Μαυρούδι Αραχώβης. Το 2005

επιβεβαίωσαν την συνωνυμία της κυπριακής Μαλάγας και του Muscat of Alexandria, της κυπριακής Λέφκας και του ελληνικού Βερτζαμι όπως και του κυπριακού Μοσχάτου, Tamyanka Βουλγαρίας και Moscato Bianco Ιταλίας.

Οι Cipriani *et al.*, (1994) επιβεβαίωσαν τα συνώνυμα Refosco di Faedis και Refoscone ενώ οι Botta *et al.*, 1995 τα Favorita, Pigato και Vermentino. Οι Bowers *et al.*, (1996) επιβεβαίωσαν ότι η ποικιλία Keshmesh είναι συνώνυμη με την Thomson seedless και η Dattier με την ποικιλία Ραζακί.

Οι Zulini *et al.*, (2002) επιβεβαίωσαν τα συνώνυμα Regina/Mennavacca Porcinale/Porcinaρα ενώ υποστήριξαν ότι οι ποικιλίες Porcinale /Porcinara και Negro δεν είναι συνώνυμα. Στην ίδια μελέτη απέδειξαν ότι η ποικιλία Victoria προήλθε από τη διασταύρωση Cardinal x Afuz και η Matilde από την Italia x Cardinal.

Στη νοτιοανατολική Αυστρία, υπήρχε μια υποψία για την ποικιλία που καλλιεργείτο με την ονομασία Morillon, ότι είναι συνώνυμη με την ποικιλία Chardonnay, και η μικροδορυφορική ανάλυση έδειξε δύο πανομοιότυπες ζώνες (Sefc *et al.*, 1998).

Οι Maletic *et al.*, (1999) εκτός του ότι έδειξαν ότι οι κροατικές ποικιλίες Plavina και Brajdica είναι συνώνυμες, σύγκριναν γονότυπους που λήφθηκαν από κροατικές ποικιλίες με εκείνους από γειτονικές χώρες και βρέθηκαν κάποια συνώνυμα όπως για παράδειγμα η ποικιλία Teran από την Ίστρια της Κροατίας με την Bijeli Prosecco της Β. Ιταλίας. Επίσης, απέρριψαν τη θεωρία ότι η κροατική ποικιλία Hrvatica είναι ταυτόσημη με την ιταλική Croatia και αυτό γιατί η μικροδορυφορική ανάλυση έδειξε να διαφέρουν σε αρκετούς γενετικούς τόπους

Κλώνοι

Η από πολλών αιώνων καλλιέργεια της αμπέλου, οι φυσικές ή τεχνητές διασταυρώσεις και οι μεταλλαγές που συσσωρεύτηκαν κατά την πορεία αυτή, εξηγούν την υψηλή γενετική ετερογένεια των ποικιλιών αμπέλου και την πολυκλωνικότητά τους. Ενώ η διάκριση των ποικιλιών μπορεί να επιτευχθεί σε διαφορετικό βαθμό με όλα τα αναφερόμενα συστήματα των μοριακών δεικτών, ωστόσο δεν είναι πολύ πιθανό να ανιχνευθεί πολυμορφισμός μεταξύ διαφορετικών κλώνων από μία ποικιλία με κάποιον από τους γνωστούς δείκτες (Thomas και Scott, 1993; Botta *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 1995; Sefc *et al.*, 1998).

Τόσο η αμπελουργική εμπειρία όσο και η αμπελουργική έρευνα σε συνδυασμό με την εξέλιξη του ειδικού κλάδου της Αμπελογραφίας έχουν συμβάλει σημαντικά στη διερεύνηση του φαινομένου της πολυκλωνικής προέλευσης των ποικιλιών αμπέλου και την ύπαρξη σημαντικής ετερογένειας μεταξύ και κυρίως, εντός των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου. Σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης του DNA που βασίζονται στη χρήση μοριακών δεικτών μπορούν να παρέχουν αντικειμενικές πληροφορίες για τη γενετική ετερογένεια των κλώνων μιας συγκεκριμένης ποικιλίας και είναι σε θέση να επιβεβαιώσουν ή να απορρίψουν την πολυκλωνική προέλευση μιας θεωρούμενης πολυκλωνικής ποικιλίας (Silvestroni *et al.*, 1997).

Σε πείραμα που διεξήχθη από τους Silvestroni *et al.*, (1997) διακρίθηκαν δύο διαφορετικοί μικροδορυφορικοί γονότυποι μεταξύ κλώνων της ποικιλίας Fontana με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών. Επιβεβαιώθηκε ότι η ποικιλία Fontana είναι πολυκλωνικής προελεύσεως και στην πραγματικότητα αποτελείται από δύο ξεχωριστές ποικιλίες. Επίσης, αποδείχθηκε ότι οι δύο ομάδες των κλώνων έχουν στενή συγγένεια και πρέπει να είχαν προέλθει από τη διασταύρωση ενός γονέα με το σπορόφυτο που προέκυψε από την αυτογονιμοποίησή του.

Άλλα πειράματα που αφορούν τη διαπίστωση ή όχι κλώνων έγιναν από τους: Bourquin *et al.*, 1992; 1995; Collins and Simons, 1993; Jean-Jacques *et al.*, 1993; Cipriani *et al.*, 1994; Bowers *et al.*, 1996; Loureiro *et al.*, 1998; Sefc *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 1998; Riaz *et al.*, 2002; Regner *et al.*, 2000.

Μικροδορυφόροι οργανιδίων

Τα γονιδιώματα φυτικών οργανιδίων όπως το χλωροπλαστικό και μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε μελέτες δομής γενετικών πλυθησμών και για εύρεση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ φυτών. Λόγω το ότι μεταδίδονται μόνο από τον ένα γονέα, τα μιτοχονδριακά και χλωροπλαστικά γονιδιώματα παρουσιάζουν διαφορετικά σχέδια/πρότυπα γενετικών διαφοροποιήσεων, σε σύγκριση με τα πυρηνικά αλληλόμορφα. Κατά συνέπεια, για καλύτερη κατανόηση των φυτικών πληθυσμών, διαφοροποιήσεων και εξελίξεων, πρέπει να ληφθούν υπ' όψη τρία συσχετιζόμενα γονιδιώματα, οπότε εκτός των πυρηνικών μικροδορυφόρων, έχουν αναπτυχθεί και τεχνικές βασισμένες σε μιτοχονδριακούς και χλωροπλαστικούς μικροδορυφόρους. Οι Arroyo-Garcia *et al* (2002) μελέτησαν τους χλωροπλαστικούς μικροδορυφορικούς

πολυμορφισμούς στα είδη του *Vitis* ενώ οι Grassi *et al.* (2003), μελέτησαν τη γενετική δομή έξι ιταλικών και πέντε ισπανικών πληθυσμών άγριων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* ssp *sylvestris*) με πυρηνική και χλωροπλαστική SSR ανάλυση.

Single nucleotide polymorfism (SNPs)

Οι μονές νουκλεοτιδικές παραλλαγές στην αλληλουχία του γονιδιώματος ανεξάρτητων ατόμων ενός πληθυσμού είναι γνωστές ως SNPs. Αποτελούν τους πιο άφθονους μοριακούς δείκτες στο γονιδίωμα και είναι καθολικοί σε όλα τα γονιδιώματα αν και η παρουσία και διανομή τους ποικίλει ανάμεσα στα είδη. Τα SNPs είναι συνήθως κυρίαρχα στις μη-κωδικές περιοχές του γονιδιώματος. Στις κωδικές περιοχές, ένα SNP είναι είτε μη-συνώνυμο και έχει ως αποτέλεσμα μία αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία, είτε είναι συνώνυμο και δεν αλλάζει/τροποποιεί την αμινοξική ακολουθία. Συνώνυμες αλλαγές μπορούν να τροποποιήσουν το mRNA splicing, με αποτέλεσμα τις φαινοτυπικές αλλαγές. Η υψηλής ευκρίνειας μέθοδοι μελέτης γονοτύπων καθιστούν τα SNPs ιδιαίτερα ελκυστικά για να χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες. Είναι κατάλληλοι για αυτοματοποίηση και χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως άμεση ταυτοποίηση ποικιλιών και σχεδιασμό λεπτομερέστατων γενετικών χαρτών (Agarwal *et al.*, 2008).

Εξελιγμένες τεχνικές των μοριακών δεικτών

Οι εξελίξεις στην τεχνολογία και η αύξηση των πληροφοριών όσον αφορά στο γονιδίωμα οδήγησε στη βελτίωση των τεχνικών με μοριακούς δείκτες. Αυτές οι εξελιγμένες τεχνικές αποτελούν συγχώνευση όλων των πλεονεκτικών χαρακτηριστικών των βασικών τεχνικών καθώς και ενσωμάτωση των τροποποιήσεων των μεθοδολογιών για να αυξηθεί η ευαισθησία και ευκρίνεια για τον εντοπισμό γενετικής ασυνέχειας και ιδιομορφίας.

Πολυμορφισμός κομμένων ενισχυμένων αλληλουχιών (Cleaved amplified polymorphic sequences-CAPS)

Η μεθοδολογία αυτή συνδυάζει τις δύο τεχνικές RFLP και RAPD, (ονομάζεται και PCR-RFLP), ώστε να είναι αποτελεσματική σε περιπτώσεις μικρών ποσοτικά δειγμάτων DNA και να έχει την ικανότητα να διακρίνει μεταξύ γενοτύπων ανάλογα με τη παρουσία

ή απουσία μιας θέσης αναγνώρισης ενός ενζύμου περιορισμού.

Εκκινητές με συντηρητική αλληλουχία χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Ακολούθως, το ενισχυμένο τμήμα πέπτεται με ένζυμο περιορισμού (συνήθως αυτά που αναγνωρίζουν θέσεις 4 βάσεων). Η πρακτική αυτή αυξάνει την πιθανότητα εύρεσης κάποιου πολυμορφισμού μέσα σ' ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA (Χατζόπουλος, 2001).

Sequence characterized amplified regions - SCAR

Οι SCAR μοριακοί δείκτες στηρίζονται στην PCR μέθοδο και αντιπροσωπεύουν τα τμήματα του DNA σε καθορισμένους γενετικούς τόπους που ταυτοποιούνται με PCR, χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές με εξειδικευμένες αλληλουχίες (Paran and Michelmore, 1993)

Randomly amplified microsatellite polymorphisms - RAMP

Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε για να αντισταθμιστούν οι περιορισμοί από τις τεχνικές των μικροδορυφόρων και RAPD (υψηλός και χαμηλός βαθμός πολυμορφισμού αλληλομόρφων αντίστοιχα). Η τεχνική αυτή διαφοροποιείται από τις άλλες, από έναν ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή με 5' προστιθέμενες βάσεις και επαναλήψεις στο 3' και που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση γονιδιωματικού DNA παρουσία ή μη RAPD εκκινητών. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και αφού ο εκκινητής με τις επαναλήψεις είναι σημασμένος, ανιχνεύονται μόνο τα προϊόντα από τον εκκινητή (Wu *et al.*, 1994).

Sequence-related amplified polymorphism - SRAP

Ο στόχος της τεχνικής αυτής είναι η ενίσχυση των ανοικτών αναγνωστικών πλαισίων (ORFs) και στηρίζεται στην ενίσχυση με δύο εκκινητές. Η αλληλουχία των εκκινητών είναι τυχαία, με μήκος 17-21 νουκλεοτίδια. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών με το κεντρικό μέρος (cores) πλούσιο σε AT- ή GC- για ενίσχυση ενδογενών τμημάτων για ανίχνευση πολυμορφισμών (Li and Quiros, 2001).

Target region amplification polymorphism - TRAP

Μία γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος, στηριζόμενη στην PCR, που

χρησιμοποιεί εργαλεία βιοπληροφορικής και EST (expressed sequence tag) βάση δεδομένων για δημιουργία πολυμορφικών δεικτών για στοχευμένες γονιδιακές αλληλουχίες. Απαιτούνται δύο εκκινητές (18 νουκλεοτιδίων). Ο ένας είναι σταθερός και έχει σχεδιαστεί από την EST βάση δεδομένων και ο δεύτερος είναι ένας τυχαίος εκκινητής με AT- ή GC πλούσιο άκρο για να αποδιαταχθεί με ένα ιντρόνιο ή εξόνιο (Hu and Vick, 2003).

Single strand conformation polymorphism -SSCP

Ακόμα μία μέθοδος που στηρίζεται στην PCR μέθοδο. Είναι γρήγορη, απλή και ευαίσθητη τεχνική για ανίχνευση μεταλλάξεων συμπεριλαμβανομένου και αντικαταστάσεις, προσθέσεις, και αφαιρέσεις, σε PCR ενισχυμένα τμήματα DNA (Hayashi, 1993) και χρησιμοποιείται ευρέως για γονιδιακές αναλύσεις και κυρίως για ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (Fukuoka *et al.*, 1994). Το μεγαλύτερο μειονέκτημά της είναι ότι ο σχεδιασμός των δεικτών απαιτεί αρκετά μεγάλη προεργασία, κοστίζει και δεν μπορεί να αυτοματοποιηθεί.

RNA-based μοριακοί δείκτες

Τεχνικές που στηρίζονται στην PCR μέθοδο χρησιμοποιούνται για τη μελέτη διαφορικού RNA με επιλεκτική ενίσχυση των cDNA (complementary DNA).

- cDNA-SSCP
- RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)
- cDNA-AFLP

Transposable elements-based molecular markers

- Retrotransposon-based molecular markers
- Transposable display (TD)
- Inter-MITE polymorphism (IMP)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την πειραματική μελέτη είναι από τον πειραματικό σταθμό Αθαλάσσιας του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (Ι.Γ.Ε) στην Κύπρο. Λήφθηκαν νεαρά φύλλα από 21 ποικιλίες και υποκείμενα τα οποία αφού αριθμήθηκαν διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια αφού λειοτριβήθηκαν με γουδοχέρι και υγρό άζωτο αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Σιριβιτιανό	Φράουλα	Victoria	41B
Φλούρικο Άλωνα	Σκούρο μαύρο	Alfalav	99R
Μοσχάτο μαύρο	Αλωνάρι	Black rose	3309C
Αετονόχι άσπρο	Βαμβακάδα	Ruby seedless	110R
Γιαννούδι	Εφτάκιλο	Barlinka	140R
Κατομυλίτικο	Monucca	Rose	

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με το DNeasy kit της εταιρείας Quiagen.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική μετανάστευσης ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων-ιόντων ή άλλων σωματιδίων της ύλης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Σημαντικά βιολογικά μόρια, όπως τα αμινοξέα, τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα, μπορούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο να μετακινηθούν είτε προς την άνοδο (-) είτε προς την κάθοδο (+) αναλόγως της φύσης του ηλεκτρικού τους φορτίου. Με αυτό τον τρόπο, εκμεταλλεζόμενοι τα διαφορετικά φορτία και μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που υφίστανται την ηλεκτροφόρηση, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους.

Η χαρακτηριστική ιδιότητα των νουκλεϊνικών οξέων που τα καθιστά ικανά να κινούνται σε ένα τέτοιο περιβάλλον είναι το αρνητικό τους φορτίο. Το πορώδες μέσο συνήθως είναι αγαρόζη ή πολυακρυλαμίδη. Στην αγαρόζη διαχωρίζονται ικανοποιητικά τμήματα DNA μήκους μερικών δεκάδων βάσεων έως 20kb. Η αγαρόζη είναι υδατοδιαλυτή σε υψηλή θερμοκρασία και αρχίζει να στερεοποιείται στους 50°C. Διαλυτοποιείται σε διάλυμα ίδιας σύστασης με το ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Η απαιτούμενη ποσότητα αγαρόζης καθορίζεται από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά της πηκτής όσον αφορά τη διαχωριστικότητα των μορίων.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων (kb)
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1.0	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6

Σκοπός αυτής της ηλεκτροφόρησης είναι ο έλεγχος παρουσίας ζώνης ως ένδειξη απομόνωσης DNA.

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 0.8%

1. Κατασκευάζεται το καλούπι και τοποθετείται η χτένα που θα δημιουργήσει τα βοηθία φορτώσεως-πηγαδάκια στα οποία θα τοποθετηθεί το υλικό που απομονώθηκε για ηλεκτροφόρηση.
2. Σε κωνική φιάλη (Erlenmeyer) προστίθενται 50X TAE (διάλυμα ηλεκτροφόρησης), νερό και αγαρόζη.
3. Ζεσταίνεται το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι λίγο πριν το σημείο ζέσεως του διαλύματος.
4. Ανακινείται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και αφήνεται να ηρεμήσει

ωσότου φτάσει περίπου στη θερμοκρασία των 40°C. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκεντρώσεως 10mg/ml με μεγάλη προσοχή. Ανακινείται το διάλυμα μέχρι την πλήρη διασπορά του βρωμιούχου αιθιδίου.

5. Χύνεται το διάλυμα με σταθερή ροή στο καλούπι.
6. Απομακρύνονται οι τυχόν φυσαλίδες που δημιουργούνται με μυτερό αντικείμενο και αφήνεται η πηκτή να πήξει σε πλήρως οριζόντια επιφάνεια.
7. Αφαιρείται η χτένα (εάν είναι δύσκολη η αφαίρεσή της, περιλούνται οι περιοχές επαφής της χτένας με την πηκτή με διάλυμα ηλεκτροφόρησης).
8. Τοποθετείται το καλούπι στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και γεμίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνειά του.
9. Τοποθετούνται τα δείγματα σε πλαστική μεμβράνη (parafilm) υπό μορφή σταγόνων (2μl) και τα ανακατεύουμε με 1μl χρωστικής.
10. Φορτώνονται οι σταγόνες στα πηγαδάκια της πηκτής.
11. Εφαρμόζεται σταθερή διαφορά τάσης μεταξύ των πόλων έτσι ώστε το DNA να κινείται κατά μήκος της επιφάνειας της μεγάλης επιφάνειας της πηκτής (το DNA ως αρνητικά φορτισμένο σώμα (ανιόν), κινείται προς τον θετικό πόλο).

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Για να ποσοτικοποιήσουμε τα δείγματά μας χρειαζόμαστε γνωστές συγκεντρώσεις για να γίνει σύγκριση και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε λφάγο σε διάφορες συγκεντρώσεις.

1. Ο λφάγος από stock είναι 0.3mg/ml και φτιάχνεται ορισμένη ποσότητα των 100ng/μl.
2. Με διαδοχικές αραιώσεις φτιάχνονται οι εξής συγκεντρώσεις : 10ng/μl, 5ng/μl, 2.5 ng/μl, 1.25 ng/μl, 0.625 ng/μl και 0.312 ng/μl.
3. Η ποσοτικοποίηση σε αυτή την περίπτωση γίνεται με 0.5ng, 1ng, 2.5ng, 5ng, 10ng, 20ng, 50ng και 100ng.

Σημείωση : Αποφεύγεται να παίρνονται μικρές ποσότητες με την πιπέτα οπότε είναι προτιμότερο να παίρνονται περισσότερα μl από μικρότερη αραιώση π.χ. για να φτιαχτούν τα 10ng παίρνονται 4μl από την αραιώση 2.5ng/μl αντί 1μl από τα 10ng/μl.

4. Φτιάχεται πολύ λεπτή (περίπου 0.003cm) πηκτή αγαρόζης 0.8%.
5. Τοποθετούνται σταγόνες νερού σε παραφίλμ, αναμιγνύονται με 1μl χρωστική και στη συνέχεια με τον λφάγο.
6. Ξαναγίνεται το ίδιο με τα δείγματα DNA.
7. Τοποθετείται η πηκτή στη συσκευή, φορτώνονται τα δείγματα και εφαρμόζεται σταθερή διαφορά τάσης.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ – Polymerase chain Reaction (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία νέα μέθοδος γρήγορου πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro* και αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA *in vitro* και *in situ*.

Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA: Η μήτρα DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Στη συνέχεια, δύο ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου το οποίο είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg⁺². Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν, χρησιμεύουν εκ νέου ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές.

Τα συστατικά για μία PCR αντίδραση είναι :

- Μήτρα DNA
- Ορθόδρομος εκκινητής (forward primer)
- Ανάστροφος εκκινητής (reverse primer)
- Μίγμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPSs)
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
- DNA πολυμεράση

Εκκινητές

Εκκινητής (forward)/ (reverse)	Αλληλουχία	Θερμοκρασία υβριδισμού (Tm)	Μήκος (bp)	Αναμενόμενο τμήμα
VVS2 (F)	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	57.8	21	129-155
VVS2(R)	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	53	25	
VVS4 (F)	CCATCAGTGATAAAAACCTAATGCC	59.3	24	167-187
VVS4 (R)	CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	60.3	22	
VVMD5 (F)	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	57	20	226-246
VVMD5 (R)	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	50.76	24	
VVMD6 (F)	ATCTCTAACCCCTAAAACCAT	51	20	194-214
VVMD6 (R)	CTGTGCTAAGACGAAGAAGA	55.3	20	
VVMD7 (F)	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	57.3	20	149-172
VVMD7 (R)	CGAACCTTCACACGCTTGAT	57.3	20	
VVMD27 (F)	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	62	27	173-194
VVMD27 (R)	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	60	22	
ssrVrZAG47 (F)	GGTCTGAATACATCCGTAAGTATAT	58.06	25	149-172
ssrVrZAG47 (R)	ACGGTGTGCTCTCATTGTCATTGAC	62.98	25	
ssrVrZAG62 (F)	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	67.9	25	185-203
ssrVrZAG62 (R)	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	66.26	25	
ssrVrZAG79 (F)	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	64.6	25	236-260
ssrVrZAG79 (R)	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	64.6	25	
UCH11 (F)	ATGCCCGAGAAGAGTCGAGAA	59.8	21	220-262
UCH11 (R)	CTGCCGTTTGGGTAAGATGCT	59.8	21	
UCH12 (F)	TTTTATTGAAAAGAAGGA	45.9	19	135-234
UCH12 (R)	TGTGCTTTGTGCTAGATAA	50.2	19	
UCH29 (F)	AAACATGATCTGATGCAGGTGA	56.5	22	207-315
UCH29 (R)	CAACCTGTTGATGAAAGGGAAA	56.5	22	

Πολυμεράση

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η DyNAzyme EXT πολυμεράση της εταιρείας Finnzymes.

Ρυθμιστικό διάλυμα

Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει $MgCl_2$ συνήθως σε συγκέντρωση 15mM. Αν όχι, παρέχεται σε ξεχωριστή συσκευασία πυκνού διαλύματος συγκέντρωσης 25mM. Ικανοποιητική συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} στην αντίδραση θεωρείται 1-4mM, ενώ συνηθέστερη είναι η τελική συγκέντρωση των 1.5mM.

Δεοξυνουκλεοτίδια

Το κάθε ένα νουκλεοτίδιο υπήρχε σε stock των 100mM και για αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα των τεσσάρων αφού πρώτα αραιώθηκαν σε συγκέντρωση 10mM.

Δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA

Για να ελέγξουμε αν η συγκέντρωση του DNA επηρεάζει τα πρότυπα των ζωνών στην πολυακρυλαμίδα, έγινε PCR με όλους τους εκκινητές με διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA σε δύο δείγματα (σταθερά). Επειδή αρκετά δείγματα ήταν αραιά ως προς τη συγκέντρωση σε DNA, η συγκέντρωση στην τελική PCR, αν γινόταν έπρεπε να είναι μικρή. Οπότε και το εύρος συγκεντρώσεων στις δοκιμές επιλέχθηκε να είναι σχετικά μικρό και να αρχίζει από πολύ μικρή συγκέντρωση. Οι δοκιμές έγιναν με τις εξής συγκεντρώσεις : 1ng, 2.5ng, 5ng, 10ng, 15ng και 30ng. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που επιλέχθηκε είναι αυτή που αναφέρεται στον πιο κάτω πίνακα ως “πρώτη θερμοκρασία υβριδισμού”.

Δοκιμές με διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών

Για να ελέγξουμε αν η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών επηρεάζει τα πρότυπα ζωνών στην πολυακρυλαμίδα, έγινε PCR σε δύο δείγματα (σταθερά), με όλους τους εκκινητές σε δύο θερμοκρασίες έκαστος, με συγκέντρωση DNA 5ng.

Εκκινητής	1η θερμοκρασία υβριδισμού (5κύκλους/35κύκλους ή 40κ)	2η θερμοκρασία υβριδισμού (5κύκλους/35κύκλους ή 40κ)
VVMD5	52°C/48°C	52°C/47°C
VVMD6	54°C/50°C	50°C/48°C
VVMD7	54°C/52°C	56°C
VVMD27	58°C/56°C	60°C
VVS2	54°C/52°C	52°C
VVS4	57°C	58°C
UCH11	57°C	58°C
UCH12	48°C/44°C	48°C/45°C
UCH29	54.5°C	55.5°C
ssrVrZAG47	58°C/56°C	58°C
ssrVrZAG62	63°C/60°C	65°C
ssrVrZAG79	62°C	63°C

Σε ένα σωλήνα erpendorf φτιάχνεται το βασικό διάλυμα, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά εκτός του δείγματος. Πρώτα προστίθεται το δις απιονισμένο νερό και ακολούθως το ρυθμιστικό διάλυμα. Ανακατεύονται με την πιπέτα (πιπετάρισμα). Μετά, προστίθεται το μείγμα των δεοξυνουκλεοτιδίων, οι εκκινητές και τελευταία η πολυμεράση φορώντας γάντια. Αναδεύονται πολύ καλά. Η πολυμεράση μέχρι την στιγμή που θα προστεθεί είναι στους -20°C. Γι' αυτό, πριν προστεθεί, ετοιμάζουμε τα σωληνάκια με τα δείγματα. Η πιπέτα πρέπει να ακουμπάει στον πάτο έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων. Μοιράζεται το βασικό διάλυμα στα σωληνάκια με τα δείγματα και αναδεύονται πολύ καλά. Φυγοκεντρώνονται για ένα λεπτό στις 14.000 στρ/λεπτό (rpm) και μετά τοποθετούνται τα δείγματα στον κυκλικό εναλλάκτη θερμότητας (thermal cycler), όπου η διαδικασία διαρκεί από 2.5 έως 4.5 ώρες. Με το τέλος της διαδικασίας τα δείγματα ηλεκτροφορούνται για έλεγχο της επιτυχίας της PCR. Αν δε γίνει αμέσως, τα δείγματα αποθηκεύονται στους -4°C.

Μίγμα αντίδρασης	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Μήτρα DNA		5ng/μl
ρυθμιστικό διάλυμα	10X	1X
dNTPS	10mM	1mM
Πρόσθιος εκκινητής	10μM	1.7μM
Ανάστροφος εκκινητής	10μM	1.7μM
Πολυμεράση	1U/μl	0.5U/μl
ddH ₂ O	συμπληρώνουμε μέχρι τον τελικό όγκο : 30μl	

Συνθήκες ενίσχυσης στον κυκλικό εναλλάκτη θερμότητας

1	Αρχική αποδιάταξη DNA	94°C για 3 λεπτά
2	Αποδιάταξη DNA	94°C για 0.5 λεπτό
3	Υβριδισμός εκκινητών	**°C για 0.5 λεπτό
4	Επιμήκυνση	72°C για 1 λεπτό
5	Σύνολο κύκλων 2→4	40

** θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε εκκινητή

Στις περιπτώσεις που η ενίσχυση έγινε σε δύο φάσεις, π.χ. εκκινητής VVMD6 54°C/50°C, επαναλήφθηκαν τα βήματα 2 έως 4 στους 54°C για 5 κύκλους και μετά πάλι τα βήματα 2 έως 4 στους 50°C για 35 κύκλους.

Ο υβριδισμός των εκκινητών πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ανάλογη με τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, T_m. Ορίζεται ως η θερμοκρασία, στην οποία το 50% των υβριδίων εκκινητή-μήτρας DNA έχει αποχωριστεί. Υπολογίζεται δε, από την παρακάτω εξίσωση :

$$T_m = 69.3^\circ\text{C} + 0.41 \times (\text{G}+\text{C})\% - 650/(\text{μήκος εκκινητή})$$

Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών εξαρτάται από το περιεχόμενο των εκκινητών σε G (γουανίνη) και C (κυτοσίνη) και από το μήκος (αριθμός βάσεων) αυτών. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών κυμαίνεται 2-8°C κάτω (συνήθως) από το T_m των εκκινητών. Ωστόσο δύναται να υπάρχουν διακυμάνσεις ανάλογα με τις ιδιότητες της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Γενικά όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία υβριδισμού από το T_m των εκκινητών, τόσο λιγότερο αυστηρές είναι οι συνθήκες υβριδοποίησης, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη-ειδικών, ανεπιθύμητων, τμημάτων DNA.

Οι ιδιότητες της εκάστοτε χρησιμοποιούμενης πολυμεράσης καθορίζουν τη θερμοκρασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης, καθώς και τη χρονική διάρκεια των παραπάνω σταδίων.

Η θερμοκρασία του κάθε εκκινητή που επιλέχθηκε για την ταυτοποίηση των ποικιλιών φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα :

Εκκινητής	Θερμοκρασία υβριδισμού (5κύκλους/35κύκλους ή 40κ)
VVMD5	52°C/48°C
VVMD6	54°C/50°C
VVMD7	54°C/52°C
VVMD27	58°C/56°C
VVS2	54°C/52°C
VVS4	57°C
UCH11	57°C
UCH12	48°C/45°C
UCH29	54.5°C
ssrVrZAG47	58°C/56°C
ssrVrZAG62	63°C/60°C
ssrVrZAG79	63°C

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Στο συγκεκριμένο αυτό είδος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού το ακρυλαμίδιο το οποίο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μια ευρεία κλίμακα. Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στη δημιουργία αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του εν χρήση ακρυλαμιδίου και η οποία κυμαίνεται μεταξύ 3.5 και 20%. Στις αλυσίδες αυτές ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια NN-μεθυλέν-bis-ακρυλαμιδίου (bis-acrylamide), τα οποία λόγω της δομής τους μπορούν να ενσωματωθούν σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι να δημιουργηθεί πλέγμα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου είναι ένα παράδειγμα καταλυτικής δράσης των ελευθέρων ριζών. Η κατάλυση γίνεται μέσω μίας βάσης, της NNN'N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), αλλά μόνο με τη βοήθεια ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται χημικά με υπερθειικά ιόντα, χάρη στην παρουσία ενός δεύτερου καταλύτη, του Ammonium Persulphate (APS).

Οι πηκτές αυτές είναι πολύ πιο δύσκολες να φτιαχτούν σε σχέση με αυτές της αγαρόζης και επειδή το οξυγόνο επιβραδύνει τη διαδικασία πολυμερισμού πρέπει να χύνονται ανάμεσα σε δύο τζάμια. Ενώ έχουν ένα σχετικά μικρό εύρος διαχωρισμού, παρουσιάζουν υψηλή ευκρίνεια. Όσον αφορά στο DNA, η πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για διαχωρισμό τμημάτων μέχρι 500bp. Ωστόσο, υπό κατάλληλες συνθήκες, τμήματα που διαφέρουν σε μήκος κατά ένα ζεύγος βάσεων διαχωρίζονται εύκολα. Σε αντίθεση με την πηκτή αγαρόζης, χρησιμοποιούνται ευρέως για διαχωρισμό και χαρακτηρισμό μείγμα πρωτεϊνών.

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τέσσερα στάδια :

1. Παρασκευή διαλυμάτων
2. Καθαρισμός τζαμιών
3. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδής
4. Ηλεκτροφόρηση
5. Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Υλικά

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης για πηκτή πολυακρυλαμίδης (στην πειραματική αυτή διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή “LIFE TECHNOLOGIES Gibco BRL Seq. System”) και τα αντίστοιχα τζάμια της συσκευής - ένα μικρό (33cm X 40cm) και ένα μεγάλο (33cm X 42cm).
 - Διαχωριστικά τζαμιών (spacers) (0.35mm)
 - Χτένες για σχηματισμό των βοθρίων φορτώσεως (combs) (2X 25δόντια)
 - Αυτιά
 - Σύριγγες
 - Plexi-glass (λίγο μεγαλύτερο από το μικρό τζάμι)
 - Βάση για στήριξη τζαμιών (π.χ. φελιζόλ)
 - Ταινία
 - Bulldog clips
 - Παροχέα τάσης –Consort

Διαλύματα (Πρωτόκολλο Creste *et al.*, 2001)

	Τελική συγκέντρωση	
97% (v/v) γ-methacryloxy-propyl-trimethoxysilane ή trimethoxysilopropyl-methacrylate Έτοιμο διάλυμα	-	
100% (v/v) οξικό οξύ Έτοιμο διάλυμα	-	
100% (v/v) αιθανόλη Έτοιμο διάλυμα	-	
Οξική αιθανόλη	0.5% (v/v) οξικό οξύ σε 95% (v/v) αιθανόλη	

<p>2%(v/v) dimethyldichlorosilane σε octamethyl cyclo-octasilane Binding solution Έτοιμο διάλυμα δέσμευσης</p>	-	
<p>30% ακρυλαμίδη</p>	<p>29% (w/v) ακρυλαμίδη 1% (w/v) N,N'- methylene bisacrylamide</p>	<p>29gr ακρυλαμίδη και 1gr N,N'-methylene bisacrylamide σε 100mL καθαρό νερό. Καλή ανάδευση και φιλτράρισμα με χαρτί Whatman. Αποθήκευση σε σκουρόχρωμο μπουκάλι στους 4°C. Προσοχή : νευροτοξική ουσία. Διαδικασία μέσα στον απαγωγό.</p>
<p>EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acedic acid/ αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)</p>	0.5M	
<p>TBE (Tris-base, βορικό οξύ, EDTA)</p>	10X TBE, 1X TBE	<p>10X: 10.8gr Tris-base, 5.5gr βορικό οξύ, 4mL 0.5M EDTA, ddH₂O</p>
<p>ουρία : ακρυλαμίδη</p>	<p>6% πολυακρυλαμίδη 7M ουρία</p>	<p>20mL 30% ακρυλαμίδη, 10mL 10X TBE, 42gr ουρία, ddH₂O μέχρι τα 100 mL. Το διάλυμα αυτό μπορεί να φτιαχτεί και ως stock και να αποθηκευτεί στους 4°C .</p>

<p>APS (ammonium persulfate)</p>	<p>20% (v/v)</p>	<p>0.2gr σε 1mL καθαρό νερό . Διατηρείται για πέντε μέρες στους 4°C ή σε aliquots στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα</p>
<p>TEMED (Tetramethylethylenediamine/ NNN'N'- τετρα- μεθυλαιθυλενοδιαμίνη) Έτοιμο διάλυμα</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>Αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα</p>		
<p>ΝΑΟΗ</p>	<p>10mM</p>	
<p>Κυανόλη του ξυλενίου Κυανούν της βρωμοφαινόλης</p>	<p>0.05% [w/v]</p>	<p>Επειδή είναι πολύ μικρές οι ποσότητες φτιάχνουμε stock με μείγμα των δύο χρωστικών (10ml 10X). 0.05gr από κάθε χρωστική σε σωλήνα falcon και συμπληρώνουμε με καθαρό νερό μέχρι τα 10ml. Αραιώνουμε 1:10 (1X).</p>
<p>EDTA/ φορμαμίδιο</p>	<p>20mM EDTA σε 95% (v/v) φορμαμίδιο</p>	<p>80μL από 0.5M EDTA σε 920μL φορμαμίδιο (40mM EDTA σε φορμαμίδιο). 500μL από 40mM EDTA για 1000μL 20mM EDTA</p>

Δείκτες

Τα αναμενόμενα μήκη των αλληλομόρφων είναι της τάξεως των 120-260bp και οι μεταξύ τους διαφορές πολύ μικρές οπότε ο δείκτης που θα χρησιμοποιείτο έπρεπε να δίνει ζώνες με τη μικρότερη δυνατή διαφορά μεταξύ τους. Αρχικά επιχειρήθηκε η δημιουργία ενός δείκτη που να πληρεί τις προϋποθέσεις αλλά μετά από μία σειρά δοκιμών δεν επετεύχθη το επιθυμητό αποτέλεσμα. Μετά από έρευνα αγοράς, το καλύτερο δυνατό που βρέθηκε ήταν ο 10bp DNA ladder της Invitrogen. Στο εργαστήριο υπήρχε ο 50bp DNA ladder της Biolabs New England και χρησιμοποιήθηκε και αυτός για σύγκριση.

Οι δύο αλυσίδες του 10bp DNA ladder είναι όμοιες και αυτό του δίνει τη δυνατότητα να αποδιαταχθεί. Η μονή αλυσίδα μπορεί να ηλεκτροφορηθεί σε πηκτή ουρίας-πολυακρυλαμίδης 6-8%. Για την αποδιάταξή του απαιτείται ένα αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα : 95% (v/v) φορμαμίδιο, 10mM EDTA και 0.1% (w/v) χρωστικών κυανούν της βρωμοφαινόλης και κυανόλη του ξυλενίου. Για την ηλεκτροφόρηση προστίθεται ίσος όγκος μ' αυτόν της PCR αντίδρασης (1:1) και πριν την ηλεκτροφόρηση απαιτείται θέρμανση στους 70°C για πέντε λεπτά.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

1. Πλένονται τα τζάμια με σαπουνάδα πολύ καλά και ξεπλένονται αρχικά με νερό βρύσης και μετά με ddH₂O. Το μικρό τζάμι στο οποίο θα γίνει η δέσμευση, πρέπει να είναι πάρα πολύ καθαρό.

2. Αφήνονται στον απαγωγό (hood) να στεγνώσουν. Τοποθετούνται όρθια και με την 'καλή' πλευρά να βλέπει προς το εσωτερικό του απαγωγού για αποφυγή επικόλλησης ακαθαρσιών. Σημαδεύεται η καλά πλευρά για να είναι αναγνωρίσιμη τις επόμενες φορές. Οι χειρισμοί από δω και πέρα γίνονται με γάντια μέσα στον απαγωγό .

3. Τοποθετείται το μικρό τζάμι στο φελιζόλ (παράλληλα) με την καλή πλευρά να κοιτάει προς τα πάνω. Σε ένα erpendorf αναμιγνύονται νερό και καθαρό οξικό οξύ. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται καθαρή αιθανόλη, η πιο πάνω ποσότητα οξικού οξέος και το trimethoxysilopropyl-methacrylate (binding solution). Ανακατεύονται καλά και απλώνεται το διάλυμα με χαρτί πάνω στο τζάμι έως ότου αρχίσει να στεγνώνει και να δημιουργεί λεπτό στρώμα. Προσοχή να μην αφαιρεθεί μεγάλη ποσότητα από το διάλυμα γιατί δεν θα γίνει επιτυχής η επικόλληση της πηκτής πάνω στο τζάμι. Αφήνεται να

στεγνώσει όπως στο βήμα 2. Αλλάζονται γάντια.

4. Τοποθετείται το μεγάλο τζάμι στο φελιζόλ (παράλληλα) και με χαρτί απλώνεται σε όλη την επιφάνεια 1mL από το διάλυμα dimethyldichlorosilane octamethyl cyclo-octasilane (υποβοηθά στην ξεκόλληση της πηκτής) έως ότου αρχίσει να δημιουργεί λεπτό στρώμα. Αφήνεται να στεγνώσει. Αλλάζονται γάντια.

5. Τοποθετείται με προσοχή το μεγάλο τζάμι σε πάγκο με την καλή πλευρά να κοιτάει προς τα πάνω. Τοποθετούνται στις δύο άκρες τα διαχωριστικά και με προσοχή τοποθετείται το μικρό τζάμι από πάνω με την καλή πλευρά να βλέπει προς το μεγάλο τζάμι. Τα δύο τζάμια πρέπει να είναι ευθυγραμμισμένα στο πλάι και από κάτω. Ενώνονται τα δύο τζάμια με ταινία με ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να μην υπάρχουν κενά για διαρροή και συγκρατούνται με πιαστράκια. Εκεί που τελειώνει το μικρό τζάμι, μπαίνουν τα αυτιά και αν χρειάζεται να κολληθούν στο τζάμι, γίνεται με τη βοήθεια βαζελίνης. Τοποθετούνται τα τζάμια σε επικλινή θέση (ακουμπώντας στο φελιζόλ).

6. Φτιάχνεται διάλυμα ουρίας:ακρυλαμίδης. Σε ένα πίκερ (με μαγνητάκι) αναμιγνύονται νερό και ουρία. Αφήνονται στον αναδευτήρα και αφού διαλυθεί η ουρία, προστίθενται TBE και διάλυμα ακρυλαμίδης. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι την τελική ποσότητα. Προστίθενται APS και TEMED. Δεν αφήνονται πολύ ώρα να αναδεύονται γιατί πήζει το διάλυμα.

7. Χωρίς καθυστέρηση, χύνεται το διάλυμα με σύριγγα στο κενό ανάμεσα στα τζάμια με προσοχή και με σταθερή ροή για να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Κρατείται με το ένα χέρι η μία γωνία από πάνω με κλίση περίπου 30° ενώ η εκ διαμέτρου αντίθετη γωνία ακουμπάει στον πάγκο. Σε περίπτωση που δημιουργηθούν φυσαλίδες σηκώνονται τα τζάμια πιο ψηλά για να κατέβει η στάθμη ή χτυπιούνται απαλά τα τζάμια με το δάκτυλο ή πιπέτα. Σε περίπτωση που οι φυσαλίδες δημιουργηθούν κοντά στο άνοιγμα των τζαμιών, τραβιούνται με τη χτένα προς τα έξω. Αφήνονται τα τζάμια να ακουμπήσουν στο φενιζόλ (περίπου 5° κλίση).

8. Τοποθετούνται οι χτένες ανάποδα (η ευθεία πλευρά μέσα στο υγρό εκτοπίζοντας έτσι κάποια ποσότητα). Οι χτένες μπαίνουν μέσα στο διάλυμα της πηκτής μέχρι το σημείο που αφού πολυμεριστεί, να σχηματίζεται τέτοιος χώρος ώστε αφού μπουν οι χτένες από τη σωστή πλευρά να σχηματίζεται το κατάλληλο μέγεθος βοθρίων φορτώσεως. (Οι χτένες, αφού πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα και δημιουργηθεί η πηκτή,

αφαιρούνται καθαρίζονται πολύ καλά με σαπουνάδα και αιθανόλη και ξανατοποθετούνται με τα δόντια μέσα στην πηκτή και σχηματίζουν τα πηγαδάκια). Συγκρατούνται οι χτένες στα τζάμια με πιαστράκια για αποφυγή διαρροής του δείγματος σε διπλανά βοθρία κατά το φόρτωμα.

9. Αν πέσει η στάθμη του διαλύματος συμπληρώνεται έτσι ώστε να βγαίνει έξω από το μικρό τζάμι και αφήνεται για λίγα λεπτά μέχρι το διάλυμα στο σημείο αυτό αρχίζει να πολυμερίζεται

10. Τοποθετείται ένα βρεγμένο χαρτί στην αρχή του μικρού τζαμιού (για ενυδάτωση). Στερεώνονται τα δύο τζάμια με πιαστράκια και καλύπτεται η πάνω πλευρά των τζαμιών με διαφανή μεμβράνη Αφήνεται να πήξει για περίπου έξι ώρες (ή όσο χρειαστεί).

11. Αφαιρούνται η μεμβράνη, το χαρτί, οι χτένες και οι ταινίες και καθαρίζονται πολύ καλά τα τζάμια από τα υπολείμματα, κυρίως στην προεξοχή του μεγάλου τζαμιού, η κάτω πλευρά των τζαμιών καθώς και οι χτένες.

Ηλεκτροφόρηση

1. Τοποθετούνται τα τζάμια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (το μικρό από πίσω για να κλείνει το κύκλωμα) και γεμίζονται οι κατάλληλοι χώροι με 1X TBE. Προσοχή να μην υπάρχει διαρροή από την πάνω δεξαμενή προς την κάτω και τα τζάμια να έχουν στηριχτεί καλά στη συσκευή (γυρνώντας καλά τις βαλβίδες).

2. Καθαρίζεται πολύ καλά η περιοχή που θα μπου οι χτένες από τυχόν υπολείμματα πολυακρυλαμίδης και ουρίας με τη χρήση σύριγγας και χτένας (προσοχή μη καταστραφούν τα δόντια). Τοποθετούνται οι χτένες έτσι ώστε τα δόντια να εισχωρούν στην πηκτή (περίπου 1mm) και απαιτείται προσοχή ώστε να μην μετακινηθούν οι χτένες και δημιουργηθούν σχισμές (για αποφυγή διαρροής των δειγμάτων).

3. Προθερμαίνεται η πηκτή εφαρμόζοντας τάση 50W για περίπου 20λεπτά (ή 35W για 30 λεπτά). Δεν πρέπει να ζεσταθούν πολύ τα τζάμια γιατί μπορεί να ραγίσουν αλλά ούτε και η πηκτή γιατί θα υδρολυθεί. Ξανακαθαρίζεται ο χώρος των χτενών.

4. Παράλληλα γίνεται η ετοιμασία των δειγμάτων. Στο δείγμα προστίθεται αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα. (1:2). Ζεσταίνονται στους 94°C για 3mins και κατευθείαν μπαίνουν σε πάγο έως ότου φορτωθούν. Το ίδιο γίνεται και για τον δείκτη (ladder) με το αντίστοιχο αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (1:1) σε θερμοκρασία 70°C για 5mins.

5. Φορτώνονται ο δείκτης και τα δείγματα. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία οι ποσότητες που φορτώθηκαν ήταν 3μL και 6μL αντίστοιχα. Αν φτάνει ο χώρος είναι προτιμότερο να φορτώνονται σε εναλλάξ πηγαδάκια γιατί υπάρχει συχνά διαρροή από το ένα πηγαδάκι στα διπλανά και επίσης αν γίνεται να φορτωθεί σε δύο θέσεις ο δείκτης (μία στην αρχή και μία στη μέση της πηκτής). Το υπόλοιπο των δειγμάτων και του δείκτη αποθηκεύονται στους -20°C και αν χρειαστεί να ξαναχρησιμοποιηθούν ακολουθούνται κανονικά τα παραπάνω δύο βήματα.

6. Εφαρμόζεται τάση 55W για δύο ώρες. Αν παρατηρηθεί ότι οι ζώνες δε τρέχουν σε ευθεία (smiling) μειώνεται η τάση. Αν το επιτρέπει το πρότυπο των ζωνών είναι δυνατό να φορτωθεί και δεύτερη σειρά. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία, η δεύτερη σειρά φορτώθηκε όταν το σκούρο μπλε χρώμα της χρωστικής (κυανούν της βρωμοφαινόλης) έφτανε τη μέση και η διαδικασία τελείωνε όταν το χρώμα έφευγε από κάτω.

Σημειώσεις

- Η ακρυλαμίδα είναι νευροτοξική. Είναι απαραίτητη η χρήση γαντιών και μασκών κατά το χειρισμό της, είτε είναι σε μορφή σκόνης είτε σε διάλυμα.
- Τα κυριότερα προβλήματα κατά το γέμισμα των τζαμιών με το διάλυμα ουρίας-ακρυλαμίδης είναι οι διαρροές και η δημιουργία φυσαλίδων. Το σημαντικότερο βήμα για τη λύση αυτών των προβλημάτων είναι ο πολύ καλός καθαρισμός των τζαμιών και των διαχωριστικών και αυτό είναι ευκολότερο αμέσως μετά τη χρήση τους. Τα τζάμια πλένονται με απορρυπαντικό και ξεπλένονται με νερό βρύσης. Σκουπίζονται με ένα καθαρό χαρτί κουζίνας και ακολούθως με χαρτί εμποτισμένο με αιθανόλη. Το τζάμι στο οποίο επικολλάται η πηκτή (μικρό), μετά το αρχικό πλύσιμο, σκουπίζεται επιπροσθέτως με χαρτί εμποτισμένο με διάλυμα σιλικοναρίσματος, και αφού στεγνώσει, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Αν έχει χρησιμοποιηθεί κάποιο kit ή επαναχρησιμοποιούμενα υλικά για την ασφάλιση των τζαμιών κατά το γέμισμα, πρέπει να πλυθούν με απορρυπαντικό και ζεστό νερό.
- Οι καλές πλευρές των τζαμιών πρέπει να ξεχωρίζουν έτσι ώστε το σιλικονάρισμα να γίνεται πάντα από την ίδια πλευρά. Σε περίπτωση που αυτό δεν είναι προκαθορισμένο από τον κατασκευαστή, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταινία, μόνιμος μαρκαδόρος,

αυτοκόλλητα τύπου τατουαζ στην εξωτερική πλευρά των τζαμιών.

- Μερικά kit παρέχουν εναλλακτικές μεθόδους σφραγίσματος, όπως ειδικά σχεδιασμένα πιαστράκια για το πλάϊ και ένα δοχείο (αυτό που τοποθετείται στο κάτω μέρος της συσκευής) το οποίο επιτρέπει το σφράγισμα του κάτω μέρους του τζαμιού χρησιμοποιώντας μία λωρίδα χαρτιού με κορεσμένο ακρυλαμίδιο. Αυτά είναι συνήθως πιο εύκολα στη χρήση και πιο αξιόπιστα από ότι η ταινία και τα πιαστράκια.

- Η συγκέντρωση ακρυλαμίδης που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας που θα δώσει ο εκκινητής. Συγκέντρωση 6% είναι κατάλληλη για διάβασμα μεταξύ 25 και 400 νουκλεοτιδίων από τον εκκινητή. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (12-20%) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αλληλουχίες των 50 νουκλεοτιδίων και χαμηλότερες (4 ή 5%) για περισσότερα από 400 νουκλεοτίδια.

- Μερικά πρωτόκολλα προτείνουν απαέρωση του διαλύματος ουρίας/TBE/ακρυλαμίδης αμέσως πριν τη χρήση του για να μειωθούν οι πιθανότητες σχηματισμού φυσαλίδων κατά το γέμισμα των τζαμιών, αλλά αυτό το βήμα δεν είναι απαραίτητο.

- Η φορμαλδεΰδη χάνει τη δραστηριότητά της ταχέως στους 4°C.

- Τυχόν σχίσσιμο της πηκτής ή μη επιτυχής επικόλλησή της στο τζάμι παραπέμπει σε λάθος χειρισμό κατά την προετοιμασία των τζαμιών, που είναι ένα κρίσιμο σημείο της διαδικασίας.

ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Η μέθοδος αυτή έγινε ευρέως γνωστή αφού η σήμανση πρωτεϊνών ή μονής αλυσίδας DNA σε πολυακρυλαμίδη με ραδιενέργεια ή φθορισμό είναι δύο τρόποι που απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό άρα και ακριβό και επίσης είναι χρονοβόροι. Αρχικά η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για εντοπισμό πολυπεπτιδίων σε ηλεκτροφόρηση με πηκτή πολυακρυλαμίδης (Merril *et al.*, 1981) και αργότερα προσαρμόστηκε για εντοπισμό νουκλεϊνικών οξέων (Sommerville και Wang; 1981; Herring *et al.*, 1982; Blum *et al.*, 1987). Το 1982 ο Beidler εφάρμοσε μία μέθοδο εντοπισμού νουκλεϊνικών οξέων με φωτοχημική χρώση νιτρικού αργύρου και από τότε γίνονται διάφορες τροποποιήσεις για να μειωθούν τα βήματα της διαδικασίας, να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, να περιοριστεί η τοξικότητα από τα εν χρήσει συστατικά, να μειωθεί το κόστος και για

βελτίωση της ανάλυσης του DNA ή της μεθόδου διαχωρισμού των τμημάτων του (Bassam *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1993; Sanguinetti *et al.*, 1994).

Διαλύματα

<i>Αρχική συγκέντρωση</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	
100% (v/v) οξικό οξύ (CH₃COOH)	1% και 5% (v/v)	(1%) 10mL CH ₃ COOH + 990mL ddH ₂ O. Με γυάλινη προχοϊδα.
100% (v/v) αιθανόλη (EtOH)	10% (v/v)	100mL EtOH + 900mL ddH ₂ O
65% (v/v) νιτρικό οξύ (HNO₃)	1.5% (v/v)	23mL HNO ₃ + 823mL ddH ₂ O. Με γυάλινη πιπέτα.
Νιτρικός άργυρος (AgNO₃)	0.2% (v/v)	2gr και ddH ₂ O Προσοχή να μη διασκορπιστούν κόκκοι
Διάλυμα εμφάνισης: -όξινο ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) -37%(v/v) φορμαλ-δεΐδη Έτοιμο διάλυμα.	3% (w/v) 19.98% (v/v)	30gr και dd H ₂ O + 0.54mL

Διαδικασία

1. Αφαιρούνται οι χτένες και τα αυτιά.
2. Διαχωρίζονται τα δύο τζάμια βγάζοντας αρχικά τα διαχωριστικά και ακολούθως, τραβώντας προσεχτικά τα τζάμια από τη μία γωνία.
3. Τοποθετείται το μικρό τζάμι στο plexi-glass.
4. Προστίθεται το διάλυμα fixing και αφήνεται για δέκα λεπτά. Αν δεν υπάρχει αναδευτήρας, η ανάδευση γίνεται κουνώντας το δοχείο.
5. Αδειάζεται το περιεχόμενο του δοχείου και ξεπλένονται τα τζάμια με ddH₂O για ένα λεπτό. Ξαναδειάζεται το περιεχόμενο.
6. Προστίθεται το διάλυμα νιτρικού οξέος και ανακινείται το δοχείο για τρία λεπτά.
7. Αδειάζεται το περιεχόμενο του δοχείου και ξεπλένονται τα τζάμια με ddH₂O για ένα λεπτό. Ξαναδειάζεται το περιεχόμενο..
8. Εμποτισμός με νιτρικό άργυρο και αφήνεται για είκοσι λεπτά. Ανακινείται το δοχείο.
9. Αδειάζεται το περιεχόμενο του δοχείου και ξεπλένονται τα τζάμια με ddH₂O για ένα λεπτό δύο φορές.. Ξαναδειάζεται το περιεχόμενο.
10. Προστίθεται το διάλυμα εμφάνισης και ακολουθεί ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες. Αδειάζεται το περιεχόμενο.
11. Διακόπτεται η αντίδραση με 5% οξικό οξύ για πέντε λεπτά.
12. Αδειάζεται το περιεχόμενο, ξεπλένεται το τζάμι με ddH₂O και αφήνεται να στεγνώσει. Όσο στεγνώνει σχηματίζεται ένα λεπτό φιλμ στο οποίο υπάρχουν οι ζώνες.
13. Σκανάρουμε ή φωτογραφίζουμε το φιλμ όσο είναι πάνω στο τζάμι και πριν αφυδατωθεί.

Σημειώσεις

- Οποιοδήποτε υπόλειμμα από αντιδραστήριο, μπορεί να προκαλέσει ένα καφέ υπόβαθρο.
- Το νερό που χρησιμοποιείται κατά τη χρώση πρέπει να είναι πάρα πολύ καθαρό. Εάν είναι μολυσμένο, κυρίως με αλογόνα ή μεταλλικά ιόντα με την τοποθέτηση του νιτρικού αργύρου θα αλλάξει το χρώμα του νερού σε υπογαλακτώδες και το σήμα των ζωνών ενδέχεται να μην εμφανιστεί καθόλου ή να είναι εμφανής μόνο οι ζώνες στο πάνω

μισό της πηκτής.

- Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται διαφορετικά plexi-glass για τη χρώση και την εμφάνιση για αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης από τα δύο διαλύματα. Τα δοχεία για την εμφάνιση είναι προτιμότερο να είναι λευκό.

- Ο χρόνος ξεπλύματος μετά τη χρώση είναι καθοριστικός. Ο χρόνος ανάμεσα στο ξέπλυμα και στην εμφάνιση των ζωνών δεν πρέπει να ξεπερνά τα 5-10s. Αν η πηκτή ξεπλυθεί πολύ τότε δε θα γίνει ικανοποιητική χρώση και οι ζώνες ή δε θα εμφανιστούν καθόλου ή θα έχουν αχνό σήμα. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να ξαναγίνει η χρώση.

- Το διάλυμα εμφάνισης πρέπει να είναι 10°C για να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες χρωματισμού του υπόβαθρου. Ο ρυθμός εμφάνισης των ζωνών είναι πολύ ευαίσθητος στη θερμοκρασία.

- Ο χρόνος εμφάνισης πρέπει να είναι τέτοιος ώστε οι ζώνες να είναι ικανοποιητικά ορατές. Προσοχή να μην χρωματιστούν πολύ γιατί επέρχεται αλλαγή στο πρότυπο.

- Όλη η διαδικασία απαιτεί τη χρήση γαντιών και τα τζάμια να πιάνονται από τις άκρες για αποφυγή τυχόν εμφάνισης αποτυπωμάτων.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Με τη βοήθεια των δύο δεικτών υπολογίζεται το μήκος των αλληλομόρφων και αφού επεξεργαστούν κατάλληλα, χρησιμοποιούνται στο στατιστικό πρόγραμμα NT-SYSTEM, όπου με τη μέθοδο UPGMA (Unweighted Pair Method with Arithmetic mean) βρίσκεται ο βαθμός γενετικής ομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους ποικιλιών. Με βάση τα δεδομένα αυτά σχηματίζεται το φυλογενετικό δέντρο.

Μέσω του προγράμματος IDENTITY 1.0 προσδιορίστηκαν οι εξής γενετικές παράμετροι: ο αριθμός των παρατηρηθέντων αλληλομόρφων, η πιθανότητα ταυτοποίησης (PI), η αναμενόμενη (He) και η παρατηρηθείσα (Ho) ετεροζυγωτία, η συχνότητα εμφάνισης μηδενικών αλληλομόρφων

Δημιουργία ladder που να ανιχνεύει μικρές διαφορές ανάμεσα στα παραγόμενα τμήματα

Η χρήση μικροδορυφόρων έχει ως αποτέλεσμα τα παραγόμενα τμήματα να έχουν μεταξύ τους μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων οπότε για να γίνει η μέτρηση του μεγέθους των παραγόμενων τμημάτων είναι απαραίτητος ένας δείκτης που να ανιχνεύει μικρές διαφορές και αν είναι δυνατόν ανά νουκλεοτίδιο. Μετά από έρευνα αγοράς, το καλύτερο δυνατό που βρέθηκε ήταν ο 10bp DNA ladder της Invitrogen, οπότε σκεφτήκαμε να φτιάξουμε στο εργαστήριο ένα δείκτη που να πληρεί τις προϋποθέσεις.

Η λογική που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλληλούχιση (sequencing) γνωστής ακολουθίας. Μας είναι γνωστή η αλληλουχία dgat οπότε με αλληλούχιση αποτυπώνεται η αλληλουχία ανά νουκλεοτίδιο και με βάση το διάβασμα του μήκους της μπορεί να υπολογιστεί το μήκος των παραγόμενων τμημάτων που τρέχουν στα διπλανά πηγαδάκια.

Στο εργαστήριο υπήρχε ο κλώνος dgat2.3 (1262bp) σε φορέα pGem-Teasy (σύνολο 3.015bp) σε στέλεχος *E.coli*, το DH5a. Οπότε, αφού πρώτα έγινε streaking σε τρυβλίο με υπόστρωμα LB και με αντιβιοτικό επιλογής την αμπικιλίνη (LB/amp), απομονώθηκε μονή αποικία και έγινε καλλιέργειά της σε υγρό υπόστρωμα LB/amp για 12hrs στους 37°C σε αναδευόμενο θάλαμο. Στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης και αφού ποσοτικοποιήθηκε, πρώτα με φωτόμετρο και μετά με λφάγο (το τελευταίο προϋποθέτει πέψη με ένζυμο περιορισμού), υποβλήθηκε σε PCR sequencing με ddNTPS.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *Esherichia coli*

Η απομόνωση πλασμιδίου από βακτήρια *E. coli* δύναται να επιτευχθεί με δύο τρόπους α. με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης και β. με τη μέθοδο του βρασμού. Και στις δύο περιπτώσεις πρέπει να προηγηθεί ανάπτυξη μονής βακτηριακής αποικίας, η οποία περιέχει το επιθυμητό πλασμίδιο, σε θρεπτικό μέσο LB με κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, σε αναδευόμενο θάλαμο, σε θερμοκρασία 37°C για 12-16h. Από αυτήν 1.5ml μεταφέρονται σε σωλήνα erppendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1-2 min. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και η ίδια διαδικασία, προσθήκης βακτηριακής καλλιέργειας και φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται ανάλογα με

τα χαρακτηριστικά του πλασμιδίου και συγκεκριμένα των αριθμό των αντιγράφων του πλασμιδίου σε κάθε βακτηριακό κύτταρο.

Στην παρούσα μελέτη η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αλκαλική μέθοδος, το πρωτόκολλο της οποίας ακολουθεί και αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Birnboim *et al.* (1979) και από τους Ish-Horowicz *et al.* (1981).

1. 1-5ml βακτηριακής καλλιέργειας φυγοκεντρώνται σύντομα με σκοπό την κατακρήμνιση των βακτηριακών κυττάρων
2. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 - 300μl διαλύματος P1 (διατηρείται στο πάγο) και αναδεύεται έντονα (χρήση Vortex)
3. Ακολούθως προστίθενται 200-300μl φρέσκου διαλύματος P2 και το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς αναποδογυρίζοντας το σωλήνα. Το διάλυμα πρέπει να γίνει διαυγές στο στάδιο αυτό. Η διαδικασία της λύσης δεν πρέπει να διαρκέσει πάνω από 5min
4. Με το πέρας ακριβώς των 5min προστίθενται στο μίγμα 200-300μl παγωμένου διαλύματος P3 και αναδεύεται ελαφρώς αναποδογυρίζοντας το σωλήνα, έως ότου φανούν λευκά συσσωματώματα (υπολείμματα των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών)
5. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 - 20min σε θερμοκρασία δωματίου
6. 700-800μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο σωλήνα eppendorf
7. Προστίθενται στο παραπάνω ίσος όγκος ισοπροπανόλης και ακολούθως αναδεύεται ελαφρώς αναποδογυρίζοντας το σωλήνα. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
8. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 - 20min σε θερμοκρασία δωματίου
9. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500μl παγωμένης 70% αιθανόλης
10. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
11. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και αφήνονται οι σωλήνες eppendorfs να στεγνώσουν καλά. Έπειτα επαναδιαλύεται σε επιθυμητό όγκο αποστειρωμένου ddH₂O
12. Φύλαξη στους -20°C

Διαλύματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

• **P1 διάλυμα αλκαλικής λύσης**

50mM Tris – HCl pH = 8.0, 10mM EDTA pH = 8.0, 100μg/ml RNase

• **P2 διάλυμα αλκαλικής λύσης**

1% w/v SDS, 0.2N NaOH

• **P3 διάλυμα αλκαλικής λύσης**

3M CH₃COOK/ 5M CH₃COOH

60ml 5M CH₃COOK, 11.5ml οξικό οξύ, 28.5ml ddH₂O

Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων και σγαιτικά αντιδραστήρια

LB θρεπτικό μέσο

0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl, 1% w/v πεπτόνη. Όταν πρόκειται για στερεό θρεπτικό μέσο, προστίθεται επιπλέον 1.4% w/v άγαρ

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών οξέων έγινε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) στα 240nm, 260nm και 280nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο U-1100 της Hitachi. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm και η συγκέντρωσή τους υπολογίζεται από τον τύπο των Beer-Lambert. Σε μήκος κύματος 280nm απορροφούν οι πρωτεΐνες εξαιτίας κυρίως της περιέχουσας τρυπτοφάνης, ενώ στα 240nm απορροφούν τα φαινολικά παράγωγα. Επομένως ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ αντιπροσωπεύει την καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων. Όπου δεν υπάρχουν προσμίξεις ο λόγος αυτός είναι 2.0, ενώ όταν υπάρχουν προσμίξεις αυτός μειώνεται. Ο λόγος OD₂₄₀/OD₂₆₀ πρέπει να είναι περίπου 0.5.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊνικών γίνεται βάση του παρακάτω τύπου :

$$a \times OD_{260} \times \text{συντελεστής αραίωσης}$$

Όπου :

OD ₂₆₀	η οπτική πυκνότητα στα 260nm								
συντελεστής αραίωσης	η αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει η φασματοφωτομέτρηση								
a	ορίζεται ως η συγκέντρωση που παρατηρείται όταν η OD ₂₆₀ = 1.0 και διαμορφώνεται ως εξής για τα ακόλουθα: <table border="1" data-bbox="797 590 1255 852"> <thead> <tr> <th>Νουκλεϊνικά οξέα</th> <th>a</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNA</td> <td>50mg/ml</td> </tr> <tr> <td>RNA</td> <td>40mg/ml</td> </tr> <tr> <td>Ολιγονουκλεοτίδια</td> <td>20mg/ml</td> </tr> </tbody> </table>	Νουκλεϊνικά οξέα	a	DNA	50mg/ml	RNA	40mg/ml	Ολιγονουκλεοτίδια	20mg/ml
Νουκλεϊνικά οξέα	a								
DNA	50mg/ml								
RNA	40mg/ml								
Ολιγονουκλεοτίδια	20mg/ml								

Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένη ακολουθία DNA και κόβουν εντός ή εκτός αυτής. Διαχωρίζονται δε, σε τρεις τύπους, εκ των οποίων χρησιμοποιούνται κυρίως τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη, παλίνδρομη, αλληλουχία δίκλωνου DNA εντός της οποίας το τεμαχίζουν. Η κάθε περιοριστική ενδονουκλεάση δρα σε συγκεκριμένες συνθήκες (ιοντική ισχύς, pH και θερμοκρασία). Η διαδικασία δράσης των περιοριστικών ενζύμων καλείται πέψη και πραγματοποιείται σε σωλήνες erpendorfs, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Συστατικά	Περιεκτικότητα v/v τελικής αντίδρασης
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	1x
DNA	έως 80% του όγκου αντίδρασης
Ένζυμο περιορισμού	έως 10% του όγκου αντίδρασης
ddH ₂ O	Έως τελικού επιθυμητού όγκου αντίδρασης

Το μίγμα αναμειγνύεται και επωάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία (για τα περισσότερα ένζυμα η θερμοκρασία αυτή είναι 37°C) για ορισμένο χρόνο, ανάλογα με το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιείται.

Εδώ, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού BAMHI με ρυθμιστικά διαλύματα τα NEB και BSA.

Στη συνέχεια, τα πεπτόμενα κομμάτια ποσοτικοποιούνται με λφάγο. Η ποσοτικοποίηση σε αυτή την περίπτωση έγινε με 10ng, 20ng και 50ng.

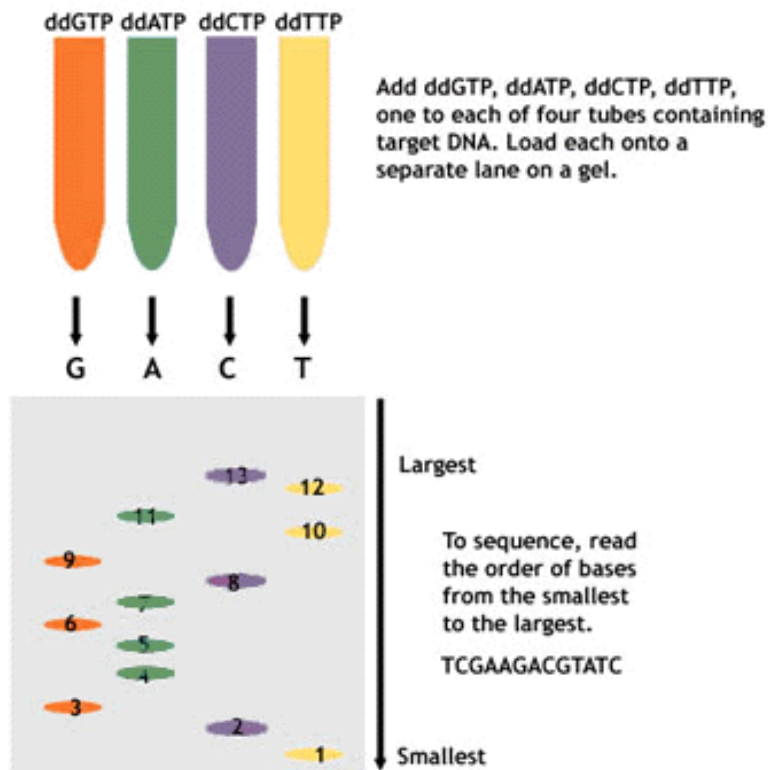
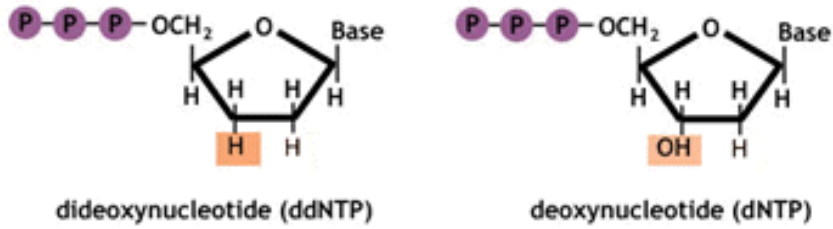
PCR αλληλούχιση με ddNTPs και χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver sequencing)

Η μεθοδολογία της αλληλούχισης έχει χρησιμοποιηθεί με διάφορες παραλλαγές. Οι συμβατικές μέθοδοι των Maxam και Gibert (1977) με χημικό κόψιμο των σημασμένων τμημάτων DNA και των Sanger *et al.*, (1977), με ενζυμική επιμήκυνση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων, παραμένουν οι πιο αξιόπιστες· αλλά σε σύγκριση με τις μοντέρνες μεθόδους απαιτούν πιο εντατική εργασία. Για πιο γρήγορη αλληλούχιση μικρών ποσοτήτων δείγματος διαδόθηκε ευρέως η κυκλική αλληλούχιση (cycle sequencing). Ο Blakesley (1993) εφαρμόζει διδεόξυ αλληλούχιση χρησιμοποιώντας *Taq* πολυμεράση γιατί αυτή είναι ανθεκτική στα πολλαπλά στάδια αποδιάταξης σε υψηλή θερμοκρασία. Αυτό επιτρέπει την επανάληψη σύνθεσης αλυσίδων από την ίδια μήτρα με αποτέλεσμα την ποσοτική αύξηση του παραγόμενου προϊόντος.

Επειδή οι τεχνικές αυτές, απαιτούν τη χρήση ραδιενέργειας, ανακαλύφθηκαν εναλλακτικοί τρόποι σήμανσης, όπως φθορισμός, βιοτίνη, χημειοφθορισμός, διγοξυγενίνη (digoxigenine). Παρ' όλα αυτά δεν προτιμούνται τόσο, γιατί έχουν υψηλό κόστος· είτε για εξειδικευμένο εξοπλισμό, είτε για καταλλήλως τροποποιημένα/σημασμένα νουκλεοτίδια (Wade-Evans, 1996).

Μία από τις κυριότερες τεχνικές αλληλούχισης DNA είναι η αλληλούχιση τερματισμού αλυσίδας (chain reaction sequencing) ή αλλιώς μέθοδος Sanger (από τον εφευρέτη Frederick Sanger) ή αλλιώς διδεόξυ αλληλούχιση. Η τεχνική αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της PCR αλληλούχισης και της χρώσης με νιτρικό άργυρο με την παραλλαγή ότι κατά τη διάρκεια της PCR αλληλούχισης χρησιμοποιούνται εκτός από τα dNTPs και ddNTPs. Οι αλυσίδες του DNA αποτελούνται από dNTPs και κατά τη

διάρκεια της PCR, χρησιμοποιούνται τα dNTPs της αντίδρασης για το σχηματισμό της αλυσίδας. Στα ddNTPs λείπει το -OH στη θέση 3' C και είναι εκεί που γίνεται ο σχηματισμός της αλυσίδας. Κατά συνέπεια η διαδικασία σύνθεσης της αλυσίδας διακόπτεται.



Διαδικασία

1. Φτιάχεται ένα διάλυμα dNTPs με συγκέντρωση 0.3mM (κάθε νουκλεοτίδιο) και ένα διάλυμα ddNTPs 10mM το κάθε ένα νουκλεοτίδιο. Από αυτά φτιάχονται τα αντίστοιχα διαλύματα dNTPs /ddNTPs (4 εppendorfs) με τελικές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα

Συστατικό	Διάλυμα G	Διάλυμα A	Διάλυμα T	Διάλυμα C
ddGTP	45μM	-	-	-
ddATP	-	525μM	-	-
ddTTP	-	-	900μM	-
ddCTP	-	-	-	300μM
dGTP	30μM	30μM	30μM	30μM
dATP	30μM	30μM	30μM	30μM
dTTP	30μM	30μM	30μM	30μM
dCTP	30μM	30μM	30μM	30μM

2. Στα 4 εppendorfs προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα του PCR διαλύματος και αναδεύονται καλά.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	5X
dNTPs	100mM	Βλ. πίνακα
ddNTPs	5mM	Βλ. πίνακα
Πολυμεράση (DyNAzyme™ EXT polymerase, Finnzymes.)	1U/μl	4-5U/μl
Εκκινητής	2μM	5-6pmol*
Μήτρα DNA		0.5-1 pmol **

*Για ssDNA ισχύει 1pmol=(n/3) ng όπου n ο αριθμός των βάσεων 5UTRDGAT₂=23bp

**ανάλογα το είδος του DNA. Η συγκέντρωση είναι πολύ κρίσιμη για την επιτυχία της αντίδρασης. Για προϊόντα PCR συνίσταται η συγκέντρωση των 60-120 fmol, για υπερελικωμένο

πλασμίδιο 1-2pmol και για λ-φάγο ή κοσμίδιο 31fmol. Το υπερελικωμένο πλασμίδιο δίνει ασθενέστερο σήμα από το ήρεμο dsDNA, οπότε απαιτείται περισσότερη ποσότητα.

$$\text{dsDNA: } 1\text{pmol} = n \times (6.6 \times 10^{-4}) \text{ gr} \quad \text{ssDNA: } 1\text{pmol} = n \times (3.3 \times 10^{-4}) \text{ gr}$$

3. Προθερμαίνονται σε κυκλωτή στους 94 °C για 2mins
4. PCR

Στάδιο	Χρόνος
Αποδιάταξη	94 °C για 0.45mins
Υβριδισμός	56 °C για 0.45mins
Επιμήκυνση	72 °C για 1 mins
Επανάληψη κύκλου 59X	

5. Αν δε χρησιμοποιηθούν κατευθείαν αποθηκεύονται στους -20°C.
6. Προστίθεται στο κάθε eppendorf το διάλυμα τερματισμού αντίδρασης (stop solution) και προθερμούνται στους 70 °C για 2mins.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
NaOH	10M	10mM
Xylene cyanol	1% (v/v)	0.05%
Μπλε της βρωμοφαινόλης	1% (v/v)	0.05%
Φορμαμίδιο	100% (v/v)	95% (v/v)

7. Ηλεκτροφόρηση κατάλληλης ποσότητας σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% μαζί με τα δείγματα υπό εξέταση.
8. Χρώση με νιτρικό άργυρο.
9. Φωτογραφίζεται/σκανάρεται το φιλμ.
10. Επεξεργασία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΔΟΚΙΜΕΣ PCR ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ DNA

Λόγω της μικρής συγκέντρωσης DNA στα υπονήφια δείγματα και της μικρής ποσότητας σε αρκετά, οι δοκιμές έγιναν με 1ng, 2.5ng, 5ng, 10ng, 15ng και 30ng DNA με δύο ποικιλίες και δεν εντοπίστηκαν διαφορές στα πρότυπα των ζωνών. Για αυτό το λόγο η πειραματική διαδικασία έγινε με 5 ng.

ΔΟΚΙΜΕΣ PCR ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Οι δοκιμές έγιναν με όλα τα δείγματα με 5ng DNA με δύο διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης των εκκινήτων. Ως αποτέλεσμα αυτού ήταν τα διαφορετικά πρότυπα ζωνών στη σύγκριση ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες. Σε μερικούς εκκινήτες, αλλά λίγους, υπήρξε το ίδιο πρότυπο.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Υπολογίστηκαν τα μήκη των αλληλομόρφων και καταχωρήθηκαν στο πρόγραμμα IDENTITY 1.0 για τον υπολογισμό κάποιων γενετικών παραμέτρων

ΜΙΚΡΟΔΟ-ΡΥΦΟΡΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ (PI)	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ (He)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΙΣΑ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ (Ho)	ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΜΗΔΕΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ (r) $r = He - Ho / 1 + He$
VVMD6	12	0.084	0.818	0.450	0.202
VVMD7	19	0.019	0.928	0.455	0.245
VVMD27	17	0.036	0.894	0.273	0.328
VVS4	14	0.044	0.883	0.850	0.020
VrZAG47	16	0.026	0.915	0.360	0.172
VrZAG79	21	0.017	0.930	0.682	0.128
UCH12	19	0.015	0.935	0.550	0.199
UCH29	18	0.020	0.925	0.571	0.184

- **Πιθανότητα ταυτότητας (probability of identity) (PI):** η πιθανότητα δύο μη συγγενικά (τυχαία δειγματοληψία) άτομα να έχουν πανομοιότυπο γονότυπο. Αυτή η πιθανότητα μικραίνει όσο αυξάνεται ο αριθμός των υψηλά πολυμορφικών δεικτών.
- **Ετεροζυγωτία :** μονάδα μέτρησης γενετικής παρέκκλισης που αφορά είτε στην παρατηρηθείσα είτε στην αναμενόμενη μερίδα ατόμων σ' ένα πληθυσμό που είναι ετεροζυγωτά. (οργανισμός με δύο διαφορετικά αλληλόμορφα σ' έναν γενετικό τόπο-Aa)
- **Μηδενικό αλληλόμορφο (null) (r) :** δεν είναι ανιχνεύσιμο είτε λόγω σφάλματος κατά τη διάρκεια παραγωγής λειτουργικού προϊόντος είτε λόγω μετάλλαξης σε μέρος του εκκινήτη που αποκλείει ενίσχυση κατά την PCR.

Ακόμα, με το πρόγραμμα NT-SYSTEM τα μήκη των αλληλομόρφων επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο UPGMA (Unweighted Pair Method with Arithmetic mean) Η επεξεργασία έγινε χωρίς δείγματα από τον μικροδορυφορικό δείκτη VVMD5 γιατί δεν κατέστη δυνατόν να δώσει σήμα, όπως και με κανένα δείγμα του υποκειμένου 99R γιατί δεν έφτασε το γενετικό υλικό για όλους τους μικροδορυφορικούς δείκτες. Ενώ αρχικά κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τα μήκη των αλληλομόρφων από όλους τους μικροδορυφορικούς, για το τελικό αποτέλεσμα επιλέχτηκαν οχτώ μοριακοί δείκτες (VVMD6, VVMD7, VVMD27, VVS4, VrZAG47, VrZAG79, UCH12, UCH29).

Φυλογενετικά Δέντρα

Η φυλογένεια είναι η ιστορία σύμφωνα με την οποία ένα είδος ή άλλα taxa έχουν προέλθει επιτυχώς από κοινό πρόγονο. Στο μοριακό επίπεδο, η εξελικτική ιστορία είναι κρυμμένη στις αλληλουχίες του DNA. Η ιστορία αυτή παριστάνεται με φυλογενετικά δέντρα, στα οποία κάθε σημείο διακλάδωσης αναπαριστάνει τη διάσπαση ενός προγονικού είδους σε δύο νέες γενεαλογικές γραμμές σε δύο νέα είδη.

Για τη βιολογική ταξινόμηση υπάρχουν δύο κύριες στρατηγικές και τρεις κύριες σχολές: η φαινετική και η κλαδιστική (ή φυλογενετική) στρατηγική και η φαινετική, η κλαδιστική και η εξελικτική σχολή. Στη φαινετική ταξινόμηση αγνοούνται οι εξελικτικές σχέσεις και η κατάταξη γίνεται στη βάση της φαινοτυπικής ομοιότητας των ειδών. Στην κλαδιστική αγνοούνται οι φαινετικές σχέσεις και η κατάταξη γίνεται με βάση τον πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο. Στην εξελικτική ταξινόμηση συνεκτιμώνται τόσο οι φαινετικές όσο και οι φυλογενετικές σχέσεις.

Οι φυλογενετικές σχέσεις εξάγονται με αξιοποίηση των κοινών χαρακτηριστικών των ειδών. Τέτοια χαρακτηριστικά μπορεί να είναι μορφολογικά, τόσο για τους ζωντανούς οργανισμούς όσο και για τους απολιθωμένους, ή μοριακά, με τη μοριακή φυλογένεια να αποτελεί σήμερα το πιο ενεργό ερευνητικό μέτωπο.

Οι αντικειμενικοί στόχοι κατασκευής των φυλογενετικών μελετών είναι η αναπαράσταση των πραγματικών γενεαλογικών σχέσεων των οργανισμών όπως και η χρονολόγηση της διάσπασης των ειδών από τον τελευταίο τους πρόγονο.

Το δέντρο της ζωής δεν είναι οφθαλμοφανές. Γι' αυτό και πρέπει να αποκαλυφθεί. Και επειδή η πλειονότητα των πληροφοριών που είναι αναγκαίες για την κατασκευή

ενός τέτοιου δέντρου έχουν τροποποιηθεί από την εξέλιξη, πρέπει να χρησιμοποιούνται μέθοδοι οι οποίες εξισορροπούν τέτοιες πληροφορίες. Στο πλαίσιο αυτό χρησιμοποιούνται δύο τύποι δέντρων, το φυλογενετικό και το γονιδιακό, τα οποία μπορεί να είναι με ρίζα ή χωρίς ρίζα, να δείχνουν δηλαδή ή όχι και την κατεύθυνση της εξέλιξης—όχι μόνο τις εξελικτικές σχέσεις, τις σχέσεις διακλάδωσης.

Το φυλογενετικό δέντρο είναι μια γραφική αναπαράσταση της φυλογένειας μιας ομάδας από taxa ή γονίδια. Ένα γονιδιακό δέντρο κατασκευάζεται με την αξιοποίηση των γενετικών πληροφοριών ενός ή πολύ λίγων γονιδίων. Τα στοιχεία ενός οργανισμού τα οποία χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων καλούνται χαρακτήρες ή λειτουργική ταξινομική μονάδα (OTU). Είναι οποιαδήποτε υπάρχουσα και αξιοποιούμενη στη μελέτη ταξινομική μονάδα, όπως χαρακτήρας, είδος κ.α. και οι χαρακτήρες αυτοί μπορεί να βασίζονται στη μορφολογία, στη φυσιολογία, στην οικολογία, στις διατροφικές ή άλλες συνήθειες, στη βιοχημεία ή στη γενετική. Σε κάθε δέντρο διακρίνουμε τις ενεργές ταξινομικές μονάδες και τις υποθετικές ταξινομικές ομάδες (hypothetical taxonomic units-HTU), ενώ το σχέδιο της διακλάδωσης των δέντρων ονομάζεται τοπολογία (topology). Το μέγεθος κάθε κλάδου αναπαριστά συνήθως τον αριθμό των αλλαγών. Υπάρχουν πολλά πιθανά δέντρα με ή χωρίς ρίζα για ένα δεδομένο αριθμό OTU.

Οι ρεαλιστικές φυλογενετικές μέθοδοι βασίζονται στην αξιοποίηση χαρακτήρων που είναι πληροφοριακοί για τις αναζητούμενες εξελικτικές σχέσεις· τέτοιοι χαρακτήρες είναι παράγωγοι, έχουν προέλθει δηλαδή εξελικτικά και είναι επίσης κοινοί στα συγκρινόμενα taxa. Δεν είναι πληροφοριακοί οι χαρακτήρες που είναι κοινοί αλλά δεν έχουν αλλάξει από τους απόμακρους προγόνους.

Το πρώτο βήμα για την κατασκευή ενός εξελικτικού δέντρου είναι η δημιουργία μιας μήτρας ή ενός πίνακα χαρακτήρων για τα υπό διερεύνηση είδη. Επειδή μπορεί να συναχθούν πολλά διαφορετικά δέντρα από μια τέτοια μήτρα, προτιμάται είτε το απλούστερο—το πιο φειδωλό, που βασίζεται στις λιγότερες εξελικτικές αλλαγές για να δομηθεί—είτε το δέντρο κατά το οποίο υπολογίζεται η πιθανότητα των παρατηρούμενων δεδομένων, είτε ακόμα ένας συνδυασμός των δύο. Στο πλαίσιο αυτό έχουν μεταποιηθεί σε λογισμικά πακέτα που τροφοδοτούμενα καταλλήλως, δίνουν γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Οι μέθοδοι κατασκευής χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την κατηγορία των μητρών απόστασης, που περιλαμβάνει τις μεθόδους UPGMA, των μετασχηματισμένων αποστάσεων, των Fitch–Margoliash και των γειτονικών ζευγαριών (neighbour joining) και την κατηγορία που βασίζεται στην παρουσία ή απουσία πληροφοριακών χαρακτήρων και περιλαμβάνει τις μεθόδους της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony), της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) και της μπεισιανής ανάλυσης (Bayes analysis).

Στην πρώτη κατηγορία οι εξελικτικές αποστάσεις (συνήθως νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές διαφορές) υπολογίζονται όλα τα ζευγάρια και χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος για την κατασκευή του δέντρου. Στη δεύτερη κατηγορία και ειδικότερα στη μέγιστη φειδωλότητα, επιλέγονται οι μικρότερες (κάθε φορά) εξελικτικές αποστάσεις (νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές υποκαταστάσεις) για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου, το οποίο επιλέγεται με βάση αυτή τη συλλογιστική σε σχέση με όλα τα πιθανά δέντρα και θεωρείται πιο πιθανό να είναι το σωστό δέντρο.

Στην κατασκευή του δέντρου παρεμβαίνουν δύο τύποι λαθών: τα τοπολογικά λάθη και τα λάθη που αφορούν το μήκος των βραχιόνων. Το μήκος των βραχιόνων αντανακλά το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο σημείων διακλάδωσης ή μεταξύ ενός σημείου διακλάδωσης και ενός άλλου υπάρχοντος είδους (Αλαχιώτης, 2007).

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)

Η μέθοδος αυτή (Sneath και Sokal 1973) αρχικά προτάθηκε για ταξινομήσεις με βάση μορφολογικά δεδομένα, αλλά αργότερα χρησιμοποιήθηκε σε μοριακά δεδομένα χωρίς να μειωθεί η αξία της. Βασική αρχή για την κατασκευή δέντρων αποτελεί η προϋπόθεση σταθερού ρυθμού εξέλιξης μεταξύ όλων των κλάδων του δέντρου, έτσι ώστε να υπάρχει μια σχεδόν γραμμική σχέση μεταξύ των υπολογιζόμενων γενετικών αποστάσεων και των χρόνων διαχωρισμού (Nei, 1975).

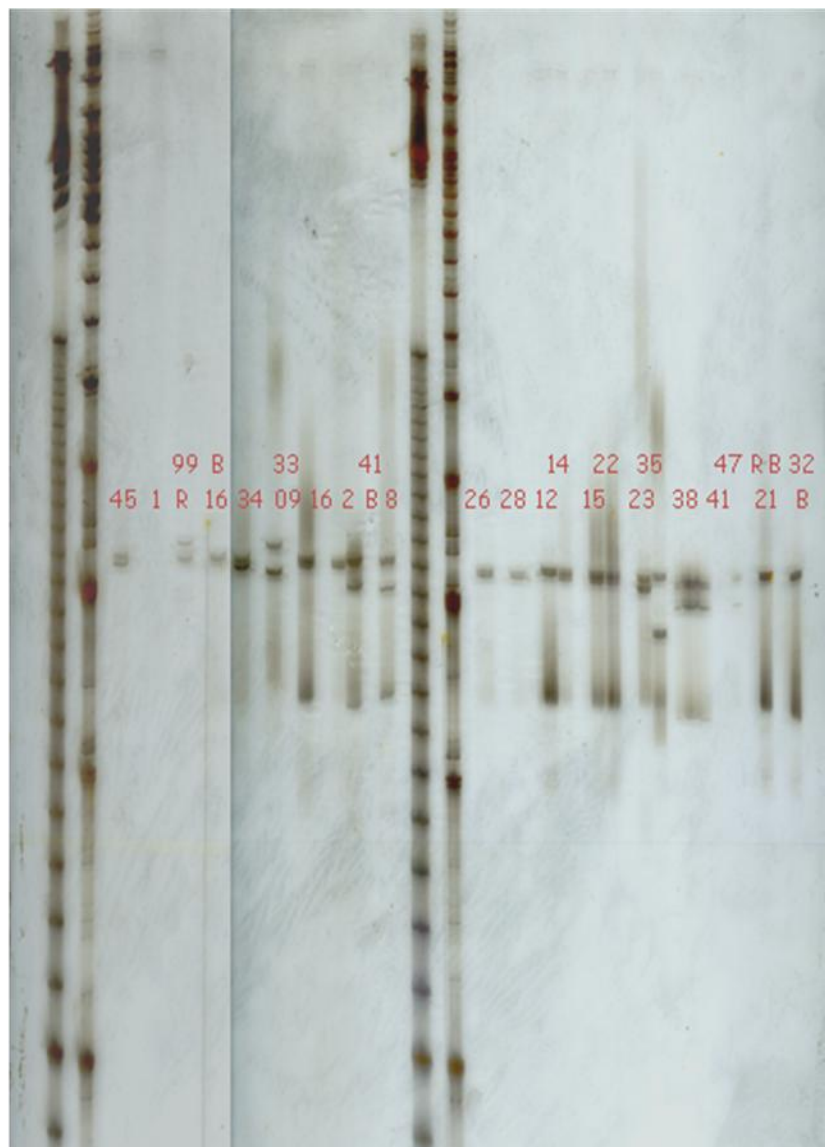
Προσομοιώσεις αλληλουχιών έχουν δείξει ότι όταν η έννοια του μοριακού ρολογιού ισχύει και όταν οι γενετικές αποστάσεις είναι μεγάλες για όλα τα ζεύγη των OTU τότε το δέντρο το οποίο προκύπτει έχει μεγάλη πιθανότητα να ανταποκρίνεται στο πραγματικό (Tateno *et al.* 1982, Σούρδης και Κριμπάς, 1987). Εάν η μέθοδος αυτή εφαρμοστεί με δεδομένα γενετικών αποστάσεων όπως αυτά προκύπτουν από τη μελέτη πολλών γόνων

με μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδίων, τότε το φυλογενετικό δέντρο που προσδιορίζεται αναμένεται να προσεγγίζει σε ικανοποιητικό βαθμό το πραγματικό. Ωστόσο πολλές ερευνητικές μελέτες περιλαμβάνουν σχετικά μικρές αλληλουχίες DNA και για αυτό το λόγο τα παραγόμενα φυλογενετικά δέντρα πρέπει να αντιμετωπίζονται με κάποια επιφύλαξη ως προς την ορθότητά τους.

Ο αλγόριθμος ο οποίος χρησιμοποιείται από τη μέθοδο αυτή οδηγεί σε απλούς μαθηματικούς υπολογισμούς και καταλήγει πάντα σε ένα συγκεκριμένο φυλογενετικό δέντρο με ρίζα. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου πρώτα γίνεται ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων για όλα τα ζεύγη των εξεταζόμενων OTU και εν συνεχεία οι τιμές αυτές τοποθετούνται σε μια μήτρα. Από το σύνολο των αποστάσεων της μήτρας αρχικά επιλέγεται το ζεύγος των OTU τα οποία έχουν τη μικρότερη τιμή. Τα δύο αυτά OTU συγκροτούν ένα καινούργιο OTU το οποίο αναφέρεται ως σύνθετο και αποτελεί την πρώτη ομάδα του δέντρου. Το σύνθετο αυτό OTU σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα OTU συνθέτουν μια καινούργια μήτρα από την οποία επιλέγεται και πάλι το ζεύγος εκείνο με τη μικρότερη απόσταση και η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως το τέλος. Ο υπολογισμός της απόστασης ενός απλού και ενός σύνθετου OTU υπολογίζεται από το μέσο όρο των αποστάσεων μεταξύ του απλού OTU και των απλών OTU από τα οποία αποτελείται το σύνθετο (Αλαχιώτης, 2007).

Σκοπός της πειραματικής αυτής διαδικασίας είναι η ταυτοποίηση των ποικιλιών όπως και η μελέτη των γενετικών τους σχέσεων. Γι' αυτό το λόγο παρουσιάζονται τα μήκη των αλληλομόρφων της κάθε ποικιλίας με τους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν όπως και τα φυλογενετικά δέντρα που προκύπτουν από αυτά. Οι γενετικές σχέσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 φυλογενετικά δέντρα για καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων και σαφήνεια.

VVMD6



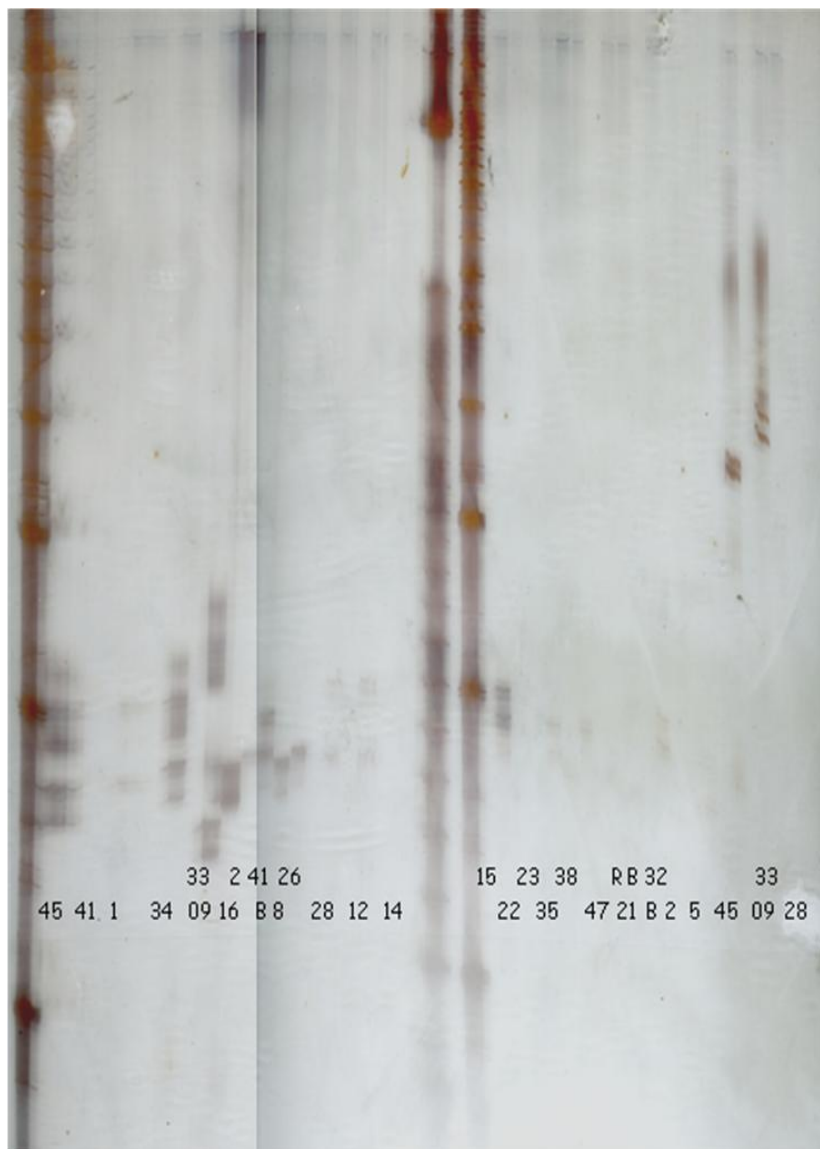
VVMD7



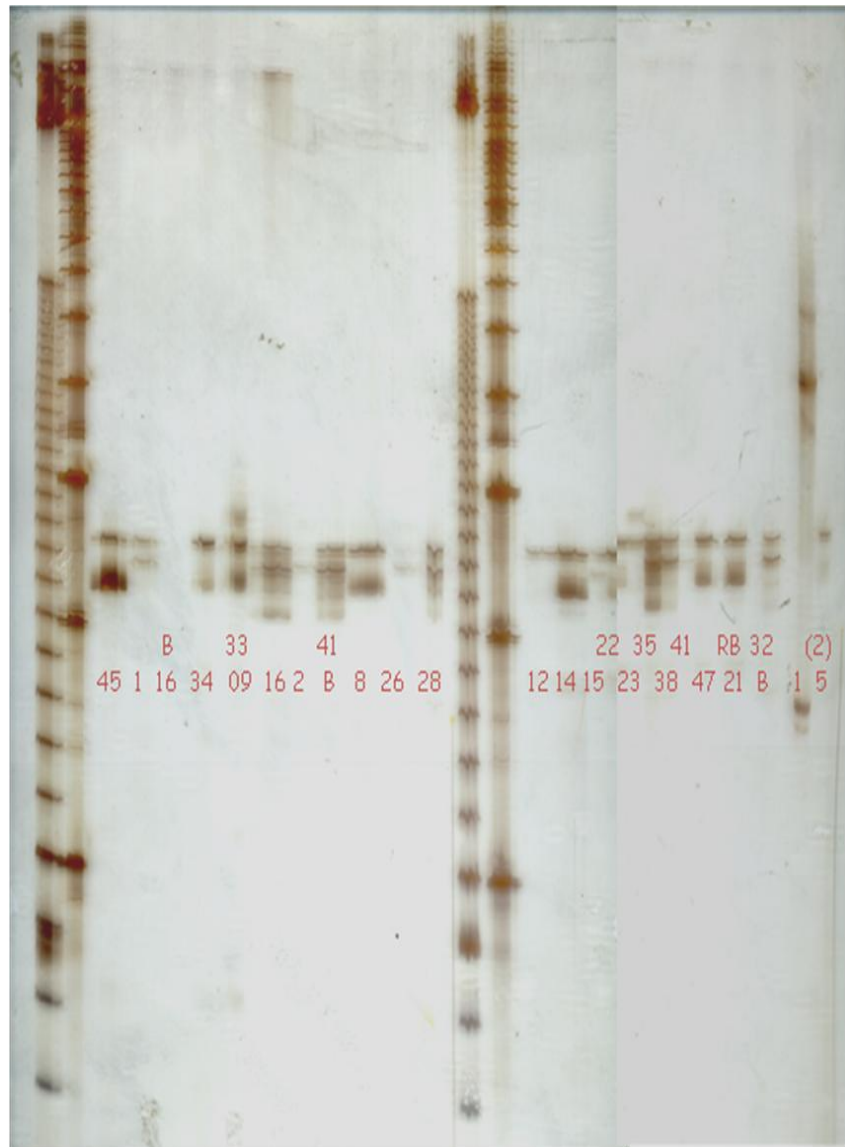
VVMD27



VVS2



VVS4



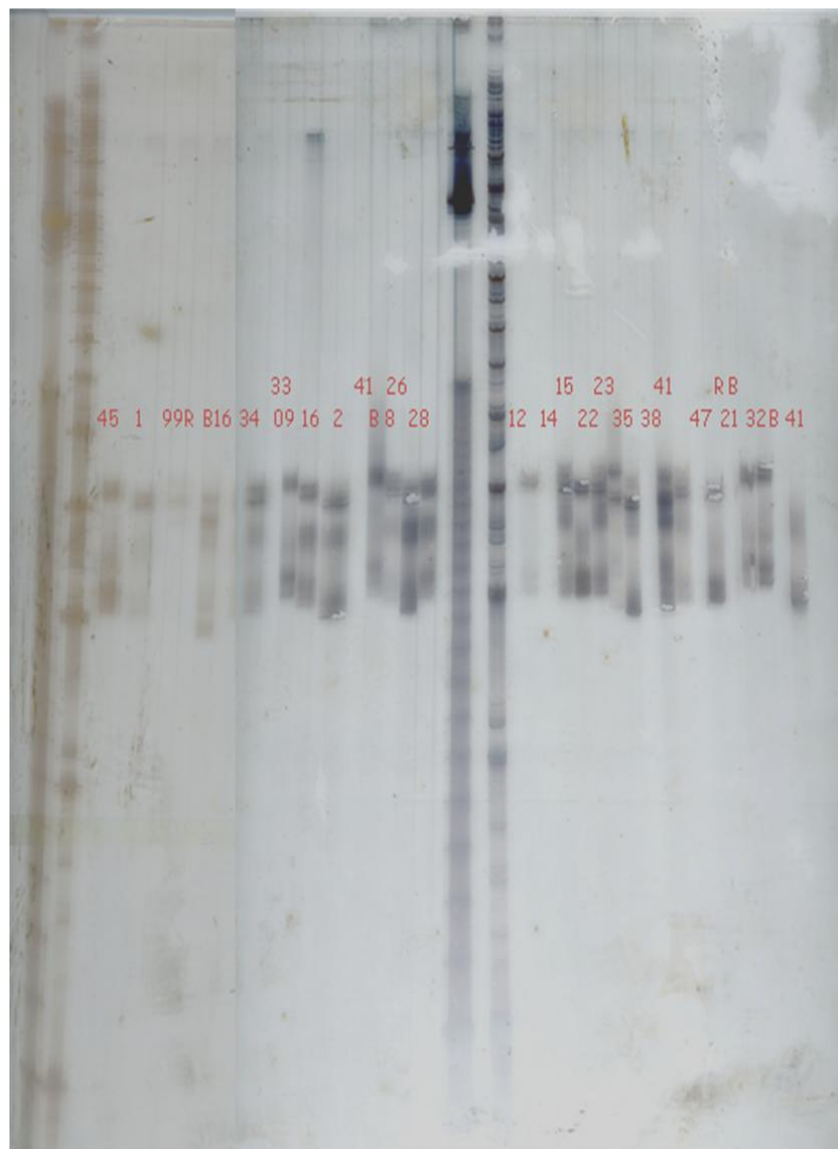
VrZAG42



VrZAG64



VrZAG79



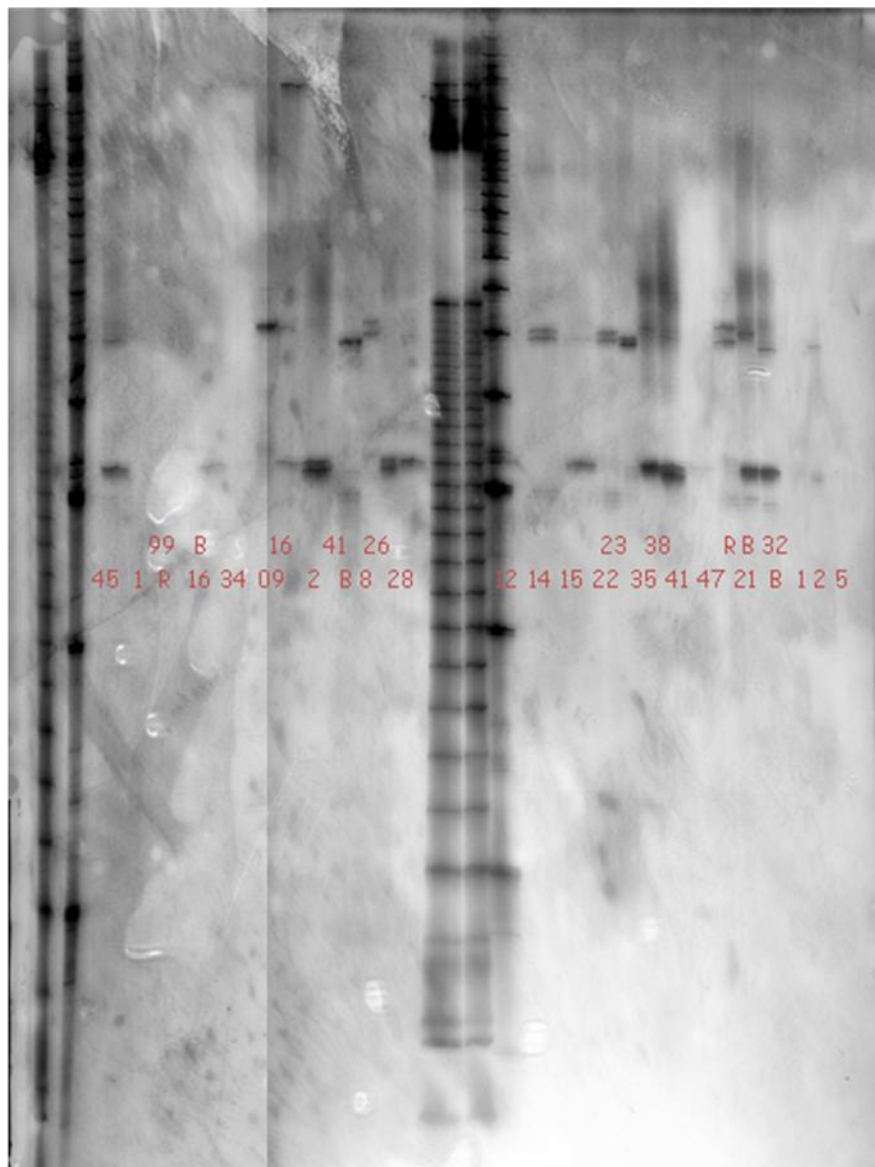
UCH11



UCH12



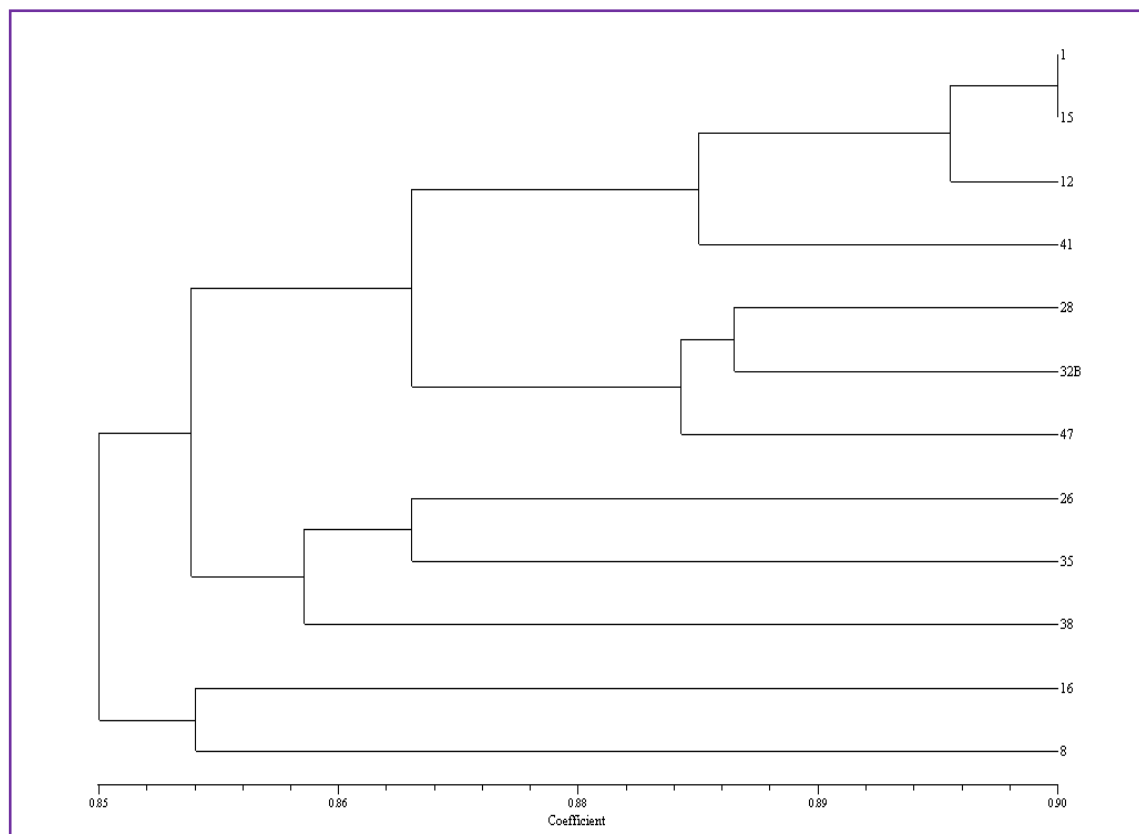
UCH29



Μήκη αλληλομόρφων από τις πηκτές πολυακρυλαμίδης

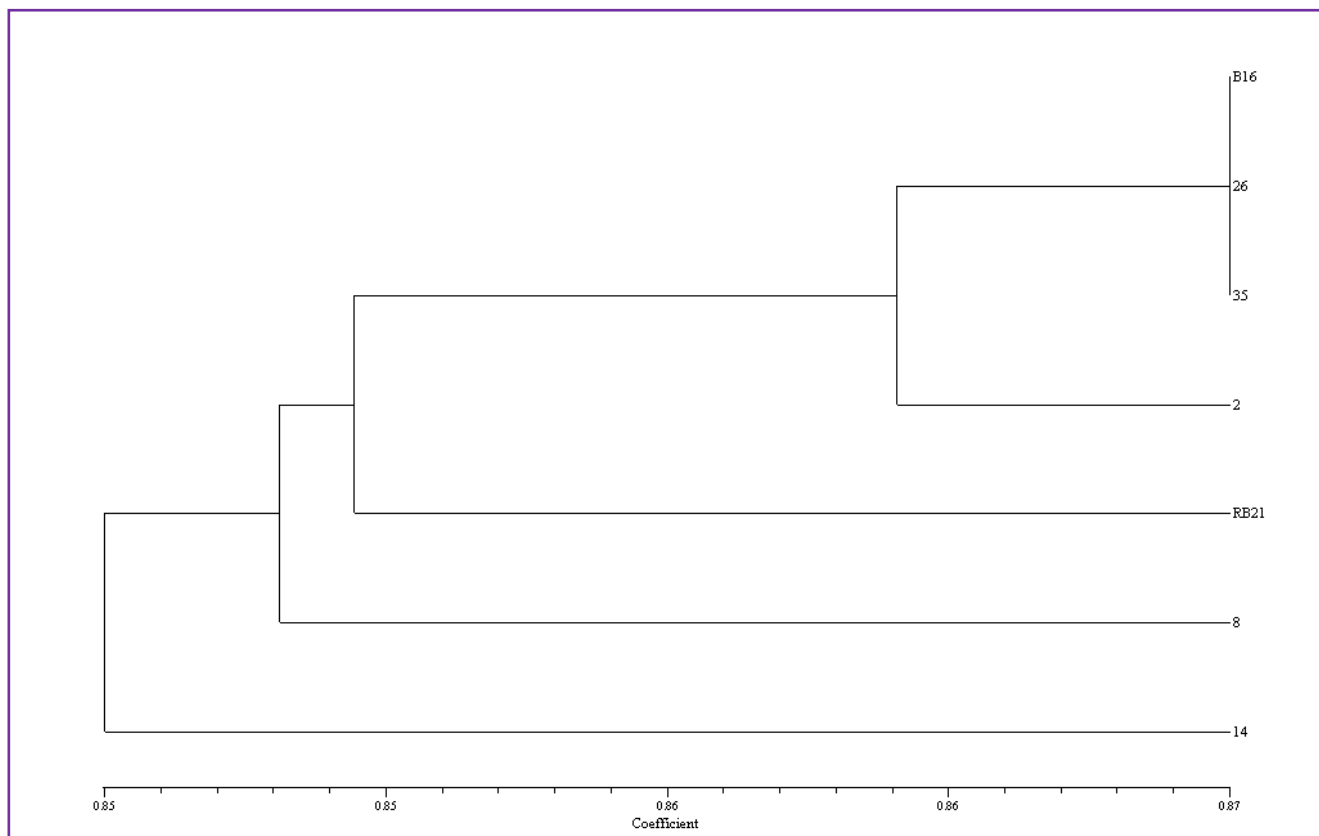
	VVMD 6		VVMD 7		VVMD 27		VVS 4		VrZAG 47		VrZAG 79		UCH 12		UCH 29	
45	206	210	245	250	183	205	160	173	161	161	255	255	148	166	211	296
1	-	-	257	257	180	180	165	172	163	163	248	254	-	-	-	-
B16	209	209	259	259	187	187	-	-	170	170	240	250	147	165	212	212
34	210	212	250	257	183	183	160	171	168	168	252	246	147	166	214	214
3309	208	218	242	255	188	215	160	171	174	174	253	253	160	160	310	310
16	212	212	241	245	184	184	169	176	157	157	247	252	166	170	210	210
2	210	210	236	246	184	184	170	170	161	167	241	241	167	170	207	210
41B	203	212	229	237	186	186	168	175	165	165	259	259	169	169	290	290
8	202	212	245	245	178	190	164	175	158	158	251	251	171	171	300	312
26	207	207	238	247	184	184	168	175	163	169	242	242	167	171	208	212
28	206	206	248	248	175	180	168	175	159	159	250	255	166	170	212	212
12	207	207	249	249	180	180	174	174	158	165	252	252	150	150	211	211
14	207	207	253	253	182	182	165	174	161	161	249	252	150	164	294	302
15	206	206	248	248	180	180	167	174	159	168	248	252	150	150	210	294
22	206	206	253	253	182	182	164	174	161	161	248	252	157	157	292	300
23	202	206	257	257	190	204	174	174	169	169	244	259	156	156	290	294
35	188	206	254	254	184	184	167	175	164	170	239	243	151	151	209	209
38	196	205	246	246	189	189	167	175	169	179	242	256	172	172	205	209
41	-	-	236	246	179	179	-	-	158	158	245	248	-	-	208	208
47	196	206	242	242	175	210	162	175	151	157	245	249	153	174	290	302
RB21	206	206	236	246	192	192	162	175	171	171	256	259	153	173	208	298
32B	206	206	240	251	180	180	168	175	154	157	257	261	154	174	208	286

ΕΥΡΩΠΑΪΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ



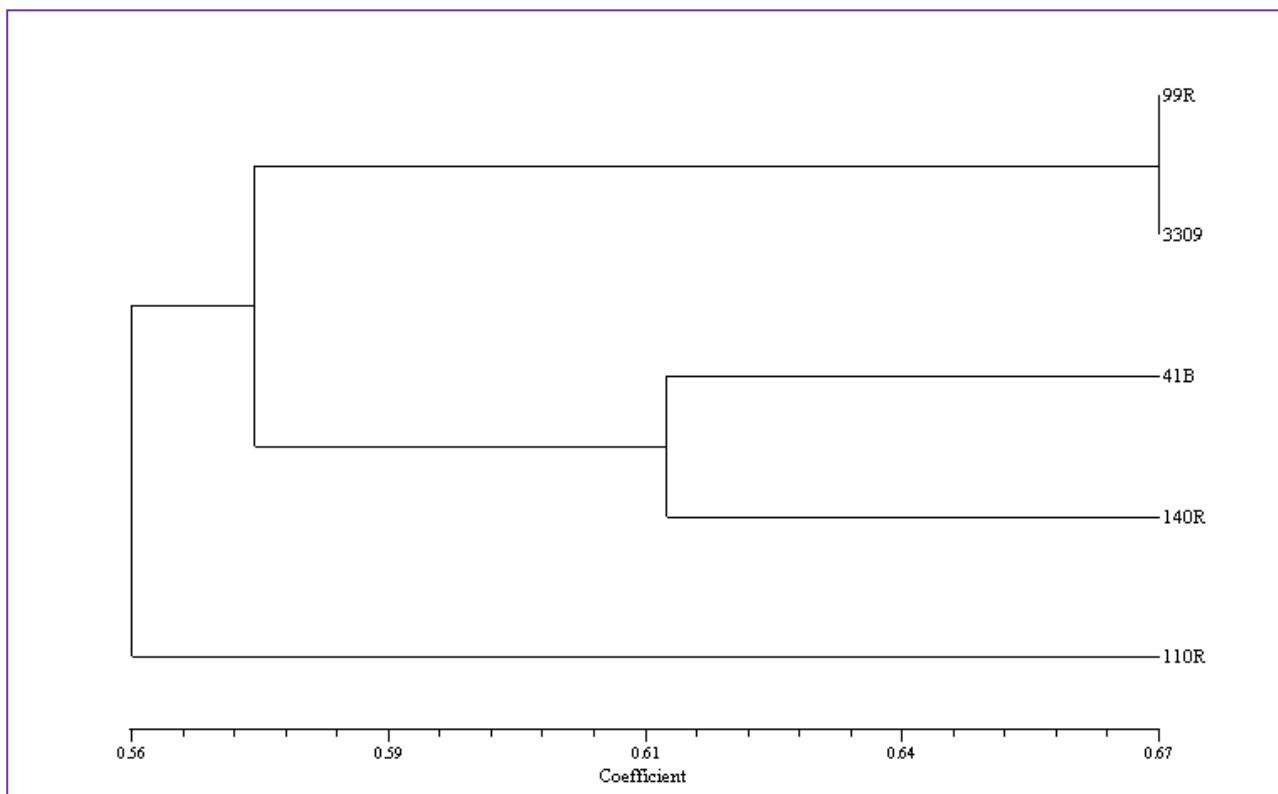
1	Sirividiano
15	Katomylitiko
12	Aetonychi aspro
41	Eftakilo
28	Yiannoudi
32B	Fraoula
47	Vamvakada
26	Victoria
35	Alphonse lavallee
38	Alonari
16	Flouriko alonas
8	Moshato mauro

ΞΕΝΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ



B16	Barlinca
26	Victoria
35	Alphonse lavalle
2	Black rose
RB21	Ruby seedless
8	Moshato mauro
14	Black monucca

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ



ΟΜΑΔΑ RIPARIA X RUPESTRIS	
3309C	<i>Riparia tomenteux X Rubestris Martin</i>
ΟΜΑΔΑ BERLANDIERI X RUPESTRIS	
Υπομάδα Richter	
R99	Berlandieri Las Sorres X Rubestris du Lot
R110	Berlandieri Resseguier No2 X Rubestris Martin
Υπομάδα Σικελικών	
140Ru	Berlandieri Resseguier No I X Rubestris du Lot
ΟΜΑΔΑ VINIFERA X BERLANDIERI	
41B	Chasselas X Berlandieri

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΧΡΗΣΗ	ΧΡΩΜΑ	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΑ
SIRIVITIANO		Μαύρο	Πιθανόν Κύπρος	
FLOURIKO	Οινοποιήσιμη	Μαύρο	Κύπρος	
YIANNOUDI	Οινοποιήσιμη	Μαύρο	Κύπρος	
ΚΑΤΟΜΥΛΙΤΙΚΟ	Επιτραπέζια	Λευκό	Κύπρος	
ALONARI		Λευκό		
EFTAKILO	Επιτραπέζια	Κόκκινο	Ελλάδα/Τουρκία	
VAMVAKADA	Οινοποιήσιμη	Μαύρο	Κύπρος	
FRAOULA	Επιτραπέζια	Ροζέ	Ελλάδα	
ΑΕΤΟΝΥΧΙ ΑΣΠΡΟ	Επιτραπέζια	Λευκό	Ελλάδα	
MOSHATO ΜΑΥΡΟ	Οινοποιήσιμη Επιτραπέζια	Μαύρο	Ην. Βασίλειο	Shiava Grossa (Trollinger) X Muscat of Alexandria
BLACK ROSE	Οινοποιήσιμη Επιτραπέζια	Μαύρο	Ην. Πολιτείες	(Damas Rose X Black Monukka) X Alp. Lavallée

VICTORIA	Επιτραπέζια	Λευκό	Ρουμανία	<u>Cardinal</u> * X Razaki
ALPHONSE LAVALLEE	Επιτραπέζια	Μαύρο	Γαλλία	Bellino X Lady Downe's Seedling
BARLINKA	Επιτραπέζια	Μαύρο	Ν. Αφρική	
BLACK MONUKKA	Επιτραπέζια Σταφίδες	Μαύρο	Ην. Πολιτείες/ Χώρες Καυκάσου	
RUBY SEEDLESS	Επιτραπέζια	Κόκκινο	Ην. Πολιτείες	Emperor X <u>Pirovano-75</u> *

<u>ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ</u>	<u>ΟΜΑΔΑ</u>	<u>ΥΠΟΟΜΑΔΑ</u>	
COUDERC 3309	RIPARIA X RUPESTRIS		Riparia tomanteux X Rupestris Martin
RICHTER No 99	BERLANDIERI X RUPESTRIS	RICTERS	Berlandieri Las Sorres X Rubestris du Lot

RICHTER No 110	BERLANDIERI X RUPESTRIS	RICHTERS	Berlandieri Ressequier No2 X Rupestris Martin
140 RUGGERI	BERLANDIERI X RUPESTRIS	ΣΙΚΕΛΙΚΩΝ	Berlandieri Ressequier No2 X Rupestris du Lot
41B	VINIFERA X BERLANDIERI		Chasselas X Berlandieri

CARDINAL = FLAME TOKAY (συνών. Ahmeur-bou-Ahmer) X RIBIER DU MAROC (συνών. Alphonse Lavallée)

RUBY SEEDLESS = EMPEROR X PIROVANO-75 (συνών. Sultana Moscata)

▪ PIROVANO-75 = MUSCAT OF ALEXANDRIA X THOMPSON SEEDLESS (συνών. Sultanina)

Από τις ποικιλίες που εξετάστηκαν, η γενετική σχέση δύο ποικιλιών ήταν γνωστή και αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα δύο φυλογενετικά δέντρα, “Ευρωπαϊκές ποικιλίες” και “Ξένες ποικιλίες”. Η ποικιλία Alphonse Lavalle είναι απόγονος της Victoria.

VICTORIA= CARDINAL* X RAZAKI

*CARDINAL = FLAME TOKAY X RIBIER DU MAROC (συνών. **Alphonse Lavallée**)

Οι δύο αυτές ποικιλίες όπως και τα υποκείμενα χρησιμοποιήθηκαν για επαληθευτικούς λόγους.

Αν λάβουμε υπόψη τη χώρα προέλευσης κάποιων ποικιλιών υπάρχει ένας λογικός συσχετισμός ανάμεσα στις κατηγοριοποιημένες ομάδες ταξινόμησης στα φυλογενετικά δέντρα.

Ανάμεσα στις υπό εξέταση ποικιλίες δεν έχουν βρεθεί συνώνυμες ποικιλίες αλλά εξετάστηκε η πιθανότητα συνωνυμίας με ποικιλίες άλλων χωρών χρησιμοποιώντας δημοσιευμένες καταχωρήσεις σε βάσεις δεδομένων.

Η ποικιλομορφία των γενετικών τόπων περιγράφεται καλύτερα από μεγέθη που αφορούν τη συχνότητα των αλληλομόρφων π.χ. PI (Probability of Identity), D (Discrimination power). Και τα δύο αυτά μεγέθη περιγράφουν την πιθανότητα, δύο μη συσχετισμένες ποικιλίες, να μπορούν να διακριθούν με ένα συγκεκριμένο μοριακό δείκτη, επιτρέποντας τη διάκριση δύο διαφορετικών ποικιλιών.

Σε υπερπολυμορφικούς *Vitis* μικροδορυφορικούς γενετικούς τόπους, το μέγεθος *pI* μπορεί να είναι πολύ χαμηλό, μέχρι και 0.05, το οποίο αντιστοιχεί σε 5% πιθανότητα ο γονότυπος να μοιράζεται (sharing) ανάμεσα σε μη συσχετιζόμενες ποικιλίες. Στην πειραματική αυτή διαδικασία το εύρος διακύμανσης ήταν 0.015-0.084 (UCH12 και VVMD6 αντίστοιχα).

Σε αρκετές περιπτώσεις, κυρίως με τον VVMD6 μοριακό δείκτη, κάποιες ποικιλίες παρουσίαζαν τα ίδια μήκη αλληλομόρφων, αφήνοντας την υπόνοια πιθανής συνωνυμίας αλλά με την αύξηση του αριθμού μοριακών δεικτών η διάκριση ανάμεσα στις ποικιλίες ήταν σαφής. Η χρήση αρκετών πολυμορφικών δεικτών είναι επιθυμητή και για έναν ακόμη λόγο, καθώς κατά το τρέξιμο της πηκτής πολυακρυλαμίδης ενδέχεται να υπάρχει διαρροή σε διπλανά πηγαδάκια και τυγχάνει τα μήκη αλληλομόρφων να είναι κοντά, να μην υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ των.

Ο αριθμός των αλληλομόρφων που παρατηρήθηκε με κάθε μοριακό δείκτη κυμάνθηκε από 12 (VVMD6) μέχρι και 21 (ssrVrZAG79), αριθμοί που καθιστούν τους συγκεκριμένους δείκτες υψηλά πολυμορφικούς και κατά συνέπεια αξιόπιστους για την σαφή διάκριση των ποικιλιών. Ο μέσος αριθμός των παρατηρηθέντων αλληλομόρφων ήταν 17.25.

Συγκρίνοντας το πληροφοριακό περιεχόμενο των δεικτών ο περισσότερο πληροφοριακός ήταν ο ssrVrZAG79 με 21 αλληλομόρφα και πιθανότητα ταυτότητας (*pI*) 0.017 ενώ ο λιγότερο πληροφοριακός αποδείχθηκε ο VVMD6 με 12 αλληλομόρφα

και rI 0.084.

Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία διακυμάνθηκε από 0.818 (VVMD6) μέχρι 0.935 (UCH12) (υψηλή γονιδιακή ποικιλότητα) και η παρατηρηθείσα από 0.273 (VVMD27) μέχρι 0.850 (VVS4) και σε όλες τις περιπτώσεις η παρατηρηθείσα ήταν μικρότερη από την αναμενόμενη.

Στις περιπτώσεις που ανιχνεύθηκε ένα αλληλόμορφο θεωρήθηκε ότι υπήρχε ομοζυγωτία και όχι ετεροζυγωτία με ένα μηδενικό αλληλόμορφο και επίσης παρατηρήθηκαν και κάποιες περιπτώσεις ομοζυγωτίας μηδενικών αλληλομόρφων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αμπέλι είναι μία πιο τις πιο οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες στον κόσμο και επικρατούν 8.000-10.000 ποικιλίες παγκοσμίως. Πιστεύεται ότι διαδόθηκε από το Αφγανιστάν έως τα νότια της Κασπίας θάλασσας και μέσω του νοτίου Καυκάσου στις νότιες ακτές της Μαύρης θάλασσας.

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των ποικιλιών με τις συμβατικές μεθόδους είναι αρκετές φορές δύσκολη. Καθώς οι μορφολογικοί δείκτες είναι χρονοβόροι και ευάλωτοι στις περιβαλλοντικές συνθήκες, έχει αυξηθεί η χρήση των μοριακών προσεγγίσεων.

Ο υψηλός πολυμορφισμός των μικροδορυφόρων ή γενικά των SSR, μία κατηγορία δεικτών από επαναλαμβανόμενες μικρές αλληλουχίες 1-6 βάσεων DNA (έως και 100 επαναλήψεις), επιτρέπουν την ταυτοποίηση και το διαχωρισμό των ποικιλιών και η συγκυρίαρχη Μενδελική κληρονομικότητά τους, επιτρέπει την αναπαράσταση των διασταυρώσεων.

Έως τώρα, οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για δείκτες SSR στο *Vitis* έχουν σχεδιαστεί σε ανεξάρτητα εργαστήρια και η χρησιμότητά τους έχει αποδειχθεί από τα ίδια τα εργαστήρια με πειράματα σε καλλιεργούμενες ποικιλίες των αντίστοιχων περιοχών· Αυστραλία, Καλιφόρνια, Κεντρική Ευρώπη, Καλαβρία και Σικελία.

Η σημαντικότητα των μικροδορυφόρων ως μοριακοί δείκτες και η δυνατότητα χρήσης τους σε εφαρμογές όπως η γενετική χαρτογράφηση και η ανάλυση ποικιλότητας έχει επιβεβαιωθεί και έχει καταγραφεί σε αρκετές βιβλιογραφίες πειραμάτων στο αμπέλι π.χ. Thomas and Scott, 1993; Scott *et al.*, 2000; Cipriani *et al.*, 1994; Bowers *et al.*, 1999, 2000; Grando *et al.*, 2003; Adam-Blondon *et al.*, 2004; Riaz *et al.*, 2004 αλλά και σε πολλά άλλα φυτά με υψηλό οικονομικό όφελος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι με τη ταχύτατη πλέον σήμερα αλληλούχιση του DNA με pyrosequencing είναι δυνατό οι μοριακές αυτές τεχνικές να παραγκωνιστούν.

Ωστόσο το πληροφοριακό περιεχόμενο του κάθε δείκτη μπορεί να ποικίλλει σε ποικιλίες από διαφορετικές περιοχές είτε λόγω της επικράτησης συγκεκριμένων αλληλομόρφων είτε λόγω της παρουσίας μηδενικών αλληλομόρφων σε κάποιους πληθυσμούς (Sefc *et al.*, 2000).

Η υψηλή πολυμορφικότητα των δεικτών είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των ποικιλιών και αποδεικνύεται από τον αριθμό των αλληλομόρφων που παρουσιάζει ο

κάθε δείκτης Το επίπεδο πολυμορφισμού που βρέθηκε σ' αυτήν την πειραματική διαδικασία είναι συγκρίσιμο μ' αυτό που έχει δημοσιευθεί σε αρκετές βιβλιογραφίες με πειράματα σε αμπέλι με μικροδορυφορικούς δείκτες.

Οι Martin *et al.* (2003) και Ibañez *et al.* (2003) αναφέρουν 9-13 και 4-16 αλληλόμορφα αντίστοιχα. Οι Fatahi *et al.* (2003), είχαν παρόμοια αποτελέσματα αφού παρατήρησαν και αυτοί 4-16 αλληλομόρφους και ένα επίπεδο πολυμορφισμού 76%. Οι Bowers *et al.* που χρησιμοποίησαν μόνο τέσσερις μοριακούς δείκτες σε 77 ποικιλίες παρατήρησαν μικρότερο βαθμό πολυμορφισμού με 5-11 αλληλομόρφους αλλά με μέσο όρο παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας (Ho) 85.5%, ποσοστό πολύ υψηλότερο από το παρατηρούμενο σ' αυτή την πειραματική διαδικασία (52.4%).

Επίσης υψηλότερο ποσοστό Ho ανέφεραν οι Martinez *et al.* (2006) με 81.8%, οι Bowers *et al.* (1996) με 85.5%, οι Fatahi *et al.* (2003) με 76%, οι Ibañez *et al.* (2003) με 70.7%, οι Lopes *et al.* (2006) με 81%, οι Lefort *et al.* (2002) με 82.1%, οι Karatas *et al.* με 60%, οι Hvarleva *et al.* (2005) με 74.2% οι Ramezani *et al.* (2009) με 84.2%.

Ο λιγότερο και περισσότερο πολυμορφικός δείκτης διαφέρει στην κάθε πειραματική διαδικασία και εξαρτάται από την ομάδα των μοριακών δεικτών που θα επιλεγθούν κάθε φορά. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που τυγχάνει τα αποτελέσματα να συμφωνούν. Στην περίπτωση των Hvarleva *et al.* (2005) οι VVS2, VVMD5, VVMD27 και ZAG79 είναι οι πιο πολυμορφικοί σε αντίθεση με τον ZAG83 που είναι ο λιγότερο και συμφωνούν με τους Cipriani *et al.* (1994) που ανεφέρουν τον VVS2 ως τον πιο πολυμορφικό. Οι Lopes *et al.* (2006) και Lefort *et al.* (unpublished) αναφέρουν και αυτοί τον ZAG83 ως τον λιγότερο πολυμορφικό. Στην πειραματική αυτή διαδικασία βρέθηκε ως λιγότερο πολυμορφικός ο VVMD6, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τους Lopes *et al.* (2006) και ως πιο πολυμορφικός ο ZAG79 όπως αναφέρουν και οι Hvarleva *et al.* (2005).

Ένα ακόμα δεδομένο που επιβεβαιώνεται τόσο από τα δικά μας αποτελέσματα όσο και από άλλων είναι η συμφωνία του μικροδορυφόρου που δείχνει τη μέγιστη παρατηρούμενη ετεροζυγωτία και την ελάχιστη πιθανότητα δύο ποικιλίες να' ναι οι ίδιες (pI), όπως και ο μικροδορυφόρος που δείχνει την ελάχιστη αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He) και την μέγιστη pI (Lefort *et al.*, unpublished; Lopes *et al.*, 2006; Hvarleva *et al.*, 2005; Ramezani *et al.*, 2009).

Εφόσον ένα από τα προβλήματα στο διαχωρισμό των ποικιλιών είναι η παρουσία

συνώνυμων ποικιλιών, εξετάσαμε το ενδεχόμενο κάποια από τις υπό εξέταση ποικιλίες μας να είναι συνώνυμη με κάποια/ες που καλλιεργείται/ούνται σε άλλη χώρα. Υποψία υπήρχε για τις ποικιλίες Βαμβακάδα που καλλιεργείται σε Κύπρο και Ελλάδα και Μαραθεύτικο Κύπρου. Από τα δημοσιευμένα αποτελέσματα των Hvarleva *et al.* (2005) για την ποικιλία “Μαραθεύτικο” φάνηκε ότι έχουν κάποια αλληλόμορφα με μικρές διαφορές στον αριθμό βάσεων και αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η επεξεργασία των αποτελεσμάτων στο δικό μας εργαστήριο ήταν μη αυτοματοποιημένη και είναι πολύ πιθανή η εσφαλμένη απόδοση μήκους των αλληλομόρφων.

ΣΥΝΩΝΥΜΑ

ΕΦΤΑΚΙΛΟ Επτάκιλο, Γεντί Βερέν-Τουρκία (Νταβίδης, 1982).

ΒΑΜΒΑΚΑΔΑ Μαραθεύτικο.

ΦΡΑΟΥΛΑ (ΚΟΚΚΙΝΗ) Fraoula de Thessalie, Fraoula rouge, Fraula, Fraula kokini, Phraoula kokkini, Phraoula rodini, Phraoula rose, Phraoula kokkine, Raisin fraise, Rodinos, Roumi ahmar (VIVC).

Υπάρχει και Φράουλα λευκή και μαύρη.

ΑΕΤΟΝΥΧΙ ΑΣΠΡΟ Πιπερίονος, Κοντεγάλο, Cornichon blanc, Olivette blanche, Uva Galleta, Ditto di Donna, Pizzutello, (Νταβίδης, 1982), Aetoniki, Aetonychi blanc, Aitonychi lefko, Aetonishi bean, Aetonychi aspro, Aitonychi aspro (VIVC).

- Υπάρχει και Αετονύχι κόκκινο και μαύρο.

ΜΟΣΧΑΤΟ ΜΑΥΡΟ Muscat Hamburg, Black Hamburg, Black Muskat, Black Muscat of Alexandria, Black of Alexandria, Chasselas Muscat, Golden Hamburg, Esperione, Fekete Muskotaly, Gulabi, Hambourg Musque, Hamburg Misketi, Hamburg Musque, Hamburgi Muskotaly, Hamburgii Muskotaly, Hamburgeskii Misket, Hamburshi Muscat, Hamburski Muskat, Hampton Court vine, Kekmuskotaly, Mai-Gui-San, Malaga rouge, Mavro Moschato, Mei-Gun-Sjan, Misket Hamburski, Misket Siyah, Moscatel de

Hambourgo, Moscatel de Hamburgo, Moscatel negro, Moscatel prato, Moscatellone rosso, Moscato d' Amburgo, Moscato di Amburgo, Moscato nero, Moscato nero di Amburgo, Moschato Amvourgou, Moschato Tyrnavou, Muscat Albertdient's, Muscat Cernii Aleksandriiskii, Muscat de Hambourg, Muscat de Hamburg, Muscat Gamburgskii, Muscat Gamburgskiy, Muscat Gordo Encarnado, Muscat Hambro, Muscat Hambrug Crni, Muscat rouge foscati, Muskat de Hambourg, Muskat Gamburskii, Muskat Gamburskij, Muskat Hamburg, Muskat Preto, Muskat Trollinger, Muskateller Trollinger, Muskattrollinger, Myrodato, Myrodato proimo, Oeillade Musquee, Red Muskat of Alexandria, Salamanna rossa, Salisbury Violet, Siyah Misket, Snow's, Snow's Muscat Hamburg, Tamaiioasa Hambrug, Tamaiioasa neagra, Tamiioasa Hamburg, Tamiioasa neagra, Trollinger Muscateller, Venn's seedling, Venn's seedling black Muscat, Visparu Sihwarser, Zibibbo nero (VIVC), Admiral, Black Gibraltar, Black Hamburg, Black Portugal, Black Teneriffe, Blue Trollinger, Bocksaugen, Bommerer, Brown Hamburg, Dutch Hamburg, Fleisch Traube, Frankendale, Frankenthal, Frankenthaler, Frankenthaler gros noir, Gelbholziger Trollinger, Gibraltar, Hudler, Languedoc, Lugiana nera, Malvasier, Mohrendutte, Pale Wooded Trollinger, Purple Hamburg, Red Hamburg, Richmond Villa Hamburg, Schiava Grossa, Schwarzeblauer Gutedel, Schwarzeblauer Trollinger, Schwarzer Gutedel, Schwarzwelscher, Troller, Trollinger, Valentines, Victoria, Warner's, Warner's Black Hamburg, Warner's Hamburg, Weissholziger Trollinger, Welscher (NGR).

BLACK ROSE Blek roz

VICTORIA Hibridul 2-13- 8, Victoria blanc, Vittoria

ALPHONSE LAVALLEE Afrikai Szoeloe, Alfons, Almeria negra, Alphonse Lavalée, Alphonse Lavallée, Ansleys Large Oval, Barbarou, Black Marocco, Black Muscadel, Blaue Geisdutte, Blaue Oliventraube, Blauer Damascener, Cespljevna, De Eenfes, Enfes, Entes, Garnacha roja, Gros noir, Grosse noir, Karatopalak, Moltge, Oktyabrskii, Persia, Petit Ribier, Petit Ribier, Petit Rouvier, Prince Royal Albert, Raisin d' Afrique, Raisin du Jerusalem, Raisin St. Antoine, Revier d' Anjou, Ribiere, Ribier noir, Rimpie, Rivier,

Riviere, Royal, Royal Albert, Royal Emile Terhyden, Royal Terheyden, Slyvovy, Tintillo
(NGR, VIVC)

BLACK MONUKKA Sultanina nera, Sultanine noire

RUBY SEEDLESS I8-17, King's ruby, Kings ruby, Moscatel de Malaga, Rubi sidles
(VIVC)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ALPHONSE LAVALLEE



VICTORIA



BLACK ROSE



BARLINKA



RUBY SEEDLESS



ΜΟΣΧΑΤΟ ΜΑΥΡΟ



BLACK MONUKKA



ΕΦΤΑΚΙΛΟ



ΦΡΑΟΥΛΑ



ΒΑΜΒΑΚΑΔΑ



ΑΕΤΟΝΥΧΙ ΑΣΠΡΟ



ΑΛΟΝΑΡΙ



ΣΙΡΙΒΙΤΙΑΝΟ



ΓΙΑΝΝΟΥΔΙ



ΦΛΟΥΡΙΚΟ ΑΛΩΝΑΣ



ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ

RICHTER No 99

RICHTER No 110



COUDERC 3309



41B



140 RUGGERI



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adam-Blondon AF, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D and This P (2004) Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: A tool for grape genetics. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1017-1027.
- Agarwal M, Shrivastava N and Padh H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* **27**: 617-631.
- Althoff DM, Gitzendanner MA, Segraves KA (2007) The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst Biol* **56**: 477-484
- Arroyo-Garcia R Lefort F, de Andrés MT, Ibáñez J, Borrego J, Jouve N, Cabello F and Martinez-Zapater JM (2002) Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species. *Genome* **45**(6): 1142-1149.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **196**: 80-83.
- Bauer F and Zyprian E (1997) Identification of grapevine rootstock cv. Borner and differentiation of 125AA from 5BB and SO₄. *Vitis* **36**(4): 185-189.
- Beidler JL Hilliard PR and Rill RL (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* **126**: 374-380.
- Benjak A, Ercisli S, Vokurka A, Maletic E, and Pejic I (2005) Genetic relationships among grapevine cultivars native to Croatia, Greece and Turkey. *Vitis* **44**(2): 73-77.
- Benin M, Gasquez J Mahfoudi A and Bessis R (1988) Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d' isoenzymes foliaires: essai de classification des variétés. *Vitis* **27**: 157-172.
- Birnboim HC. and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Res.* **7**(6): 1513-1523.
- Blakesley RW (1993) Cycle sequencing in *DNA Sequencing Protocols, vol. 23, Methods in Molecular Biology*, editors Griffin HG and Griffin AM, Humana, Totowa, NJ, pp.209-217.
- Blum H, Beier H and Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Botta R, Scott NS, Eynard I and Thomas MR (1995) Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis* **34**(2): 99-102.
- Boursiquot JM et Parra P (1996) Contribution a l' utilization des isozymes pour l' identification des porte-greffe et des cepages. *Riv. Vitic. Enol.* **1**: 41-49.
- Bourquin JC, Otten L and Walter B (1995) PCR-RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Parthenocissus* and its application to the identification of rootstocks. *Vitis* **34**(2): 103-108.

- Bourquin JC, Otten L and Walter B (1991) Identification of grapevine rootstocks by RFLP. *Comptes-Rendus de l'Academie des Sciences de Paris Series III* **312**: 593-598.
- Bourquin JC, Sonko A, Otten L and Walter B (1993) Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Gen.* **87**: 431-438.
- Bourquin JC, Tournier P, Otten L, Walter B (1992) Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RAPDs analysis of nuclear DNA extracted from the wood. *Vitis* **31**: 157-162.
- Bowers JE, Dangl GS, Meredith CP (1999b) Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am J Enol Vitic*, **50**(30): 243-246.
- Bowers JE, Dangl GS, Vignani R, Meredith CP (1996) Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* **39**: 628-633.
- Bowers JE and Meredith CP (1996) Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. *J.Amer. Soc. Hort. Sci* **121**(4): 620-624.
- Buscher N, Zyprian E, Bachmann O and Blaich R (1994) On the origin of the grapevine variety Muller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA(RAPD). *Vitis* **33**: 15-17.
- Buscher N, Zyprian E and Blaich R (1993) Identification of grapevine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of RAPD DNA techniques using 10mer primers. *Vitis* **32**: 187-188.
- Calo A, Costacurta A, Paludetti G, Calo G, Aruselkar S. and Parfit D (1989) The use of isoenzyme markers to characterize grape cultivars. *Rivista Vitic. Enol.* **42**(1): 15-22.
- Cervera MT, Cabezas A, Sancha JC, Martinez de Toda and Martinez-Zapater JM (1998) Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Gen.* **97**(1-2): 51-59.
- Cipriani G, Frazza G, Peterlunger E, Testolin R (1994) Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis* **33**: 211-215.
- Collins GG and Symons RH (1993) Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD-PCR technique. *Plant Mol.Biol.Rep.***11**:105-112.
- Crespan M, Milani N. (2001): The Muscats: a molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. *Vitis***40**: 23-30.
- Creste S, Tulmann Neto A and Figueira A (2001) Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 299-306.
- Dakin EE and Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredit* **93**: 504-509.
- Dettweiler E (1991) Preliminary minimal descriptor list for grapevine varieties. Institute of Grapevine Breeding, Geilweilerhof.

- Eiras-Dias JE and Bruno-Sousa R (1998) Isoenzymatic polymorphism differentiation of Portuguese grapevine cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**(1): 86-90.
- Eiras-Dias JE, Sousa S, Cabral F and Carralho I (1989) Isoenzymatic characterization of Portuguese vine varieties of *Vitis vinifera* L. *Rivista Vitic. Enol.* **42**(1): 23-26.
- Fukuoka S, Inoue T, Miyao A and Monna L (1994). Mapping of sequence-tagged sites in rice by single conformation polymorphism. *DNA Res* **1**: 271-277.
- Goldstein DB, Ruiz-Linarez A, Cavalli-Sforza and Feldman MW (1995b) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* **139**: 463-471.
- Goldstein DB, Ruiz Linarez A. Cavalli-Sforza and Feldman MW (1995a) Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**: 6723-6725.
- Gogorcena Y, Arulsekar S, Dandekar AM and Parfitt DE (1993) Molecular markers for grape characterisation. *Vitis*. **32**: 183-185.
- Grassi F, Imazio S, Failla O, Scienza A, Ocete Rubio R, Lopez MA, Sala F and Labra M (2000) Genetic isolation and diffusion of wild grapevine Italian and Spanish populations as estimated by nuclear and chloroplast SSR analysis. *Plant Biol (Stuttg)* **5**(6): 608-614.
- Grando MS, Bellin D, Edwards KJ, Pozzi C, Stefanini M and Velasco R (2003). Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* mchx. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1213-1224.
- Grando MS, De Micheli L, Biasetto L and Scienza A (1995) RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. *Vitis* **34**: 37-39.
- Grando MS, De Micheli L and Scienza A (1996) Characterization of *Vitis* germplasm using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **43**: 187-192.
- Guerra B and Meredith CP (1995) Comparison of *Vitis berlandieri* X *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis* **34**(2): 109-112.
- Hayashi K (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Cell* **5**: 180-184.
- Herrera R, Cares V, Wilkinson MJ and Caligari PDS (2002) Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from Central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. *Euphytica* **124**(1): 139-145.
- Herring AJ, Inglis N.F, Ojeh CK, Snodgrass DR and Menzies JD (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiology* **16**: 473-477.
- Hong LI, Walker MA and Lin H (1998) Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**: 403-407.
- Hu J and Vick BA (2003) Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol Biol Rep* **21**: 289-294.

Hvarleva T, Hadjinicoli A, Atanassov I, Atanassov A and Ioannou N (2005) Genotyping *Vitis vinifera* L. Cultivars of Cyprus by microsatellite analysis. *Vitis* **44**(2): 93-97.

Hvarleva T, Rusanov K, Lefort F, Tsvetkov L, Ahanassov A and Atanassov I (2004) Genotyping of Bulgarian *Vitis vinifera* cultivars by microsatellite analysis. *Vitis* **43**(1): 27-34.

Ibañez J, Andrés MT, Molino A and Borrego J (2003) Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**: 22-29.

IDENTITY 1.0 by Wagner HW and Sefc KM (1999) <http://www.boku.ac.at/zag/identity.htm>.

Ish-Horowicz D and Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning *Nucleic Acids Res* **9**(13): 2989-2998.

Jarne P and Lagoda PJJ (1996) Microsatellites from molecules to population and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 424-429.

Jean-Jacques I, Defontaine A, Hallet JN (1993) Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* **32**: 189-190

Karatas H, Değirmenci D, Velasco R, Vezzulli S, Bodur Ç and Ağaoğlu YS (2007) Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. *Sc. Hort.* **114**: 164-169.

Karp A and Edwards KJ (1997) DNA markers: a global overview in *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews*. Edited by Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff., Gutavo.

Kashi Y and Soller M (1999). Functional Roles of Microsatellites. In: *Microsatellite-Evolution and Applications*. Edited by Goldstein and Schlotterer. Oxford University Press.

Labra M, Moriondo G, Schneider A, Grassi F, Failla O, Scienza O and Sala F (2002) Biodiversity of grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in Aosta Valley. *Vitis* **41**: 89-92.

Lamboy WF, Alpha CG (1998) Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis vinifera* L.) species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **123**: 182-188.

Lefort F, Anzidei M, Roubelakis-Angelakis KA and Vendramin GG (2000a) Microsatellite profiling of the Greek Muscat cultivars with nuclear and chloroplast SSRs markers. *Quaderni della Scuola di Specializzazione in Scienze Viticole ed Enologiche* **23**: 57-82.

Lefort F, Primikiris N and Roubelakis-Angelakis KA (2001) Δημιουργία τράπεζας πληροφοριών για τις ελληνικές ποικλίες αμπέλου. [Development of a database for Greek grapevine cultivars; in Green with English summary] in: *Proceedings of the 9th symposium "Arts and techniques of viticulture and enology in Northern Greece"*, Ed. ETBA, Athens, Greece (in press).

Lefort F and Roubelakis-Angelakis KA (2000) The Greek Vitis Database, a multimedia web-backed genetic germplasm management of Vitis resources in Greece. *Journal of Wine Research* **11**(3): 233-242.

- Levinson G and Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 203-221.
- Li G and Quiros CF (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 455-546.
- Lin H and Walker MA (1997) Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *HortScience* **32**(7): 1264-1266.
- Lopes MS, Sefc KM, Eiras Dias E, Steinkellner H, Iaimer da Camara Machado M and da Camara Machado A (1999) The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection *Theor. Appl. Gen.* **99**(3-4): 733-739.
- Lopez M, Cid N, Gonzales MV, Cuenca B, Prado MJ and Rey M (2009) Microsatellite and RFLP analysis of autochthonous Grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Am. J. Enol. Vitic.* **60**(2): 215-222.
- Lopez MS, Rodrigues dos Santos M, EirasDias JE, Mendonça and da Câmara Machado A (2006) Discrimination of Portuguese grapevines based on microsatellites markers. *Journal of Biotechnology* **127**: 34-44.
- Loureiro MD, Martinez MC, Boursiquot JM, This P (1998) Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* "albarino" and some similar grapevine cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **123**: 842-848.
- Maletic E, Sefc KM, Steinkellner H, Kontic JK and Pejic I (1999) Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring regions. *Vitis* **38**(2): 79-83.
- Marshall DR and Brown AHD (1975) The charge-state model of protein polymorphism in natural populations. *J. Mol. Evol.* **6**: 149-163.
- Martin JP, Borrego J, Cabello F and Ortiz JM (2003) Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence tagged microsatellite site markers. *Genome* **46**: 10-18.
- Martinez LE, Cavagnaro PF, Masuelli RW and Zúñiga M (2006) SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* cultivars. *Plant Science* **170**: 1036-1044.
- Mauro MC, Strefeler M, Weeden NF and Reisch BI (1992) Genetic analysis of restriction fragment length polymorphisms in *Vitis*. *J. Hered.* **83**: 18-21.
- Maxam AM and Gilbert W (1997) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**: 560-564.
- Masi E, Vignari R, Sensi E, Scali M, Cresti M and Boselli M (2004) Sequence analysis of microsatellite and its flanking regions in intraspecific hybrids of grapevines (*Vitis vinifera* L.) *Vitis* **43**(2): 69-73.

- Merdinoglu D, Butterlin G, Bevilacqua L, Chiquet V, Adam - Blondon AF and Decroocq S (2005) Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Mol. Breed.* **15**: 349-366.
- Moxon ER, Richard E and Willis C (1999a) DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* Pp 94-99.
- Moxon ER, Richard E and Willis C (1999b) DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* Pp 72-77.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA and Ebert MH (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**: 1437-1438.
- Nei M (1975) *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland, Amsterdam and New York.
- Nunez Y, Fresno J, Torres V, Ponz F and Gallego FJ (2004). Practical use of microsatellite markers to manage *Vitis vinifera* germplasm: Molecular identification of grapevine samples collected blindly in D.O. "El Bierzo" (Spain). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **79**(3): 437-440.
- O.I.V. (1984) *Codes des caracteres descriptifs des varietes et espes de Vitis*. Ed. Denon, Paris.
- Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 985-999.
- Pellerone FI, Edwards JK and Thomas MR (2001) Grapevine microsatellite repeats: Isolation, characterization and use for grape germplasm from Southern Italy. *Vitis*, **40**: 179-186.
- Pinto-Carnidae O, Martin JP, Leal F, Castro J, Guedas-Pinto H and Ortiz JM (2003) Characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from northern Portugal using RAPD and microsatellite markers. *Vitis* **32**(1): 23-25.
- Queller OC, Strassman JE and Hughes CR (1993) Microsatellites and Kinship. *Trends in Ecology and Evaluation* **8**: 285-288.
- Qu X, Lu J and Lamikanra O (1996) Genetic diversity in Muscadine and American bunch grapes based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **121**(6): 1020-1023.
- Ramezani A, Haddad R and Dorostkar M (2009) Genetic diversity of grapevine accessions from Iran, Russia and USA using microsatellite markers. *Pak. J. Biol.Sci.* **12**: 152-157.
- Reisch BI (1998) Molecular markers - The foundation for grapevine genetic mapping, DNA fingerprinting and genomics. Proc VII International Symposium on grapevine genetics and breeding. *Acta Hort* 528.
- Regner F, Stadlbauer A, Eisenheld D and Kaserer H (2000) Genetic relationships among pinots and related cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* **51**(1): 7-14.

- Riaz S, Dangl GS, Edwards KJ and Meredith CP (2004) A microsatellite marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 864-872.
- Riaz S, Garrison KE, Dangl GS, Bourisquot JM and This P (2002) Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **127**: 508-514.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1997) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E and Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**: 915-919.
- Santos FR, Pena SDJ and Epplen JT (1993) Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genet* **90**: 655-656.
- Schaeffer H (1971) Enzymopolymorphismus in Rebenblättern. *Phytochemistry* **10**: 2601-2607
- Schlotterer C and Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**: 211-215.
- Schlotterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**:365-371.
- Schneider A, Carra A, Akkak A, This P, Laucou V, Botta R (2001) Verifying synonymies between grape cultivars from France and Northwestern Italy using molecular markers. *Vitis* **40**: 197-203.
- Scott KD, Eggler P, Seaton G, Rosseto M, Ablet EM, Lee LS and Henry RJ (2000) Analysis pf SSRs derived from grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 723-726.
- Sefc KM, Lefort F, Grando MS, Scott K, Steinkellner H, Thomas MR (2001) Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*. Edited by.Roubelakis-Angelakis KA, Kluwer Publishers, Amsterdam. Pp 433-463.
- Sefc KM, Lopes MS, Lefort F, Botta R, Roubelakis-Angelakis K, Ibáñez J, Pejic I, Wagner HW, Glössl J and Steinkellner H (2000) Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 498-505.
- Sefc KM, Regner F, Turetschek E, Glossl J and Steinkellner H (1999) Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* **42**: 367-373.
- Sefc KM, Steinkellner H, Glossl J, Kampfer S and Regner F (1998) Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 227-231.
- Sensi E, Rohdle W and Biricolti S (1996) Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA Marker technology. *Vitis* **35**(4): 183-188.

Silvestroni O, Donatella di Pietro, Intrieri C, Vignoni R, Filippetto I, Cecelia Del Casino, Scali M and Cresti M (1997) Detection of genetic diversity among clones of cv Fontana (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. *Vitis* **36**(3):147-150.

Sneath PHA and Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. Publisher *Freeman W H & Co.*

Soller M and Beckmann JS (1983) Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* **67**:25-33.

Sommerville LL and Wang K (1981) The ultrasensitive silver protein stain also detects nanograms of nucleic acids. *Biochem Biophys Res Commun* **102**: 530-548.

Sourdis J and Krimbas C (1987) Accuracy of Phylogenetic Trees Estimated from DNA Sequence Data. *Mol. Biol. Evol.* **4**(2): 159-166.

Stavrakis MN and Biniari K (1998) Genetic study of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphism. DNA markers. *Vitis* **37**(3): 119-122.

Striem MJ, Spiegel-Roy P, Ben-Hayyim G, Beckman J and Gidons D (1990) Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes *Vitis* **29**: 223-227.

Tachida H and Iizuka M (1992) Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* **131**: 471-478.

Tateno Y, Nei M, Tajima F (1982) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. I. Distantly related species. *J. Mol. Evol.* **18**: 387-404.

This P, Cusset C and Boursiquot JM (1997) Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships *Am.J.Enol.Vitic* **48**: 492-501.

This P, Jung A, Baccacci P, Borrego J, Botta R (2004) Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Gen* **109**: 1448-1458.

Thomas MR, Cain P and Scott NS (1994) DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* **25**: 939-949.

Thomas MR and Scott NS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence tagged sites (STSs), *Theor. Appl. Gen* **86**: 985-990.

Thomas MR and Scott NS (1994) Microsatellite sequence tagged site markers: simplified technique for rapidly obtaining flanking sequences. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**: 58-64.

Tscammer J and Zyprian E (1994) Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely Burgundies. *Vitis* **33**: 249-250.

Wade-Evans A (1996) Nonradioactive Cycle Sequencing of dsDNA in *Methods in Molecular Biology*, vol. 65: *PCR Sequencing Protocols*. Edited by Rapley R, Humana press Inc., Totowa, NJ, pp.91-99.

Wang Z, Weber JL, Zhong G and Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Gen* **88**: 1-6.

Walker MA and Liu L (1995) The use of isozymes to identify 60 grapevine rootstock (*Vitis* spp). *American Journal of Enology and Viticulture* **43**: 261-265.

Wu KS, Jones R, Danneberger L and Scolnic P (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res* **22**: 3257-3258.

Yamamoto N, Ono G, Takeshima K and Totsuka A (1991) Restriction fragment length polymorphisms of grapevine DNA with phenylalanine ammonia-lyase cDNA. *Jap. J Breed* **41**: 365-368.

Yamamoto NG, Mochioka R, Bonian L, Hashizume K, Umeda N and Horiuchi S (1998) RFLP and RAPD analysis of wild and cultivated grapes (*Vitis* spp). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **67**(4): 483-490.

Ye GN, Soulemezoglou G, Weeden NF, Lamboy WF, Pool RM and Reisch BI (1998) Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis* **38**(1): 33-38.

Zulini L, Russo M and Peterlunger E (2002) Genotyping wine and table grape cultivars from Apulia (Southern Italy) using microsatellite markers. *Vitis* **41**(4): 183-187.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αβαγιαννέλη Β (2005). Μελέτη των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) με την εφαρμογή μοριακών δεικτών (SSR). Μεταπτυχιακή μελέτη.

Αλαχιώτης Σ (2007). Εισαγωγή στην εξέλιξη. Εκδόσεις Λιβάνη.

Αμπαρτζίδη Σ (2006). Αμπελουργική μελέτη και αξιολόγηση ορισμένων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου. Μεταπτυχιακή μελέτη.

Αναγνωστόπουλος ΑΙ (2003). Μελέτη των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) με την εφαρμογή μοριακών δεικτών (SSR). Μεταπτυχιακή μελέτη.

Διαμαντόπουλος Η. (2006) Αμπελογραφική περιγραφή 23 γηγενών και ξενικής προέλευσης ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Μεταπτυχιακή μελέτη.

Δρακόπουλος Γ (2000) Αμπελογραφική περιγραφή ποικιλιών αμπέλου. Μεταπτυχιακή μελέτη.

Ζαρμπούτης ΒΓ και Τσιβεριώτου ΑΜ (2003). Στοιχεία Αμπελουργίας και Οινολογίας. Εκδόσεις Ίων.

Κούσουλας Ι.Κ (1995) Αμπελουργία. Εκδοτική Αγροτεχνική.

Μηνας Ι (1999) Μοριακή ταυτοποίηση καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς (*Olea europaea* L) Κύπρου με RAPDs. Μεταπτυχιακή μελέτη.

Μπινιάρη Κ (2000) Ταυτοποίηση και έλεγχος γνησιότητας των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών μεθόδων RAPD-PCR. Διδακτορική διατριβή.

Μπινιάρη Α, Σταυρακάκης ΜΝ και Χατζόπουλος Π (1996). Ταυτοποίηση των ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) με την μεθοδο RAPD-RCR. *Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών 5. 17^η Πανελλήνια Επιστημονική Συνεδρίαση, Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 1995.* 372-378.

Νταβίδης ΟΞ (1977). Ελληνική Αμπελουργία, Τόμος Α-Στοιχεία Γενικής Αμπελουργίας. Εκδόσεις Γ.Π.Α.

Νταβίδης ΟΞ (1982). Ελληνική Αμπελολογία, Τόμος Γ-Στοιχεία Αμπελογραφίας. Εκδόσεις Γ.Π.Α.

Σταυρακάκης ΜΝ (2004). Αμπελουργία iv-Ειδικά θέματα. Εκδόσεις Γ.Π.Α.

Σταυρακάκης ΜΝ (2000). Γενική Αμπελουργία. Εκδόσεις Γ.Π.Α.

Σταυρακάκης ΜΝ (2004). Ειδική Αμπελουργία-III. Θέματα Αμπελογραφίας. Εκδόσεις Γ.Π.Α.

Σταυρακάκης ΜΝ (1982). Η χρήση ενζυμικών πολυμορφισμών στη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Διδακτορική διατριβή.

Σταυρακάκης ΜΝ (1988) Συγκριτική μελέτη οκτώ ενζυμικών συστημάτων σε διάφορους “τύπους” Σουλτανίνας. *Γεωργική Έρευνα* **12**: 215-222.

Σταυρακάκης ΜΝ (1990) Συγκριτική μελέτη ποικιλιών αμπέλου της ομάδας “Μαυρούδια”. *Γεωργική Έρευνα* **14**: 19-29.

Σταυρακάκης ΜΝ (1991) Συγκριτική μελέτη των συνωνύμων της ποικιλίας οινοποιίας Σαββατιανό. *Γεωργική Έρευνα* **15**: 191-201.

Σταυρακάκης ΜΝ και Λουκάς Μ (1985) Διάκριση καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου με τη βοήθεια ενζυμικών πολυμορφισμών. *Γεωργική Έρευνα* **9**: 347-357.

Σταυρακάκης ΜΝ και Λουκάς Μ (1984) Συγκριτική μελέτη των ποικιλιών αμπέλου της ομάδας των Αητουχιών. *Γεωργική Έρευνα* **8**: 21-30.

Σταυρακάκης ΜΝ και Μπινιάρη Α (1998) Γενετική μελέτη της ποικιλίας αμπέλου Ροδίτης με τη βοήθεια μοριακών σημαντών. *Αγροτική έρευνα* **22**:45-52.

Σταυρακάκης ΜΝ., Συμινής Χ και Μπινιάρη Κ (1996) Η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ και εντός των ποικιλιών που καλλιεργούνται στη νήσο Σαντορίνη. *Γεωργική Έρευνα* **20**: 87-92.

Σταυρακάκης ΜΝ., Συμινής Χ, Μπινιάρη Κ και Σωτηρόπουλος Γ (2001). Αμπελουργία – Τεχνικά Επαγγελματικά Εκπαιδευτήρια.

Σωμαράκης Ν (2005) Αμπελογραφική μελέτη και αξιοποίηση ορισμένων ξενικών ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. Μεταπτυχιακή μελέτη.