



Αξιολόγηση και εφαρμογή μοριακών μεθόδων για τη διάκριση στελεχών μη-Σακχαρομυκήτων από ζυμούμενα γλεύκη

Εμμανουέλα Ε. Γυφτογιάννη

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Επιβλέπων καθηγητής Γ.Ι. Νυχάς

ΑΘΗΝΑ 2014

Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία

Αξιολόγηση και εφαρμογή μοριακών μεθόδων για τη διάκριση στελεχών μη-Σακχαρομυκήτων από ζυμούμενα γλεύκη

Εμμανουέλα Ε. Γυφτογιάννη

Επιβλέπων καθηγητής

Γ.Ι. Νυχάς

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Ε. Τσακαλίδου

Α. Νησιώτου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διαχωριστούν στελέχη δέκα ειδών non-*Saccharomyces* ζυμών οι οποίες λαμβάνουν μέρος στην ζύμωση του μούστου. Οι ζύμες που μελετήθηκαν απομονώθηκαν από το τέλος της ζύμωσης από δείγματα σταφυλιών προερχόμενα από δύο ευρύτερες οινοποιητικές περιοχές Νεμέα, Πελοπόννησος και Πεζά, Κρήτη.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να πετύχουμε διαχωρισμό μεταξύ των στελεχών ήταν οι RAPD-PCR και η Tandem Repeat tRNA-PCR.

Καταφέραμε να δείξουμε έναν σημαντικό διαχωρισμό στο επίπεδο στελέχους για τα είδη *Issathenckia orientalis* και *Hanseniaspora uvarum* με την χρήση RAPD-PCR, καθώς και να συνδέσουμε συγκεκριμένους γονοτύπους με την γεωγραφική τους προέλευση για τα στελέχη των ειδών *Lachancea thermotolerans* και *Metschnikowia pulcherimma* με χρήση της μεθόδου Tandem Repeat tRNA-PCR.

Συγκεκριμένα, δείξαμε για το *L.thermotolerans* ότι η γενετική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών των αμπελώνων εντός κάθε οινοποιητικής περιοχής συσχετίζεται με την γεωγραφική απόσταση μεταξύ των αμπελώνων.

Σαν συμπέρασμα, υπάρχουν ενδείξεις για σύνδεση συγκεκριμένων στελεχών του είδους *L.thermotolerans* με συγκεκριμένες γεωγραφικές υποπεριοχές, αν και απαιτούνται επαναληπτικές αναλύσεις από άλλες χρονιές. Τέλος έχουμε κάποια στοιχεία ότι ίσως οι υψομετρικές διαφορές να συσχετίζονται με γενετικές αποστάσεις.

Λέξεις κλειδιά: **κρασί, ζυμώσεις, ζύμες μη-Σακχαρομύκητες, *L.thermotolerans*, μοριακές μέθοδοι, διαχωρισμός στελεχών, γενετική απόσταση, γεωγραφική απόσταση**

ABSTRACT

Evaluation and implementation of molecular methods for discrimination of non-Saccharomyces strains isolated from grape must.

The aim of the present study was to assort different strains of ten non-*Saccharomyces* yeast species that take part in must fermentation. The methods employed for achieving a high level of discrimination among yeast strains, were RAPD-PCR and Tandem Repeat tRNA-PCR. We used yeasts isolated from the end of must fermentation process from two Greek wine producing regions Nemea, Peloponissos and Peza, Crete.

We managed to show not only that use of RAPD-PCR results in a high amount of polymorphisms for species *Issathenckia orientalis* and *Hanseniaspora uvarum* but also to link specific genotypes with geographical origin for species *Lachancea thermotolerans* and *Metschnikowia pulcherimma*, by use of Tandem Repeat tRNA-PCR for these latter species.

Specifically, we showed that geographical distance within a certain region (Peza or Nemea) correlates with genetic distance among strain populations of vineyards for *L. thermotolerans*.

As a result, there are indications for association of specific strains of *L. thermotolerans* to specific “terroirs” although we need to perform extra analyses from more seasons of cultivation. Finally we have some clues that maybe altitude also correlates with genetic distance.

Keywords: wine, fermentation, non-Saccharomyces yeasts, *L.thermotolerans*, fingerprinting, strains, genetic distance, geographical distance, terroir

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον καθηγητή κ.Νυχά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την καλλιέργεια ενός κλίματος επαγγελματισμού σε όλη την διάρκεια των σπουδών, το οποίο βοηθά να αναπτυχθεί η κριτική ικανότητα και διασφαλίζει την αντικειμενικότητα και το ήθος προϋποθέσεις απαραίτητες όταν κανείς ασχολείται με επιστημονικά θέματα.

Η ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Οίνου του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-«ΔΗΜΗΤΡΑ» ΝΠΙΔ, υπό την επίβλεψη της ερευνήτριας Δρ. Α. Νησιώτου. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς την ερευνήτρια Δρ. Ασπασία Νησιώτου, για την ευκαιρία που μου έδωσε μέσω της πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Οίνου να ασχοληθώ με ένα πάρα πολύ ενδιαφέρον επιστημονικό θέμα. Η δε παρέμβαση της σε καίρια σημεία κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης βοήθησε στο να δημιουργηθεί το κατάλληλο πλαίσιο για ένα βέλτιστο αποτέλεσμα. Οι ιδέες της για τα θέματα έρευνας του εργαστηρίου μαζί με μια δεμένη ομάδα πολύ ικανών και ζεστών συναδέλφων έκανε την εμπειρία της ερευνητικής μελέτης πολύ ευχάριστη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την δεσποινίδα Μαρίλια Φιλιππούση χωρίς την τεχνική βοήθεια της οποίας δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί η μελέτη σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα.

Ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να εκφράσω στην αγαπητή φίλη και συνάδελφο Δρ. Αναστασία Γιώτη για κριτική επισκόπηση του κειμένου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στον σύντροφο και σύζυγο μου κ Γιώργο Παπαθανασίου που πιστεύει σε εμένα, πάντα με στηρίζει ηθικά και συναισθηματικά και ο οποίος σε όλη τη διάρκεια των σπουδών και πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας φρόντισε να δημιουργήσει ένα περιβάλλον κατάλληλο ώστε να μπορέσω να εργαστώ απρόσκοπτα. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την δημιουργία των χαρτών των δύο περιοχών μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
Κρασί και ζύμες	10
Ρόλος των non- <i>Saccharomyces</i> ζυμών	13
Μοριακός χαρακτηρισμός των non- <i>Saccharomyces</i> ζυμών σε επίπεδο είδους	15
Μοριακός χαρακτηρισμός των non- <i>Saccharomyces</i> ζυμών σε επίπεδο στελέχους.....	18
Γενετική ανάλυση πληθυσμών.....	23
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
Καλλιέργειες ζυμών.....	24
Απομόνωση DNA.....	24
Ανάλυση PCR	25
Ανάλυση δεδομένων σε επίπεδο στελεχών.....	28
Διακριτική ικανότητα μοριακών μεθόδων.....	31
Μεθοδολογία ανάλυσης πληθυσμών	31
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
Δειγματοληψία.....	36
Αρχική δοκιμασία (screening) για επιλογή των κατάλληλων εκκινητών.....	39
Παράδειγμα σημείωσης πολυμορφισμών από πήκτωμα αγαρόζης	46
Δείκτης διακριτικής ικανότητας μοριακών μεθόδων	48
Παρουσίαση γονοτύπων ανά δείγμα και ανά αμπελώνα	48
Βιοποικιλότητα ανά αμπελώνα και ανά περιοχή μελέτης	52
Παρουσίαση αναλύσεων σε επίπεδο ατόμων με δύο μεθοδολογίες	60
Αποτελέσματα σε επίπεδο ατόμων για 6 είδη με μικρούς πληθυσμούς.....	74
Γενετική ανάλυση πληθυσμών.....	79
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
<i>L.thermotolerans</i>	97
<i>I.orientalis</i>	99
<i>H.uvarum</i>	101

<i>M.pulcherimma</i>	102
Συμπεράσματα	104
Ως προς τα δένδρογράμματα των ατόμων	104
Γενετική απόσταση.....	104
Αξιολόγηση των δύο μεθόδων PCR.....	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ TANDEM REPEAT TRNA-PCR	25
ΠΙΝΑΚΑΣ 2:ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ RAPD-PCR ΜΕ ΕΚΚΙΝΗΤΗ ΤΟΝ GTG3	26
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 :ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ RAPD-PCR ΜΕ ΕΚΚΙΝΗΤΗ ΤΟΝ R5	26
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	27
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΥΚΝΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΑΕ	27
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ ΑΜΠΕΛΩΝΑ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΝΕΜΕΑ.....	36
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ ΑΜΠΕΛΩΝΑ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΖΑ.....	37
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΠΟΣΟΣΤΑ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΕΙΧΑΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ.	39
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 ΤΙΜΕΣ ΔΕΙΚΤΗ SIMPSON ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΖΥΜΗΣ.....	48
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: <i>L.THERMOTOLERANS</i> ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΤΑΙ Ο ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΑ ΑΜΠΕΛΩΝΑ, ΟΙ ΚΟΙΝΟΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΩΣ Ο ΛΟΓΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΑΝΑ ΑΜΠΕΛΩΝΑ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΝΑ ΑΜΠΕΛΩΝΑ.	55
ΠΙΝΑΚΑΣ 11 <i>I.ORIENTALIS</i> ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 12 <i>H.UVARUM</i> ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 13 <i>M.PULCHERIMMA</i> ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ	57
ΠΙΝΑΚΑΣ 14 ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΤΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΓΙΑ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΜΠΕΛΩΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ Ο ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ, ΤΑ ΜΟΝΑΔΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΙ ΤΑ ΚΟΙΝΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ Η ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ.....	57
ΠΙΝΑΚΑΣ 15 ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΩΝ ΠΕΖΩΝ	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 16 ΠΟΣΟΣΤΑ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΝΕΜΕΑΣ	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 17 ΤΙΜΕΣ ΔΕΙΚΤΗ SHANNON ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΖΥΜΗΣ	80
ΠΙΝΑΚΑΣ 18 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΝΕΜΕΑΣ ΚΑΙ ΠΕΖΩΝ.....	80
ΠΙΝΑΚΑΣ 19 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΝΕΜΕΑ ΚΑΙ ΠΕΖΑ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΣ ΖΥΜΗΣ	81
ΠΙΝΑΚΑΣ 20 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΙΔΟΣ ΖΥΜΗΣ	81
ΠΙΝΑΚΑΣ 21 ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΥΨΟΜΕΤΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	96

ΕΙΚΟΝΑ 1. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΓΙΑ ΤΑ RRNA ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	16
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΧΑΡΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΕΖΩΝ.	34
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΧΑΡΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΝΕΜΕΑΣ.....	35
ΕΙΚΟΝΑ 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	40
ΕΙΚΟΝΑ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>I.ORIENTALIS</i>	41
ΕΙΚΟΝΑ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>M.PULCHERIMMA</i> (M.P)ΚΑΙ <i>H.UVARUM</i> (H.U).....	42
ΕΙΚΟΝΑ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>P.ANOMALA</i> (P.A) ΚΑΙ <i>M.CARIBICA</i> (M.C).	43
ΕΙΚΟΝΑ 8 . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>P.OSMOPHILA</i>	44
ΕΙΚΟΝΑ 9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ <i>H.PSEUDOBURTONII</i> (H.PS), <i>H.GUILLERMONDII</i> (H.G) ΚΑΙ <i>T.DELBRUECKII</i> (T.D).	45
ΕΙΚΟΝΑ 10 ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1,8% ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	46
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1,8% ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	47
ΕΙΚΟΝΑ 12:ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΔΕΙΓΜΑ (%)ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	48
ΕΙΚΟΝΑ 13 ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΑΜΠΕΛΩΝΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	49
ΕΙΚΟΝΑ 14 ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΔΕΙΓΜΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>I.ORIENTALIS</i>	49
ΕΙΚΟΝΑ 15: ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΑΜΠΕΛΩΝΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>I.ORIENTALIS</i>	50
ΕΙΚΟΝΑ 16: ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΔΕΙΓΜΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>H.UVARUM</i>	50
ΕΙΚΟΝΑ 17: ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΑΜΠΕΛΩΝΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>H.UVARUM</i>	51
ΕΙΚΟΝΑ 18: ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΔΕΙΓΜΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>M.PULCHERIMMA</i>	51
ΕΙΚΟΝΑ 19: ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ/ΑΜΠΕΛΩΝΑ (%) ΓΙΑ ΤΟ <i>M.PULCHERIMMA</i>	52
ΕΙΚΟΝΑ 20. ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	61
ΕΙΚΟΝΑ 21:ΣΥΝΑΙΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i> ΜΕ RX-SUPPORT	62
ΕΙΚΟΝΑ 22: ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	63
ΕΙΚΟΝΑ 23 ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ ΤΟ <i>I.ORIENTALIS</i>	64
ΕΙΚΟΝΑ 24: <i>I.ORIENTALIS</i> ΣΥΝΑΙΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΟΠΟΥ ΕΧΕΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΘΕΙ ΚΑΙ ΤΟ RX-SUPPORT	65
ΕΙΚΟΝΑ 25: ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ <i>I.ORIENTALIS</i>	66
ΕΙΚΟΝΑ 26. ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ <i>H.UVARUM</i>	67
ΕΙΚΟΝΑ 27: <i>H.UVARUM</i> ΣΥΝΑΙΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΟΠΟΥ ΕΧΕΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΘΕΙ ΚΑΙ ΤΟ RX-SUPPORT	68
ΕΙΚΟΝΑ 28 : ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ <i>H.UVARUM</i>	69
ΕΙΚΟΝΑ 29. ΥΡΜΓΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ <i>M. PULCHERIMMA</i>	70
ΕΙΚΟΝΑ 30: <i>M.PULCHERIMMA</i> ΣΥΝΑΙΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΟΠΟΥ ΕΧΕΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΘΕΙ ΚΑΙ ΤΟ RX-SUPPORT	71
ΕΙΚΟΝΑ 31: ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ <i>M.PULCHERIMMA</i>	72
ΕΙΚΟΝΑ 32 ΥΡΜΓΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ <i>P.ANOMALA</i>	74
ΕΙΚΟΝΑ 33 ΥΡΜΓΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ <i>H.GUILLERMONDII</i>	75
ΕΙΚΟΝΑ 34. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΓΙΑ <i>H.GUILLERMONDII</i>	76
ΕΙΚΟΝΑ 35. ΥΡΜΓΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ <i>P.OSMOPHILA</i>	77
ΕΙΚΟΝΑ 36. ΥΡΜΓΑ ΔΕΝΔΡΟ ΓΙΑ <i>T. DELBRUECKII</i>	78
ΕΙΚΟΝΑ 37 ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΦΣΤ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΖΕΥΓΩΝ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΟ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	82

ΕΙΚΟΝΑ 38: ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ <i>L.THERMOTOLERANS</i> , ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΤΙΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.....	83
ΕΙΚΟΝΑ 39.ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΦΣΤ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΖΕΥΓΩΝ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ <i>I.ORIENTALIS</i>	85
ΕΙΚΟΝΑ 40: ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ <i>I.ORIENTALIS</i> , ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΤΙΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.....	86
ΕΙΚΟΝΑ 41.ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΦΣΤ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΖΕΥΓΩΝ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ <i>H.UVARUM</i>	88
ΕΙΚΟΝΑ 42: ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ <i>H.UVARUM</i> , ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΤΙΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.....	89
ΕΙΚΟΝΑ 43 ΥΡΓΜΑ ΔΕΝΔΡΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΦΣΤ ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΖΕΥΓΩΝ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ <i>M.PULCHERIMMA</i>	91
ΕΙΚΟΝΑ 44 : ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΓΙΑ <i>M.PULCHERIMMA</i> , ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΕΣ ΣΤΙΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.....	92
ΕΙΚΟΝΑ 45. ΔΕΝΔΡΟ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΧΟΡΔΗΣ .ΩΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΕΧΟΥΝ ΟΡΙΣΤΕΙ ΤΑ ΑΤΟΜΑ <i>L.THERMOTOLERANS</i> ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ ΣΕ ΚΑΠΟΙΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΥΨΟΜΕΤΡΟ.	94
ΕΙΚΟΝΑ 46. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΟΛΑ ΤΑ ΑΤΟΜΑ <i>L.THERMOTOLERANS</i>	95

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κρασί και ζύμες

Η διαδικασία παραγωγής κρασιού είναι πολύπλοκη και παίζουν ρόλο διάφοροι παράγοντες για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Μέσα σε αυτούς τους παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του τελικώς παραγόμενου οίνου, συμπεριλαμβάνονται οι πρακτικές διαχείρισης του αμπελώνα, οι τεχνικές παραγωγής οίνου καθώς και τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιούνται[1].

Όσον αφορά την πρακτική πλευρά της παράγωγης οίνου, αυτή διενεργείται σε ειδικούς χώρους (οινοποιεία) και η διαδικασία που ακολουθείται αρχίζει με τη συλλογή των καρπών των σταφυλιών, τη δημιουργία του μούστου και τη ζύμωση αυτού από μικροοργανισμούς. Εμπορικά και για την παραγωγή ενός τυποποιημένου προϊόντος για τη ζύμωση του γλεύκους χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στελέχη του γένους *Saccharomyces*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλκοολική ζύμωση. Την μετατροπή δηλαδή των σακχάρων που περιέχονται στο γλεύκος σε αιθανόλη.

Παρά το γεγονός ότι η διαδικασία μετατροπής μούστου σε κρασί φαίνεται απλή και καλά εδραιωμένη –μια διαδικασία εξάλλου η οποία ακόμη και σήμερα πραγματοποιείται και εμπειρικά- φαίνεται από τα επιστημονικά ευρήματα ότι κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων της ζύμωσης, φιλοξενούνται πληθώρα ειδών ζυμών.

Περίπου μέχρι το 1980, παρόλο που ήταν γνωστή η ύπαρξη και άλλων ειδών ζυμών εκτός από το κύριο είδος το οποίο χρησιμοποιείτο για την αλκοολική ζύμωση, δηλαδή το *Saccharomyces cerevisiae*, αυτές οι ζύμες θεωρείτο ότι είναι δευτερεύουσας σημασίας για την παραγωγή οίνου ή ακόμη και ανεπιθύμητες [2], και η κλασική πρακτική συμπεριελάμβανε τον εμβολιασμό του μούστου με το κατάλληλο εμβόλιο και την προσθήκη διοξειδίου του θείου, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση αυτών των non-*Saccharomyces* ζυμών (μη-Σακχαρομύκητες) (2).

Από τους καρπούς του σταφυλιού έχουν απομονωθεί διάφορες ζύμες όπως ζύμες που ανήκουν στα γένη *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issathenckia*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspota* [3]

Ο λόγος για τον οποίο υπάρχουν αυτοί οι πληθυσμοί ζυμών non-*Saccharomyces*, που μπορούν να φτάσουν ακόμα και τα 10^7 cfu/ml [4] στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, οφείλεται στην οικολογία του καρπού του σταφυλιού. Δηλαδή αυτές οι ζύμες προϋπάρχουν στην επιφάνεια της φλούδας του καρπού του σταφυλιού. Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι δύσκολα απομονώνεται ο *S.cerevisiae* από καρπούς σταφυλιού και μόνο με μεθόδους εμπλουτισμού. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί πως σε μια μελέτη [5], ο συγγραφέας θεωρεί πως ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την βιοποικιλότητα των ζυμών στην επιφάνεια των καρπών των σταφυλιών είναι η κατάσταση της υγείας στην οποία βρίσκονται οι καρποί αυτοί. Με άλλα λόγια, το πόσο ώριμα είναι τα σταφύλια και τι θρεπτικά υπάρχουν ορίζει αυτή την ποικιλία και τον αριθμό των ζυμών. Ταυτόχρονα τονίζεται πως ένα γεγονός που έχει υποτιμηθεί έως τώρα στις μελέτες της οικολογίας των ζυμών είναι το κατά πόσο οι καρποί αυτοί είναι χτυπημένοι και φέρουν τραύματα. Ο συγγραφέας θεωρεί, ότι οι χτυπημένοι καρποί που βρίσκονται σε ένα τσαμπί σταφύλι και χρησιμοποιούνται στον δειγματοτισμό, προκαλούν μια υπερβολική αύξηση στον αριθμό των ειδών των ζυμών που απομονώνονται εντέλει.

Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες γενικές τάσεις ως προς τα είδη των απομονωμένων ζυμών σε φρέσκο μούστο. . Οι Esteve-Zarzoso et al το 2000 [6] σε αυθόρμητες ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας σε δεξαμενές των 10.000lt, βρήκαν ως κύριο γένος στα αρχικά στάδια της ζύμωσης την *Hanseniaspora*. Οι Beltran et al, 2002 [7] σε μια μελέτη έξι συνεχόμενων ετών σε ένα οινοποιείο απομόνωσαν ως κύρια είδη τα *Hanseniaspora uvarum* και *Candida stellata*. Οι Combina et al, 2005 [8] κατάφεραν να απομονώσουν έντεκα είδη με πιο κοινά είδη τα *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherimma*, *Candida stellata* και *Issathenckia orientalis*. Οι Andorra et al 2010,[9] βρήκαν στον μούστο *Candida zemplinina* και είδη *Hanseniaspora*.

Τα είδη αυτά απομονώθηκαν σε φρέσκο μούστο ή στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Αξίζει εδώ να αναφερθούν οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για τις

ζυμώσεις στις εργασίες αυτές. Στην εργασία των Beltran et al[7], οι ζυμώσεις γίνονταν σε δοχεία των 100lt, με προσθήκη SO₂. Παρόμοιες συνθήκες σε δοχεία 80lt χρησιμοποίησε και η Andorra[9], ενώ οι Combina et al [8]χρησιμοποίησαν μεγάλες δεξαμενές των 20.000lt. Σε κάθε περίπτωση επρόκειτο για αυθόρμητες ζυμώσεις, χωρίς εμβόλιο, ενώ οι θερμοκρασίες στις οποίες έγιναν οι ζυμώσεις ποίκιλαν από μελέτη σε μελέτη.

Σε άλλη μελέτη, το 2007 οι Di Maro et al[10], πάλι με ζύμωση σε μεγάλη κλίμακα και προσθήκη K₂S₂O₅, βρήκαν στα αρχικά στάδια της ζύμωσης *H.uvarum*, *I.terricola*, *I.occidentalis* και είδη *Candida*.

Αν και χρησιμοποιήθηκαν μεγάλης κλίμακας ζυμώσεις, παρόλα αυτά σύμφωνα με Rossouw et al [11], υπάρχει αντιστοιχία στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ ζυμώσεων μικρής και μεγάλης κλίμακας. Οι συγγραφείς θεωρούν πως οι μικρής κλίμακας ζυμώσεις αναπαριστούν ένα έγκυρο πειραματικό μοντέλο.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι οι ζύμες αυτές σε διάφορους συνδυασμούς κυριαρχούν στην αρχή της ζύμωσης του γλεύκους αλλά λόγω μικρής αντίστασης στην αιθανόλη, δίνουν την θέση τους σε πληθυσμούς *Saccharomyces* που αναλαμβάνουν την αλκοολική ζύμωση. Είναι χαρακτηριστικό ότι από καρπούς σταφυλιών μέλη του γένους *Saccharomyces* απομονώνονται πολύ δύσκολα ή σε πολύ μικρούς πληθυσμούς [2]. Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* φαίνεται ότι κυριαρχεί στα τελικά στάδια της ζύμωσης πραγματοποιώντας την αλκοολική ζύμωση. Όσον αφορά την έκλειψη των πληθυσμών non-*Saccharomyces* ειδών πέρα από τη χαμηλή αντίσταση στην αιθανόλη φαίνεται ότι παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες όπως οι διακυτταρικές επαφές, οι τοξικές ουσίες, το χαμηλό pH ,τα οργανικά οξέα και η έλλειψη θρεπτικών [12].

Παρά το γεγονός ότι αυτή είναι η πεποίθηση, δηλαδή ότι οι πληθυσμοί των non-*Saccharomyces* ζυμών θανατώνονται κατά την εξέλιξη της ζύμωσης, μελέτες των τελευταίων ετών δείχνουν ότι υπάρχουν είδη που παραμένουν ως τα τελικά στάδια της ζύμωσης και άρα έχουν υψηλή αντίσταση στην αιθανόλη. Για παράδειγμα οι Combina et al 2005 [8], βρήκαν σε μελέτες αυθόρμητης

ζύμωσης πως πληθυσμοί *Candida stellata* έφταναν ως και 10^5 - 10^6 cfu/ml και το είδος αυτό παρέμενε στο μούστο ως και δώδεκα μέρες ζύμωσης, ως το τέλος της κατανάλωσης των σακχάρων του μούστου. Βρήκαν επίσης ότι η *Kloeckera apiculata* αντέχει μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης 8%, η *C.stellata* 12% και η *M.pulcherimma* ως 7%. Οι Di Maro et al 2007[10], βρήκαν ότι μερικές non-*Saccharomyces* ζύμες όπως *Issathenckia occidentalis*, *Lachancea thermotolerans*, *Zygosaccharomyces bailii* επέμεναν ως το τέλος της ζύμωσης. Οι Nisiotou et al 2007[13], βρήκαν όχι μόνο ότι οι non-*Saccharomyces* ζύμες παραμένουν ως το τέλος της ζύμωσης αλλά σε δείγματα από συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (Αρκαδία), η αλκοολική ζύμωση έρχεται σε πέρας από το είδος *C.zemplinina*. Το 2010 οι Ocon et al[14] βρήκαν είδη όπως το *C.stellata* να επιμένει ως ένα σημείο της ζύμωσης (120 ώρες) ενώ η *K.apiculata* επέμενε ως τις 96 ώρες. Οι Torija et al [15], βρήκαν ότι η *C.stellata* επέμενε και στα τελευταία στάδια της ζύμωσης. Οι Zott et al [16], βρήκαν ότι non-*Saccharomyces* ζύμες παρέμεναν ως το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης σε πληθυσμούς 10^3 - 5×10^4 cfu/ml

Ρόλος των non-*Saccharomyces* ζυμών

Πάραυτα και αν και εμπορικά συνεχίζει να χρησιμοποιείται το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξημένο ενδιαφέρον όσον αφορά τις non-*Saccharomyces* ζύμες. Ο λόγος είναι ότι παρόλο που μια ελεγχόμενη ζύμωση με *Saccharomyces cerevisiae* δίνει ένα αξιόπιστο προϊόν, αυτό το προϊόν μπορεί να είναι μέτριας ποιότητας και με αισθητηριακά χαρακτηριστικά που είναι επίπεδα και περιορισμένα. Αυτό έχει να κάνει με την γεύση και τα αρώματα του κρασιού. Έχει προταθεί πως η χρήση non-*Saccharomyces* ζυμών στη ζύμωση αυξάνει την πολυπλοκότητα των αρωμάτων και μπορεί να δώσει προϊόντα με νέα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά . Οι Romano et al 2003 [17], προτείνουν πως οι non-*Saccharomyces* ζύμες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ζύμωση καθώς φτάνουν σε πληθυσμούς 10^6 - 10^7 cells/ml, οπότε επηρεάζουν και την κινητική της ανάπτυξης και τον μεταβολισμό του *S. cerevisiae*. Αν και το άρωμα του

κρασιού συμπεριλαμβάνει αρωματικές ουσίες που προέρχονται από την ποικιλία του σταφυλιού, υπάρχουν στο κρασί και άλλες αρωματικές ουσίες που παράγονται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι Romano et al [17], θεωρούν πως οι πτητικές ουσίες που ταυτοποιούνται στο κρασί, προέρχονται κατά κύριο λόγο από τη δράση των ζυμών κατά τη ζύμωση του μούστου, μιας και οι συγκεκριμένες πτητικές ουσίες βρίσκονται στη μέγιστη συγκέντρωση στο τελικό προϊόν. Οι συγγραφείς συνεχίζουν θεωρώντας πως οι διαφορές σε οίνους που προέρχονται από τη ζύμωση με διαφορετικά είδη ζυμών είναι ποσοτικές και όχι ποιοτικές. Τα προϊόντα της ζύμωσης ενώ είναι ίδια διαφέρουν στις σχετικές ποσότητες των διαφόρων ουσιών. Στην μελέτη τους διέκριναν δυο τάξεις δευτερογενών μεταβολιτών, η πρώτη αποτελείται από μεταβολίτες που διαφέρουν από είδος σε είδος και η δεύτερη τάξη από μεταβολίτες που διαφέρουν σε επίπεδο στελέχους εντός του ίδιου είδους.

Αλλά ποιοι είναι αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες; Γενικά υπάρχει συμφωνία ότι υπάρχει εμπλουτισμός του αρωματικού προφίλ του κρασιού από ουσίες όπως υψηλότερες αλκοόλες, εστέρες και τερπένια [18]. Ταυτόχρονα σημαντικό στοιχείο ποιότητας για ένα κρασί είναι και η αίσθηση σώματος το οποίο οφείλεται σε πολυαλκοόλες, πολυσακχαρίτες (από το σταφύλι και τις ζύμες) και φαινολικές ενώσεις κυρίως φλαβονοειδείς ταννίνες [18]. Στην μελέτη τους οι Andorra et al [19], βρήκαν ότι με εμβολιασμό σε συνθετικό μούστο το *S.cerevisiae* παρήγαγε τα λιγότερα αρωματικά συστατικά, ενώ η *C.zemplinina* παρήγαγε υψηλότερες αλκοόλες και εστέρες σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι σε φυσικό μούστο και το *H.uvarum* εστέρες σε υψηλό βαθμό και σε φυσικό μούστο και σε συνθετικό.

Το παραπάνω γεγονός ενδιαφέρει όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα. Δηλαδή ποια είναι η σύσταση του γλεύκους σε άγριες ζύμες, ποιος ο ρόλος τους επακριβώς στην παραγωγή οίνου και πως αυτές οι άγριες ζύμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά. Είναι γεγονός πως ένας τρόπος για να συμμετέχουν οι άγριες ζύμες στη δημιουργία οίνου είναι η αυθόρμητη ζύμωση. Δηλαδή χυμός σταφυλιών αφήνεται στην κατάλληλη θερμοκρασία ώστε να ζυμωθεί χωρία καμία άλλη προσθήκη. Το

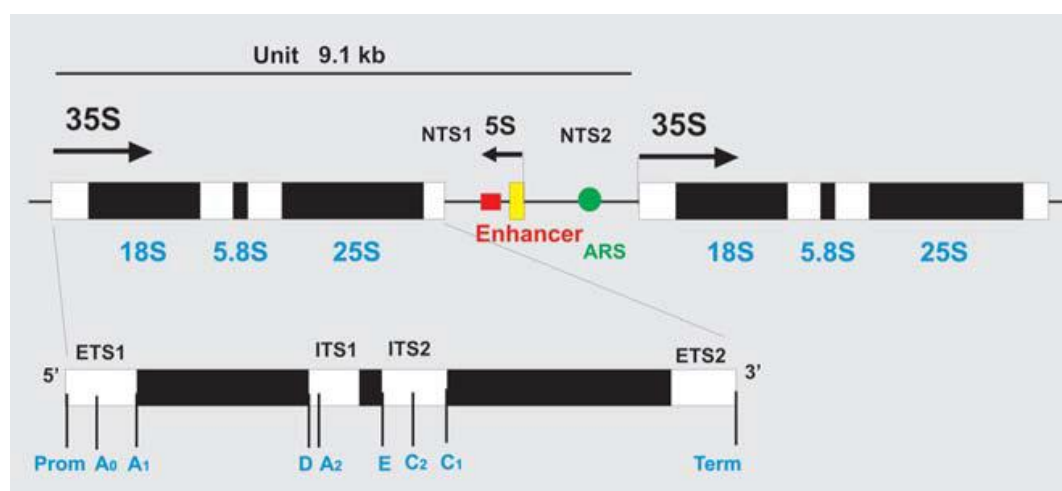
αποτέλεσμα όμως είναι συχνά μη προβλέψιμο. Ο λόγος είναι ότι οι άγριες ζύμες που περιέχονται στον χυμό των σταφυλιών βρίσκονται σε διάφορους συνδυασμούς καθώς και πληθυσμούς που διαφέρουν από αμπελώνα σε αμπελώνα καθώς και από χρονιά σε χρονιά. Έτσι λοιπόν η προσπάθεια για να παραχθεί κρασί με πλούσια χαρακτηριστικά θα πρέπει να γίνεται με έναν διαφορετικό τρόπο που θα δίνει ένα προβλέψιμο αποτέλεσμα. Ο τρόπος αυτός είναι η ελεγχόμενη και πάλι ζύμωση, όμως αυτή τη φορά πέρα από τον *Saccharomyces cerevisiae* με τον εμβολιασμό και άγριων ζυμών οι οποίες προηγουμένως έχουν χαρακτηριστεί ως προς τα οινολογικά τους χαρακτηριστικά. Η λογική του εγχειρήματος είναι καταρχάς η απομόνωση και ταυτοποίηση διαφόρων ειδών αγρίων ζυμών. Ο χαρακτηρισμός τους ως προς τα οινολογικά τους χαρακτηριστικά, η σταθερότητα τους και ο τελικός σκοπός είναι η χρήση των ειδών με τα πιο κατάλληλα χαρακτηριστικά σε ελεγχόμενες ζυμώσεις. Οι ελεγχόμενες ζυμώσεις μπορεί να γίνονται είτε με ταυτόχρονο εμβολιασμό αγρίων ζυμών και *Saccharomyces cerevisiae* ή με διαδοχικό εμβολιασμό.

Μοριακός χαρακτηρισμός των non-*Saccharomyces* ζυμών σε επίπεδο είδους

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας σε αμπελώνες διαφόρων περιοχών σε πολλές χώρες. Το εύρος της ποικιλίας των διαφορετικών συνδυασμών ειδών εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες όπως βροχοπτώσεις και ηλιοφάνεια, από τη γεωγραφική θέση, την ηλικία, το μέγεθος και την ποικιλία του σταφυλιού, τις τεχνικές διαχείρισης των αμπελώνων, το σχήμα δειγματοληψίας, τον τρόπο επεξεργασίας των δειγμάτων των σταφυλιών ώστε να απομονωθούν οι ζύμες,

τον τρόπο εμπλουτισμού κ.α. [20],[5].Όλοι οι παραπάνω παράγοντες παίζουν ρόλο στη σύσταση των πληθυσμών ακόμα και στους ίδιους αμπελώνες από χρονιά σε χρονιά.

Παρόλα αυτά οι τεχνικές για την ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών αγρίων ζυμών στο κρασί σε μοριακό επίπεδο έχουν εξελιχθεί και μια πολύ διαδεδομένη τεχνική είναι η ITS-RFLP(Εσωτερικός μεταγραφόμενος διαχωριστής-Πολυμορφισμός μήκους τμήματος περιορισμού- Internal Transcribed Spacer-Restriction Fragment Length Polymorphism).



Εικόνα 1. Μεταγραφικές μονάδες για τα rRNA των ζυμών.

NTS, nontranscribed spacer; ETS, external transcribed spacer; ITS, internal transcribed spacer; Prom, promoter; Term, terminator

Συγκεκριμένα με αυτή την τεχνική ενισχύεται αρχικά με δυο εκκινητές τους ITS1 και ITS4 η περιοχή που περιλαμβάνει τους δυο εσωτερικούς μεταγραφόμενους διαχωριστές (internal transcribed spacers) καθώς και το γονίδιο 5,8S rRNA (Εικ.1). Τα ενισχυμένα τμήματα των δειγμάτων στη συνέχεια υπόκεινται σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα και τα πρότυπα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης. Τη μέθοδο αυτή έχουν χρησιμοποιήσει οι Guillamon [21], Beltran et al[7], Gonzales et al[22], Nisiotou et al[13],[23] και άλλοι.

Παρόμοια μεθοδολογία ακολουθείται κατά την ενίσχυση τμήματος του 26S rDNA και την πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες στη συνέχεια, των ενισχυμένων τμημάτων [24]. Ή με ενίσχυση του γονιδίου 18S rRNA και στη συνέχεια πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή με ενίσχυση του τμήματος του μη μεταγραφόμενου διαχωριστή (non transcribed spacer) [25]. Σε όλες δηλαδή τις παραπάνω περιπτώσεις γίνεται RFLP ανάλυση και ως στόχοι χρησιμοποιούνται περιοχές του συμπλέγματος των rDNA γονιδίων και των ενδιάμεσων περιοχών.

Άλλη μέθοδος είναι η AFLP (Πολυμορφισμός μήκους ενισχυόμενου τμήματος- Amplified Fragment Length Polymorphism). Σε αυτή τη μέθοδο το γενωμικό DNA υφίσταται πέψη με δύο ένζυμα περιορισμού. Δημιουργούνται έτσι κάποια τμήματα αλληλουχιών DNA. Σε αυτά τα τμήματα προσδένουμε προσαρμογείς (adaptors) οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία DNA που έχει μείνει στο σημείο πέψης (πχ αν το ένζυμο MseI κόβει την αλληλουχία 5'TTAA3' μετά το πρώτο 5'T, μετά την πέψη έχει μείνει σαν προεξοχή (overhang) η αλληλουχία 5'TA3'). Ο προσαρμογέας περιέχει και ένα ζεύγος νουκλεοτιδίων που καταστρέφουν την αναγνώριση του σημείου περιορισμού. Στη συνέχεια ενισχύονται αυτά τα τμήματα DNA που είναι ενωμένα με τους προσαρμογείς με εκκινητές ειδικούς για τους προσαρμογείς και επιπλέον ένα ή δυο νουκλεοτίδια εντός της περιοχής του τμήματος του DNA που έχει προκύψει από τη πέψη. Επειδή χρησιμοποιούνται συνήθως δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ταυτόχρονα γίνεται εξειδίκευση των εκκινητών όπως προαναφέρθηκε με ένα ή δύο νουκλεοτίδια, είναι αναγκαίο οι διαφορετικοί εκκινητές να έχουν σημανθεί με φθορίζουσες ουσίες, ώστε το πρότυπο των DNA ζωνών που προκύπτει από κάθε εκκινητή να είναι ευδιάκριτο από τα υπόλοιπα πρότυπα που προκύπτουν. Γενικά η AFLP μέθοδος χρειάζεται αρκετή εξειδίκευση, είναι ακριβή και έχει χρησιμοποιηθεί σε μικρό βαθμό για την ταυτοποίηση ειδών ζυμών non-*Saccharomyces*. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ζυμών που χαλάνε το κρασί [24] και μια απλοποιημένη τεχνική που δεν απαιτεί φθορίζουσες ουσίες προτάθηκε το 2010 από τους Esteve-Zarzoso et al [26] για την ταυτοποίηση στελεχών ειδών *H.uvarum*, *H.vineae*, *C.zemplinina* και *S.cerevisiae*.

Μοριακός χαρακτηρισμός των non-*Saccharomyces* ζυμών σε επίπεδο στελέχους

Ο τρόπος λοιπόν για να χαρακτηριστεί μια ζύμη ως προς το είδος στο οποίο ανήκει είναι πολύ καλά εδραιωμένος. Τα τελευταία όμως χρόνια υπάρχει ένα αυξημένο ενδιαφέρον ως προς τον χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση εντός του είδους κάθε άγριας ζύμης σε επίπεδο στελέχους. Η εξέλιξη αυτή έρχεται φυσικά στην διαδικασία διερεύνησης των άγριων ζυμών όπως έχει γίνει εξάλλου και για διάφορα είδη φυτών και ζώων. Είναι δηλαδή μια μελέτη η ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους η οποία αποκαλύπτει στοιχεία για τη δυναμικότητα και την δομή των πληθυσμών. Το βήμα αυτό στην εξέλιξη της μελέτης των άγριων ζυμών είναι σημαντικό και ως προς την γενετική των πληθυσμών και ως προς την προσπάθεια σύνδεσης των διαφόρων στελεχών με ένα μικροπεριβάλλον το οποίο μπορεί να είναι μια ευρύτερη οινοποιητική περιοχή, ένας αμπελώνας ή ακόμη και τμήμα του αμπελώνα. Η εργασία αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί για άλλα είδη οργανισμών και εργαλεία για να γίνει αυτή η ανάλυση είναι μοριακές τεχνικές PCR όπως η RAPD-PCR (Τυχαία Ενισχυόμενο Πολυμορφικό DNA-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) και η ISSR-PCR (Μεταξύ των επαναλήψεων απλών ακολουθιών επαναλήψεων-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης –Interrepeat simple sequence repeats-PCR) μεταξύ άλλων. Όμως πέρα από καθαυτή τη μελέτη της δομής των πληθυσμών, ένας κύριος λόγος για τον οποίο υπάρχει ενδιαφέρον για το χαρακτηρισμό και διαχωρισμό εντός του είδους και σε επίπεδο στελέχους είναι ότι έχει βρεθεί ότι διαφορετικά στελέχη εντός του ίδιου είδους συμμετέχουν και αλληλοδιαδέχονται κατά την εξέλιξη της ζύμωσης [2]. Εξάλλου ήδη από το 2003 οι Romano et al (17) είχαν τονίσει ότι διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται με μεγάλη ποικιλότητα ανά στέλεχος ως προς την ποσότητα τους και εντός του ίδιου είδους. Επίσης οι Pope et al [27], σε συγκριτική ανάλυση του μεταβολικού προφίλ εννέα στελεχών *S.cerevisiae* τα οποία χρησιμοποιούνται στη ζύμωση μπύρας, ταυτόχρονα με την εφαρμογή κλασσικών μοριακών τεχνικών, προτείνουν την μεταβολωμική ως ένα ισχυρό εργαλείο στον διαχωρισμό των

στελεχών. Ακόμη και σε στελέχη στα οποία ο διαχωρισμός δεν ήταν εφικτός μοριακά, παρατηρήθηκε διαχωρισμός σε επίπεδο μεταβολωμικής.

Μια τεχνική η οποία αναπτύχθηκε ανεξάρτητα την ίδια περίοδο από τους Williams [28] και Welsh [29], η RAPD-PCR χρησιμοποιεί τυχαίους εκκινητές για τη δημιουργία PCR-προϊόντων. Η τεχνική βασίζεται στην παρατήρηση ότι μπορούν να σχεδιαστούν εκκινητές με τυχαία αλληλουχία (χωρίς ανάγκη για γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος), οι οποίοι είναι συνήθως δεκαμερή με G+C περιεχόμενο στο 50%. Αυτοί οι εκκινητές αναμένεται να προσδεθούν σε διάφορα σημεία στο γονιδίωμα. Το αποτέλεσμα που έλαβαν οι ερευνητές ήταν προφίλ DNA ζωνών με πολυμορφισμούς μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν γενετικοί δείκτες οι οποίοι ανιχνεύονται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης

Οι simple sequence repeats (SSR) ή αλλιώς microsatellites είναι αλληλουχίες DNA με διαδοχικές επαναλήψεις (tandem repeats) οι οποίες επαναλαμβάνονται πολλές φορές μέσα στο γονιδίωμα. Έχει βρεθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες για τον διαχωρισμό καταρχάς ειδών αλλά και στελεχών [30],[31],[32],[33],[34],[35]. Η μέθοδος πρωτοαναπτύχθηκε το 1993 από τους Ziekiewicz et al [36]. Συγκεκριμένα κανείς αναμένει ότι οι SSR θα επαναλαμβάνονται πολλές φορές μέσα στο γονιδίωμα. Αν θεωρήσουμε δυο τέτοιες επαναλήψεις σε απόσταση τέτοια που να μπορούν να ενισχυθεί με PCR, τότε θα πάρουμε ένα προϊόν PCR. Θεωρώντας ότι υπάρχουν πολλά τέτοια ικανά να ενισχυθούν τμήματα μέσα στο γονιδίωμα, τότε παίρνουμε ένα προφίλ DNA ζωνών διαφόρων μεγεθών. Το πολύ ενδιαφέρον είναι ότι από είδος σε είδος αλλά και εντός του είδους, οι ζώνες αυτές του DNA, διαφέρουν προσφέροντας έτσι πολυμορφικούς δείκτες. Οι Ziekiewicz et al, 1993 βρήκαν ότι πράγματι τα πρότυπα των DNA ζωνών είναι παρόμοια σε κάθε είδος αλλά διαφέρουν από άτομο σε άτομο εντός του είδους. Συγκεκριμένα χρησιμοποίησαν δείγματα από μια πληθώρα ειδών ξεκινώντας από τον άνθρωπο και φτάνοντας έως την *E.coli* και τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι πράγματι κανένα πρότυπο δεν είναι ίδιο με το άλλο ακόμα και εντός του ίδιου είδους. Αυτοί οι DNA-δείκτες είναι κυρίαρχοι

και κληρονομούνται με Μεντελικό τρόπο. Η παραπάνω μέθοδος ονομάστηκε Inter-SSR-PCR.

Η δύναμη των δύο παραπάνω τεχνικών δηλαδή της RAPD-PCR και ISSR-PCR έγκειται στο γεγονός ότι πρόκειται για τεχνικές οι οποίες μπορούν να βρουν διαφορές μεταξύ ατόμων ακόμα και στο επίπεδο του στελέχους εντός του ίδιου είδους χωρίς προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος. Έως τότε μια από τις συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούσαν οι ερευνητές ήταν η RFLP, η οποία όμως απαιτεί μια δύσκολη διαδικασία για να πραγματοποιηθεί. Όταν λοιπόν υπάρχει ανάγκη να μελετηθούν μεγάλοι πληθυσμοί σε μικρό χρόνο η παραπάνω τεχνική αποδεικνύεται δύσκολη στην εφαρμογή της. Αντίθετα η RAPD-PCR και η ISSR-PCR αποτελούν ένα εργαλείο για τη γρήγορη μελέτη πολλών ειδών ή πολλών στελεχών εντός του ίδιου είδους. Από την περίοδο εκείνη 1990-1993 που αναπτύχθηκαν αυτές οι μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μια σειρά μελετών διάφορων ειδών για την μελέτη της δομής των πληθυσμών, χωρίς να υπάρχει πρότερη γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος των ειδών αυτών.

Την ίδια εκείνη περίοδο δηλαδή το 1991 οι Welsh et al[37] εξήγησαν πως η χρήση συναινετικών εκκινητών (consensus primers) για την PCR- ενίσχυση μεταξύ των t-RNAs περιοχών μπορούν να δώσουν πληροφορίες στο επίπεδο του γένους ή του είδους. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι τα t-RNA γονίδια επαναλαμβάνονται πολλές φορές μέσα στο γονιδίωμα και είναι αρκετά συντηρημένα, έτσι εξελίσσονται πιο αργά και μπορούν να δώσουν πολυμορφισμούς στο επίπεδο του είδους.

Η μέθοδος RAPD-PCR έχει χρησιμοποιηθεί σε πάρα πολλές μελέτες της δομής των πληθυσμών. Για παράδειγμα οι Gauer et al [38] χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο για να μελετήσουν τέσσερις πληθυσμούς του *Ilex paraguariensis* δουλεύοντας με δεκαπέντε εκκινητές. Την ίδια τεχνική χρησιμοποίησαν και οι Zhou et al [39] για να μελετήσουν τη δομή πληθυσμών σε Ισραήλ και Τουρκία του είδους *Helicoverpa armigera*. Σε άλλη μελέτη [40] οι ερευνητές αρχικά διαχώρισαν πληθυσμούς του *Pinus chiapensis* σε δυο μεγάλους υποπληθυσμούς χρησιμοποιώντας mtDNA-RFLP δείκτες και στη

συνέχεια χρησιμοποιώντας οκτώ RAPD εκκινητές προχώρησαν σε οικολογική μελέτη της δομής των πληθυσμών αυτών.

Το 1995 οι Tsumura et al [31] χρησιμοποιώντας 96 ISSR εκκινητές βρήκαν αυτούς που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν λαμβάνοντας ένα υψηλό ποσοστό παραλλακτικότητας. Οι συγγραφείς τονίζουν ότι επειδή χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο εκκινητές με μεγαλύτερο μήκος από ότι στη RAPD-PCR, δίνουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμών και κληρονομούνται με Μεντελικό τρόπο θεωρούν ότι μπορούν οι ISSR δείκτες να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες πληθυσμών. Οι Reddy et al [32] χρησιμοποίησαν SSR-PCR ή ISSR-PCR για να διαχωρίσουν δεκατρία διαφορετικά στελέχη του είδους *Bombyx mori* και μάλιστα η ISSR-PCR μέθοδος έδειξε μεγαλύτερη παραλλακτικότητα σε σχέση με τη χρήση RAPD-PCR. Το 2001 οι Culley et al [34] χρησιμοποίησαν ISSR δείκτες και αλλοένζυμα. Και οι δύο τεχνικές έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα και στοιχεία για την πληθυσμιακή διαφοροποίηση και τη ροή γονιδίων μεταξύ πληθυσμών. Οι Chybicki et al [35] πρόσφατα χρησιμοποίησαν AFLP και SSR δείκτες για να μελετήσουν τους πληθυσμούς του είδους *Taxus baccata*, και συγκεκριμένα την διασπορά γονιδίων.

Με μεγάλη επιτυχία όλα τα προηγούμενα χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί οι παραπάνω μέθοδοι είτε μόνες τους είτε παράλληλα για την κατανομή πληθυσμών, διαφόρων ειδών. Ο κατάλογος των ειδών για την ανάλυση των οποίων έχουν χρησιμοποιηθεί οι παραπάνω μέθοδοι είναι μεγάλος και δείχνει για άλλη μια φορά την δύναμη αυτών των τεχνικών και τους δρόμους που άνοιξαν μετά την πρωτοπαρουσίαση τους τη δεκαετία του 90 για την ανάλυση πληθυσμών.

Εξειδικεύοντας τις παραπάνω γνώσεις για τις ζύμες οι προσπάθειες διαχωρισμού τους μοριακά άρχισαν ήδη την δεκαετία του 90. Οι Quetor και Ramon [41] συνοψίζουν τις μοριακές τεχνικές σε DNA-DNA υβριδισμό, ταυτοποίηση πολυμορφικών DNA αλληλουχιών (DNA sequence polymorphisms), mtDNA ανάλυση περιορισμού, σύγκριση των χρωμοσωμικών DNA προφίλ, ενίσχυση και χαρακτηρισμό στοιχείων δ με PCR, και ανάλυση RAPD. Όσον αφορά την ανάλυση RAPD-PCR, το 1995 ήδη οι

Paffetti et al [42] παρουσίασαν τους εκκινητές που χρησιμοποίησαν για να διαχωρίσουν σε επίπεδο είδους αλλά και στελεχούς ζύμες. Οι εκκινητές που χρησιμοποίησαν ήταν δεκαμερή με G+C % περιεχόμενο από 60-90% με την καλύτερη διαχωριστική ανάλυση να δίνεται από τον εκκινητή RF2 (5'CGGCCCTGT) με 80% περιεχόμενο σε G+C. Όλα τα δείγματα που χρησιμοποίησαν ανήκαν στα γένη *Saccharomyces* και *Zygosaccharomyces*. Το 1999 οι Andrighetto et al [43] χρησιμοποίησαν RAPD-PCR ανάλυση για να διαχωρίσουν ζύμες απομονωμένες από τρόφιμα χρησιμοποιώντας τους εκκινητές RF2 και M13(5'GAGGGTGGCGGTTCT3'). Πράγματι κατάφεραν να έχουν διαχωρισμό σε επίπεδο είδους.

Μόλις το 2011 αναπτύχθηκε μια μέθοδος από Barquet et al [44] για τον διαχωρισμό non-*Saccharomyces* στελεχών χρησιμοποιώντας συνδυασμό εκκινητών TtRNAsc και ISSR-MB ή 5CAG. Η μέθοδος ονομάστηκε Tandem Repeat tRNA PCR. Δηλαδή έγινε ένας συνδυασμός εκκινητών ώστε να ενισχυθεί η ενδιάμεση περιοχή μεταξύ ενός tRNA γονιδίου και μιας SSR περιοχής. Η μέθοδος έδωσε μια υψηλή διακριτική ικανότητα τέτοια ώστε τα στελέχη της άγριας ζύμης *M.pulcherimma* να καταταγούν σε τρεις συστάδες και να διαχωριστούν 12 διαφορετικοί γονότυποι από τους συνολικά 17, κατά τη φυλογενετική ανάλυση.

Επίσης μια άλλη μέθοδος με υψηλή διακριτική ικανότητα για τον διαχωρισμό σε επίπεδο στελεχών είναι η PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis- Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Παλμικού Πεδίου). Την μέθοδο αυτή χρησιμοποίησε η Schuller [45] για να διαχωρίσει στελέχη *S.cerevisiae* με ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με PCR μεθόδους. Το 2007, οι Miot-Sertier et al [46] ανέπτυξαν την μέθοδο REA-PFGE η οποία ως τότε χρησιμοποιείτο για τον διαχωρισμό στελεχών βακτηρίων, για να διαχωρίσουν στελέχη του είδους *Dekkera bruxellensis*. Οι ερευνητές δεν μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την PFGE όπως χρησιμοποιείται για άλλα γένη ζυμών, λόγω του μικρού αριθμού χρωμοσωμάτων του συγκεκριμένου γένους. Έτσι λοιπόν στράφηκαν στην REA-PFGE η οποία συνδυάζει την PFGE μέθοδο ταυτόχρονα με χειρισμό του χρωμοσώματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Την ίδια μέθοδο (REA-PFGE) χρησιμοποίησαν οι Renault et al [47] με

επιτυχία για τον διαχωρισμό στελεχών *T.delbrueckii*. Οι ερευνητές συνέκριναν τα αποτελέσματα της παραπάνω μεθόδου με RAPD-PCR χρησιμοποιώντας πέντε διαφορετικούς εκκινητές. Η REA-PFGE σε ένα μόνο πείραμα πέτυχε μεγαλύτερο διαχωρισμό στελεχών. Επομένως η PFGE και η REA-PFGE αποδεικνύονται εξαιρετικά ισχυρές μέθοδοι για τον διαχωρισμό ζυμών σε επίπεδο στελέχους. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι πολύ απαιτητική από άποψη εργασίας και χρόνου και ίσως όταν απαιτείται να αναλυθούν μεγάλοι πληθυσμοί στελεχών να καθίσταται δύσχρηστη.

Γενετική ανάλυση πληθυσμών

Θεωρώντας ότι έχουμε κάποια άτομα τα οποία ανήκουν σε πληθυσμούς μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα ως προς τη δομή του πληθυσμού. Συγκεκριμένα να υπολογίσουμε τρεις παραμέτρους: την γενετική ποικιλομορφία (genetic diversity) μεταξύ ατόμων και μεταξύ πληθυσμών, την γενετική διαφοροποίηση (genetic differentiation) μεταξύ πληθυσμών, και την γενετική απόσταση (genetic distance) μεταξύ ζευγών πληθυσμών.

Η γενετική ποικιλομορφία αποτελεί μέτρο της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των ατόμων εντός ενός πληθυσμού ή μεταξύ πληθυσμών. Η γενετική διαφοροποίηση ορίζεται σαν η κατανομή της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών και η γενετική απόσταση σαν το μέτρο της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ ζευγών πληθυσμών.

Το ποιες στατιστικές αναλύσεις θα γίνουν εξαρτάται από το είδος των γενετικών δεικτών που έχουν χρησιμοποιηθεί. Έτσι, για παράδειγμα η G_{st} στατιστική ανάλυση μπορεί να γίνει για συνεπικρατή δεδομένα, όπως είναι τα αποτελέσματα που λαμβάνουμε από μικροδορυφόρους, μιας και υπολογίζεται η ετεροζυγωτία. Αυτό είναι αδύνατον να υπολογιστεί όταν έχουν εφαρμοστεί επικρατείς δείκτες όπως οι RAPD και ISSR δείκτες, όπου σαν αποτέλεσμα έχουμε παρουσία ή απουσία ζώνης DNA. Παρουσία ζώνης DNA σημαίνει ότι

μπορεί για ένα αλληλόμορφο να έχουμε γονότυπο AA ή Aa, αλλά αυτό είναι αδύνατον να το ξεχωρίσουμε.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργειες ζυμών

Οι ταυτοποιημένες ζύμες αναπτύχθηκαν για 12-15 ώρες σε YPD broth (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Glucose 2%) σε όγκο 50ml.

Απομόνωση DNA

5ml από φρέσκια καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές για 2 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 0,5ml 1M σορβιτόλη, 0,1M Na₂EDTA (PH=7,5). Στη συνέχεια προστέθηκαν 25μl λυτικάσης και τα erpendorf επωάστηκαν στους 37⁰C για 2 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 0,5ml 50mM Tris-HCl (PH=7,4), 20mM Na₂EDTA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0,05ml 10% SDS και έγινε ελαφριά ανάδευση. Τα σωληνάκια επωάστηκαν στους 65⁰C για 30 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 0,2ml από 5M οξικό κάλιο και τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 1 ώρα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά, το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf και ξαναφυγοκεντρήθηκε για αλλά 15 λεπτά στις 14000 στροφές ανά λεπτό. Προστέθηκε ίσος όγκος 100% ισοπροπανόλης και τα σωληνάκια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα και το ίζημα αφέθηκε να ξηραθεί στον αέρα. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 300μl

TE (PH=7,4) και προστέθηκαν 15 μlt από 1mg/ml RNAαση A και επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 37⁰C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 30 μlt 3M οξικό νάτριο και αναδεύθηκαν. Προστέθηκαν 0,2ml ισοπροπανόλης, έγινε ανάδευση και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για να ιζηματοποιηθεί το DNA. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 45 μlt ddH₂O.

Ανάλυση PCR

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικοί εκκινητές. Οι αντιδράσεις και τα προγράμματα για κάθε PCR ανάλυση φαίνονται παρακάτω

1. Tandem Repeat tRNA-PCR

Πίνακας 1: αντιδράσεις και πρόγραμμα για Tandem Repeat tRNA-PCR

DNA	2μlt (5-10ng)
Buffer B	2,5 μl από 10X
dNTPs	200 μM
TtRNASc	12,5 μmol
ISSR-MB	12,5 μmol
MgCl₂ (25mM)	2 μl
Taq	0.1 μl
H₂O	Έως τα 25 μl

1	94⁰C	3:00 min
2	94 ⁰ C	0:30 min
3	50 ⁰ C	0:30 min
4	72 ⁰ C	1:30 min
5	Go to 2x 34 times	
6	72 ⁰ C	10:00 min
7	12 ⁰ C	∞

2. RAPD-PCR

Πίνακας 2: αντιδράσεις και πρόγραμμα για RAPD-PCR με εκκινητή τον GTG₃

DNA	2μlt(5-10ng)
Buffer B	3 μl από 10X
dNTPs	200μM
GTG ₃	10pmol
Taq	1U
H₂O	Έως τα 30 μlt

1	94⁰C	3:00 min
2	94 ⁰ C	0:30 min
3	36 ⁰ C	0:45 min
4	72 ⁰ C	1:30 min
5	Go to 2x 34 times	
6	72 ⁰ C	7:00 min
7	12 ⁰ C	∞

Πίνακας 3 : αντιδράσεις και πρόγραμμα για RAPD-PCR με εκκινητή τον R5

DNA	2μlt(5-10ng)
Buffer B	2,5 μl από 10X
dNTPs	200μM
R5	10pmol
MgCl₂	2,5mM
Taq	1U
H₂O	Έως τα 25 μlt

1	94⁰C	3:00 min
2	94 ⁰ C	0:30 min
3	29 ⁰ C	1:00 min
4	72 ⁰ C	1:30 min
5	Go to 2x 39 times	
6	72 ⁰ C	10:00 min
7	12 ⁰ C	∞

Οι ακολουθίες για κάθε εκκινητή παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 4 Ακολουθίες εκκινητών

Εκκινητής	Ακολουθία
TtRNASc	GCTTCTATGGCCAAGTTG
ISSR-MB	CTCACAACAACAACAACA
GTG ₃	GTGGTGGTG
R5	AACGCGCAAC

Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,8% (κ.ο) για τα προϊόντα της Tandem Repeat TtRNA-Sc-PCR, 1,2% για την RAPD-PCR με GTG₃ εκκινητή και 1,5% για την RAPD-PCR με R5 εκκινητή. Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα έτρεξαν στο πήκτωμα στα 120Volts για 3,5 ώρες. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης περιείχε διάλυμα TAE1x με 5% EtBr.

TAE 50x

Πίνακας 5 σύνθεση πυκνού διαλύματος TAE

Tris-Base	2M
EDTA pH=8 0,5M	10%
Glacial acetic acid	5.71%

Ανάλυση δεδομένων σε επίπεδο στελεχών

Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις σε επίπεδο στελεχών και σε επίπεδο πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό FAMD [48] λόγω της ευκολίας με την οποία μπορεί ο χρήστης να δημιουργήσει τα input files, των πολλών επιλογών αναλύσεων που διαθέτει το συγκεκριμένο πρόγραμμα και την καταλληλότητα του λογισμικού για την ανάλυση κυρίαρχων δεικτών όπως αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία και για την επιλογή των κατάλληλων στατιστικών αναλύσεων βασιστήκαμε στην θεωρία του βιβλίου [49].

Για να γίνει ανάλυση σε RAPD-PCR ή Tandem Repeat tRNA-PCR προφίλ δημιουργείται ένας πίνακας δεδομένων με τιμές 0 ή 1. Η τιμή 0 αντιστοιχεί στην απουσία μιας ζώνης DNA (DNA band) και η τιμή 1 στην παρουσία της. Κατά τη διαδικασία σύγκρισης των προφίλ διαφόρων δειγμάτων προσμετρούνται μόνο οι πολυμορφικές ζώνες DNA. Δηλαδή αυτές που απουσιάζουν έστω και από ένα δείγμα, ανεξάρτητα του πόσα δείγματα συγκρίνονται. Δημιουργείται λοιπόν ένας πίνακας με τιμές 0 και 1. Από αυτόν τον πίνακα στη συνέχεια προκύπτει μια μήτρα (matrix), αφού έχει χρησιμοποιηθεί κάποιος συντελεστής ομοιότητας. Γίνεται δηλαδή κάποια επεξεργασία στα αρχικά δεδομένα με την βοήθεια του συντελεστή. Υπάρχουν διάφοροι συντελεστές, οι κυριότεροι είναι οι Simple Matching, Dice, Jaccard's οι οποίοι δημιουργούν μια μήτρα ομοιότητας. Ο ορισμός για τον συντελεστή Jaccard για ένα ζεύγος ατόμων i και j είναι ο εξής:

$S_{ij} = n_{11} / (n_{11} + n_{01} + n_{10})$ όπου n_{xy} είναι ο αριθμός των χαρακτήρων που είναι στην κατάσταση x για το άτομο i και στην κατάσταση y για το άτομο j . Οι πιθανοί χαρακτήρες είναι παρουσία ζώνης 1 απουσία ζώνης 0.

Ο Dice-Sorensen ορίζεται ως εξής

$$S_{ijDICE} = 2n_{11} / (2n_{11} + n_{01} + n_{10})$$

Και ο Simple Matching

$$S_{ijSMC} = \frac{n_{11} + n_{00}}{n_{11} + n_{01} + n_{10} + n_{00}}$$

Όσον αφορά τον Dice μοιάζει με τον Jaccard αλλά προσμετρά τις κοινές παρουσίες επί δύο. Ο SMC μετρά εκτός από τις κοινές παρουσίες και τις κοινές απουσίες.

Στη συνέχεια δημιουργείται ένα δέντρο το οποίο μας δείχνει γενετικές αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων ομαδοποιώντας τα σε συστάδες. Και εδώ υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι και μοντέλα ώστε να γίνει αυτή η διαδικασία. Οι πιο κοινοί είναι το neighbor-joining tree και ο UPGMA αλγόριθμος για την κατασκευή του δέντρου. Για να ελέγξουμε την ορθότητα των αποτελεσμάτων μας, δηλαδή του τρόπου με τον οποίο έχουν δημιουργηθεί οι συστάδες και κατ'ουσίαν για να ελέγξουμε την ορθότητα του αλγορίθμου που χρησιμοποιήσαμε, συνεχίζουμε την ανάλυση του δένδρου που έχουμε λάβει κάνοντας bootstrapping. Δηλαδή θα λέγαμε ότι γίνεται μια επανεκκίνηση, δηλαδή παράγεται ένας πολύ μεγάλος αριθμός δένδρων με διαφορετική τοπολογία κλάδων (clades) και συστάδων (clusters). Για παράδειγμα μπορεί να λαμβάνουμε 1000 τέτοια δένδρα με διαφορετικές τοπολογίες όπου αλλάζουν θέση οι κλάδοι του δένδρου. Στη συνέχεια και τα χίλια δένδρα συνδυάζονται μαθηματικά με έναν άλλο αλγόριθμο δίνοντας ένα consensus tree ή αλλιώς ένα συναινετικό δένδρο. Υπάρχουν και πάλι διάφορες μέθοδοι για να δημιουργηθεί το συναινετικό δένδρο όπως η μέθοδος majority rule και η μέθοδος strict. Στο δένδρο αυτό λαμβάνουμε και την πιθανότητα ένας κλάδος να βρίσκεται σε μια συγκεκριμένη θέση και όχι σε κάποια άλλη. Η πιθανότητα αυτή εκφράζεται με διάφορους δείκτες όπως πχ ένα ποσοστό επί τοις εκατό ή με τον CI δείκτη ή με τον R_x- support δείκτη. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο R_x- support δείκτης. Στην ουσία δημιουργείται ένα majority rule δένδρο όπου όσο πιο μικρή η τιμή του R τόσο πιο πολύ στηρίζονται οι συστάδες που έχουν δημιουργηθεί. Η ελάχιστη τιμή για το R είναι 0. Η τιμή του R δίνεται από τον τύπο $R_x = \log_{10} r_x$, όπου το r παίρνει διάφορες τιμές από το διάστημα $[s_{ij_{min}} - s_{ij_{max}}]$. Έτσι κατασκευάζεται το συναινετικό δένδρο από 50 δέντρα τα οποία έχουν υπολογισθεί από μήτρες ομοιότητας μέσου όρου που έχουν παραχθεί από διάφορες τιμές του r.

Αφού έχουμε λάβει το συναινετικό δένδρο έχουμε μια εικόνα των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων και μπορούμε να προχωρήσουμε την ανάλυση παρακάτω.

Δηλαδή πραγματοποιούμε Principal Coordinates Analysis στα πρωτογενή μας δεδομένα για να δούμε με αυτή τη μέθοδο πώς ομαδοποιούνται τα δεδομένα και αν ομαδοποιούνται με παρόμοιο τρόπο με το δένδρο.

Καταρχάς με τη μήτρα που έχουμε δημιουργήσει με τη βοήθεια του συντελεστή Dice, κατασκευάζουμε για κάθε είδος ένα UPGMA δένδρο. Κάθε πήκτωμα που είχε αναλυθεί, για το οποίο δηλαδή είχαμε φτιάξει ένα αρχείο με 0 για απουσία ζώνης DNA και 1 για παρουσία, σκοραρίστηκε 3 φορές. Δηλαδή 3 φορές έγινε σύγκριση των προφίλ των στελεχών και σκοράρισμα των ζωνών DNA . Έτσι λοιπόν προέκυψαν από τις τρεις αναλύσεις τρία δένδρα. Στη συνέχεια για κάθε ένα δένδρο από αυτά έγινε bootstrapping με αποτέλεσμα να λάβουμε 1000 πιθανά δένδρα σε κάθε περίπτωση. Κατόπιν δημιουργήθηκε ένα συναινετικό δένδρο με Rx support για τους κλάδους, ώστε να δούμε ποια είναι η τελική κατανομή των κλάδων στο δένδρο. Έτσι προέκυψαν τρία συναινετικά δέντρα. Ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των τριών συναινετικών δέντρων για να δούμε ποιες συστάδες παρέμειναν σταθερές και στα τρία δέντρα και σε ποιες συστάδες παρουσιαζόταν αλλαγή. Ταυτόχρονα γινόταν επιβεβαίωση του αρχικού σκοραρίσματος των ζωνών DNA στα gel και καταλήξαμε σε ένα από τα τρία δένδρα και άρα σε ένα από τα τρία αρχικά σκοραρίσματα και με τα επιλεγμένα αρχεία προχωρήσαμε παρακάτω στην ανάλυση μας. Παρακάτω φαίνονται το UPGMA δένδρο, το τελικό συναινετικό δένδρο και οι αναλύσεις PCoA.

Στο επίπεδο ατόμων έγινε PCoA (Principal Coordinates Analysis) για να δούμε πώς ομαδοποιούνται τα άτομα με αυτή την ανάλυση σε τρία επίπεδα. Στην ουσία η ανάλυση κυρίων συνιστωσών είναι μια ανάλυση η οποία επιτρέπει από έναν μεγάλο αριθμό μεταβλητών να περιοριστούμε σε λίγες και τις πιο σημαντικές οι οποίες αποδίδουν το μεγαλύτερο ποσοστό

παραλλακτικότητας. Έτσι γίνεται μια ομαδοποίηση των ατόμων σε τρεις διαστάσεις.

Διακριτική ικανότητα μοριακών μεθόδων

Για να γίνει κάποια αξιολόγηση της ικανότητας διαχωρισμού των στελεχών των PCR μεθόδων εφαρμόστηκε ο δείκτης ποικιλομορφίας Simpson όπως περιγράφεται στο [50]. Ο δείκτης Simpson εφαρμόζεται κανονικά για τον υπολογισμό της ποικιλομορφίας μεταξύ ειδών όμως οι συγγραφείς του [50] έχουν προσαρμόσει τον δείκτη για τον διαχωρισμό στελεχών εντός του ίδιου είδους και την αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ταυτοποίησης στελεχών. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο δείκτης Simpson και οι υπόλοιπες αναλύσεις έχουν υπολογιστεί μόνο για τα είδη *L.thermotolerans*, *I.orientalis*, *H.uvarum* και *M.pulcherimma* καθώς για αυτά τα είδη απομονώθηκαν αρκετά στελέχη από το τέλος της ζύμωσης από κάθε δείγμα. Εξάλλου ο Hunter [50], αναφέρει ότι η επικύρωση των μεθόδων ταυτοποίησης δεν πρέπει να γίνεται με μικρούς πληθυσμούς καθώς δεν έχει υπολογισθεί παράγοντας διόρθωσης για μικρούς πληθυσμούς.

Μεθοδολογία ανάλυσης πληθυσμών

Για να υπολογίσουμε την γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών καταρχάς ορίζουμε τους πληθυσμούς μας. Υπολογίζουμε την γενετική διαφοροποίηση ορίζοντας σαν πληθυσμό την γεωγραφική περιοχή και στη συνέχεια ορίζοντας σαν πληθυσμό κάθε αμπελώνα. Για να υπολογίσουμε αυτήν την παράμετρο πραγματοποιούμε ανάλυση AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance). Η μέθοδος αυτή έχει αναπτυχθεί από Excoffier [51] και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί στην ουσία να χρησιμοποιηθεί για ένα εύρος τύπων δεδομένων. Χρησιμοποιεί Φ-στατιστικά κατά αναλογία με F- στατιστικά αν και θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι δεν μπορούν άμεσα να συγκριθούν οι

τιμές Φ με τιμές F που θα μπορούσαν να προκύψουν από άλλη ανάλυση[48] . Και πάλι λόγω του γεγονότος ότι έχουμε χρησιμοποιήσει επικρατείς δείκτες μας περιορίζει στο να μην χρησιμοποιήσουμε G_{st} στατιστικά από Nei.

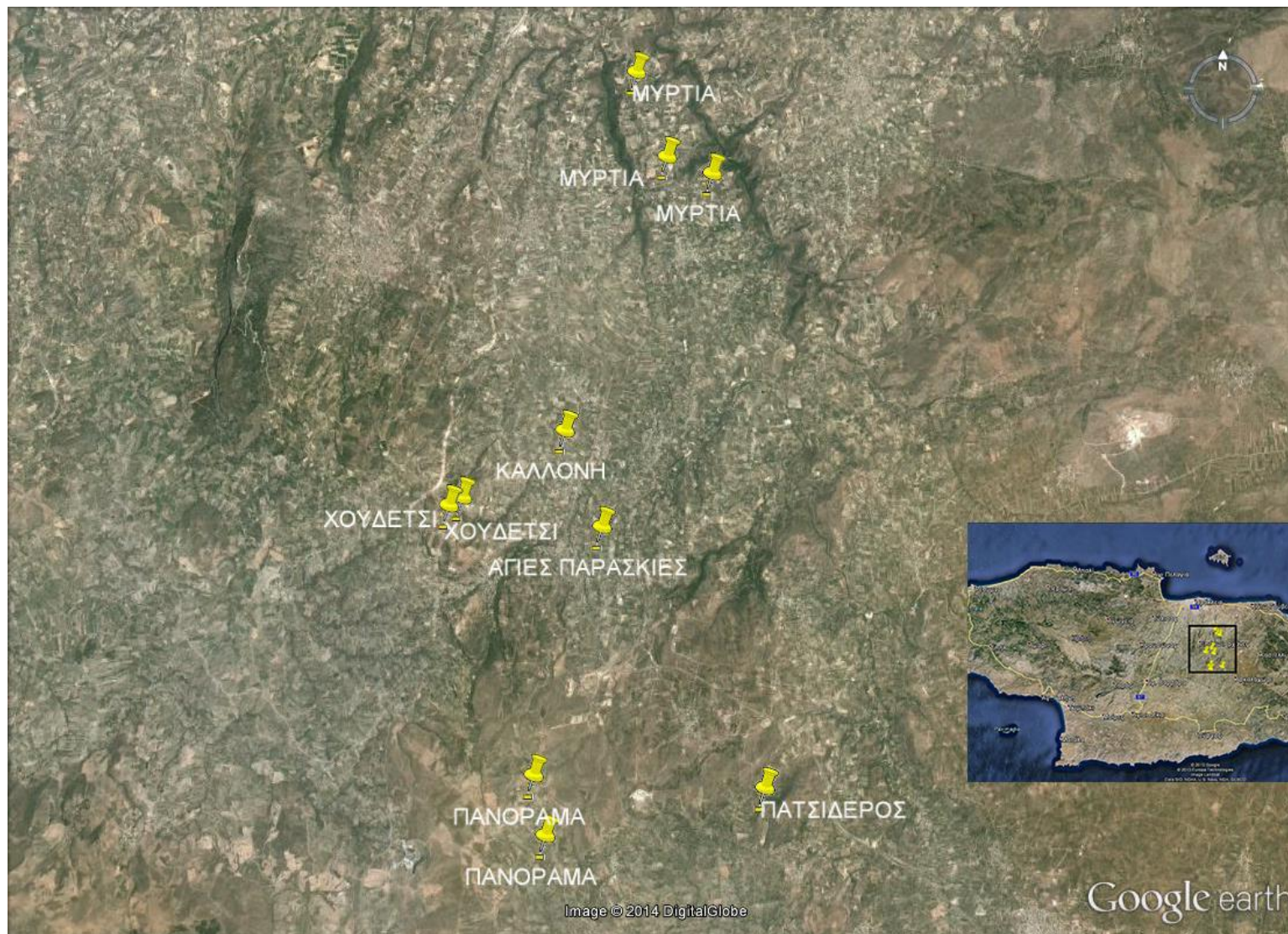
Για τον υπολογισμό της τρίτης παραμέτρου δηλαδή της γενετικής απόστασης μεταξύ ζευγών πληθυσμών χρησιμοποιούμε ως πληθυσμιακές μονάδες τους αμπελώνες. Εφόσον χρησιμοποιούμε δεδομένα μη διατεταγμένα (unordered) δηλαδή RAPD και ISSR δείκτες σε αντίθεση με διατεταγμένα δεδομένα (προερχόμενα από sequencing) μπορούμε να ακολουθήσουμε δύο μεθοδολογίες. Η μια είναι να υπολογίσουμε τις F_{st} αποστάσεις μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών (αμπελώνες) με βάση τις τετραγωνικές ευκλείδειες αποστάσεις. Η δεύτερη μεθοδολογία είναι με βάση την απόσταση της χορδής (D_c) όπου υπολογίζονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων μεταξύ δύο πληθυσμών και αυτές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της απόστασης. Αν φανταστούμε μια υπερσφαίρα, κάθε αλληλόμορφο μιας γενετικής θέσης είναι ένα διάνυσμα το μέγεθος του οποίου ορίζει την θέση του πληθυσμού πάνω στην σφαίρα. Εφόσον τα αλληλόμορφα μπορεί να διαφέρουν θα διαφέρουν και οι θέσεις των πληθυσμών πάνω στη σφαίρα. Αυτές οι αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών μπορούν να μετρηθούν βάσει του τόξου που σχηματίζεται μεταξύ των πληθυσμών. Όμως ένα τόξο είναι κυρτό επομένως υπολογίζουμε την χορδή του τόξου αυτού, η οποία χορδή είναι η συντομότερη απόσταση μεταξύ των δύο σημείων που ορίζουν οι θέσεις των πληθυσμών. Ο μαθηματικός τύπος που δίνει την τιμή της χορδής περιλαμβάνει και τις συχνότητες των αλληλομόρφων στους δύο πληθυσμούς [52].

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η απόσταση της χορδής είναι μια Bayesian μέθοδος με non-uniform prior ανάμεσα στους πληθυσμούς η οποία περιγράφεται στο [53] και σύμφωνα με τον συγγραφέα αυτή η μέθοδος αφαιρεί την μεροληψία η οποία προκύπτει από την εφαρμογή του τύπου των Lynch and Milligan [54] για τον υπολογισμό της γενετικής απόστασης. Ο τρόπος υπολογισμού της απόστασης με τη μέθοδο Lynch and Milligan είναι στην ουσία τροποποίηση της μεθόδου υπολογισμού Nei [55]

,ώστε να είναι κατάλληλος για την εφαρμογή για κυρίαρχα δεδομένα. Παρόλα αυτά όμως οι ίδιοι οι Lynch and Milligan παραδέχονται ότι ακόμα και έτσι δεν αφαιρείται εντελώς η μεροληψία.

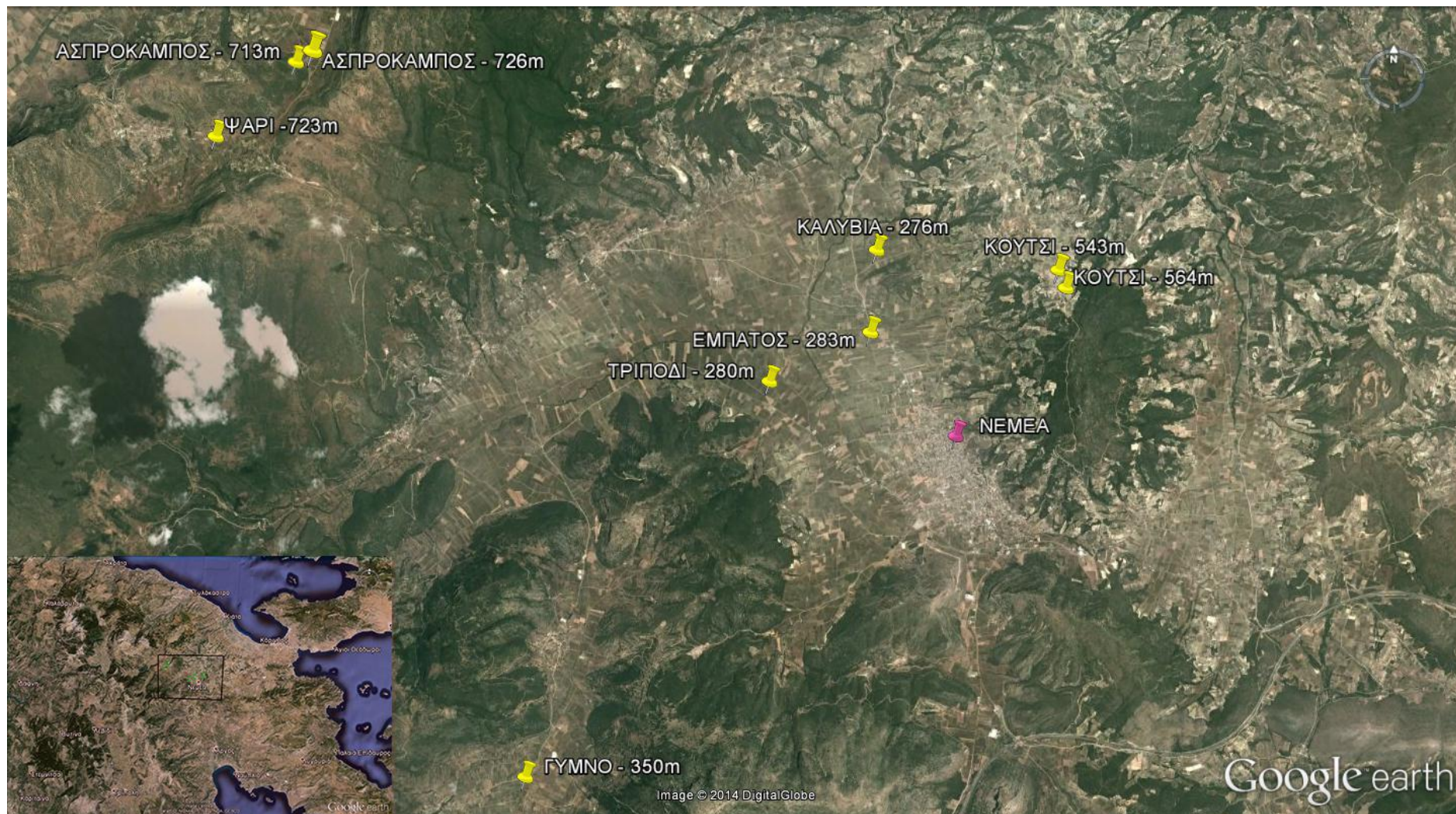
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του πληθυσμού για κάθε είδος ζύμης η οποία απομονώθηκε εξαρτάται και από την αρχική δειγματοληψία και από τις συνθήκες της ζύμωσης (αλληλεπιδράσεις με άλλα είδη, αντοχή στην αιθανόλη, ικανότητα ζύμωσης σακχάρων κ.α.) καθώς και από το σχήμα δειγματοληψίας αποικιών από τα τρυβλία Lysine-YPD.

Οι δειγματοληψίες έγιναν από δύο οινοποιητικές περιοχές την Νεμέα (Κορινθία, Πελοπόννησος) και τα Πεζά (Κρήτη). Στις Εικόνα 2,34 και Εικόνα 3,35 φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας.



Εικόνα 2. Χάρτης περιοχής Πεζών.

Με κίτρινο φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας.



Εικόνα 3. Χάρτης περιοχής Νεμέας.

Με κίτρινο φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας και δίπλα οι τιμές των υψομέτρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να δοκιμαστούν δύο μέθοδοι PCR και διάφοροι εκκινητές σε 10 είδη ζυμών non-*Saccharomyces* απομονωμένων από δύο ζώνες παραγωγής οίνων ΠΟΠ, με στόχο να επιλεγούν οι καλύτεροι εκκινητές ώστε να γίνει διαχωρισμός των ατόμων σε επίπεδο στελέχους (ενδοειδικά) με ταυτόχρονη αξιολόγηση κάθε μεθόδου.

Δειγματοληψία

Πίνακας 6 δείγματα και είδη ζυμών ανά αμπελώνα και ποικιλία για τη Νεμέα

Αμπελώνας	ποικιλία	κωδικός	είδος 1	είδος 2	είδος 3
ΔΑΦΝΗ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	4N	<i>H.quillermondii</i>		
ΔΑΦΝΗ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	6N	<i>H.pseudoburtonii</i>		
ΓΥΜΝΟ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	7N	<i>H.uvarum</i>		
ΑΡΧΑΙΑ ΝΕΜΕΑ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	10N	<i>C.zemplinina</i>		
ΑΡΧΑΙΑ ΝΕΜΕΑ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	12N	<i>C.zemplinina</i>	<i>I.orientalis</i>	
ΕΜΠΑΤΟΣ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	13N	<i>L.thermotolerans</i>	<i>P.osmophila</i>	
ΕΜΠΑΤΟΣ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	14N	<i>T.delbruekii</i>		
ΚΑΛΥΒΙΑ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	16N	<i>L.thermotolerans</i>	<i>H.quillermondii</i>	
ΚΑΛΥΒΙΑ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	18N	<i>H.quillermondii</i>		
ΤΡΙΠΟΔΙ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	19N	<i>L.thermotolerans</i>		
ΤΡΙΠΟΔΙ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	21N	<i>C.zemplinina</i>	<i>M.pulcherimma</i>	
ΨΑΡΙ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	22N	<i>I.orientalis</i>	<i>L.thermotolerans</i>	
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	25N	<i>L.thermotolerans</i>	<i>H.uvarum</i>	
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	26N	<i>C.zemplinina</i>	<i>L.thermotolerans</i>	<i>P.osmophila</i>
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	27N	<i>C.zemplinina</i>	<i>M.pulcherimma</i>	
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	31N	<i>I.orientalis</i>	<i>H.uvarum</i>	
ΚΟΥΤΣΙ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	28N	<i>C.zemplinina</i>		
ΚΟΥΤΣΙ	ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	2N	<i>I.orientalis</i>		

Όλα τα στελέχη προέρχονται από το τέλος της ζύμωσης μούστου. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν για δειγματισμό 7 αμπελώνες από Πεζά (Ηράκλειο Κρήτης) και 9 αμπελώνες από Νεμέα (Κορινθία Πελοπόννησος). Όσον αφορά τους αμπελώνες των Πεζών για πέντε από τους επτά ελήφθησαν δείγματα από τρεις ποικιλίες σταφυλιών :Βηλάνα (λευκή ποικιλία), Κοτσιφάλι (ερυθρή ποικιλία) και Μαντηλάρι (ερυθρή ποικιλία). Για τους άλλους δύο αμπελώνες έγινε δειγματοληψία δύο ποικιλιών (Βηλάνα και Κοτσιφάλι). Όλα τα δείγματα της Νεμέας ήταν ποικιλίας Αγιωργίτικο (ερυθρή ποικιλία)

Έγιναν ζυμώσεις σε 18 δείγματα από την Νεμέα και 31 δείγματα από τα Πεζά. Στους (Πίνακας 6, Πίνακας 7) φαίνεται πως κατανέμονται τα διάφορα είδη ζυμών ανά δείγμα για τη Νεμέα και τα Πεζά .

Πίνακας 7 δείγματα και είδη ζυμών ανά αμπελώνα και ποικιλία για τα Πεζά

αμπελώνας	ποικιλία	δείγμα	Είδος 1	Είδος 2	Είδος 3
ΜΥΡΤΙΑ	ΒΗΛΑΝΑ	2P	<i>C.zemplinina</i>		
ΜΥΡΤΙΑ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	5P	<i>C.zemplinina</i>	<i>I.orientalis</i>	
ΜΥΡΤΙΑ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	6P	<i>C.zemplinina</i>	<i>M.pulcherimma</i>	
ΜΥΡΤΙΑ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	7P	<i>H.uvarum</i>		
ΜΥΡΤΙΑ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	9P	<i>I.orientalis</i>		
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΒΗΛΑΝΑ	10P	<i>C.zemplinina</i>	<i>I.orientalis</i>	
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΒΗΛΑΝΑ	11P	<i>I.orientalis</i>		
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	13P	<i>I.orientalis</i>		
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	14P	<i>P.anomala</i>		
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	15P	<i>H.uvarum</i>	<i>M.pulcherimma</i>	
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	16P	<i>I.orientalis</i>	<i>P.anomala</i>	<i>L.thermotolerans</i>
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	17P	<i>I.orientalis</i>	<i>P.anomala</i>	
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΒΗΛΑΝΑ	19P	<i>H.uvarum</i>	<i>M.pulcherimma</i>	
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΒΗΛΑΝΑ	21P	<i>L.thermotolerans</i>		
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	22P	<i>C.zemplinina</i>	<i>L.thermotolerans</i>	
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	23P	<i>L.thermotolerans</i>		
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	24P	<i>C.zemplinina</i>		
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	46P	<i>I.orientalis</i>		
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	47P	<i>I.orientalis</i>		
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ	48P	<i>C.zemplinina</i>		
ΧΟΥΔΕΤΣΙ	ΒΗΛΑΝΑ	27P	<i>C.zemplinina</i>	<i>L.thermotolerans</i>	<i>M.caribica</i>
ΧΟΥΔΕΤΣΙ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	28P	<i>L.thermotolerans</i>		

ΧΟΥΔΕΤΣΙ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	29P	<i>M.pulcherimma</i>		
ΚΑΛΛΟΝΗ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	35P	<i>M.pulcherimma</i>		
ΚΑΛΛΟΝΗ	ΜΑΝΤΙΛΑΡΙ	37P	<i>L.thermotolerans</i>		
ΚΑΛΛΟΝΗ	ΜΑΝΤΙΛΑΡΙ	38P	<i>C.zemplanina</i>	<i>P.anomala</i>	<i>I.orientalis</i>
ΚΑΛΛΟΝΗ	ΜΑΝΤΙΛΑΡΙ	39P	<i>I.orientalis</i>		
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	ΒΗΛΑΝΑ	40P	<i>I.orientalis</i>	<i>M.pulcherimma</i>	
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	ΒΗΛΑΝΑ	41P	<i>H.uvarum</i>		
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	ΒΗΛΑΝΑ	42P	<i>H.uvarum</i>		
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	43P	<i>C.zemplanina</i>	<i>M.pulcherimma</i>	<i>H.uvarum</i>
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	44P	<i>C.zemplanina</i>		
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	45P	<i>C.zemplanina</i>		

Ο αριθμός των στελεχών που προκύπτουν στο τέλος εξαρτάται και από το είδος του μοριακού δείκτη που χρησιμοποιείται δηλαδή την διακριτική του ικανότητα αλλά και εντέλει πόσοι κλώνοι περιέχονται σε κάθε πληθυσμό. Επειδή ήταν άγνωστο πόσες και ποιες ζύμες non-*Saccharomyces* θα βρίσκονται στο τέλος της ζύμωσης η δειγματοληψία έγινε ως εξής: ελήφθησαν τρία δείγματα για κάθε ποικιλία και για κάθε αμπελώνα, ώστε να απομονωθεί ένας ικανός αριθμός ειδών και στελεχών. Από τις αποικίες που επιλέχθηκαν τυχαία, τα είδη που απομονώθηκαν έχουν διαφορές στο μέγεθος των πληθυσμών τους. Πχ ο πληθυσμός του *L.thermotolerans* που μελετήθηκε είναι 97 στελέχη ενώ ο πληθυσμός του *M.caribica* αποτελείται μόνο από 9 στελέχη

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ποσοστά των στελεχών που μελετήθηκαν σε σχέση με τα συνολικά στελέχη που είχαν απομονωθεί.

Πίνακας 8 ποσοστά των ατόμων που μελετήθηκαν σε σχέση με τα άτομα που είχαν απομονωθεί.

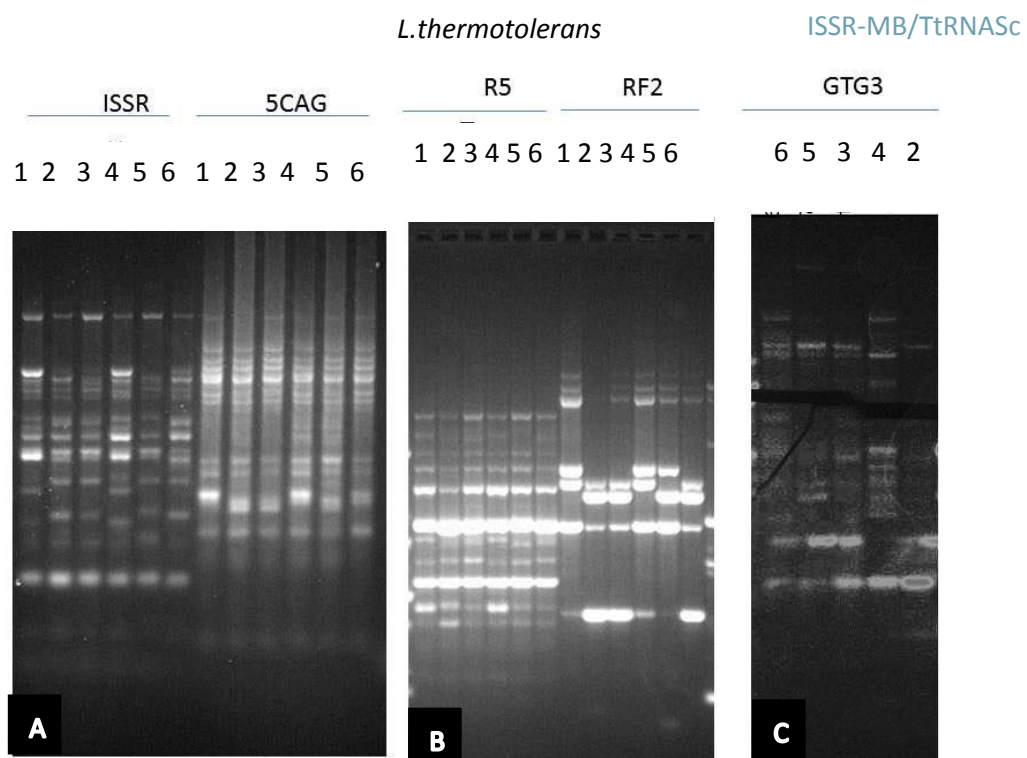
	Στελέχη που απομονώθηκαν	Στελέχη που αναλύθηκαν	Ποσοστό στελεχών που αναλύθηκαν
<i>L.thermotolerans</i>	129	97	75,2%
<i>I.orientalis</i>	201	91	45,27%
<i>H.uvarum</i>	127	55	43,3%
<i>M.pulcherimma</i>	65	32	49,23%
<i>H.pseudoburtonii</i>	20	19	95%
<i>P.anomala</i>	38	16	42,1%
<i>H. guilliermondii</i>	34	26	76,5%
<i>T.delbruekii</i>	7	7	100%
<i>H.osmophila</i>	9	7	77,8%
<i>M.caribica</i>	13	9	69,3%

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι αναλύθηκαν και 101 στελέχη του είδους *C.zemplinina*, χρησιμοποιώντας τον εκκινητή RF2 (RAPD-PCR) αλλά δεν μας επέτρεψε η μέθοδος να πάρουμε αρκετούς τέτοιους πολυμορφισμούς ώστε να εξαγάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Αρχική δοκιμασία (screening) για επιλογή των κατάλληλων εκκινητών

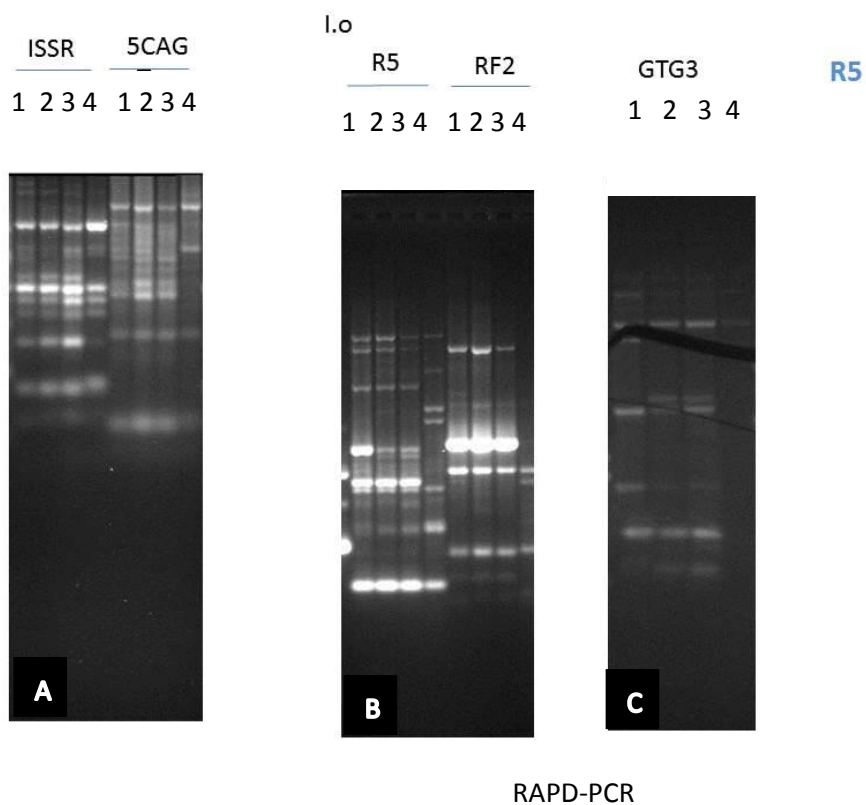
Στο πρώτο στάδιο έγινε μια αρχική δοκιμασία σε αντιπροσωπευτικό αριθμό απομονώσεων με κάθε μέθοδο PCR (RAPD-PCR και Tandem Repeat TtRNA-PCR). Για την Tandem Repeat tRNA-PCR δοκιμάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, ο ISSR-MB σε συνδυασμό με τον TtRNA-Sc και ο 5CAG σε συνδυασμό με τον TtRNA-Sc. Για την RAPD-PCR δοκιμάστηκαν τρεις εκκινητές (R5, RF2, GTG3) καθένας σε ξεχωριστή αντίδραση.

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα των δοκιμών με τους διάφορους εκκινητές.



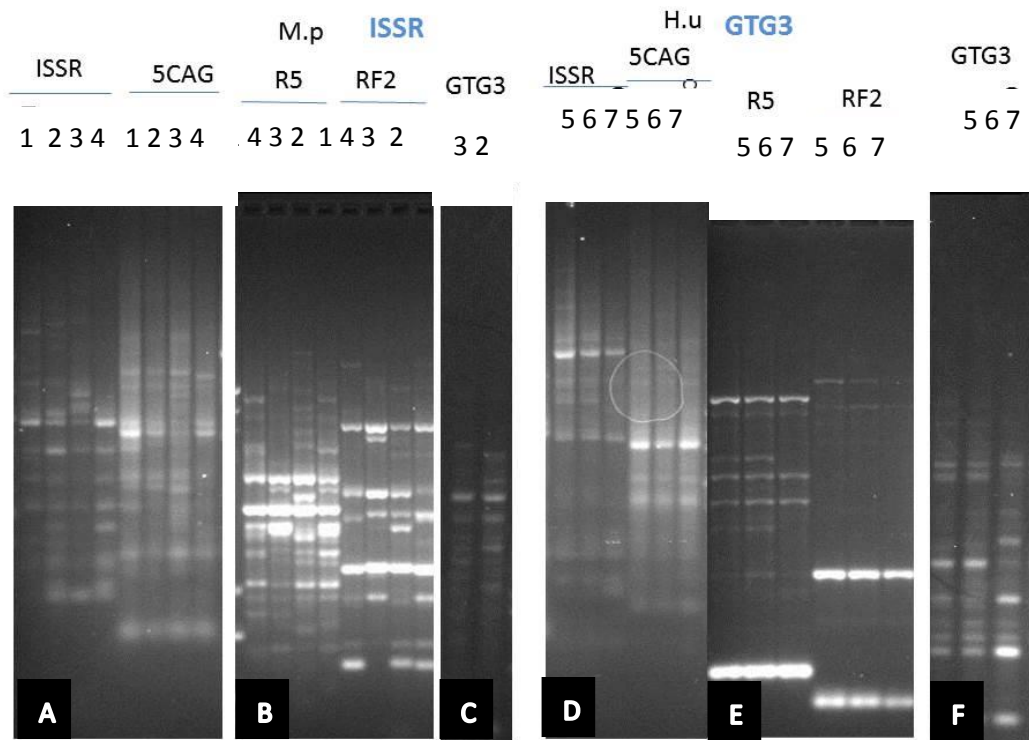
Εικόνα 4.Αποτελέσματα δοκιμασιών εκκινητών για το *L.thermotolerans*.

A.Tandem repeat TtRNA-PCR, B,C.RAPD-PCR.Επάνω δεξιά με μπλε εμφανίζεται ο εκκινητής που επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη. Πάνω από το πήκτωμα, όπου αναφέρεται ISSR πρόκειται για τον ISSR-MB. Λωρίδα 1,2 και 4 1877,Υ7 και 10387 αντίστοιχα (σελέχη αναφοράς), λωρίδα 3 και 6 δείγματα Πεζών 28PL14 και 28PL9 αντίστοιχα. Λωρίδα 5 δείγμα Νεμέας 22NL2.



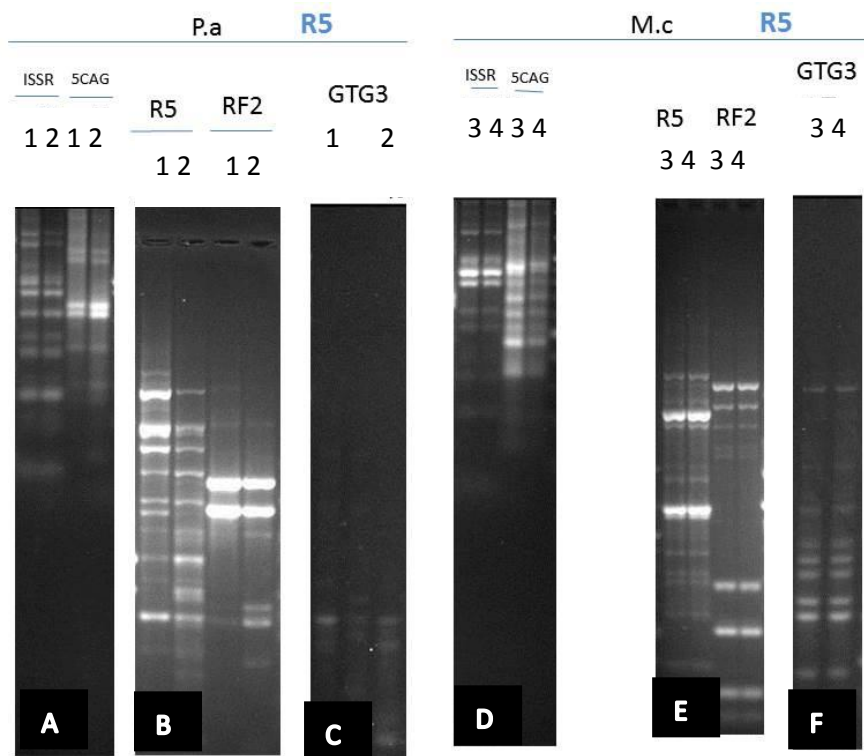
Εικόνα 5 Αποτελέσματα δοκιμασιών εκκινήτων για το *I.orientalis*.

A.Tandem repeat tRNA-PCR B,C. RAPD-PCR.Επάνω δεξιά με μπλε εμφανίζεται ο εκκινήτης που επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη. Πάνω από το πήκτωμα, όπου αναφέρεται ISSR πρόκειται για τον ISSR-MB.Λωρίδα 1 και 2 δείγματα Πεζών 46PL8 και 16PL14 αντίστοιχα, λωρίδα 3 δείγμα Νεμέας 12NL5 και λωρίδα 4 Υ6 (στέλεχος αναφοράς)



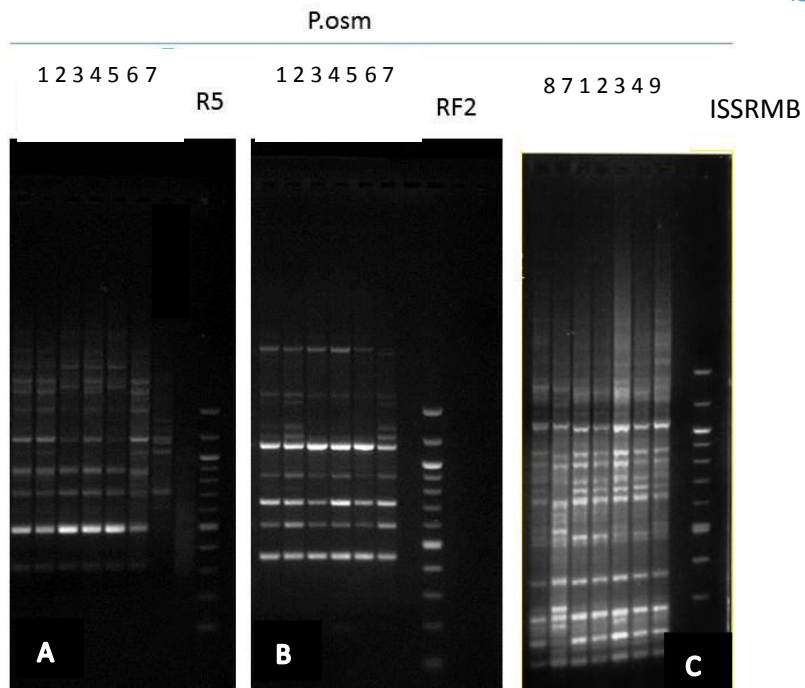
Εικόνα 6 Αποτελέσματα δοκιμασιών εκκνητών για το *M.pulcherimma* (M.p) και *H.uvarum* (H.u)

A,D: Tandem repeat tRNA-PCR για M.p και H.u αντίστοιχα. B,C:RAPD-PCR για M.p
 E,F:RAPD-PCR για H.u. Επάνω δεξιά με μπλε εμφανίζεται ο εκκνητής που επιλέχθηκε
 για την περαιτέρω μελέτη. Πάνω από το πήκτωμα, όπου αναφέρεται ISSR πρόκειται για
 τον ISSR-MB 1-4: M.p. 1: δείγμα Πεζών 43PL16, 2 και 3: δείγματα Νεμέας 21NL4 και NL6
 αντίστοιχα, 4: στέλεχος αναφοράς MP11. 5-8: H.u 5: δείγμα Πεζών 41PL12, 6: δείγμα
 Νεμέας NL10, 7: CECT 10389 δείγμα αναφοράς



Εικόνα 7. Αποτελέσματα δοκιμασιών εκκινητών για το *P.anomala* (P.a) και *M.caribica*(M.c).

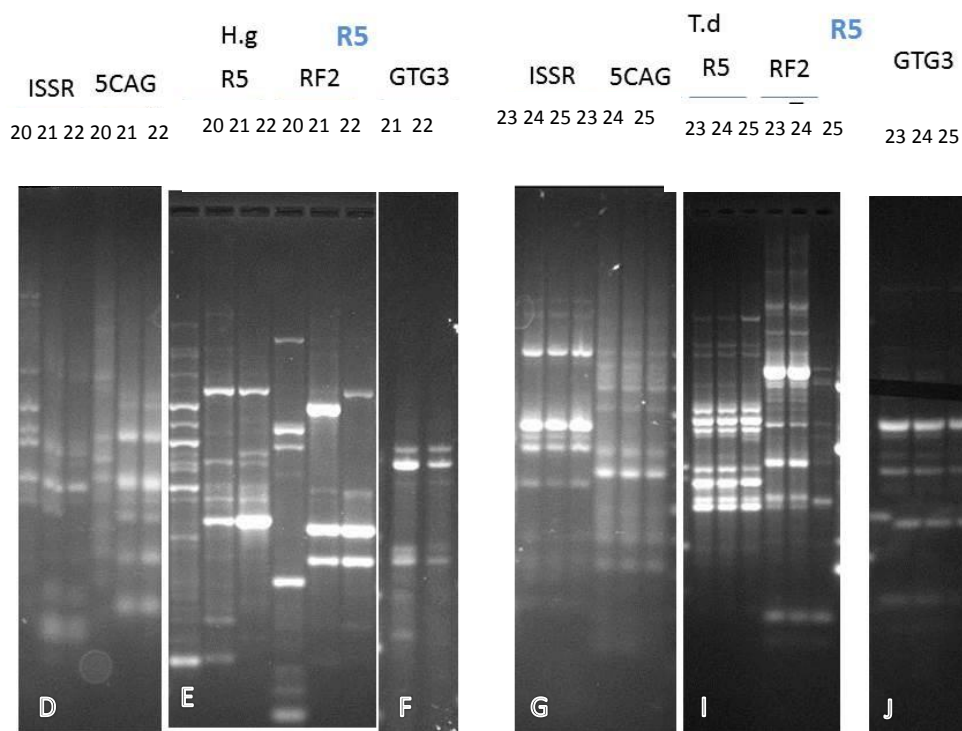
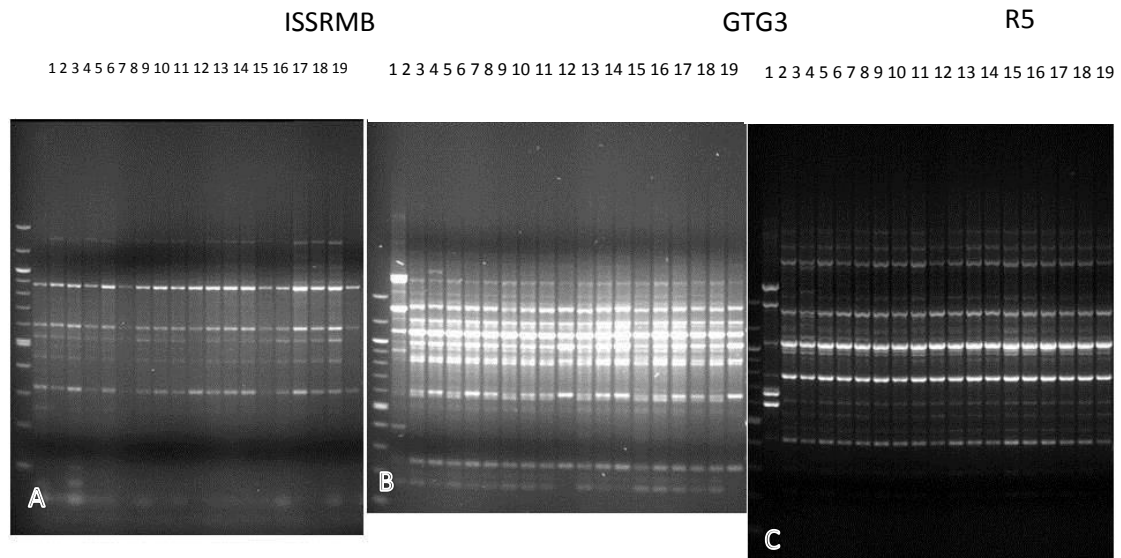
A,D: Tandem repeat tRNA-PCR για P.a και M.c αντίστοιχα B,C:RAPD-PCR για P.a, E,F:RAPD-PCR για M.c. Επάνω δεξιά με μπλε εμφανίζεται ο εκκινητής που επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη. Πάνω από το πήκτωμα, όπου αναφέρεται ISSR πρόκειται για τον ISSR-MB. 1,2:P.a,δείγματα Πεζών 14PL9 και 17PL12 αντίστοιχα 3,4 :δείγματα Πεζών 27PL17 και 27PL21 αντίστοιχα



Εικόνα 8 . Αποτελέσματα δοκιμασιών εκκινήτων για το *P.osmorphila*.

Επάνω δεξιά με μπλε εμφανίζεται ο εκκινήτης που επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη
Όλα είναι δείγματα Νεμέας.

1:26NL1,2:26NL6,3:26NL13,4:26NL15,5:26NL18,6:26NL20,7:13NL18b1,8:13NL18a,9:26NL15



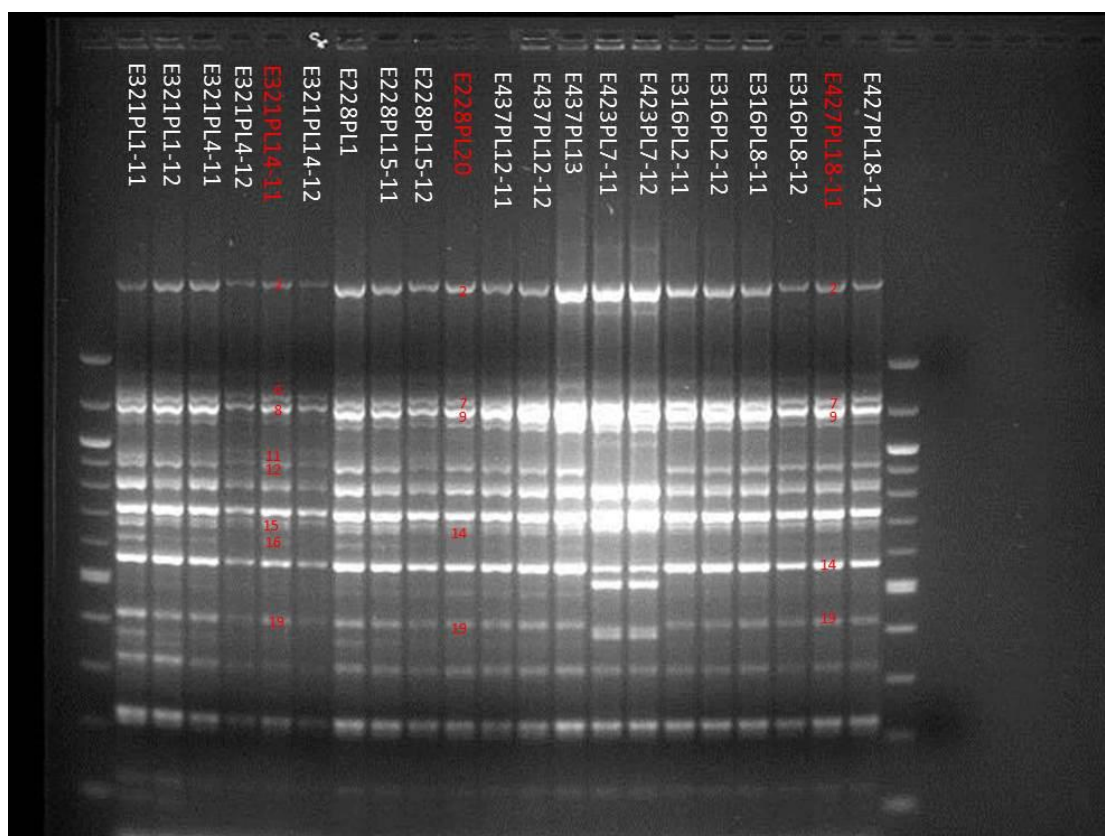
Εικόνα 9 Αποτελέσματα δοκιμασιών εκκινητών για *H.pseudoburtonii* (H.ps), *H.guillermondii*(H.g) και *T.delbrueckii* (T.d).

Με μπλε εμφανίζονται οι εκκινητές που τελικά επιλέχθηκαν. Όπου αναφέρεται ISSR πρόκειται για τον ISSRMB A,D,G: Tandem Repeat tRNA-PCR για H.ps, H.g, T.d αντίστοιχα B,C:RAPD-PCR για H.ps,E,F:RAPD-PCR για H.g και I,J:RAPD-PCR για T.d.1-19:6NL1-6NL17,NL19,NL20,20-45 22:Y6(στέλεχος αναφοράς),16NL8,34NL3αντίστοιχα,23-25:14NL6,14NL13,TO2(στέλεχος αναφοράς)

Η εκτίμηση τους ποιος εκκινητής θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε είδος ζύμης έγινε με σύγκριση των προφίλ των DNA ζωνών για κάθε είδος. Παρατηρήθηκε δηλαδή πόσοι πολυμορφισμοί εμφανίζονται μεταξύ των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

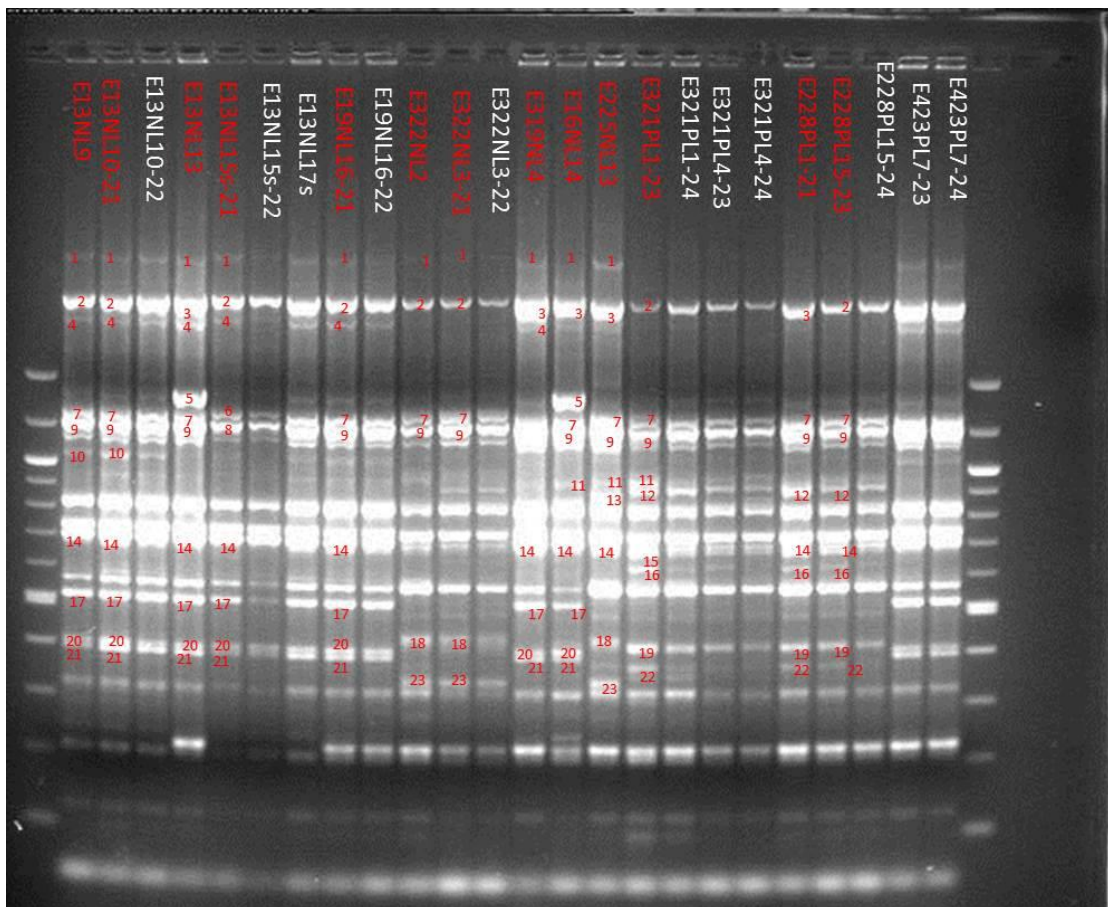
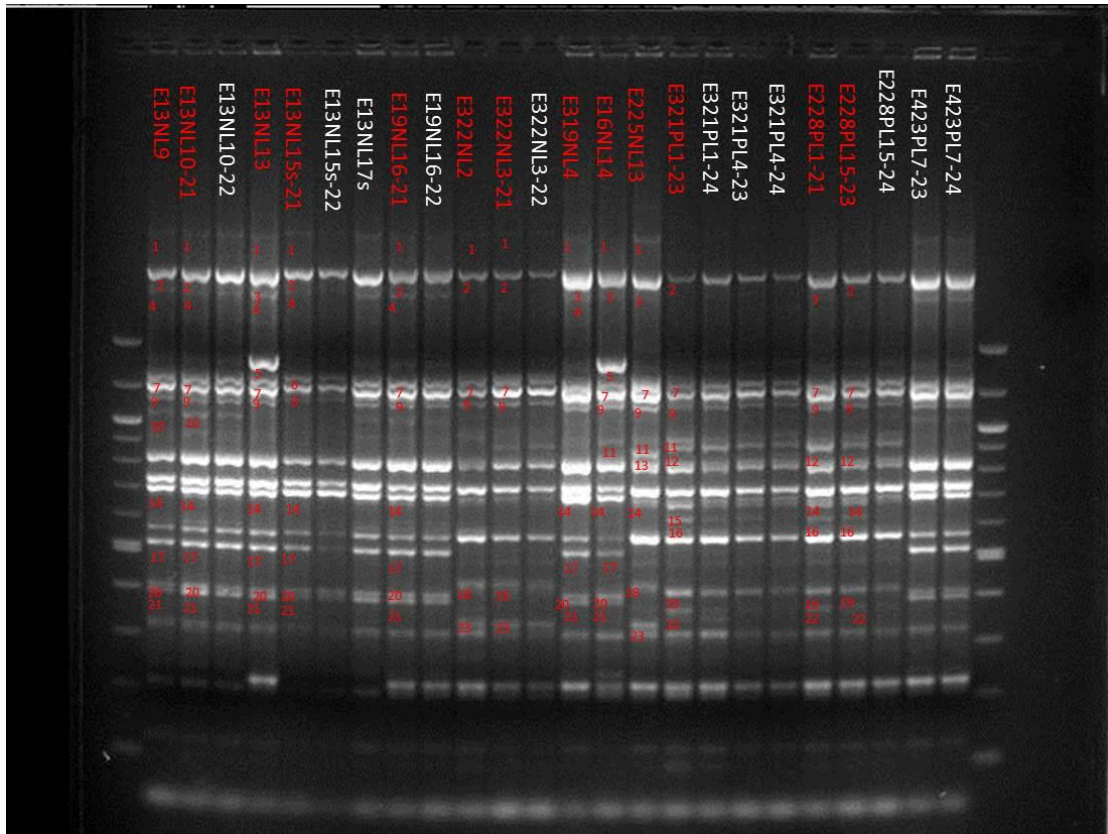
Παράδειγμα σημείωσης πολυμορφισμών από πήκτωμα αγαρόζης

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα πήκτωμα των στελεχών του *L.thermotolerans* και πως έχουν σημειωθεί επάνω σε αυτά οι πολυμορφικές ζώνες DNA. Σε κάθε ζώνη δίνεται ένας αριθμός και σημειώνεται επάνω σε κάθε λωρίδα (lane) όσες φορές την συναντάμε, αρκεί να είναι πολυμορφική και όχι να βρίσκεται σε όλα τα δείγματα (fixed). Στη συνέχεια δημιουργείται ένας πίνακας δεδομένων όπου η παρουσία μιας ζώνης σημειώνεται με 1 και η απουσία με 0.



Εικόνα 10 Πήκτωμα αγαρόζης 1,8% για το *L.thermotolerans*.

Έχουν σκοραριστεί μόνο τα δείγματα με κόκκινο χρώμα. Πρόκειται για δείγματα των Πεζών.



Εικόνα 11 Πήκτωμα αγαρόζης 1,8% για το *L. thermotolerans*.

Έχουν σκοραρισθεί μόνο τα δείγματα με κόκκινο χρώμα. Πρόκειται για δείγματα των Πεζών και της Νεμέας. Οι δύο εικόνες είναι ίδιες η τάδε είναι με χαμηλή φωτεινότητα και η τάδε με υψηλή φωτεινότητα, ώστε μέσω συγκρίσεων των δυο εικόνων να μπορέσουμε να σκοράρουμε τις ζώνες DNA.

Δείκτης διακριτικής ικανότητας μοριακών μεθόδων

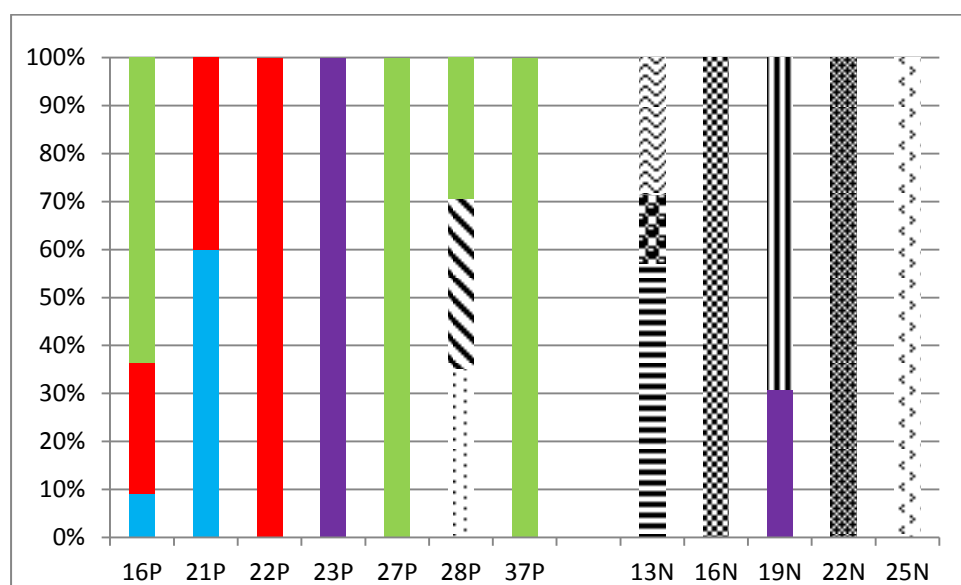
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα υπολογισμού του δείκτη Simpson

Είδος ζύμης	Τιμή δείκτη Simpson
<i>L.thermotolerans</i>	0.858033
<i>I.orientalis</i>	0.952869
<i>H.uvarum</i>	0.950842
<i>M.pulcherimma</i>	0.985887

Πίνακας 9 τιμές δείκτη Simpson ανά είδος ζύμης

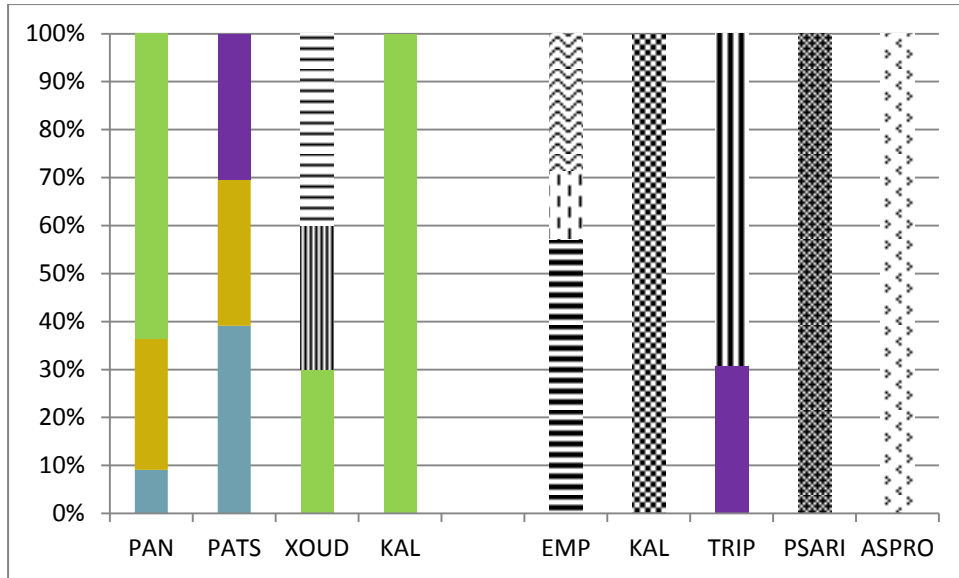
Παρουσίαση γονοτύπων ανά δείγμα και ανά αμπελώνα

Αποδόθηκαν γραφικά οι γονότυποι ανά δείγμα και ανά αμπελώνα. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα για τα διάφορα είδη ζυμών.



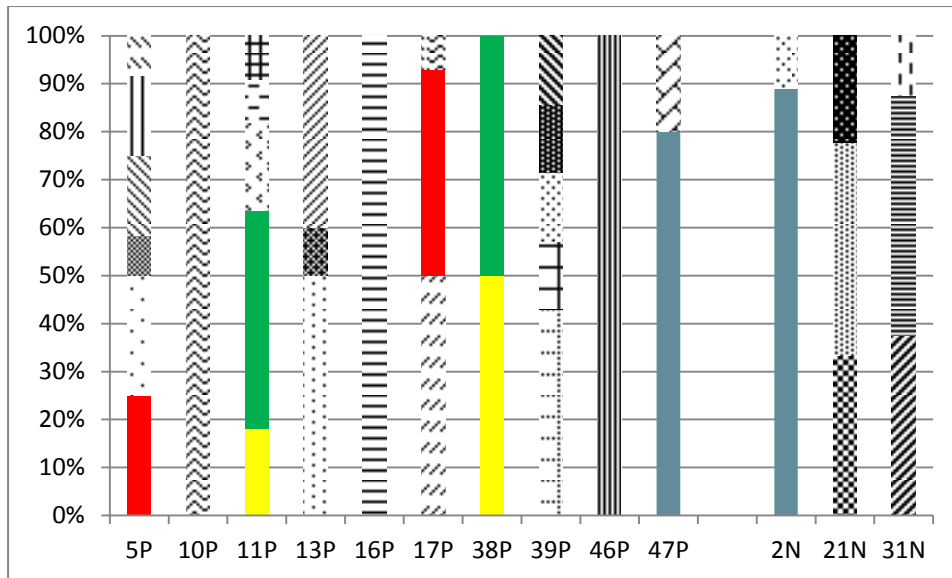
Εικόνα 12: Γονότυποι/δείγμα (%) για το *L.thermotolerans*.

Οι κοινói γονότυποι εμφανίζονται έγχρωμοι και οι μοναδικοί ασπρόμαυροι.
Δείγματα Νεμέας (N), Δείγματα Πεζών (P)



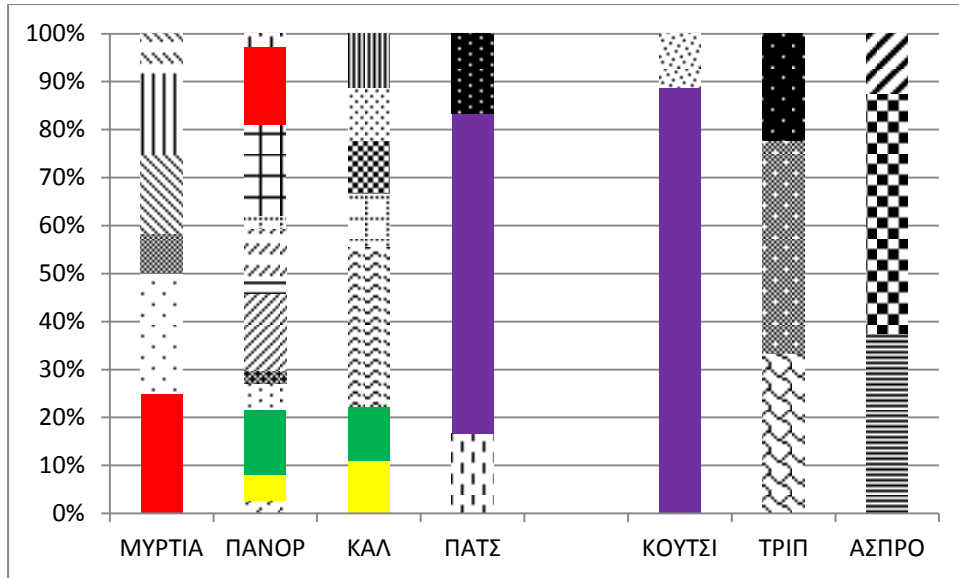
Εικόνα 13 Γονότυποι/αμπελώνια (%) για το *L. thermotolerans*.

Αριστερά εμφανίζονται οι αμπελώνες των Πεζών και δεξιά της Νεμέας.



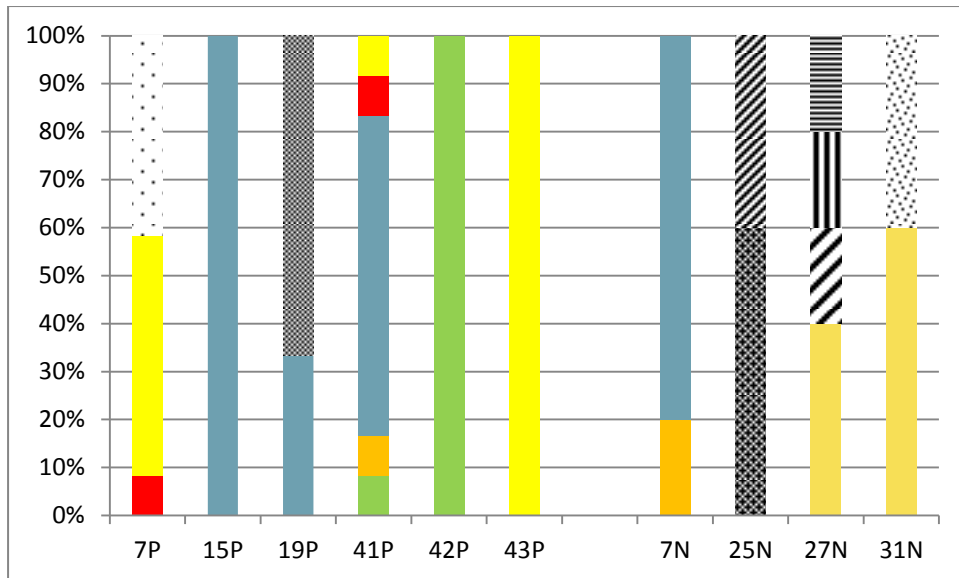
Εικόνα 14 Γονότυποι/δείγματα (%) για το *I. orientalis*.

P: δείγμα Πεζών, N: δείγμα Νεμέας.



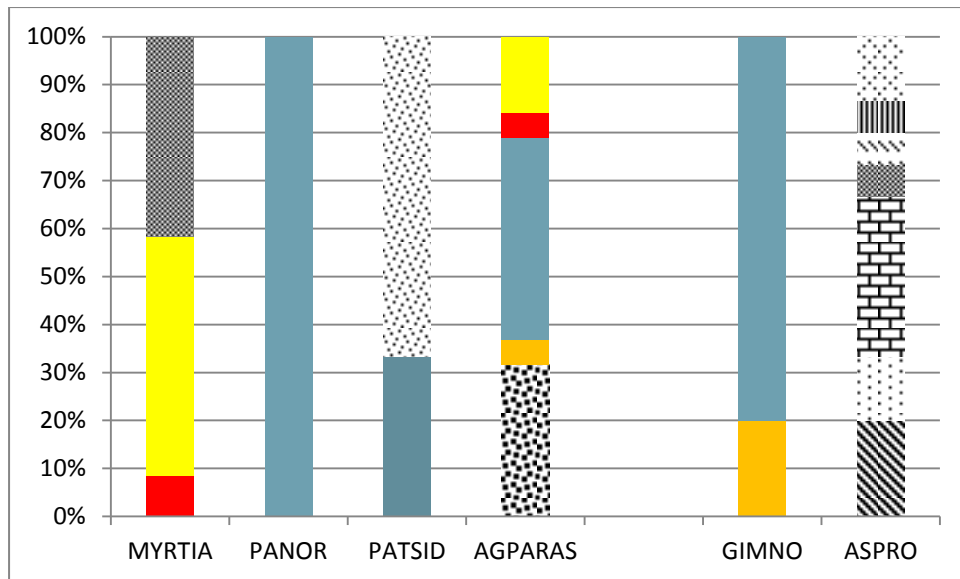
Εικόνα 15: Γονότυποι/αμπελώνα (%) για το *I.orientalis*.

Αριστερά εμφανίζονται οι αμπελώνες των Πεζών και δεξιά της Νεμέας.



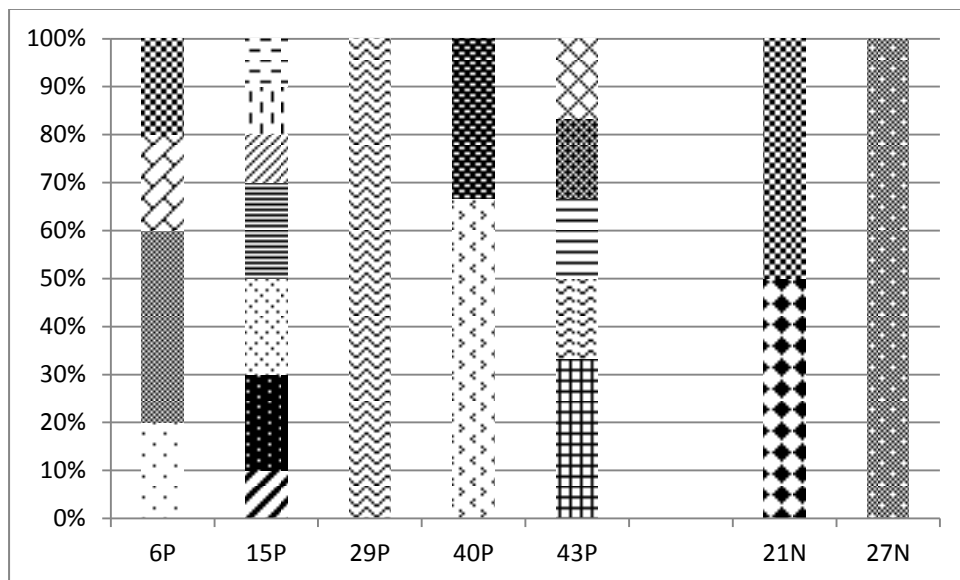
Εικόνα 16: Γονότυποι/δείγμα (%) για το *H. unarum*.

P: δείγμα Πεζών, N: δείγμα Νεμέας.



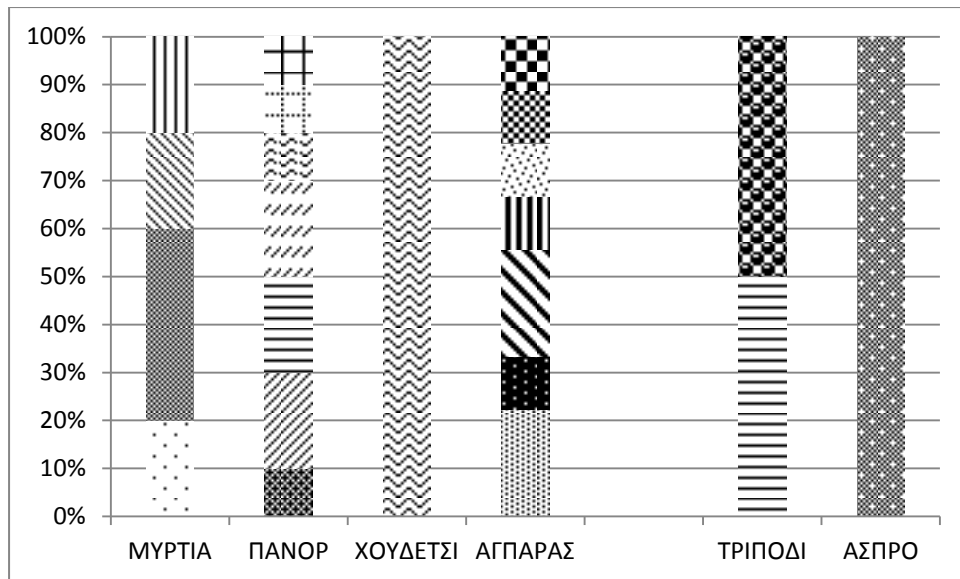
Εικόνα 17: Γονότυποι/αμπελώνια (%) για το *H.uvarum*.

Αριστερά εμφανίζονται οι αμπελώνες των Πεζών και δεξιά της Νεμέας.



Εικόνα 18: Γονότυποι/δείγμα (%) για το *M.pulcherima*.

P: δείγμα Πεζών, N: δείγμα Νεμέας.



Εικόνα 19: Γονότυποι/αμπελώννα (%) για το *M.pulcherimma*.

Αριστερά εμφανίζονται οι αμπελώνες των Πεζών και δεξιά της Νεμέας.

Από Εικόνα 12,48 παρατηρείται ότι για το *L.thermotolerans* για τα δείγματα της Νεμέας, εμφανίζονται μοναδικοί γονότυποι ανά δείγμα με μια εξαίρεση και για τα δείγματα των Πεζών κοινοί γονότυποι επίσης με μια εξαίρεση. Στην Εικόνα 13,49 παρατηρούμε ότι υπάρχει ένας κοινός γονότυπος μεταξύ Πεζών και Νεμέας. Όλοι οι αμπελώνες της Νεμέας με εξαίρεση το Τριπόδι έχουν μοναδικούς γονοτύπους. Στην Εικόνα 14,49 για το *I.orientalis* παρατηρούμε ότι στα δείγματα από τα Πεζά παρατηρούνται 26 διαφορετικοί γονότυποι. Όσον αφορά την κατανομή των γονοτύπων του *I.orientalis* ανά αμπελώνα Εικόνα 15,50 υπάρχει ένας κοινός γονότυπος μεταξύ Πεζών και Νεμέας και συνολικά παρατηρούνται 32 μοναδικοί γονότυποι. Για το *H.uvarum* Εικόνα 16,50 παρατηρούνται 6 κοινοί γονότυποι και 7 μοναδικοί γονότυποι. Στην Εικόνα 17,51 εμφανίζονται δύο κοινοί γονότυποι μεταξύ Πεζών και Νεμέας. Οι γονότυποι του Ασπροκάμπου (Νεμέα) είναι μοναδικοί. Τέλος όσον αφορά το *M.pulcherimma* στην Εικόνα 18,51 παρατηρούνται 22 γονότυποι, όλοι

μοναδικοί και στην Εικόνα 19,52 παρατηρείται ότι όλοι οι γονότυποι είναι μοναδικοί και κάθε αμπελώνας αντιπροσωπεύεται από ένα δείγμα.

Βιοποικιλότητα ανά αμπελώνα και ανά περιοχή μελέτης

Παρακάτω έχουν υπολογιστεί τα διαφορετικά και κοινά πρότυπα για όλους τους αμπελώνες και ανά δείγμα και έχει υπολογισθεί η % βιοποικιλότητα όπως ορίζεται στο [56]

Πίνακας 10: *L.thermotolerans* Παρουσιάζεται ο αριθμός των διαφορετικών γονοτύπων ανά αμπελώνα, οι κοινοί γονότυποι και το ποσοστό της ποικιλότητας ως ο λόγος του αριθμού των διαφορετικών γονοτύπων ανά αμπελώνα προς τον αριθμό των στελεχών ανά αμπελώνα.

Αμπελώνας	Στελέχη	διαφορετικά πρότυπα	μοναδικά πρότυπα ανά δείγμα	κοινά πρότυπα μεταξύ δειγμάτων	κοινά πρότυπα μεταξύ αμπελώνων	% βιοποικιλότητα ((πρότυπα/στελεχη)x 100)
Πασιδέρος	23	3	0	3	2	13
Καλλονή	15	1	0	0	1	7
Χούδετσι	20	3	2	0	1	15
Πανόραμα	11	3	0	1	3	27
Έμπατος	7	3	3	0	0	43
Τριπόδι	13	2	1	1	1	15
Καλύβια	2	1	1	0	0	50
Ψάρι	2	1	1	0	0	50
Ασπρόκαμπος	4	1	1	0	0	25
	97					

Πίνακας 11 *I.orientalis* Ποσοστά βιοποικιλότητας

Αμπελώνας	Στελέχη	διαφορετικά πρότυπα	μοναδικά πρότυπα ανά δείγμα	κοινά πρότυπα μεταξύ δειγμάτων	κοινά πρότυπα μεταξύ αμπελώνων	% βιοποικιλότητα ((πρότυπα/στελεχη)×100)
ΜΥΡΤΙΑ	14	6	5	0	1	43
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	37	13	10	0	3	35
ΚΑΛΛΟΝΗ	9	7	5	0	2	78
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	5	3	2	0	1	60
ΚΟΥΤΣΙ	9	2	1	0	1	22
ΤΡΙΠΟΔΙ	9	3	3	0	0	33
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	8	3	3	0	0	38
	91		29			

Πίνακας 12 *H.uvarum* Ποσοστά βιοποικιλότητας

Αμπελώνας	Στελέχη	διαφορετικά πρότυπα	μοναδικά πρότυπα ανά δείγμα	κοινά πρότυπα μεταξύ δειγμάτων	κοινά πρότυπα μεταξύ αμπελώνων	% βιοποικιλότητα ((πρότυπα/στελεχη)×100)
ΜΥΡΤΙΑ	12	3	1	0	2	25
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	1	1	0	0	1	100
ΠΑΤΣΙΔΕΡΟΣ	3	2	1	0	1	67
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	19	5	0	2	3	26
ΓΥΜΝΟ	5	2	0	0	2	40
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	15	7	6	1	0	47
	55					

Πίνακας 13 *M.pulcherimma* Ποσοστά βιοποικιλότητας

Αμπελώνας	Στελέχη	διαφορετικά πρότυπα	μοναδικά πρότυπα ανά δείγμα	κοινά πρότυπα μεταξύ δειγμάτων	κοινά πρότυπα μεταξύ αμπελώνων	% βιοποικιλότητα ((πρότυπα/στελέχη)×100)
ΜΥΡΤΙΑ	5	4	4	0	0	80
ΠΑΝΟΡΑΜΑ	10	7	7	0	0	70
ΧΟΥΔΕΤΣΙ	4	1	1	0	0	25
ΑΓΙΕΣ ΠΑΡΑΣΚΕΣ	9	7	7	0	0	78
ΤΡΙΠΟΔΙ	2	2	2	0	0	100
ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	2	1	1	0	0	50
	32					

Πίνακας 14 Παρουσιάζεται συνολικά για όλους τους αμπελώνες και ανά είδος ο αριθμός των διαφορετικών προτύπων, τα μοναδικά πρότυπα και τα κοινά πρότυπα καθώς και η βιοποικιλότητα ανά είδος.

Είδος	Αριθμός στελεχών	Διαφορετικά πρότυπα στο σύνολο των αμπελώνων	Μοναδικά πρότυπα στο σύνολο των αμπελώνων	Κοινά πρότυπα στο σύνολο των αμπελώνων	βιοποικιλότητα ανά είδος (% αριθμός προτύπων/αριθμό στελεχών)
<i>L.thermotolerans</i>	97	13	9	4	14%
<i>I.orientalis</i>	91	32	28	4	35%
<i>H.uvarum</i>	55	14	8	6	25%
<i>M.pulcherimma</i>	32	22	22	0	69%

Πίνακας 15 Ποσοστά βιοποικιλότητας ανά είδος για την περιοχή των **Πεζών**.

Είδη	Νο στελεχών	Διαφορετικά πρότυπα στο σύνολο αμπελώνων	Μοναδικά πρότυπα στο σύνολο αμπελώνων	Κοινά πρότυπα στο σύνολο αμπελώνων	%βιοποικιλότητα ((πρότυπα/στελέχη)x 100)
<i>L.thermotolerans</i>	69	6	3	3	9%
<i>I.orientalis</i>	65	25	22	3	39%
<i>H.uvarum</i>	35	7	4	3	20%
<i>M.pulcherimma</i>	28	19	19	0	68%

Πίνακας 16 Ποσοστά βιοποικιλότητας ανά είδος για την περιοχή της **Νεμέας**.

Είδη	Νο στελεχών	Διαφορετικά πρότυπα στο σύνολο αμπελώνων	Μοναδικά πρότυπα στο σύνολο αμπελώνων	Κοινά πρότυπα στο σύνολο αμπελώνων	%ποικιλότητα ((πρότυπα/στελέχη)x 100)
<i>L.thermotolerans</i>	28	8	8	0	29%
<i>I.orientalis</i>	26	8	8	0	31%
<i>H.uvarum</i>	20	9	9	0	45%
<i>M.pulcherimma</i>	4	3	3	0	75%

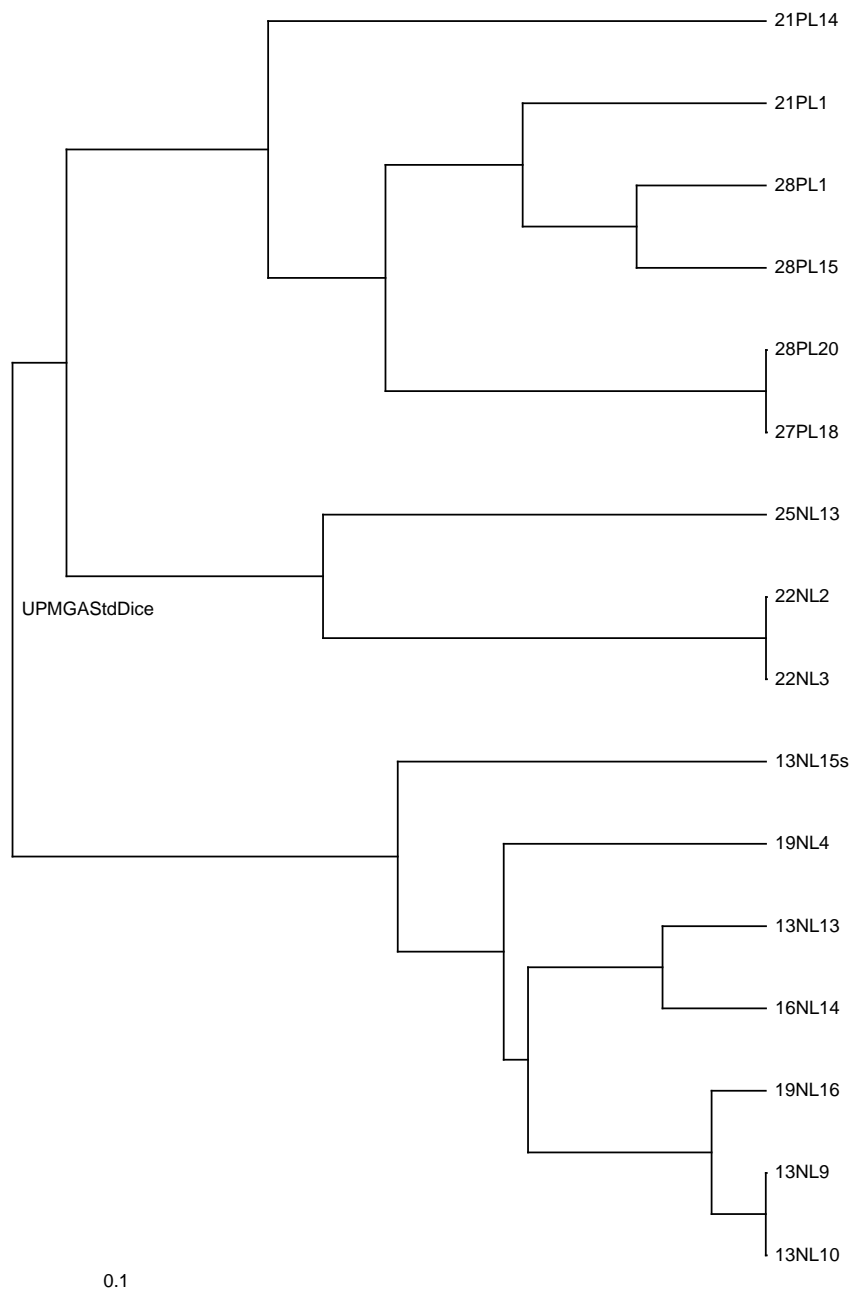
Από Πίνακας 10,55 παρατηρείται ότι για το *L.thermotolerans* την μικρότερη ποικιλότητα παρουσιάζει η Καλλονή, ενώ για το *I.orientalis* Πίνακας 11,56 την μεγαλύτερη βιοποικιλότητα παρουσιάζει η Καλλονή και την μικρότερη το Κούτσι. Δεν υπάρχουν κοινοί γονότυποι ανά δείγμα για αυτό το είδος. Για το *H.uvarum*

Πίνακας 12,56 είναι χαρακτηριστικό ότι για το Γυμνό και οι δύο γονότυποι είναι κοινοί με άλλους αμπελώνες. Το ίδιο συμβαίνει και για το Πανόραμα. Για το είδος *M.pulcherimma*

Πίνακας 13,57 την μικρότερη βιοποικιλότητα παρουσιάζει το Χούδετσι και την μεγαλύτερη το Τριπόδι.

Στο δεύτερο τμήμα της εργασίας έγινε γενετική μελέτη των απομονώσεων (isolates) και πληθυσμών.

Παρουσίαση αναλύσεων σε επίπεδο ατόμων με δύο μεθοδολογίες
Παρακάτω φαίνονται τα δένδρογράμματα (UPGMA και συναινετικό-consensus) καθώς και η ανάλυση PCoA των ατόμων για κάθε είδος ζύμης

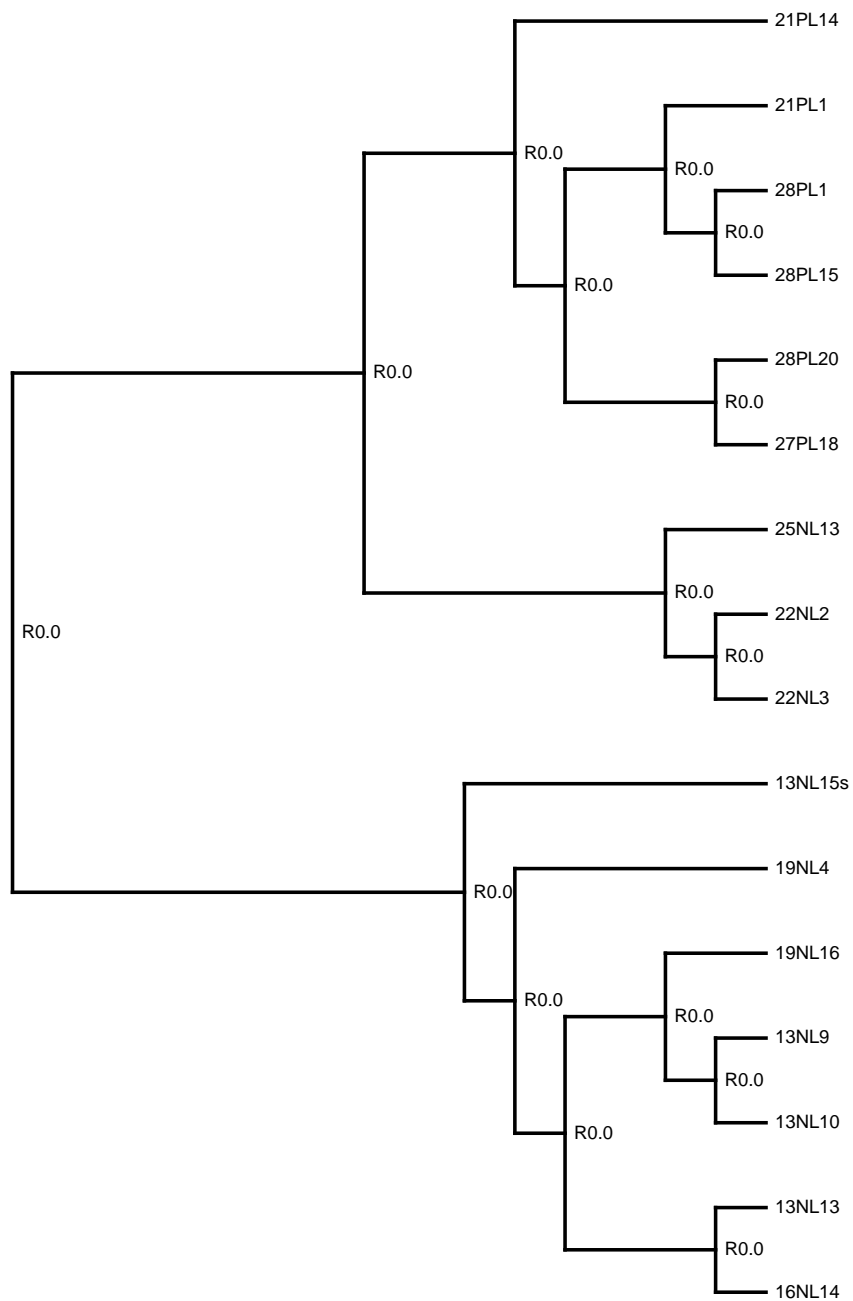


Εικόνα 20. UPGMA δένδρο για *L. thermotolerans*

PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

21PL:Πασιδέρος,27,28PL:Χούδετσι,13NL:Έμπατος,16NL:Καλύβια,19

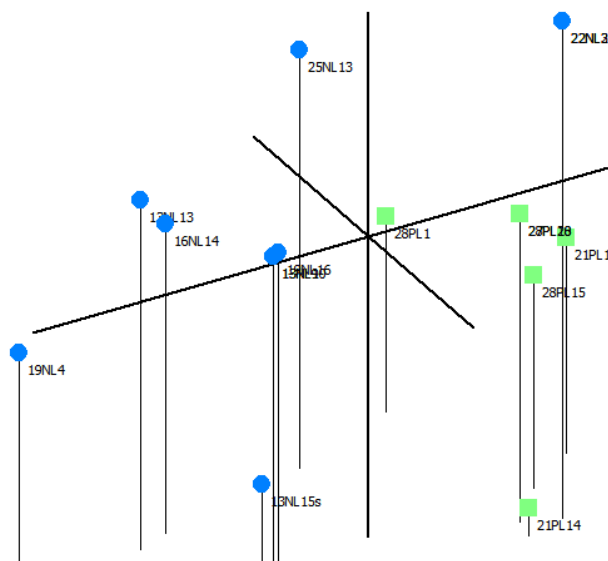
NL:Τριπόδι,22NL:Ψάρι,25NL:Ασπρόκαμπος



Εικόνα 21:Συναινετικό δένδρο για το *L.thermotolerans* με Rx-support

PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

21PL:Πατσιδερως,27,28PL:Χούδετσι,13NL:Έμπατος,16NL:Καλύβια,19NL:Τριπ
όδι,22NL:Ψάρι,25NL:Ασπρόκαμπος



Εικόνα 22: Ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα στελέχη του *L. thermotolerans*.

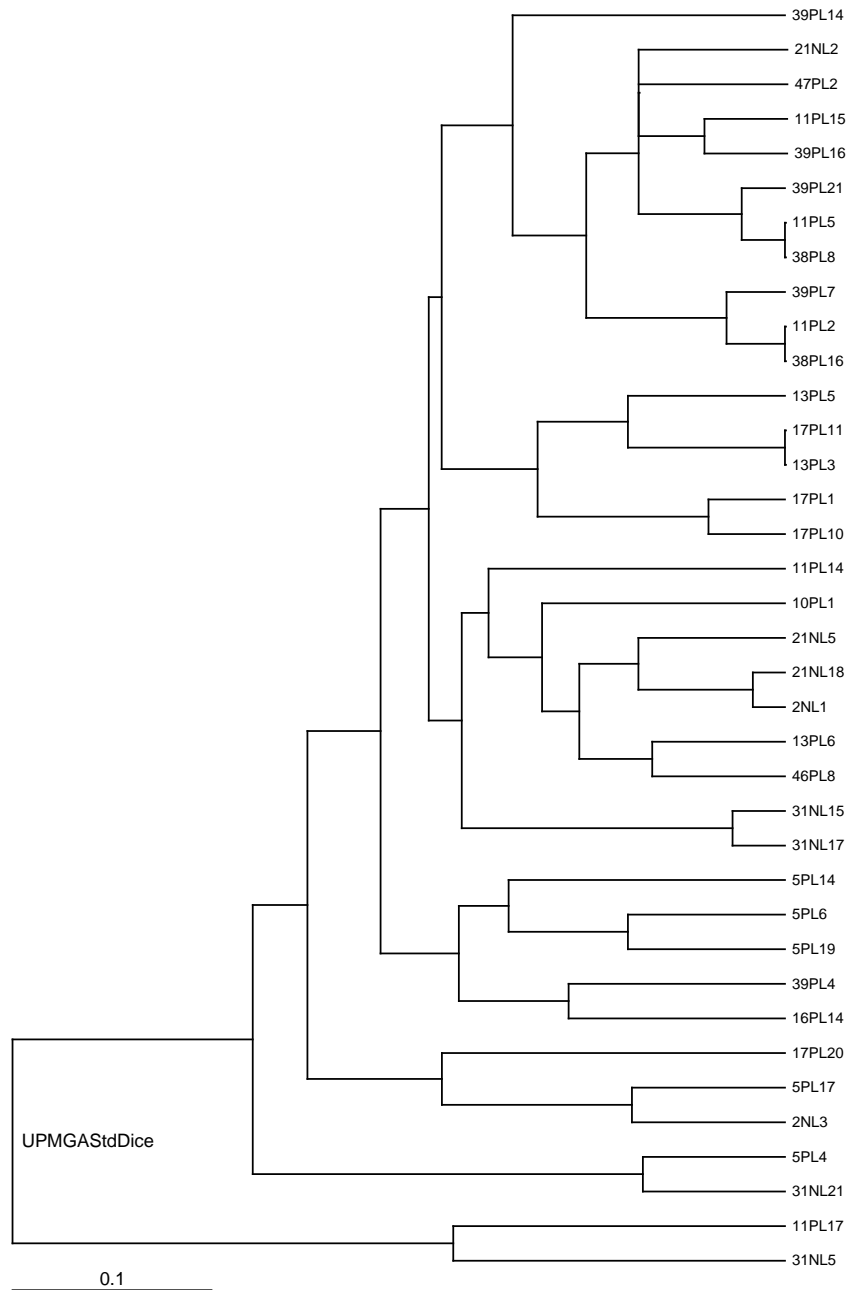
Με μπλε κύκλους ● απεικονίζονται τα άτομα που προέρχονται από τη Νεμέα και με πράσινα τετράγωνα ■ τα άτομα των Πεζών.

PL:δείγματα Πεζών, NL:δείγματα Νεμέας

21PL:Πατσίδερος, 27, 28PL:Χούδετσι, 13NL:Έμπατος, 16NL:Καλύβια, 19NL:Τριπόδι, 22NL:Ψάρι, 25NL:Ασπρόκαμπος

Από τη σύγκριση του UPGMA δένδρογράμματος με το συναινετικό δέντρο μετά από bootstrapping και υπολογισμό του Rx-support, παρατηρούμε ότι UPGMA δένδρο είναι πολύ ακριβές και δίνει ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με το συναινετικό δένδρο. Για το συναινετικό δένδρο του *L. thermotolerans*, σχηματίζονται τρεις κλάδοι, ένας των πληθυσμών των Πεζών που βρίσκεται σε σχετικά μικρή γενετική απόσταση από έναν κλάδο της Νεμέας με τα δείγματα 22 και 25N, και σχηματίζεται και ένας τρίτος κλάδος πιο απομονωμένος με δείγματα της Νεμέας (13, 19, 16N). Από την ανάλυση PCoA φαίνεται μια στενή ομαδοποίηση για τα δείγματα των Πεζών και μια άλλη ομαδοποίηση για τα δείγματα της Νεμέας. Τα δείγματα της Νεμέας (25N, 22N) που στο δένδρο μπαίνουν στον ίδιο κύριο κλάδο με αυτά των Πεζών στην

PCoA φαίνονται να είναι στην ίδια ομάδα με τα υπόλοιπα δείγματα της Νεμέας αλλά είναι πιο απομακρυσμένα.

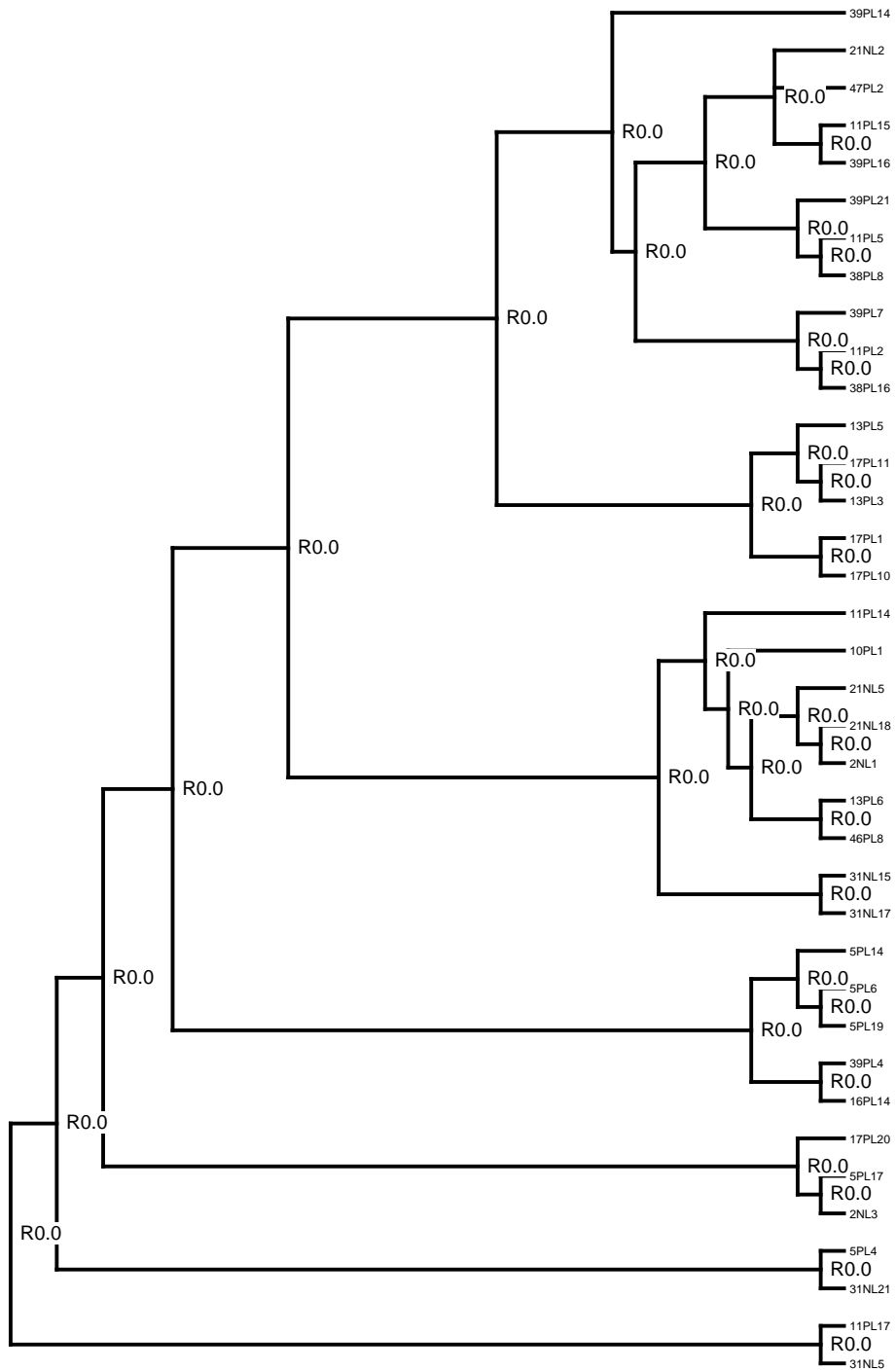


Εικόνα 23 UPGMA δένδρο για το *I.orientalis*

PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

5PL:Μυρτιά,10PL,11PL,13PL,16PL,17PL:Πανόραμα,46PL,47PL:Πατσιδέρος

38PL,39PL:Καλλονή 2NL:Κούτσι,21NL:Τριπόδι,22NL: Ψάρι, 31NL:Ασπρόκαμπος

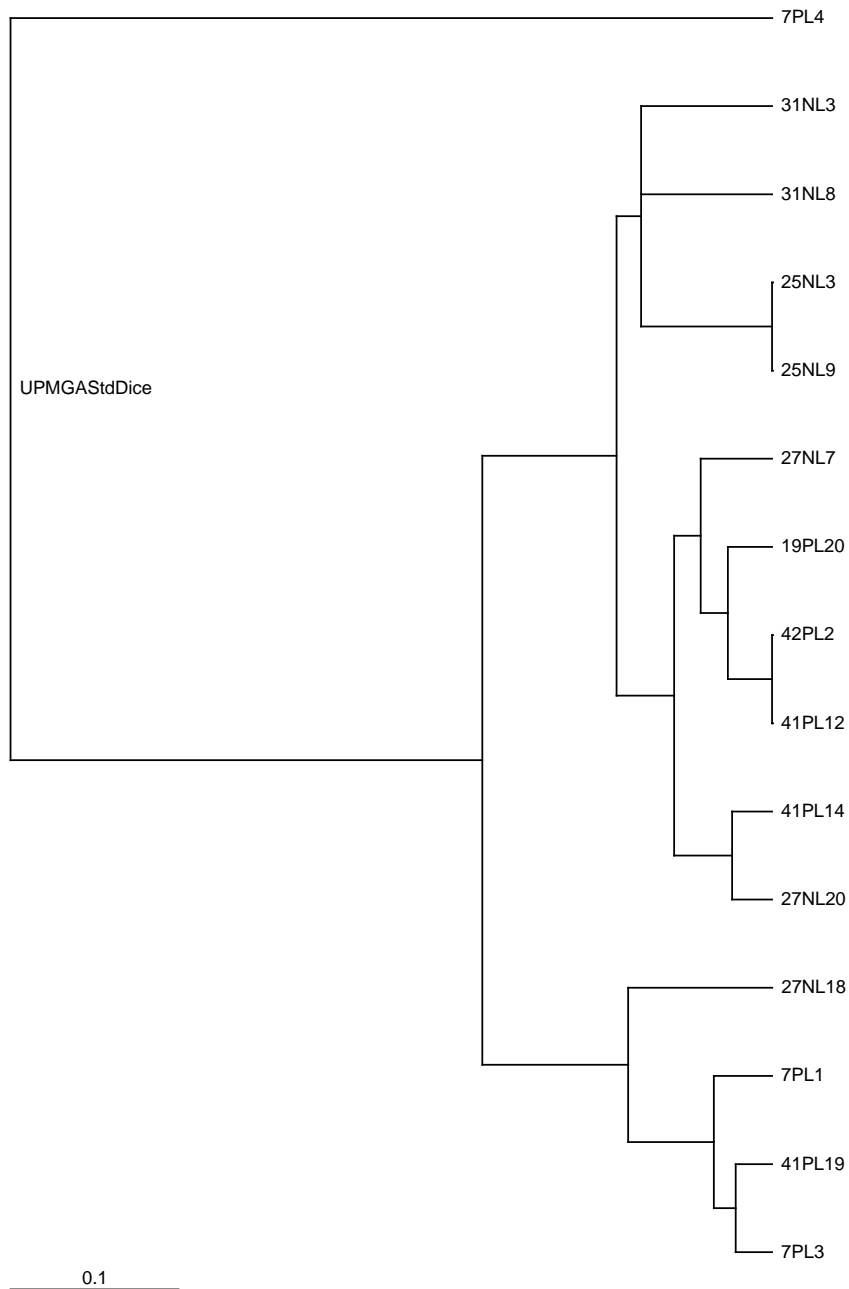


Εικόνα 24: *I.orientalis* συναινετικό δένδρο όπου έχει υπολογισθεί και το Rx-support

PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

5PL:Μυρτιά,10PL,11PL,13PL,16PL,17PL:Πανόραμα,46PL,47PL:Πατσίδερος

38PL,39PL:Καλλονή 2NL:Κούτσι,21NL:Τριπόδι,22NL: Ψάρι, 31NL:Ασπρόκαμπος

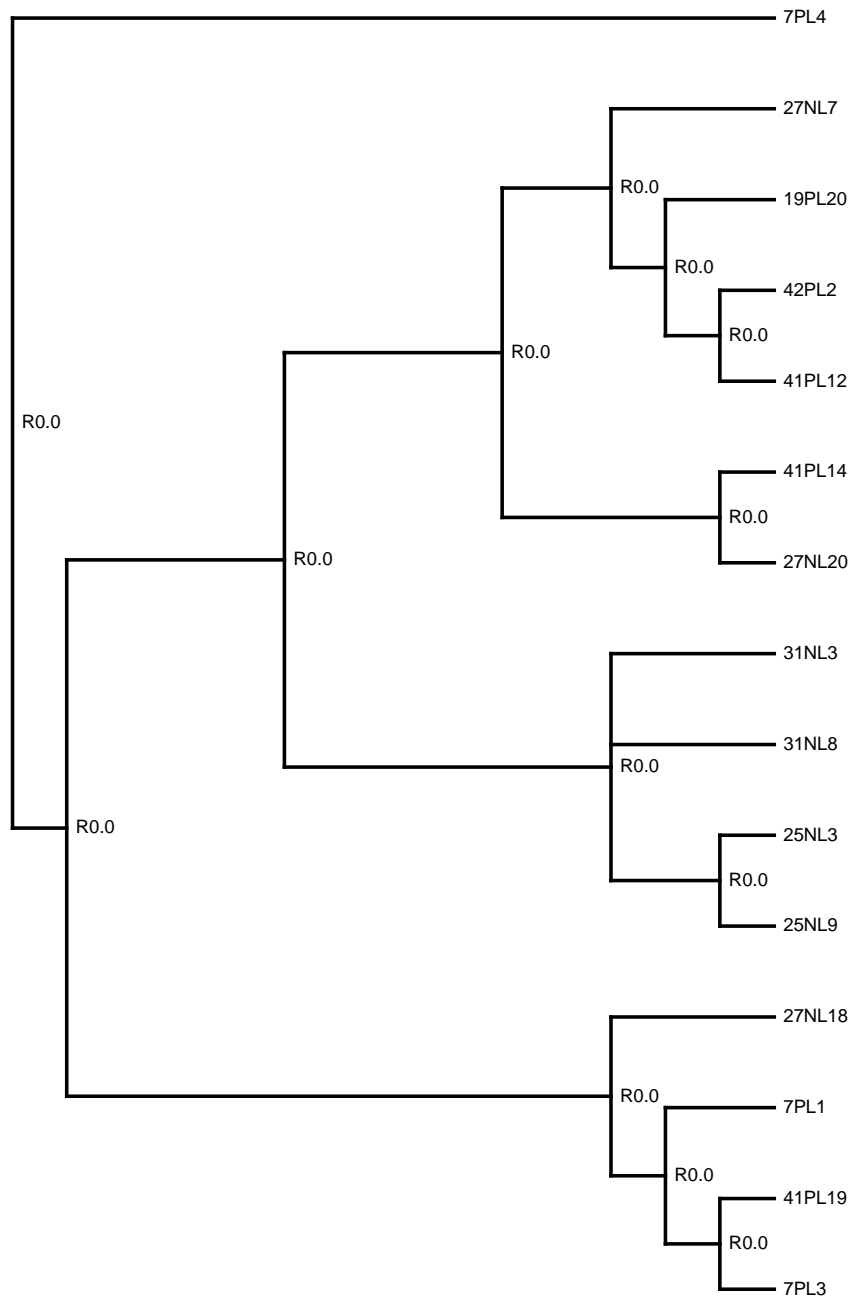


Εικόνα 26. UPGMA δένδρο *H. uvarum*

PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

7PL:Μυρτιά,19PL:Πατσιδέρος,41PL,42PL:Άγιες Παρασκιές

25NL,27NL,31NL:Ασπρόκαμπος

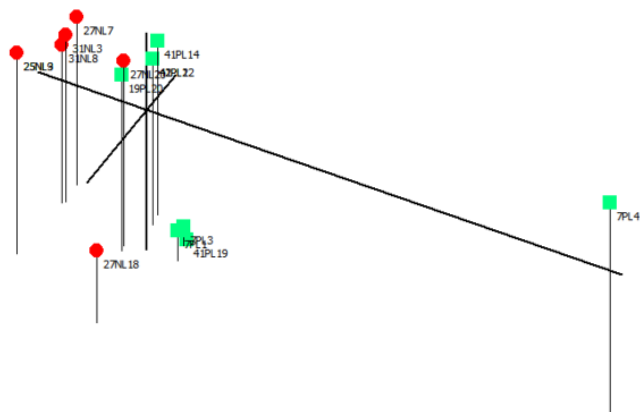


Εικόνα 27: *H.uvarum* συναινετικό δένδρο όπου έχει υπολογισθεί και το Rx-support

PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

7PL:Μυρτιά,19PL:Πατσιδερος,41PL,42PL:Άγιες Παρασκιές

25NL,27NL,31NL:Ασπρόκαμπος



Εικόνα 28 : Ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα στελέχη του *H.uvarum*.

Με κόκκινους κύκλους ● απεικονίζονται τα άτομα που προέρχονται από τη Νεμέα και με πράσινα τετράγωνα ■ τα άτομα των Πεζών.

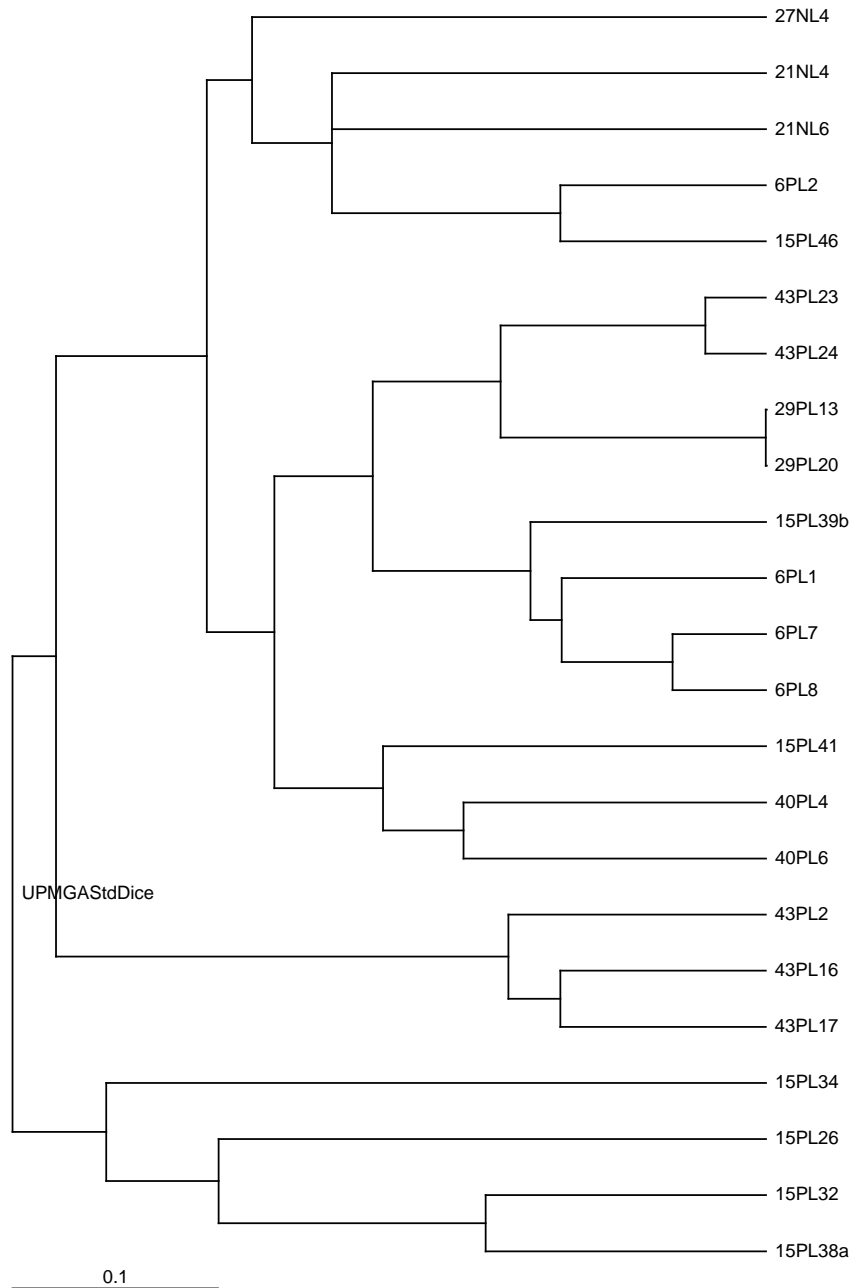
PL:δείγματα Πεζών,NL:δείγματα Νεμέας

7PL:Μυρτιά,19PL:Πατσιδέρος,41PL,42PL:Άγιες Παρασκιές

25NL,27NL,31NL:Ασπρόκαμπος

Από σύγκριση του UPGMA δένδρου με το συναινετικό δένδρο βλέπουμε ότι υπάρχει μια επαναληψιμότητα στην ομαδοποίηση των μεμονωμένων δειγμάτων αλλά αλλάζει η τοπολογία των κλάδων. Συγκεκριμένα τα δείγματα 27NL7, 19PL20, 42PL, 41PL12 δημιουργούν μια συστάδα ενώ μια άλλη συστάδα δημιουργείται από τα δείγματα 27NL20 και 41PL14. Επίσης τα 31N και 25N δείγματα ομαδοποιούνται μαζί δημιουργώντας μια ξεχωριστή συστάδα. Τέλος μια άλλη συστάδα δημιουργείται από δείγματα των Πεζών 7PL1, 7PL3, 41PL19. Στο συναινετικό δένδρο υπάρχουν τέσσερις κλάδοι με συστάδες δειγμάτων των Πεζών και ένας κλάδος ανάμεσα τους με δείγματα της Νεμέας. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τα αποτελέσματα της PCoA. Πράγματι το δείγμα 7PL4 ,βρίσκεται μακριά από

όλα τα υπόλοιπα και τα δείγματα της Νεμέας ομαδοποιούνται μαζί εκτός από το 27NL20.

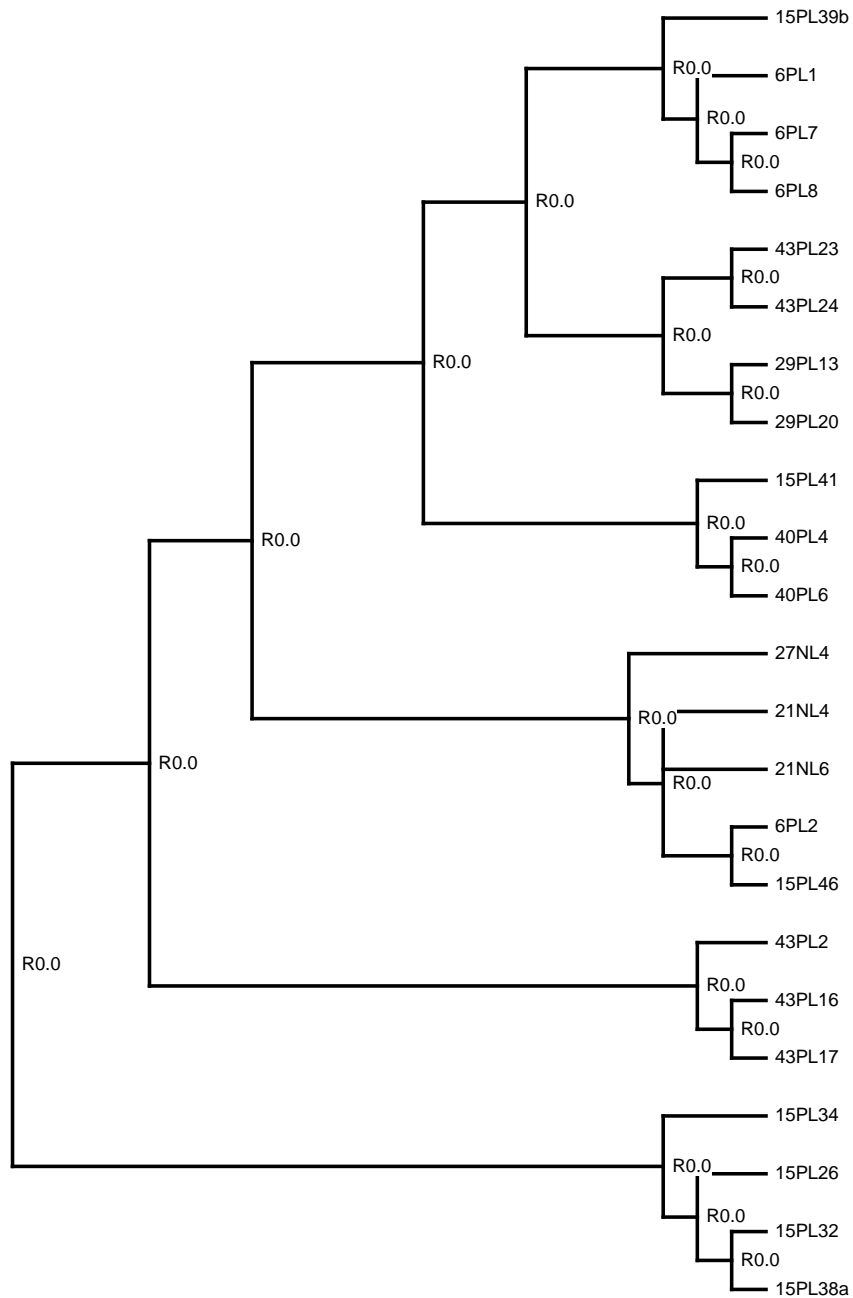


Εικόνα 29. UPMGA δένδρο για *M. pulcherimma*

PL: δείγματα Πεζών, NL: δείγματα Νεμέας

6PL:Μυρτιά,15PL:Πανόραμα,29PL:Χούδετσι,40PL,43PL:Άγιες Παρασκιές

21NL:Τριπόδι,27NL:Ασπρόκαμπος

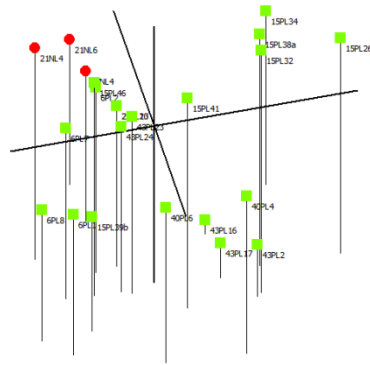


Εικόνα 30: *M. pulcherimma* συναινετικό δένδρο όπου έχει υπολογισθεί και το Rx-support

PL: δείγματα Πεζών, NL: δείγματα Νεμέας

6PL:Μυρτιά,15PL:Πανόραμα,29PL:Χούδετσι,40PL,43PL:Άγιες Παρασκιές

21NL:Τριπόδι,27NL:Ασπρόκαμπος



Εικόνα 31: Ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα στελέχη του *M.pulcherimma*.

Με κόκκινους κύκλους ● απεικονίζονται τα άτομα που προέρχονται από τη Νεμέα και με πράσινα τετράγωνα ■ τα άτομα των Πεζών. PL: δείγματα Πεζών, NL: δείγματα Νεμέας

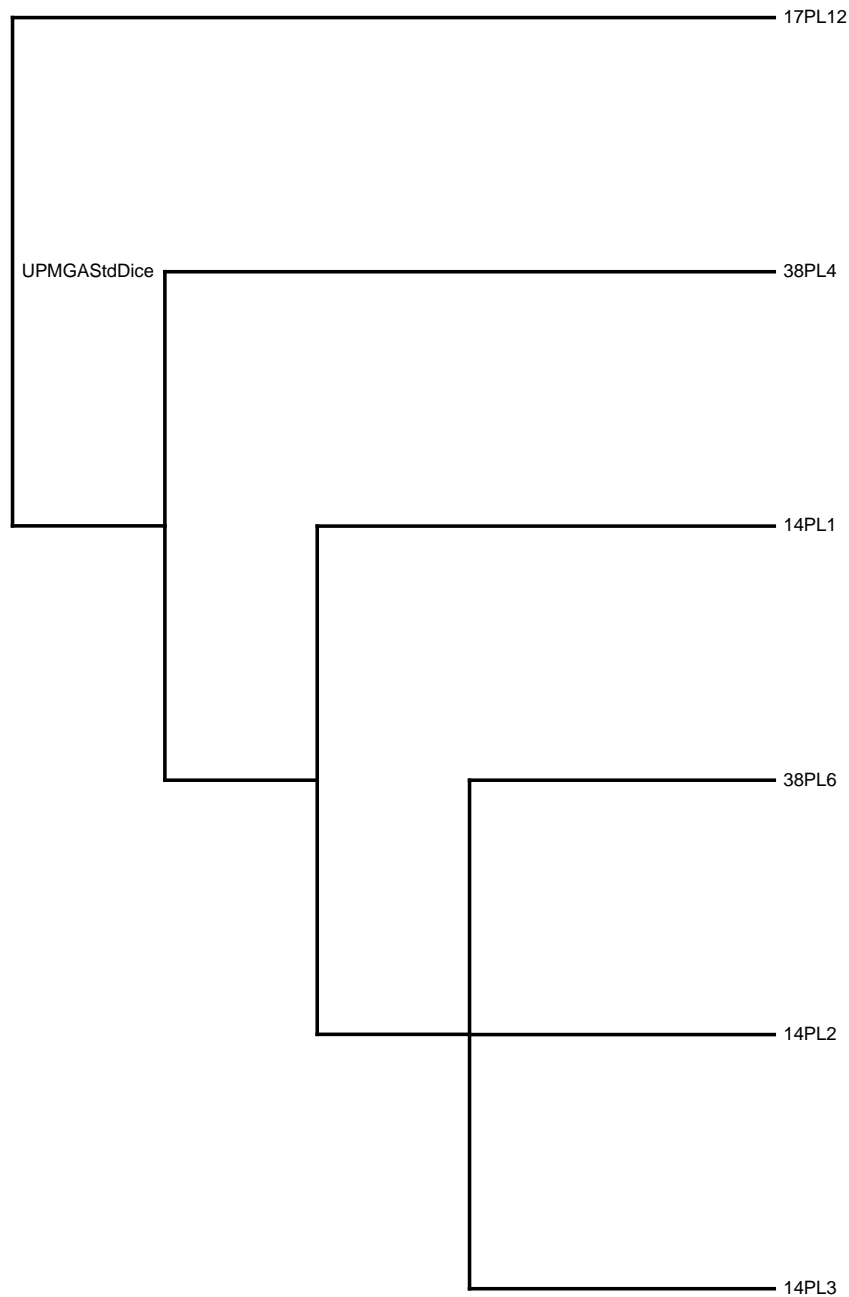
6PL:Μυρτιά,15PL:Πανόραμα,29PL:Χούδετσι,40PL,43PL:Άγιες Παρασκιές

21NL:Τριπόδι,27NL:Ασπρόκαμπος

Το συναινετικό δένδρο που προέκυψε έδειξε μια αρχική ομαδοποίηση ανά δείγμα. Τα 6P δείγματα ομαδοποιήθηκαν μαζί όπως ξεχωριστές συστάδες σχημάτισαν και τα δείγματα 43P, 29P, 15P. Τα δείγματα της Νεμέας επίσης ομαδοποιούνται μαζί, στην ίδια συστάδα όμως σε αυτή τη συστάδα μπαίνουν και δύο δείγματα από τα Πεζά και συγκριμένα με το 6PL2 και το 15PL46. Σε μεγαλύτερη γενετική απόσταση βρίσκονται τα δείγματα 15P, μαζί με μια από τις συστάδες 43P. Στη μέση υπάρχουν τα δείγματα της Νεμέας και σε έναν άλλο κλάδο τα υπόλοιπα δείγματα των Πεζών 6P,43P,29P,40P. Δηλαδή φαίνεται πως τα δείγματα της Νεμέας έχουν σχετική μεγάλη γενετική ομοιότητα μεταξύ τους και κοινά γενετικά στοιχεία με τα δείγματα των Πεζών. Συνολικά φαίνεται πως υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες δειγμάτων Πεζών που απέχουν γενετικά και στην ενδιάμεση απόσταση υπάρχουν τα δείγματα της Νεμέας.

Από την PCoA για τα μεμονωμένα άτομα βλέπουμε πως η ομαδοποίηση είναι ως εξής :τα δείγματα 6P δημιουργούν μια ομάδα σε γενετική απόσταση από τα 15P ενώ τα δείγματα της Νεμέας ομαδοποιούνται ξεχωριστά.

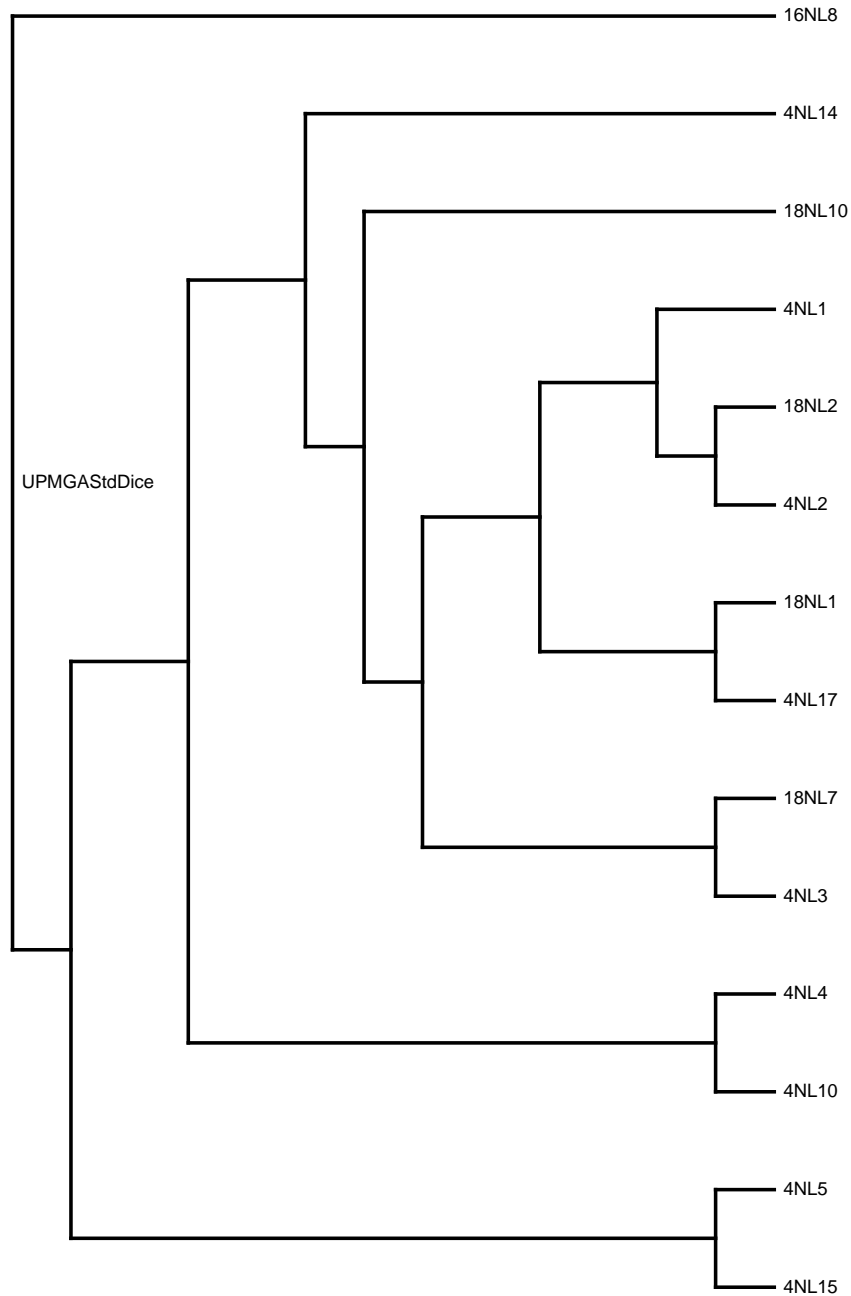
Αποτελέσματα σε επίπεδο ατόμων για 6 είδη με μικρούς πληθυσμούς



Εικόνα 32 UPMGA δένδρο για *P. anomala*

PL: δείγματα Πεζών

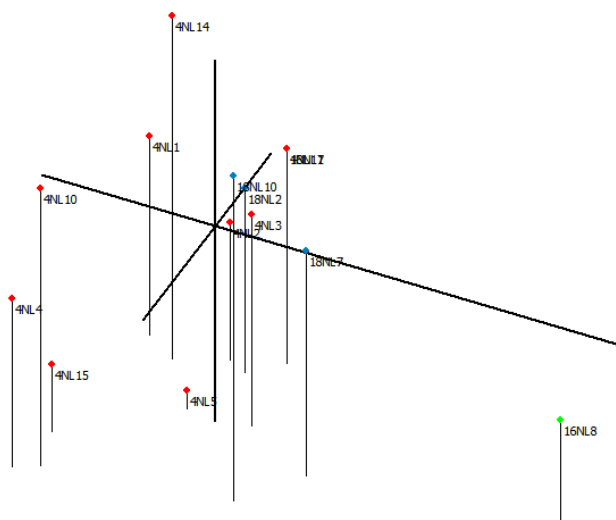
14PL,17PL:Πανόραμα, 38PL:Καλλονή



Εικόνα 33 UPMGA δένδρο για *H.guillermondii*

NL: δείγματα Νεμέας

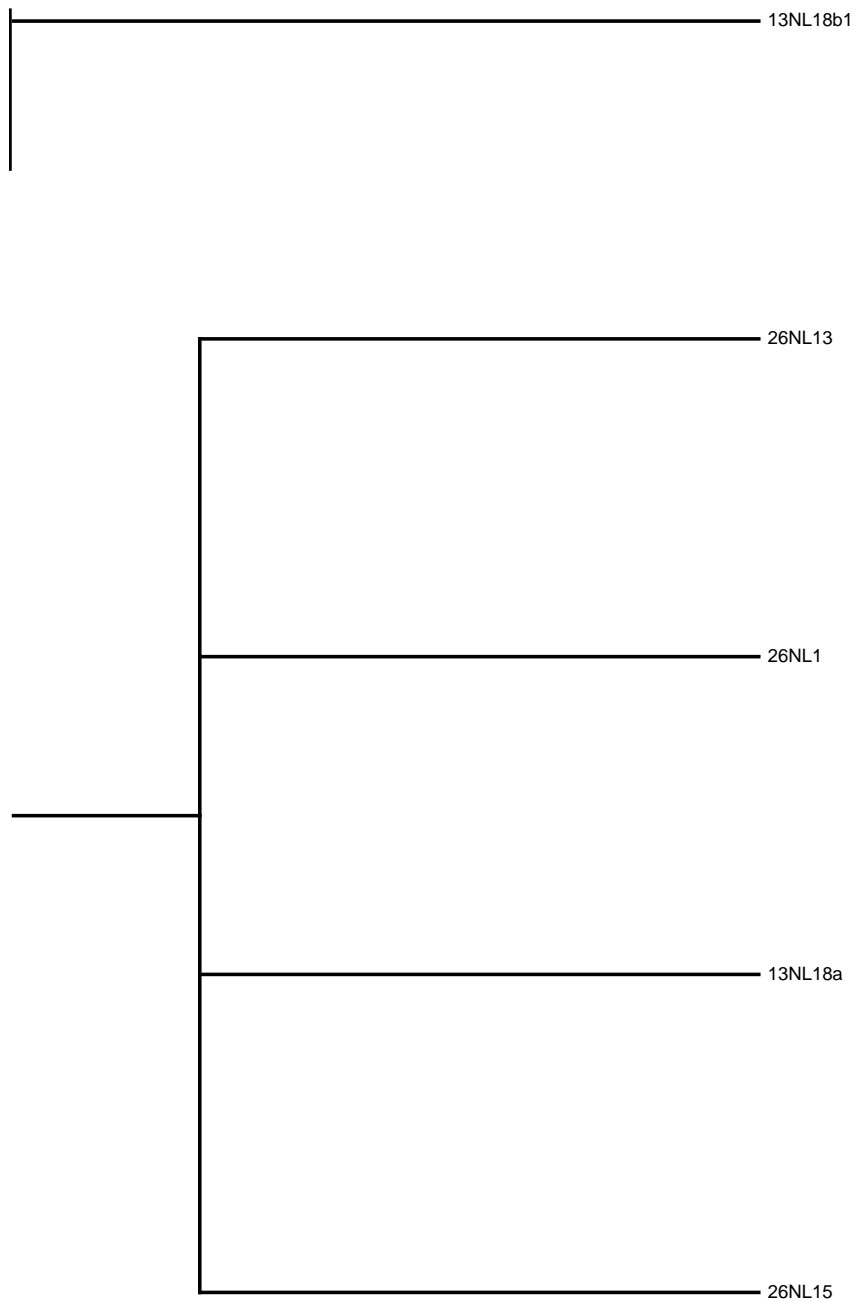
4NL:Δάφνη,16NL, 18NL:Καλύβια



Εικόνα 34. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών για *H.guillermondii*

NL: δείγματα Νεμέας

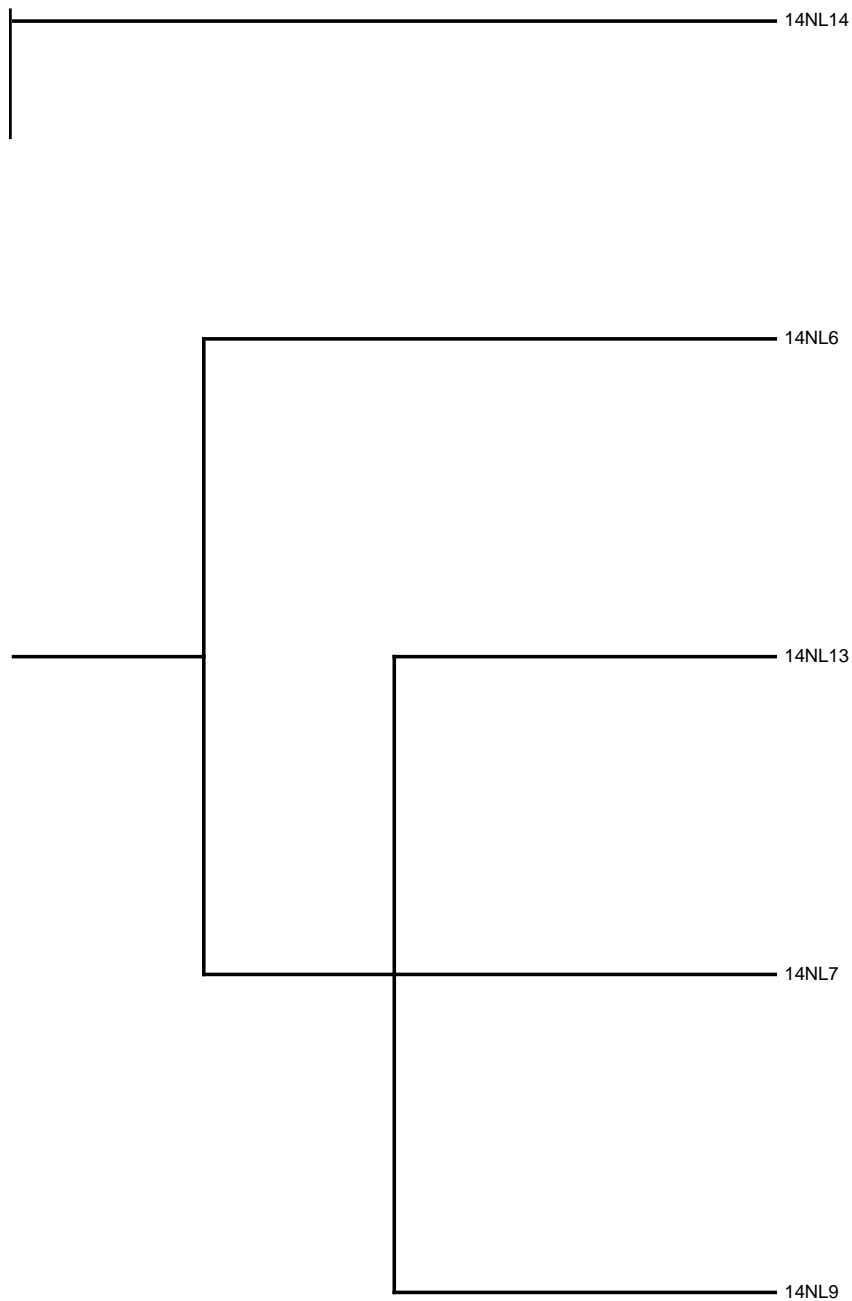
4NL:Δάφνη,16NL, 18NL:Καλύβια



Εικόνα 35. UPMGA δένδρο για *P.osmophila*

NL: δείγματα Νεμέας

13NL:Έμπατος,26NL:Ασπρόκαμπος



Εικόνα 36. UPMGA δένδρο για *T. Delbrueckii*

NL: δείγματα Νεμέας

14NL: Έμπατος

H.pseudoburtonii

Αναλύθηκαν και τα 20 δείγματα που είχαν απομονωθεί και προέκυψαν τρεις διαφορετικοί γονότυποι με τον εκκινητή R5 (Εικόνα 9,45). Ο γονότυπος του E6NL1 διαφέρει πάρα πολύ από όλους τους υπόλοιπους γονότυπους.

M.caribica

Αναλύθηκαν 9 στελέχη με τον εκκινητή R5 (Εικόνα 7,43) και δεν προέκυψαν πολυμορφισμοί.

Γενετική ανάλυση πληθυσμών

Κατόπιν προχωρήσαμε σε ανάλυση των πληθυσμών. Τα δείγματα μας προέρχονταν από δύο ευρύτερες γεωγραφικές ζώνες την Νεμέα (Κορινθία) και τα Πεζά (Ηράκλειο). Τα διάφορα δείγματα που είχαμε λάβει προέρχονται με τη σειρά τους από υποπεριοχές δηλαδή αμπελώνες. Έτσι μπορούμε να θεωρήσουμε διάφορα επίπεδα στους πληθυσμούς μας. Το πρώτο επίπεδο διαχωρισμού είναι μεταξύ Νεμέας και Πεζών. Το δεύτερο επίπεδο είναι μεταξύ αμπελώνων.

Σε επίπεδο ατόμων έχει υπολογισθεί ο δείκτης Shannon ως μέτρο της ποικιλομορφίας εντός ολόκληρου του πληθυσμού των ατόμων (χωρίς δηλαδή να έχει σχηματισθεί κάποια ομαδοποίηση). Στην ουσία δηλαδή συγκρίνουμε την ποικιλομορφία ανά είδος. Ο δείκτης Shannon [49]είναι κατάλληλος για ανάλυση δεδομένων που έχουν προκύψει από τη χρήση κυρίαρχων δεικτών.

Πίνακας 17 τιμές δείκτη Shannon ανά είδος ζύμης

Είδος ζύμης	Δείκτης Shannon(I)	Παραλλακτικότητα Shannon Var(I)	Δείκτη	Τυπική απόκλιση(SD)
<i>L.thermotolerans</i>	4,19	0,093		0,3057
<i>I.orientalis</i>	4,31	0,029		0,17
<i>H.uvarum</i>	3,99	0,107		0,327
<i>M.pulcherimma</i>	4,37	0,0849		0,291

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ πληθυσμών. Ως πληθυσμούς για αυτή την ανάλυση ορίστηκαν οι δύο γεωγραφικές περιοχές Νεμέα και Πεζά. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι ένα t-test το οποίο βασίζεται στις τιμές του δείκτη Shannon (I) και της παραλλακτικότητας αυτού var (I) οι οποίες έχουν γίνει bootstrapped 1000 φορές. Σαν αποτέλεσμα λαμβάνουμε την τιμή t για συγκεκριμένους βαθμούς ελευθερίας ,για το ελάχιστο επίπεδο σημαντικότητας στο οποίο παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών (Νεμέα versus Πεζών)

Πίνακας 18 γενετική ποικιλομορφία μεταξύ Νεμέας και Πεζών

Είδος ζύμης	Τιμή t	B.E	Τιμή p (επίπεδο σημαντικότητας)
<i>L.thermotolerans</i>	1,63	10	13%
<i>I.orientalis</i>	4,31	26	54%
<i>H.uvarum</i>	3,99	11	7%
<i>M.pulcherimma</i>	3,151	4	3,4%

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των δύο περιοχών Νεμέα και Πεζά καθώς και εντός αυτών

Πίνακας 19 γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των δύο περιοχών Νεμέα και Πεζά για κάθε είδος ζύμης

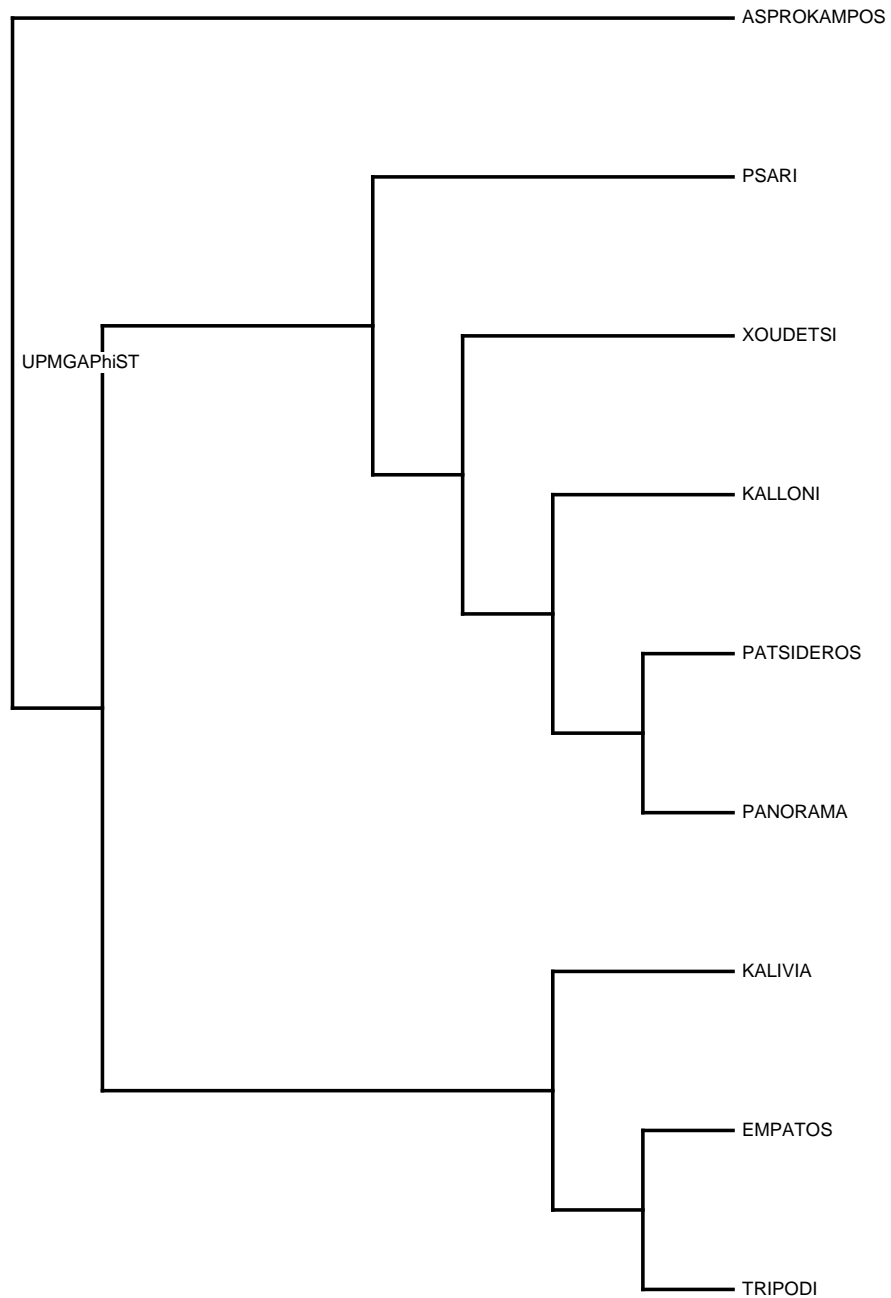
Πληθυσμοί	Είδος ζύμης	Παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών	Παραλλακτικότητα εντός του πληθυσμού	Φ_{st}
ΝΕΜΕΑ/ΠΕΖΑ	<i>L.thermotolerans</i>	62,066%	37,933%	0,62
ΝΕΜΕΑ/ΠΕΖΑ	<i>I.orientalis</i>	20,847%	79,152%	0,208
ΝΕΜΕΑ/ΠΕΖΑ	<i>H.uvarum</i>	33,075%	66,924%	0,33
ΝΕΜΕΑ/ΠΕΖΑ	<i>M.pulcherimma</i>	21,424%	78,575%	0,214

Στη συνέχεια πραγματοποιούμε την ίδια ανάλυση και σε επίπεδο αμπελώνων. Δηλαδή, ορίζουμε σαν πληθυσμό, το σύνολο των ατόμων που προέρχεται από κάθε αμπελώνα.

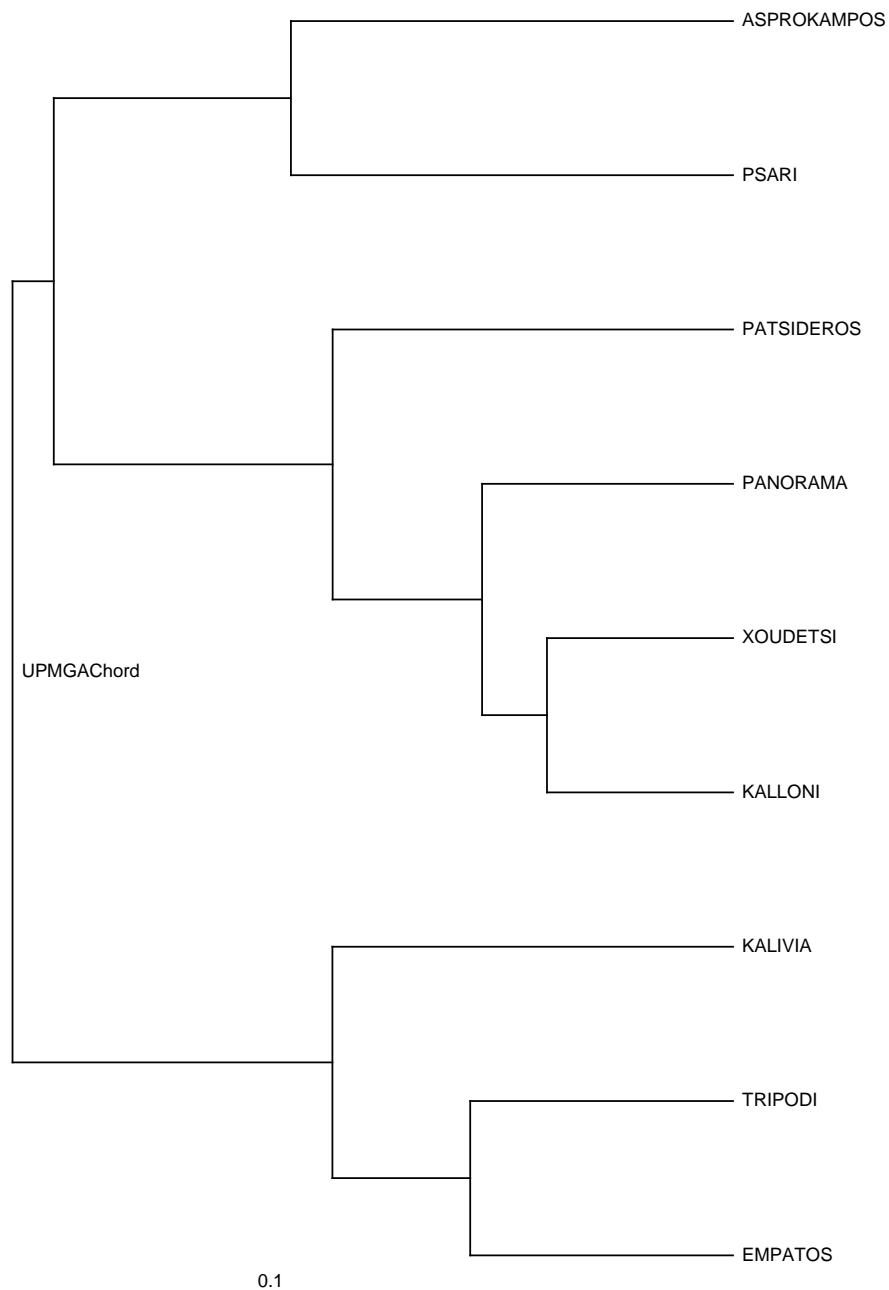
Πίνακας 20 γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ αμπελώνων για κάθε είδος ζύμης

Πληθυσμοί	Είδος ζύμης	Παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών	Παραλλακτικότητα εντός του πληθυσμού	Φ_{st}
Αμπελώνες	<i>L.thermotolerans</i>	61,68%	38,319%	0,616
Αμπελώνες	<i>I.orientalis</i>	44,427%	55,572%	0,444
Αμπελώνες	<i>H.uvarum</i>	42,697%	57,302%	0,426
Αμπελώνες	<i>M.pulcherimma</i>	40,281%	59,718%	0,4028

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση AMOVA δημιουργήθηκε μια μήτρα δεδομένων με τις τετραγωνικές ευκλείδειες αποστάσεις των πληθυσμών.



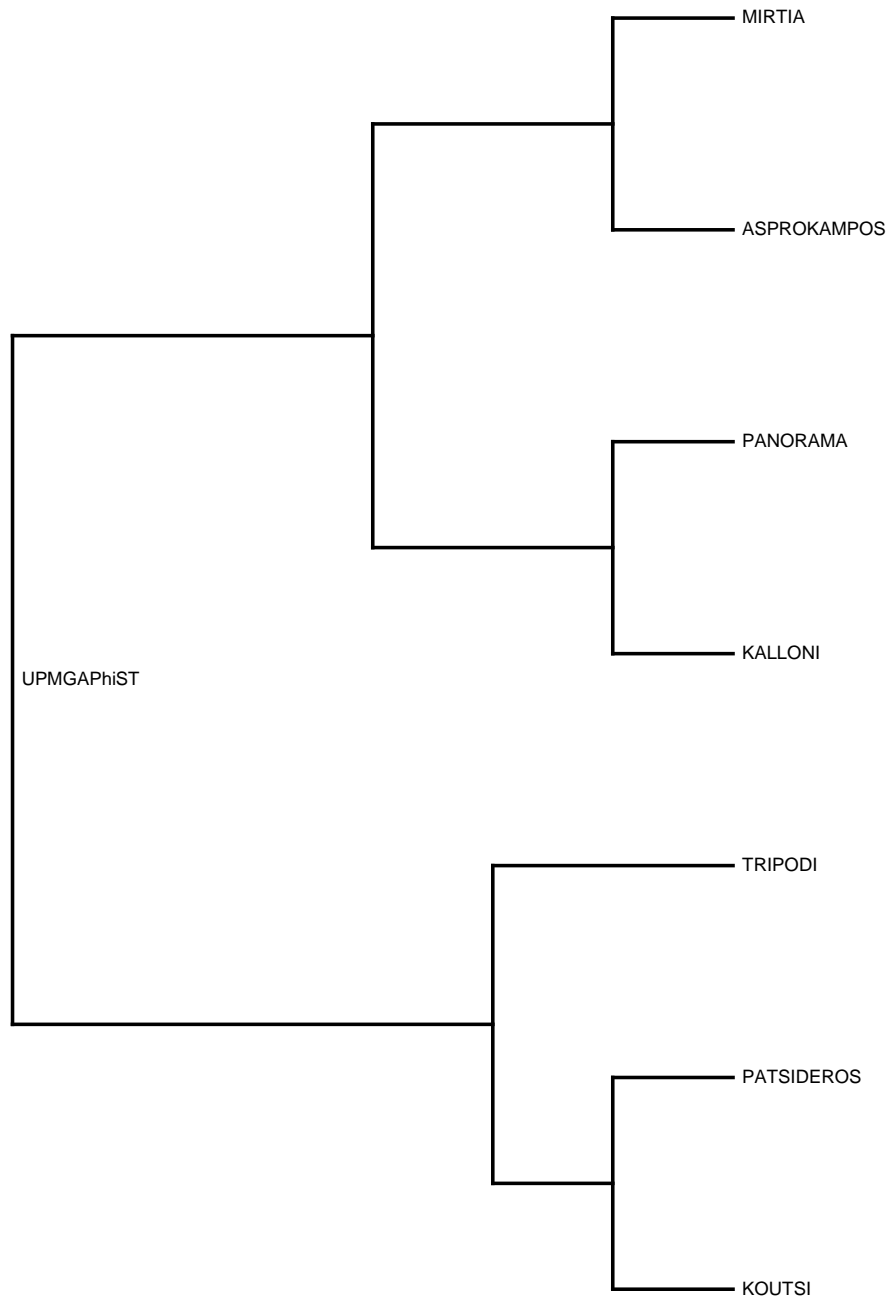
Εικόνα 37 UPGMA δένδρο με βάση τις Φ_{st} αποστάσεις μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών για το *L. thermotolerans*



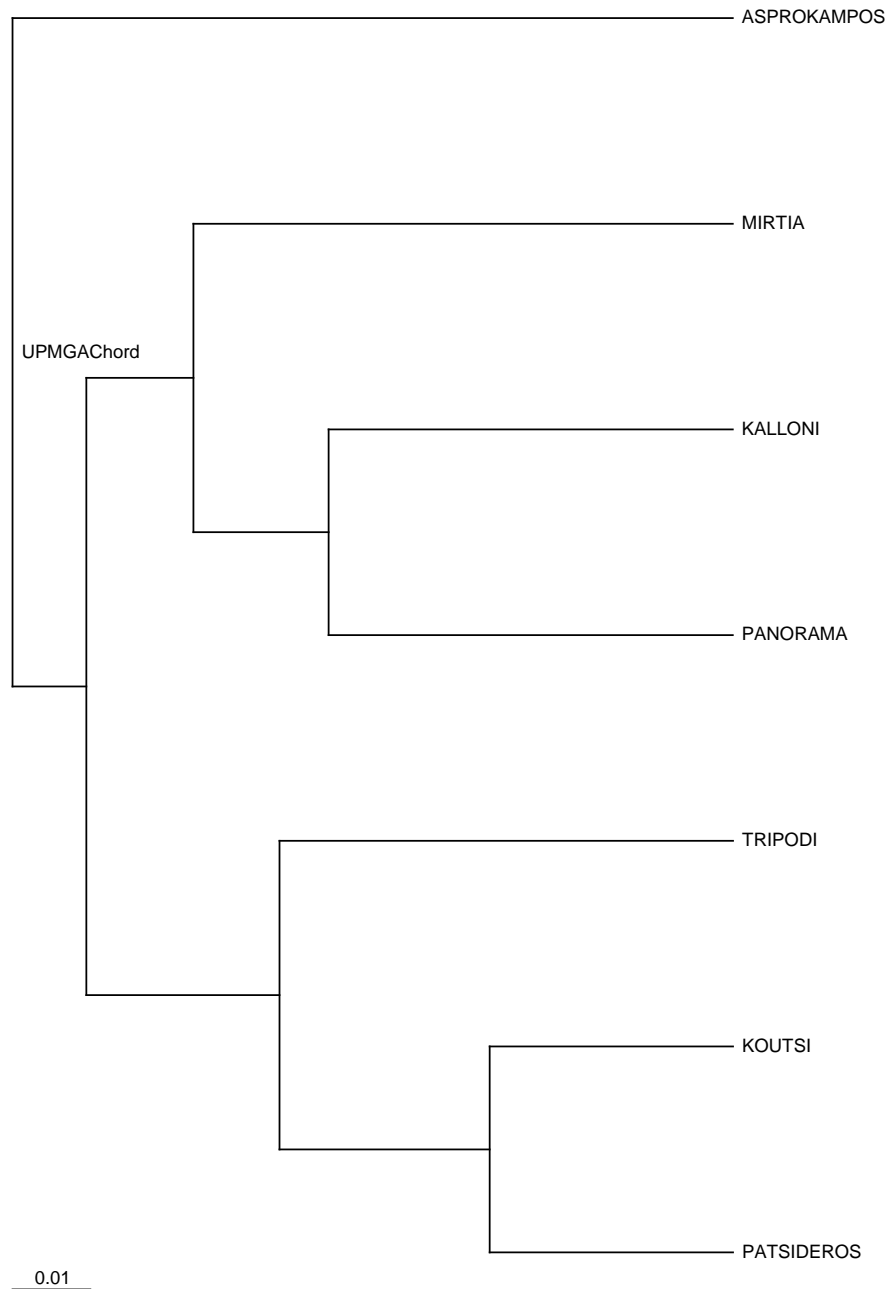
Εικόνα 38: Αποστάσεις πληθυσμών για *L. thermotolerans*, βασιζόμενες στις συχνότητες των αλληλομόρφων.

Για να δημιουργηθεί η μήτρα των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ένας Bayesian non-uniform prior among populations αλγόριθμος και για την κατασκευή του UPGMA δένδρου η απόσταση Dc.

Το δενδρόγραμμα που προκύπτει από την εφαρμογή των αποστάσεων Φst για το *L.thermotolerans* δείχνει τρεις κλάδους. Στον έναν και πιο απομονωμένο υπάρχει ο πληθυσμός του Ασπροκάμπου(και πιο κοντά με τον πληθυσμό του Ψαριού). Στην συνέχεια υπάρχει ένας κλάδος όπου ομαδοποιούνται το Ψάρι (πληθυσμός Νεμέας) με τους τέσσερις πληθυσμούς των Πεζών και σε μια τρίτη συστάδα ομαδοποιούνται οι τρεις πληθυσμοί της Νεμέας. Και εδώ παρατηρούμε ότι στο δένδρο οι πληθυσμοί της Νεμέας είναι δύο κύριοι οι οποίοι απέχουν αρκετά γενετικά ενώ σε ενδιάμεση θέση βρίσκονται οι πληθυσμοί των Πεζών. Στην κατάταξη βάσει Dc απόστασης, υπάρχει ακόμη καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών .Συγκεκριμένα ο πληθυσμός του Ασπροκάμπου μαζί με αυτόν από το Ψάρι δημιουργούν μια συστάδα. Σχετικά κοντά γενετικά είναι οι πληθυσμοί των Πεζών και ακολουθούν σε μεγαλύτερη απόσταση οι τρεις υπόλοιποι πληθυσμοί της Νεμέας.



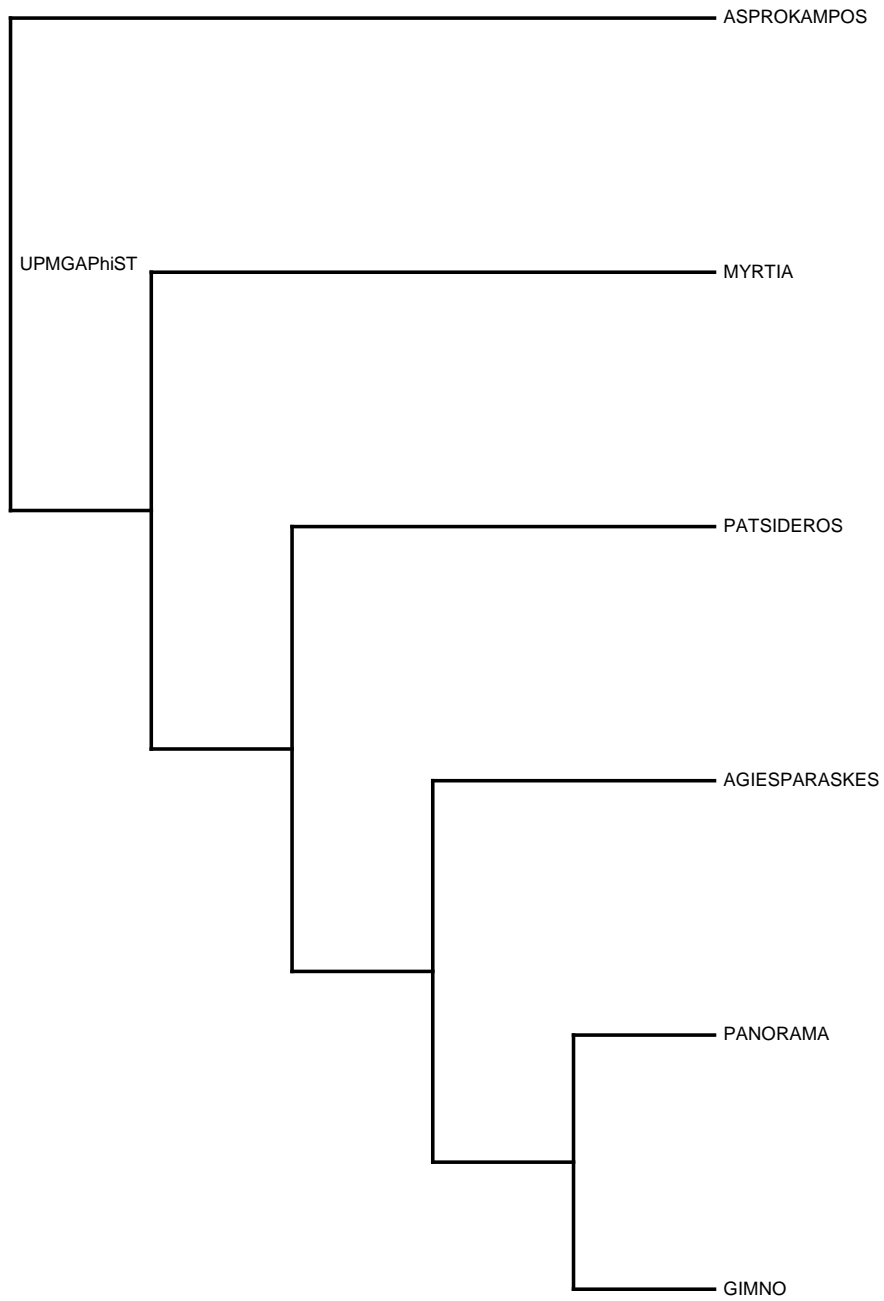
Εικόνα 39. UPGMA δένδρο με βάση τις F_{st} αποστάσεις μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών *I. orientalis*



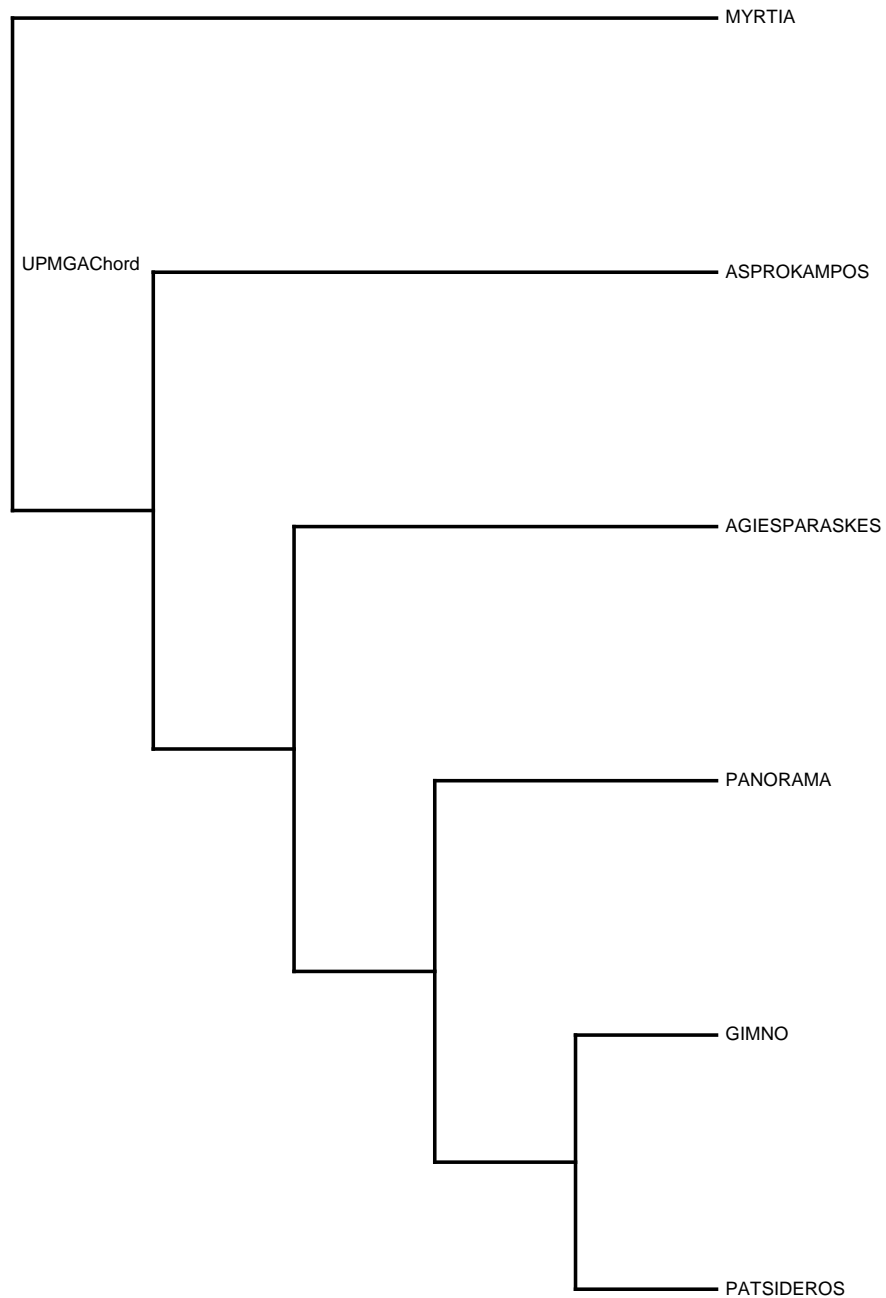
Εικόνα 40: Αποστάσεις πληθυσμών για *I.orientalis*, βασιζόμενες στις συχνότητες των αλληλομόρφων.

Για να δημιουργηθεί η μήτρα των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ένας Bayesian non-uniform prior among populations αλγόριθμος και για την κατασκευή του UPGMA δένδρου η απόσταση Dc.

Όσον αφορά την κατάταξη των πληθυσμών των αμπελώνων για το *I.orientalis* με βάση την απόσταση της χορδής, ο Ασπρόκαμπος είναι ο πιο απομακρυσμένος γενετικά πληθυσμός, ενώ οι πληθυσμοί των Πεζών ομαδοποιούνται όλοι μαζί εκτός από τον Πατσίδερο, ο οποίος ομαδοποιείται μαζί με τους πληθυσμούς της Νεμέας. Όταν η ίδια ανάλυση πραγματοποιείται με τις αποστάσεις F_{st} η Μυρτιά, περιοχή των Πεζών, ομαδοποιείται με τον Ασπρόκαμπο ενώ ο Πατσίδερος από τα Πεζά συνεχίζει να βρίσκεται στην ίδια ομάδα με τους πληθυσμούς της Νεμέας (Τριπόδι, Κούτσι).



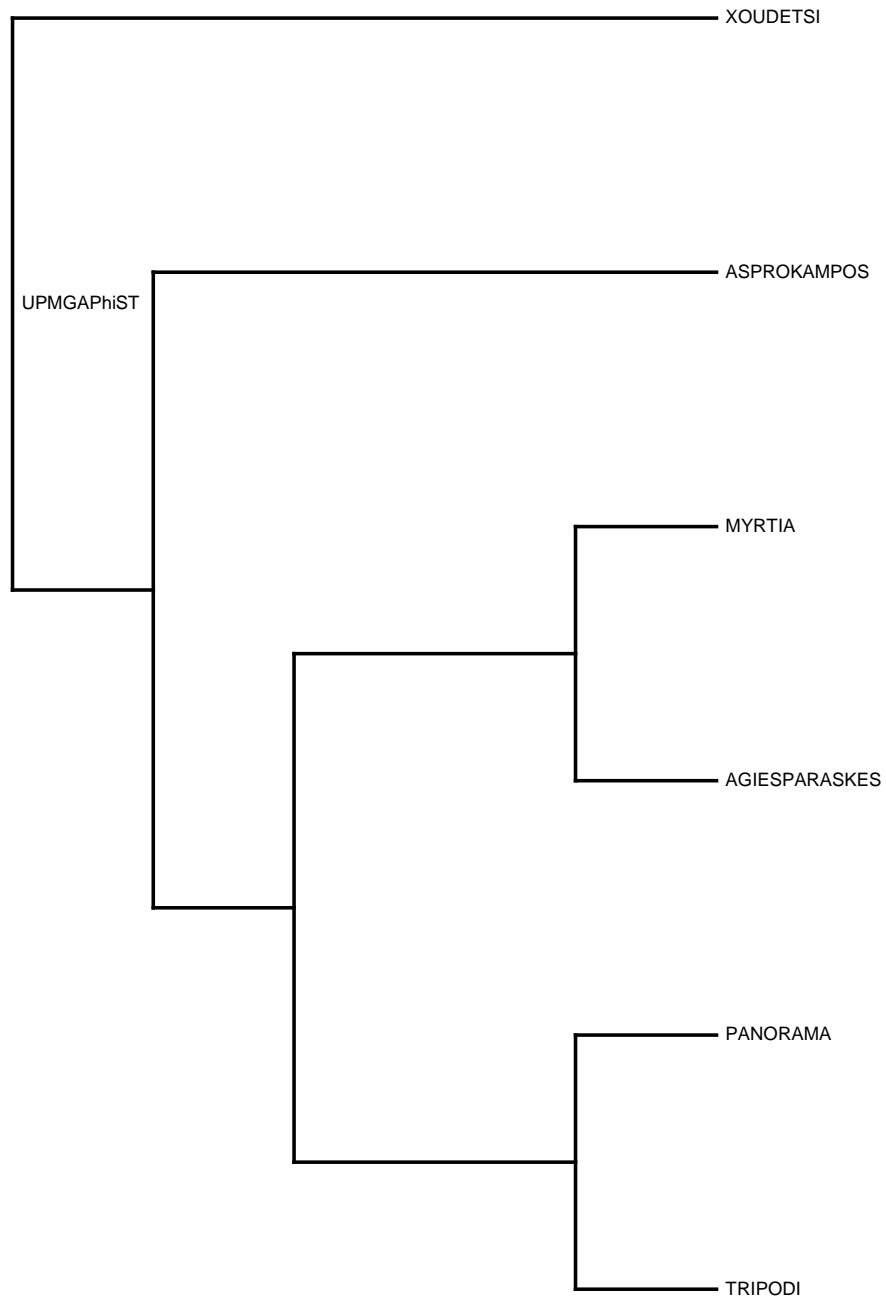
Εικόνα 41. UPGMA δένδρο με βάση τις Φst αποστάσεις μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών για *H. unarum*



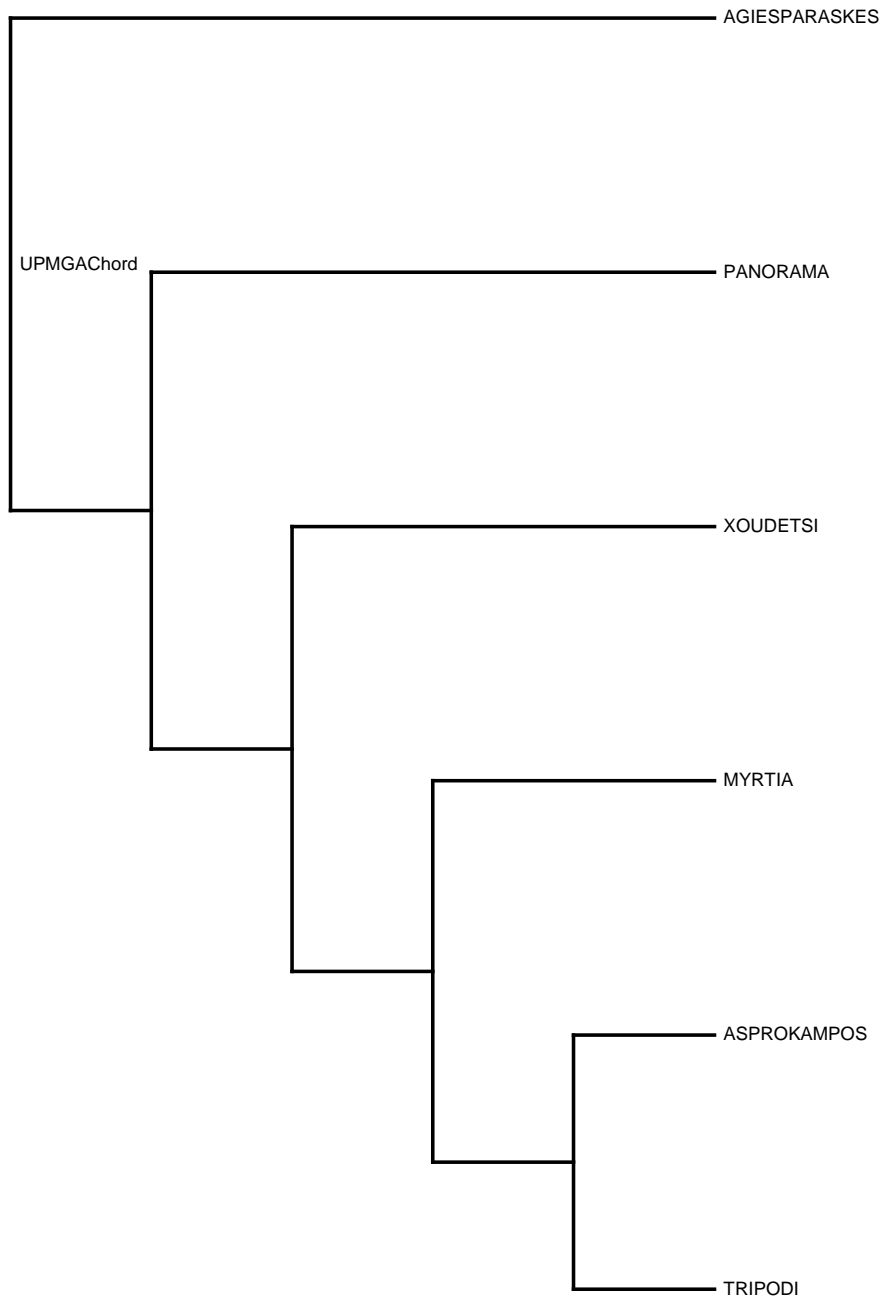
Εικόνα 42: Αποστάσεις πληθυσμών για *H.unarum*, βασιζόμενες στις συχνότητες των αλληλομόρφων.

Για να δημιουργηθεί η μήτρα των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ένας Bayesian non-uniform prior among populations αλγόριθμος και για την κατασκευή του UPGMA δένδρου η απόσταση Dc.

Όσον αφορά την ομαδοποίηση των πληθυσμών του *H.unarum* με τη απόσταση της χορδής, η Μυρτιά (Πεζά) βρέθηκε να είναι ο πιο απομακρυσμένος πληθυσμός αλλά πιο κοντά στον Ασπρόκαμπο (Νεμέα). Ο άλλος πληθυσμός της Νεμέας, το Γυμνό, ομαδοποιείται μαζί με τον Πασιίδερο από τα Πεζά. Παρόμοια αποτελέσματα λάβαμε και όταν έγινε ανάλυση με τις Φst αποστάσεις. Συγκεκριμένα πάλι οι πληθυσμοί Μυρτιά και Ασπρόκαμπος είναι κοντά, ενώ ο πληθυσμός του Γυμνού πάλι ομαδοποιείται μαζί με έναν πληθυσμό από τα Πεζά, αυτή τη φορά όμως με τον πληθυσμό του Πανοράματος.



Εικόνα 43 UPGMA δένδρο με βάση τις Φst αποστάσεις μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών για *M.pulcherimma*

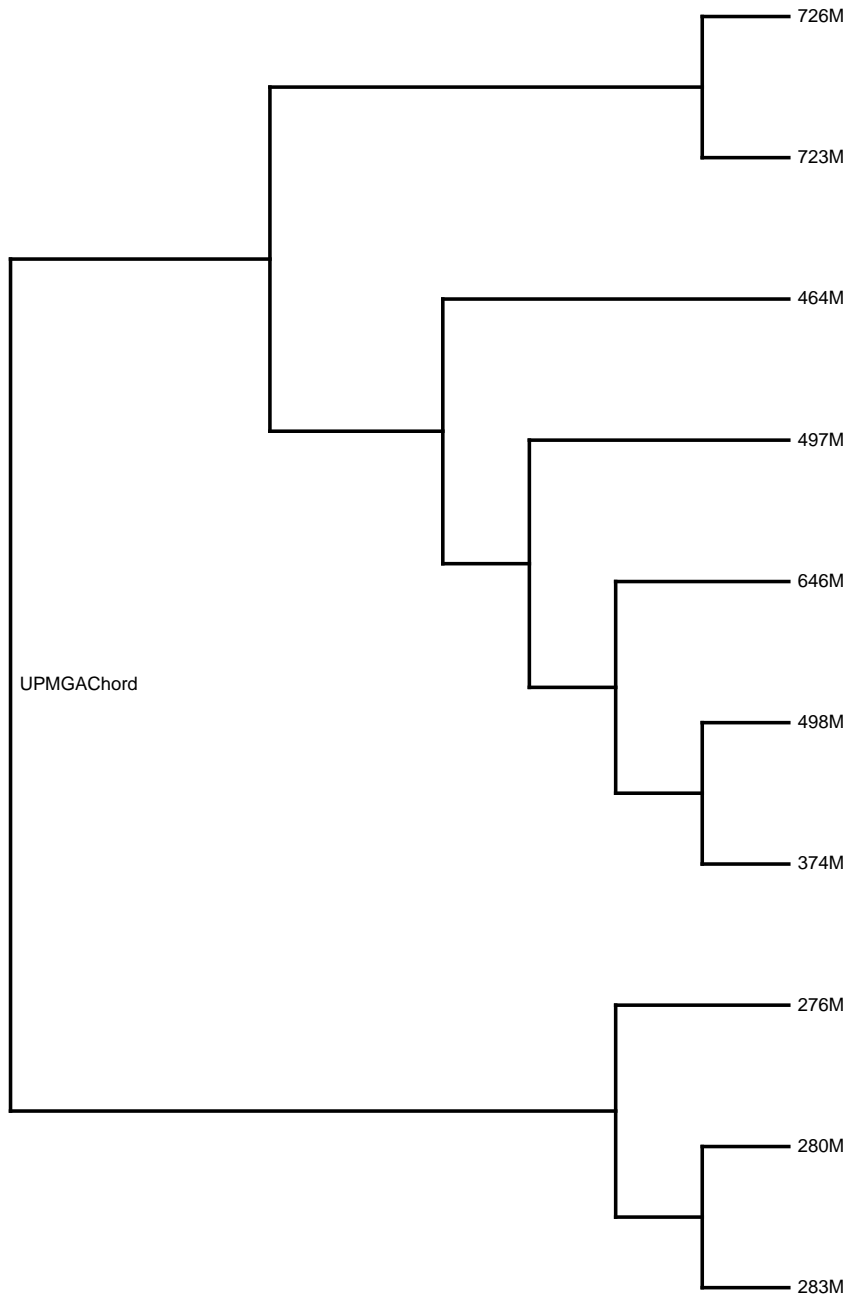


Εικόνα 44 : Αποστάσεις πληθυσμών για *M.pulcherimma*, βασιζόμενες στις συχνότητες των αλληλομόρφων.

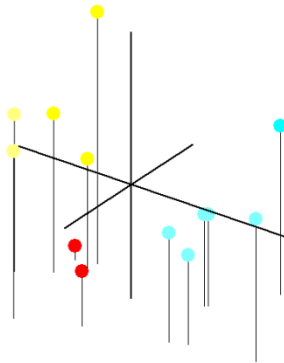
Για να δημιουργηθεί η μήτρα των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ένας Bayesian non-uniform prior among populations αλγόριθμος και για την κατασκευή του UPGMA δένδρου η απόσταση Dc.

Ως προς την γεωγραφική κατανομή ανά αμπελώνα για το *M.pulcherimma* παρατηρούμε ότι η απόσταση της χορδής προκαλεί καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ Νεμέας και Πεζών. Συγκεκριμένα η Νεμέα δημιουργεί μια συστάδα και από τα Πεζά ο πιο απομακρυσμένος πληθυσμός είναι αυτός στις Άγιες Παρασκιές. Ο πιο κοντινός γενετικά πληθυσμός των Πεζών στη Νεμέα είναι η Μυρτιά. Όταν η ίδια ανάλυση γίνεται με τις Φst αποστάσεις η εικόνα αλλάζει πολύ. Συγκεκριμένα το Χούδετσι από την περιοχή των Πεζών είναι ο πιο απομακρυσμένος γενετικά πληθυσμός. Στην ίδια συστάδα ανήκει και η Μυρτιά με τις Άγιες Παρασκιές, ενώ δεν υπάρχει μαζί ομαδοποίηση για τους δυο πληθυσμούς της Νεμέας.

Τέλος παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα για τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών στελεχών *L.thermotolerans* σε σχέση με το υψόμετρο.



Εικόνα 45. Δένδρο αποστάσεων με την μέθοδο της χορδής .Ως πληθυσμοί έχουν οριστεί τα άτομα *L.thermotolerans* που ανήκουν σε κάποιο συγκεκριμένο υψόμετρο.



Εικόνα 46. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών για τα όλα τα άτομα *L. thermotolerans*

Κόκκινο >700μετρα

Μπλε <300 μέτρα

Κίτρινο 300-700 μέτρα

Όπως φαίνεται από την (Εικόνα 45,94) έχει δημιουργηθεί ένα δέντρο γενετικών αποστάσεων με βάση την μέτρηση της χορδής για πληθυσμούς σύμφωνα με το υψόμετρο από το οποίο απομονώθηκαν ανεξάρτητα ποικιλίας σταφυλιού ή γεωγραφικής προέλευσης.

Στην (Εικόνα 46, 95) φαίνεται η ανάλυση PCoA για τα άτομα όπως διαχωρίζονται βάσει υψομέτρου.

Επίσης υπολογίστηκε με ανάλυση AMOVA η τιμή F_{st} καθώς και η γενετική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών και εντός αυτών για το *L. thermotolerans* βάσει υψομέτρου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον (

Πίνακας 21,96).

Πίνακας 21 παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών υψομέτρων για το *L.thermotolerans*

Παραλλακτικότητα Μεταξύ των πληθυσμών	Παραλλακτικότητα εντός των πληθυσμών	Τιμή Φst
62%	37,99%	0.62

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καταρχήν θα πρέπει να σημειωθεί ότι από το τέλος της ζύμωσης από συνολικά 49 δείγματα, από κάθε δείγμα απομονώθηκε τουλάχιστον ένα είδος *non-Saccharomyces* ζύμης (Πίνακας 6, 36, Πίνακας 7, 37). Σε κάποια δείγματα τα είδη μπορεί να ήταν και τρία, όπως στα δείγματα 26N-Ασπρόκαμπος, 16P-Πανόραμα, 27P-Χούδετσι, 38P-Καλλονή, 43P-Άγιες Παρασκιές. Επομένως παρατηρούμε μια πληθώρα ειδών και μια επιμονή αυτών των ειδών αγρίων ζυμών να παραμένουν έως το τέλος της ζύμωσης.

L.thermotolerans

Παρατηρούμε από (Εικόνα 13,49) ότι ο ένας από τους γονοτύπους του πληθυσμού του Τριποδίου είναι κοινός με έναν από τους γονοτύπους του Πατισίδερου. Θα ανέμενε κανείς λοιπόν στο δένδρο που έχει προκύψει από τις αποστάσεις των αμπελώνων αυτοί οι πληθυσμοί με μια πρώτη ματιά να μπουν στον ίδιο κλάδο. Παρόλα αυτά από (Εικόνα 37,82 και Εικόνα 38,83) παρατηρούμε ότι οι δύο πληθυσμοί είναι απομακρυσμένοι και εδώ φαίνεται η αξία της δημιουργίας μήτρας αποστάσεων είτε με την μέθοδο Φst (όπου έχει υπολογισθεί η τιμή αυτή μεταξύ όλων των ζευγών πληθυσμών που εξετάζονται) είτε με τη μέθοδο της χορδής όπου μετρώνται οι συχνότητες των αλληλομόρφων. Από τις ίδιες εικόνες εξάγουμε το συμπέρασμα ότι ο μοναδικός γονότυπος του Ασπροκάμπου είναι τόσο διαφορετικός από τους υπολοίπους γονοτύπους ώστε να τοποθετείται στα δένδρα πιο μακριά από κάθε άλλο αμπελώνα. Είναι χαρακτηριστική η τοπολογία του αμπελώνα του Ασπροκάμπου (βλ χάρτη Εικόνα 3,35), είναι δηλαδή αρκετά απομονωμένος γεωγραφικά και το πιο σημαντικό είναι ότι διαφέρει στο υψόμετρο μιας και βρίσκεται στα 726 μέτρα. Αν εξετάσει κανείς στο δένδρο Dc τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των αμπελώνων εντός μόνο της Νεμέας ή μόνο εντός των Πεζών παρατηρεί ότι αυτές οι αποστάσεις συσχετίζονται με τις γεωγραφικές αποστάσεις (χάρτες Εικόνα 2,34, Εικόνα 3,35). Δηλαδή όσον αφορά τη Νεμέα, ο Ασπρόκαμπος και το Ψάρι είναι πιο μακριά γεωγραφικά από τους

υπόλοιπους αμπελώνες (Εικόνα 3,35). Παρατηρούμε ότι ο Ασπρόκαμπος και το Ψάρι μπαίνουν στην ίδια συστάδα (Εικόνα 38,83). Στο χάρτη της Νεμέας φαίνεται αφενός ότι οι δύο αμπελώνες είναι κοντά και αφετέρου και ο αμπελώνας από το Ψάρι βρίσκεται σε παρόμοιο υψόμετρο 723 μέτρα, όταν οι υπόλοιποι αμπελώνες βρίσκονται σε υψόμετρα περίπου 270 μέτρων. Οι υπόλοιποι αμπελώνες της Νεμέας αν και έχουν μοναδικούς γονοτύπους παρόλα αυτά ομαδοποιούνται μαζί στο δένδρο των αποστάσεων. Παρόλα αυτά τα Καλύβια είναι πιο απομακρυσμένα γενετικά από το Τριπόδι και τον Έμπατο (Εικόνα 38,83). Αν εξετάσουμε και το χάρτη πράγματι αν και οι τρεις αμπελώνες βρίσκονται στην ίδια περιοχή πιο κοντά γεωγραφικά είναι το Τριπόδι με τον Έμπατο και τα Καλύβια απέχουν λίγο παραπάνω γεωγραφικά. Όσον αφορά τους αμπελώνες των Πεζών αυτοί έχουν γονοτύπους που επαναλαμβάνονται και σχηματίζουν και στα δένδρα αποστάσεων μια κοινή συστάδα. Εξάλλου από τον χάρτη των Πεζών (Εικόνα 2,34) φαίνεται ότι και γεωγραφικά οι τέσσερις αμπελώνες βρίσκονται κοντά. Όμως και πάλι φαίνεται να υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ γενετικής και γεωγραφικής απόστασης. Δηλαδή από το δένδρο Dc (Εικόνα 38,83) ο Πασιδέρος είναι ο πιο απομακρυσμένος αμπελώνας γενετικά, μετά σε μια ενδιάμεση θέση είναι το Πανόραμα και ακολουθούν το Χούδετσι και η Καλλονή που είναι ακόμη πιο κοντά γενετικά. Αν παρατηρήσουμε και τις γεωγραφικές αποστάσεις θεωρώντας ένα τρίγωνο ο Πασιδέρος είναι στην μια γωνία του τριγώνου πιο απομακρυσμένος, το Πανόραμα είναι στην άλλη γωνία πιο κοντά σχετικά με Χούδετσι και Καλλονή και αυτοί οι τελευταίοι αμπελώνες βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους. Όσον αφορά την διακριτική ικανότητα της μεθόδου Tandem Repeat-tRNA-PCR από τον δείκτη Simpson λαμβάνουμε την τιμή 0,85 η οποία από Simpson [50] θεωρείται αρκετά χαμηλή γιατί είναι κάτω από 0,9. Αν δούμε όμως την γενετική ποικιλομορφία μέσα στο είδος από τον δείκτη Shannon η τιμή είναι αρκετά υψηλή (Πίνακας 17,80). Εδώ θα πρέπει να σημειώσουμε ότι ο δείκτης Simpson βασίζεται στους διαφορετικούς γονοτύπους που υπάρχουν σε ένα δείγμα για να υπολογισθεί η ποικιλότητα, ενώ δείκτης Shannon βασίζεται στις συχνότητες των αλληλομόρφων και γενικά προτιμάται στις γενετικές μελέτες. Επομένως ακόμη και αν θεωρήσουμε ότι η μέθοδος Tandem Repeat-tRNA-PCR δεν έχει πάρα πολύ μεγάλη διακριτική ικανότητα στην παραγωγή

απόλυτων πολυμορφισμών, παρόλα αυτά έχει ένα πολύ μεγάλο πλεονέκτημα και αυτό είναι ότι διαχωρίζει τα στελέχη με βάση την γεωγραφική τους προέλευση. Αν συγκρίνουμε την ποικιλομορφία μεταξύ των δύο γεωγραφικών περιοχών Νεμέα και Πεζά οι δύο πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικά (Πίνακας 18,80). Το παραπάνω επιβεβαιώνεται και από την τιμή F_{st} (Πίνακας 19,81) αφού η ποικιλότητα αυτή κατανέμεται κυρίως μεταξύ των δύο πληθυσμών. Μάλιστα αν εξετάσουμε και τα δένδρα που έχουν προκύψει από τις μήτρες απόστασης μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών- αμπελώνων παρατηρούμε ότι αυτή η παραλλακτικότητα εκφράζεται και μεταξύ των αμπελώνων. Επομένως σαν συμπέρασμα, η Tandem Repeat-tRNA-PCR με εκκινητές ISSR-MB και TtRNA-Sc είναι μια εξαιρετικά δυναμική μέθοδος για τον διαχωρισμό στελεχών του είδους *L.thermotolerans* το οποίο απομονώνεται από μούστο, με βάση την γεωγραφική τους προέλευση.

L.orientalis

Από τις (Εικόνα 14,Εικόνα 15,50) παρατηρούμε πολλούς μοναδικούς γονοτύπους, με μόνο έναν κοινό γονότυπο μεταξύ Πεζών Νεμέας (Πατισίδερος 47P-Κούτσι 2N) και στα δένδρα πληθυσμών (Εικόνα 39,Εικόνα 40,86) οι δύο αμπελώνες ομαδοποιούνται μαζί. Από την Εικόνα 15,50 και από Πίνακας 11,56 βλέπουμε ότι υπάρχουν 32 ξεχωριστοί γονότυποι ενώ ο δείκτης Simpson είναι υψηλός πάνω από 0,9 (0,9528). Μάλιστα είναι χαρακτηριστικό ότι το Κούτσι έχει την μικρότερη βιοποικιλότητα (Πίνακας 11) κάτι που φαίνεται και από την Εικόνα 15. Από την τιμή του δείκτη Shannon (4,31) εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η γενετική ποικιλομορφία για αυτό το είδος είναι αρκετά μεγάλη. Αυτό δείχνει ότι η συχνότητα των αλληλομόρφων είναι ενδιάμεση. Αν για παράδειγμα ο πληθυσμός είχε υψηλά νούμερα σε συχνότητες αλληλομόρφων ο δείκτης θα έπρεπε να είναι χαμηλός. Αυτή η ποικιλομορφία ίσως αντικατοπτρίζεται και στον μεγάλο αριθμό μοναδικών γονοτύπων ο οποίος προκύπτει από τον μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών. Αν συνδυάσουμε τα παραπάνω και με τον δείκτη Simpson ο οποίος είναι πολύ κοντά στο 1, θα μπορούσαμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η μέθοδος ταυτοποίησης του *L.orientalis* με RAPD-PCR και συγκεκριμένα με τον εκκινητή R5 δίνει πολύ μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών, επομένως η μέθοδος αυτή PCR για το *L.orientalis* κρίνεται πολύ ικανοποιητική, στο να λάβουμε απόλυτους

πολυμορφισμούς και στο να διαχωριστούν τα στελέχη μεταξύ τους. Όμως αν πάμε σε επίπεδο πληθυσμών αν εξετάσουμε την τιμή του t-test για τον δείκτη Shannon παρατηρούμε ότι στην ουσία οι δύο πληθυσμοί Νεμέα – Πεζά δεν διαφέρουν στατιστικά (Πίνακας 18,80). Μάλιστα αυτό επιβεβαιώνεται και από την τιμή Φst η οποία δείχνει πως κατανέμεται αυτή η γενετική ποικιλομορφία μέσα και ανάμεσα στους πληθυσμούς. Η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα παρατηρείται εντός των πληθυσμών (Πίνακας 19,81). Δηλαδή η RAPD-PCR μέθοδος με εκκινητή R5 δίνει ένα στιβαρό αποτέλεσμα όσον αφορά των διαχωρισμό των στελεχών αλλά ως προς την κατανομή με βάση την γεωγραφική προέλευση δεν δίνει ξεκάθαρα αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον εκκινητή και την μέθοδο PCR που χρησιμοποιήθηκε. Είναι αξιοσημείωτο ότι εντός των δυο πληθυσμών παρατηρείται μεγάλη παραλλακτικότητα (79%) ενώ μεταξύ τους παρατηρείται μικρή παραλλακτικότητα. Όσον αφορά στο δένδρο Φst (Εικόνα 39,85) η Μυρτιά (Πεζά) με τον Ασπρόκαμπο (Νεμέα) μπαίνουν στην ίδια συστάδα. Πρόκειται δηλαδή για δύο αμπελώνες απομακρυσμένους γενετικά ο καθένας από τους υπολοίπους της περιοχής τους αλλά με κοινά στοιχεία μεταξύ τους. Αυτό είναι σε συμφωνία με την τοπολογία των δύο αμπελώνων στους χάρτες μιας και είναι και γεωγραφικά απομακρυσμένοι από τους άλλους αμπελώνες της ίδιας περιοχής. Και οι δύο αμπελώνες παρουσιάζουν μια μέτρια βιοποικιλότητα (Πίνακας 11). Ο Πασιίδερος (Πεζά) μπαίνει στην ίδια συστάδα με Κούτσι και Τριπόδι (Νεμέα). Μάλιστα αν εξετάσουμε την τιμή Φst η οποία ονομάζεται δείκτης καθήλωσης και περιγράφει την μείωση στην ετεροζύγωση λόγω επιλογής ή γενετικής τάσης (genetic drift) στις δύο περιοχές σε σχέση με ολόκληρο τον πληθυσμό, βλέπουμε ότι η τιμή αυτή είναι χαμηλή (0,208). Επομένως θα λέγαμε ότι η γενετική τάση δεν έχει μεγάλη επίδραση στους πληθυσμούς. Δηλαδή η τυχαία απώλεια αλληλομόρφων (αλλαγή στην συχνότητα τους) από γενιά σε γενιά είναι μικρή. Αυτό ίσως δικαιολογείται από το γεγονός ότι οι πληθυσμοί *I.orientalis* είναι αρκετά μεγάλοι επομένως μια τυχαία αλλαγή στον πληθυσμό έχει και μικρό αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά θα πρέπει να είμαστε εξαιρετικά προσεκτικοί στην εξαγωγή τέτοιων συμπερασμάτων μιας και υπάρχει ιδιαιτερότητα στο σχήμα δειγματοληψίας. Εδώ δηλαδή θα χρειαζόταν να γνωρίζουμε τον πληθυσμό (αριθμό και

σύνθεση) που έχει απομονωθεί απευθείας από τα σταφύλια και αντικατοπτρίζεται στα δείγματα της αρχής της ζύμωσης. Σαν τελικό συμπέρασμα θα λέγαμε ότι η RAPD-PCR με εκκινητή R5 δίνει μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό στελεχών *I.orientalis* από δείγματα μούστου.

H.uvarum

Αν και από τον (Πίνακας 14,57) προκύπτει ότι η συνολική βιοποικιλότητα για αυτό το είδος είναι στο 25% δηλαδή είναι σχετικά χαμηλή και δεν έχουν εμφανιστεί πολύ διαφορετικοί γονότυποι σε σχέση με τον συνολικό αριθμό στελεχών, παρόλα αυτά η τιμή του δείκτη Simpson από πίνακα 1 είναι πολύ υψηλή (0,95). Η τιμή Simpson με άλλα λόγια δείχνει ότι με τη μέθοδο ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκε υπάρχει 95% πιθανότητα δύο στελέχη στη σειρά να έχουν διαφορετικούς γονοτύπους. Έτσι λοιπόν παρόλο που δεν έχει παραχθεί μεγάλος αριθμός γονοτύπων παρόλα αυτά η μέθοδος PCR που εφαρμόστηκε είναι ικανή να διαχωρίσει σε ικανοποιητικό βαθμό τα στελέχη. Επίσης παρατηρούμε ότι η βιοποικιλότητα είναι μεγαλύτερη για τη Νεμέα (

Πίνακας 16,58) σε σχέση με τα Πεζά (

Πίνακας 15,58). Μάλιστα για τον αμπελώνα του Ασπροκάμπου όλοι οι γονότυποι είναι μοναδικοί και αυτός ο αμπελώνας παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα (

Πίνακας 12,56), ενώ την μικρότερη βιοποικιλότητα παρουσιάζει ένας αμπελώνας των Πεζών, η Μυρτιά. Μεταξύ Πεζών και Νεμέας υπάρχουν δύο κοινοί γονότυποι οι οποίοι βρίσκονται στους αμπελώνες Γυμνό και Άγιες Παρασκιές (Εικόνα 17,51). Από το συναινετικό δένδρο (Εικόνα 27,68)

παρατηρούμε ότι το δείγμα 7PL4 (δείγμα Μυρτιάς) είναι απομακρυσμένο ενώ τα άτομα της Νεμέας δημιουργούν μια συστάδα. Αν εξετάσουμε και τα δένδρα των αποστάσεων (Εικόνα 41, Εικόνα 42,89) παρατηρούμε ότι η Μυρτιά μπαίνει μόνη σε έναν απομακρυσμένο κλάδο, ακολουθεί ο Ασπρόκαμπος ενώ το Γυμνό μπαίνει στην ίδια συστάδα με τον Πασιδίερο. Παρατηρούμε δηλαδή όσον αφορά την Μυρτιά ότι το δείγμα 7PL4 έχει τέτοια σύνθεση αλληλομόρφων ώστε όλος ο πληθυσμός του αμπελώνα αυτού να είναι απομακρυσμένος γενετικά όπως φαίνεται από το δένδρο των αποστάσεων. Επίσης η μεγάλη βιοποικιλότητα του Ασπροκάμπου τον καθιστά απομονωμένο γενετικά. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι δύο παραπάνω αμπελώνες όπως φαίνεται στους χάρτες (**Error! Reference source not found.****Error! Reference source not found.**,35) είναι απομακρυσμένοι γεωγραφικά από όλους τους υπολοίπους κάθε περιοχής. Όσον αφορά το Γυμνό, αν και μοιράζεται δύο κοινούς γονοτύπους με τις Άγιες Παρασκιές παρόλα αυτά στο δένδρο αποστάσεων τοποθετείται στον ίδιο κλάδο με τον Πασιδίερο με τον οποίον μοιράζεται έναν κοινό γονότυπο. Αυτό συμβαίνει λόγω των άλλων μη κοινών γονοτύπων που προφανώς έχουν τέτοιες συχνότητες αλληλομόρφων ώστε στο δένδρο αποστάσεων να τοποθετούνται οι δύο αμπελώνες μαζί. Ο δείκτης Shannon από Πίνακας 17,80 έχει σχετικά μικρή τιμή δηλώνοντας μικρή γενετική ποικιλομορφία, σε συμφωνία με την χαμηλή τιμή της βιοποικιλότητας για το είδος αυτό. Πάντως αυτή η γενετική ποικιλομορφία είναι αρκετή για να διαχωριστούν οι δύο πληθυσμοί όπως φαίνεται από το t-test (Πίνακας 18,80), ο οποίος δείχνει ότι οι δύο πληθυσμοί Νεμέα και Πεζά διαφέρουν στατιστικά, αν και η γενετική διαφοροποίηση με μέτρο την τιμή F_{st} δείχνει ότι η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα βρίσκεται εντός των πληθυσμών Νεμέας-Πεζών παρά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς (Πίνακας 19,81). Σαν συμπέρασμα θα λέγαμε ότι η μέθοδος RAPD-PCR με εκκινήτη τον GTG3 δίνει αρκετά καλά αποτελέσματα για το είδος *H.uvarum*, δίνοντας έναν ικανό αριθμό πολυμορφισμών ώστε οι δύο μεγάλοι πληθυσμοί Νεμέα και Πεζά να διαχωριστούν στατιστικά.

M.pulcherimma

Το είδος αυτό έχει μια πολύ υψηλή τιμή δείκτη Simpson (Πίνακας 9,48) πολύ κοντά στην μονάδα, επομένως η μέθοδος ταυτοποίησης έχει υψηλή διακριτική

ικανότητα. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στον μεγάλο αριθμό μοναδικών γονοτύπων που έχουν προκύψει και στην υψηλή βιοποικιλότητα που παρατηρείται 69% (Πίνακας 14,57). Είναι χαρακτηριστικό δε ότι όλοι οι γονότυποι που έχουν προκύψει είναι μοναδικοί (Εικόνα 18, Εικόνα 19,52). Όσον αφορά την γενετική ποικιλομορφία όπως αυτή εκφράζεται από την τιμή του δείκτη Shannon, είναι υψηλή (Πίνακας 17,80) γεγονός που δείχνει ότι η συχνότητα των αλληλομόρφων είναι μεσαία και μάλιστα ο συνδυασμός των αλληλομόρφων είναι τέτοιος ώστε να δίνει ένα πλήθος μοναδικών γονοτύπων με πολλούς πολυμορφισμούς. Αυτοί οι πολυμορφισμοί δίνουν μια τέτοια γενετική ποικιλότητα, ώστε να διαφέρουν στατιστικά οι δύο πληθυσμοί Νεμέα και Πεζά (Πίνακας 18,80). Βέβαια η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα παρατηρείται εντός των δύο πληθυσμών και όχι ανάμεσα σε αυτούς (Πίνακας 19,81). Όσον αφορά τον διαχωρισμό μεταξύ των ατόμων όπως φαίνεται στο συναινετικό δένδρο (Εικόνα 30,71), τα άτομα της Νεμέας μπαίνουν σε μια συστάδα αλλά στον ίδιο κλάδο με τα Πεζά. Ακολούθως, στο δένδρο των αποστάσεων με την μέθοδο της χορδής (Εικόνα 44,92) οι δυο αμπελώνες της Νεμέας ομαδοποιούνται μαζί. Ο πιο απομακρυσμένος πληθυσμός είναι οι Άγιες Παρασκίες σε αυτό το δένδρο, ένας πληθυσμός με υψηλή βιοποικιλότητα (

Πίνακας 13,57). Σαν συμπέρασμα, η μέθοδος Tandem Repeat tRNA-PCR με εκκινήτες τους ISSR-MB και TtRNA-Sc δίνει έναν μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών με απόλυτο διαχωρισμό των στελεχών και μάλιστα με ικανότητα διαχωρισμού των πληθυσμών βάσει γεωγραφικής προέλευσης (Νεμέα/Πεζά) όταν ακολουθείται η μέθοδος της χορδής. Αυτό που θα χρειαζόταν για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα θα ήταν άλλη μια δειγματοληψία, τέτοια ώστε να απομονωθεί μεγαλύτερος αριθμός ατόμων και πληθυσμών *M.pulcherimma*

Όσον αφορά τα στελέχη των υπολοίπων ειδών αγρίων ζυμών (*P.anomala*, *H.guillermondii*, *H.pseudoburtonii*, *M.caribica*, *H.osmophila*, *T.delbrueckii*) το γεγονός ότι είχαν απομονωθεί σε πολύ μικρό αριθμό από το τέλος της ζύμωσης και είτε μόνο από Νεμέα (*H.guillermondii*, *H.pseudoburtonii*, *T.delbrueckii*, *P.osmophila*) ή από Πεζά (*P.anomala*, *M.caribica*) δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε ασφαλή αποτελέσματα. Ίσως η παρουσία μόνο στην

μια περιοχή και όχι στην άλλη να σχετίζεται με την γεωγραφική προέλευση του κρασιού ή την ποικιλία αλλά χρειάζονται και άλλες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Επίσης αν θέλουμε να αξιολογήσουμε την εφαρμογή κάποιας μοριακής μεθόδου στα παραπάνω είδη, θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε δείγματα από την αρχή της ζύμωσης υποθέτοντας ότι οι πληθυσμοί των παραπάνω ειδών σε εκείνη την φάση είναι μεγαλύτεροι.

Συμπεράσματα

Ως προς τα δενδρογράμματα των ατόμων

Τον καλύτερο διαχωρισμό έχουν τα *L.thermotolerans* αφού σχηματίζονται τρεις διακριτοί κλάδοι και τα δείγματα από τα Πεζά είναι διαχωρισμένα εντελώς από τα δείγματα της Νεμέας. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από την τιμή Φst μετά την ανάλυση AMOVA.

Η ίδια μέθοδος PCR χρησιμοποιήθηκε και για το *M.pulcherimma*. Και εδώ υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ Πεζών-Νεμέας.

Για το *I.orientalis*, ο διαχωρισμός μεταξύ Νεμέας και Πεζών δεν είναι εντελώς ξεκάθαρος σε επίπεδο ατόμων παρόλο αυτά τα περισσότερα δείγματα της Νεμέας ομαδοποιούνται σε μια συστάδα, μαζί με κάποια δείγματα των Πεζών.

Ο διαχωρισμός σε επίπεδο ατόμων για το *H.uvarum* είναι καλός αφού η Νεμέα δημιουργεί μια ξεχωριστή συστάδα. Και πάλι σε αυτή την περίπτωση τα διάφορα δείγματα των Πεζών έχουν αρκετές διαφορές μεταξύ τους και κάποια κοινά γενετικά στοιχεία με τη Νεμέα.

Γενετική απόσταση

Τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των δύο ευρύτερων περιοχών μελέτης δηλαδή Νεμέα και Πεζά σε επίπεδο πληθυσμών-αμπελώνων παρατηρούμε για το *L.thermotolerans* χρησιμοποιώντας την απόσταση Dc.

Ακολουθεί το *M.pulcherimma* με πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ πληθυσμών Νεμέας και Πεζών χρησιμοποιώντας τον δείκτη Dc.

Φαίνεται πως για το *I.orientalis* καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των πληθυσμών σε επίπεδο αμπελώνων δίνει η μέθοδος μέτρησης των αποστάσεων Φst.

Για το *H.uvarum* και οι δύο μέθοδοι δίνουν κάποιες ενδείξεις για τον γεωγραφικό διαχωρισμό των πληθυσμών-αμπελώνων.

Ως προς την τοποθέτηση κάθε πληθυσμού στο δένδρογράμμα φαίνεται πως

Ο πληθυσμός του Ασπροκάμπου είναι ο πλέον απομονωμένος, τοποθετείται είτε μόνος του είτε κοντά με τον πληθυσμό του Ψαριού ή του Τριποδίου και ως προς την σχέση αυτού του πληθυσμού με τα Πεζά είναι πιο κοντά με τον πληθυσμό της Μυρτιάς.

Σε κάθε περίπτωση οι πληθυσμοί της Νεμέας κυκλώνουν τους πληθυσμούς των Πεζών. Δηλαδή εξάγουμε το συμπέρασμα πως υπάρχουν δυο ξεχωριστοί πληθυσμοί στην Νεμέα αρκετά απομονωμένοι μεταξύ τους αλλά και οι δύο με κοινά γενετικά στοιχεία με τα Πεζά.

Αξιολόγηση των δύο μεθόδων PCR

Όσον αφορά τις δύο μεθόδους ταυτοποίησης πράγματι αν και η RAPD-PCR μπορεί να δίνει πολυμορφισμούς που οφείλονται σε σημειακές μεταλλαγές [28], σε σχέση με την Tandem Repeat tRNA-PCR είναι λιγότερο εξειδικευμένη αφού οι εκκινητές συνδέονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία (<40°C) με την μήτρα[28]. Αντίθετα η Tandem Repeat tRNA-PCR εκμεταλλεύεται δύο περιοχές του DNA, μια περιοχή μικροδορυφόρου και ταυτόχρονα μια περιοχή tRNA γονιδίου, για να ενισχύσει την μεταξύ τους περιοχή. Αυτό που δεν γνωρίζουμε με την Tandem Repeat tRNA-PCR είναι πότε δεν λαμβάνουμε προϊόν. Υπάρχουν διάφορες περιπτώσεις. Μια είναι οι περιοχές SSR και tRNA να μην είναι αρκετά κοντά. Η άλλη περίπτωση είναι να διαφέρουν οι SSR περιοχές ανάμεσα στα στελέχη. Δηλαδή αν έχει χρησιμοποιηθεί ο εκκινητής ISSR-MB με ακολουθία CTCACAACAACAACAACA, αν σε κάποιο στέλεχος απουσιάζει αυτή η SSR ή υπάρχει κάποια άλλη επαναλαμβανόμενη ακολουθία, δεν θα πάρουμε προϊόν. Η μέθοδος αυτή κατάφερε στο είδος *L.thermotolerans* να διαχωρίσει τα στελέχη με βάση την γεωγραφική τους προέλευση. Γνωρίζουμε ότι τα tRNA γονίδια στο συγκεκριμένο είδος είναι 229 και βρίσκονται και στα οκτώ χρωμοσώματα του οργανισμού αυτού [57]. Επομένως και χωρίς περαιτέρω γνώση του γονιδιώματος του *L.thermotolerans* μπορούν να ενισχύονται οι περιοχές μεταξύ SSR και tRNA. Η Barquet [44] χρησιμοποιώντας μόνο τον εκκινητή TtRNA-Sc δεν έλαβε προϊόν. Επομένως τα γονίδια αυτά δεν βρίσκονται αρκετά κοντά ώστε να δώσουν προϊόν. Επίσης και ο ISSR-MB όταν χρησιμοποιήθηκε μόνος του δεν έδωσε προϊόν. Επειδή ακριβώς ο αριθμός των tRNA στο *L.thermotolerans* είναι μεγάλος και επειδή η συγκεκριμένη SSR περιοχή μπορεί να είναι κοινή μέσα στο γονιδίωμα του *L.thermotolerans*, υπάρχουν πολλές πιθανότητες οι δύο αυτές περιοχές να είναι αρκετά κοντά ώστε να παράγουν προϊόν. Τόσο από τα αποτελέσματα της Barquet όσο και τα δικά μας κάτι τέτοιο συμβαίνει αρκετές φορές μέσα στο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα λάβαμε 23 πολυμορφικές ζώνες DNA (Εικόνα 10,Εικόνα 11,47), οι οποίες αντικατοπτρίζονται σε 23 θέσεις (loci) στο γονιδίωμα. Επίσης υπάρχουν άλλες πέντε θέσεις οι οποίες επαναλαμβάνονται σε όλα τα στελέχη (fixed). Αναμένει κανείς για τις

πολυμορφικές θέσεις να διαφέρουν σε μήκος όπως αυτό αποτυπώνεται από τις διαφορετικές τους θέσεις πάνω στο πήκτωμα. Είναι χαρακτηριστικό ότι για τα δείγματα από τα Πεζά υπάρχει μια ζώνη DNA (b19) που εμφανίζεται μόνο σε αυτά και σε κανένα από τα δείγματα της Νεμέας. Ταυτόχρονα οι b1 και b14 εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα της Νεμέας εκτός από τα δείγματα 22N(Ψάρι) και σε κανένα των Πεζών. Οι b20 και b21 εμφανίζονται μόνο στα δείγματα της Νεμέας εκτός από τα 22N(Ψάρι) και 25N(Ασπρόκαμπος). Η b13 εμφανίζεται μόνο στα δείγματα 25N(Ασπρόκαμπος) και σε κανένα άλλο. Οι b18 και b23 εμφανίζονται στα δείγματα 22N(Ψάρι) και 25N(Ασπρόκαμπος) και πουθενά αλλού. Από τα δένδρογράμματα των πληθυσμών ο αμπελώνας Ασπρόκαμπος τοποθετείται μακριά από τους υπόλοιπους πληθυσμούς της Νεμέας εκτός από αυτούς του αμπελώνα Ψάρι. Έτσι παρατηρούνται κάποιες ομαδοποιήσεις βάσει της γεωγραφικής προέλευσης. Οι διαφορές αυτές είναι προκύπτουν από πολυμορφισμούς των ενισχυόμενων τμημάτων μεταξύ SSR και tRNA γονιδίων. Το πολύ ενδιαφέρον θα ήταν να παρατηρούσαμε πως διαφέρουν αυτές οι περιοχές στις ακολουθίες τους, για τις οποίες γνωρίζουμε μόνο το μέγεθος. Για παράδειγμα θα μπορούσαν να αφαιρεθούν από το πήκτωμα και να γίνει sequencing, ώστε να γίνει σύγκριση των ακολουθιών αυτών με την ακολουθία του γονιδιώματος του *L.thermotolerans* το οποίο έχει πλήρως αναλυθεί [57].

Επίσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι ISSR εκκινητές και για τα άλλα είδη ζυμών με διαφορετικά επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Έχει βρεθεί για το *L.thermotolerans* ότι έχει μεγάλο ποσοστό σε GC περιεχόμενο [57], οπότε θα φαινόταν λογικό να δοκιμαστεί και εκκινητής με μοτίβα (GC)_n είτε με την μέθοδο Tandem Repeat tRNA-PCR ή ακόμη και με την μέθοδο ISSR-PCR, παρά τα αποθαρρυντικά αποτελέσματα που έλαβε η Barquet [44] όταν χρησιμοποίησε την τελευταία αυτή μέθοδο. Αυτή η πρόταση στηρίζεται στα ευρήματα για την καταλληλότητα της μεθόδου για φυλογεωγραφικές αναλύσεις και την μεγάλη διακριτική δύναμη της όπως έχει δειχθεί σε μελέτες για άλλα είδη οργανισμών.

Τέλος ενώ η RAPD-PCR είναι μια μέθοδος κατάλληλη για διαχωρισμό στελεχών και αναλύσεις πληθυσμών το γεγονός ότι παράγει μη διατεταγμένα δεδομένα καθιστά την μέθοδο ακατάλληλη για φυλογεωγραφικές αναλύσεις, μιας και παράγει απόλυτους πολυμορφισμούς [49].

Όσον αφορά όμως την μέθοδο Tandem Repeat tRNA-PCR και κατά το πόσο αυτή η μέθοδος είναι δόκιμο να χρησιμοποιηθεί σε φυλογεωγραφικές μελέτες, προηγούμενα αποτελέσματα στο είδος *Aspergillus terreus* χρησιμοποιώντας ISSR-PCR έδειξαν έναν ισχυρό ενδημισμό στην παγκόσμια διασπορά απομονωμένων στελεχών [58] εκεί όπου η RAPD-PCR δεν κατάφερε να συνδέσει τα στελέχη με συγκεκριμένα ενδιαιτήματα. Οι Neal et al [58] προσπάθησαν τις διαφορές στη γεωγραφική κατανομή να τις συνδέσουν και με έναν δείκτη φυσιολογίας και συγκεκριμένα με την αντίσταση σε αντιμυκητιασικό παράγοντα και βρήκαν διαφορές στην τιμή του ανάλογα με την γεωγραφική κατανομή.

Σε μια εξαιρετικά εκτεταμένη μελέτη οι Li et al [59] με χρήση συνδυασμού 12 ISSR εκκινητών είχαν πλήρη διαχωρισμό δύο ειδών *Croomia* και των υποπληθυσμών αυτών βάσει γεωγραφικής προέλευσης, με την γενετική διαφοροποίηση στο μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των πληθυσμών. Οι Gaitanis et al [60] χρησιμοποιώντας τον εκκινητή M13 κατάφεραν να διαχωρίσουν στελέχη της ζύμης *Malassezia furfur* βάσει της γεωγραφικής προέλευσης των ξενιστών (άνθρωποι). Οι Graves et al [61] χρησιμοποιώντας ISSR δείκτες κατάφεραν να δείξουν γενετική απομόνωση μεταξύ τεσσάρων πληθυσμών του είδους *D.occidentalis*. Επομένως η ISSR-PCR έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και είναι κατάλληλη για φυλογεωγραφικές μελέτες.

Κρίνοντας από τα αποτελέσματα μας για το *L.thermotolerans* για το οποίο καταφέραμε να διαχωρίσουμε τους πληθυσμούς βάσει τις γεωγραφικής τους προέλευσης με μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών από ότι εντός των πληθυσμών, και ταυτόχρονα από τα αποτελέσματα για το *M.pulcherimma* για το οποίο πετύχαμε διαχωρισμό βάσει γεωγραφικής προέλευσης επίσης, θα μπορούσαμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι έχουμε ισχυρές ενδείξεις ότι η μέθοδος PCR που χρησιμοποιήθηκε Tandem Repeat tRNA-PCR είναι μια μέθοδος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την

φυλογεωγραφική ανάλυση των δύο παραπάνω ειδών ζυμών του κρασιού. Καταφέραμε δηλαδή να συνδέσουμε τα στελέχη με το ενδιαίτημα κάθε είδους. Από εκεί και πέρα για τα υπόλοιπα είδη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άλλοι εκκινητές με την ίδια μέθοδο.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πληθυσμοί των άγριων ζυμών που μελετήσαμε προέρχονται από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα [23] και δείχνουν ότι πληθυσμοί non-*Saccharomyces* ζυμών επιμένουν ως το τέλος της ζύμωσης, γεγονός με σημαντική φυσιολογική σημασία. Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τμήμα του αρχικού πληθυσμού που απομονώθηκε από τα σταφύλια, έχει χαθεί λόγω διαφόρων παραγόντων όπως αλληλεπιδράσεις με άλλους πληθυσμούς, μη αντοχή στην αιθανόλη κτλ. Αν υποθέσουμε ότι έχουμε καταφέρει να λάβουμε ένα τμήμα του αρχικού πληθυσμού σίγουρα αυτό το τμήμα του πληθυσμού έχει σημαντική φυσιολογική λειτουργία ως προς την ζύμωση του μούστου. Επομένως η αποτελεσματικότητα της μεθόδου Tandem Repeat tRNA-PCR όσον αφορά τα στελέχη πρωτίστως του *L.thermotolerans* και στη συνέχεια και του *M.pulcherimma* έχει διάφορες διαστάσεις. Αφενός έχει διακριτική ικανότητα σαν μέθοδος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για φυλογεωγραφικές αναλύσεις και τέλος συνδέει την φυσιολογική δραστηριότητα με την γεωγραφική προέλευση. Όσον αφορά τις ζύμες του κρασιού, η Barquet με Tandem Repeat tRNA-PCR κατάφερε να διαχωρίσει τα στελέχη βάσει φυσιολογικής λειτουργίας (δράση β-γλυκοσιδάσης) [44]. Φυσικά και ο φυσιολογικός ρόλος κυρίως του *L.thermotolerans* που προέρχεται από τις γεωγραφικές περιοχές που μελετήθηκαν χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Επίσης θα ήταν χρήσιμο να μελετηθούν και οι αρχικοί πληθυσμοί του είδους αυτού οι οποίοι απομονώνονται από την επιφάνεια των σταφυλιών και θα μπορούσαν ακόμη να γίνουν δειγματοληψίες από τις ίδιες περιοχές (Νεμέα Πεζά) σε μεγαλύτερο εύρος καθώς και από άλλες περιοχές της Ελλάδας.

Στην πολύ καλά σχεδιασμένη μελέτη τους οι Gayevskiy et al [62] έδειξαν ότι υπάρχει στατιστική διαφορά στην σύνθεση των κοινωμιών των ειδών ζυμών

που απομονώνονται από διάφορους αμπελώνες στην Νέα Ζηλανδία ως προς την ποικιλία του σταφυλιού. Όσον αφορά στελέχη *S.cerevisiae* που είχαν απομονωθεί από ζυμώσεις μούστου σταφυλιών που προέρχονταν από τους ίδιους αμπελώνες, στατιστικά σημαντικές διαφορές προέκυπταν όταν συγκρίνονταν οι περιοχές γεωγραφικά αλλά όχι όταν συγκρίνονταν οι πληθυσμοί βάσει της ποικιλίας του σταφυλιού. Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, οι συγγραφείς δίνουν ενδείξεις για την λεγόμενη ύπαρξη του terroir. Η έννοια του terroir εκφράζει την φυσική σχέση μεταξύ της μοναδικότητας κάθε κρασιού με ένα πλήθος παραγόντων, όπως οι κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες. Υπάρχουν ενδείξεις λοιπόν πως οι ζύμες *S.cerevisiae* στο [62] και οι λεγόμενες άγριες ζύμες (παρούσα εργασία) σχετίζονται με την δημιουργία του terroir. Μια άλλη παράμετρος που μπορεί να συμμετέχει στην δημιουργία της έννοιας του terroir είναι το υψόμετρο. Στην μελέτη τους οι Adami et al [63] έχουν μετρήσει τις τιμές δO^{18} του νερού του κρασιού, μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για την εύρεση της γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων και οι συγγραφείς βρήκαν υψηλή συσχέτιση μεταξύ του υψομέτρου και των τιμών του δO^{18} του νερού του κρασιού ανάλογα με τις περιοχές. Συγκεκριμένα οι πιο χαμηλές τιμές στην δO^{18} του νερού του κρασιού βρίσκονται στα υψηλότερα υψόμετρα ανεξαρτήτως της ποικιλίας του σταφυλιού. Επίσης οι King et al [64] σε μια συγκριτική μελέτη για το κρασί Malbec μεταξύ Αργεντινής και Αμερικής έδειξαν ότι το υψόμετρο είναι ο κυριότερος παράγοντας που διαχωρίζει τις δύο χώρες γεωγραφικά και η συγκεκριμένη παράμετρος δείχνει θετική συσχέτιση με την τιτλοδοσίσιμη οξύτητα, την αιθανόλη, την πτητική οξύτητα και διάφορες πτητικές αρωματικές ουσίες. Βρήκαν επίσης αρνητική συσχέτιση με το PH. Αν και οι ερευνητές εξήγησαν την αύξηση στην αιθανόλη και στην πτητική οξύτητα με μεγαλύτερη περίοδο ωρίμανσης των σταφυλιών δεν μπόρεσαν να εξηγήσουν για ποιο λόγο υπάρχει υψηλότερη οξύτητα στα κρασιά αυτά. Τέλος σε κρασιά που προέρχονταν από υψόμετρα μεγαλύτερα των 1200m βρήκαν υψηλά επίπεδα σακχάρων. Οι Chiotta et al [65] βρήκαν συσχέτιση μεταξύ ειδών *Aspergillus*, υπεύθυνων για την παραγωγή ωχρατοξίνης στο κρασί με το γεωγραφικό μήκος, πλάτος και υψόμετρο. Όσον αφορά τα αποτελέσματα για το *L.thermotolerans* σχετικά με το υψόμετρο, είναι ανάγκη να γίνουν και

άλλες δειγματοληψίες. Αυτό ισχύει κυρίως για την Νεμέα όπου στο ανάγλυφο της περιοχής παρατηρούνται διάφορα υψόμετρα και μάλιστα έχει διαχωριστεί η περιοχή σε τρεις οινοποιητικές ζώνες ανάλογα με το υψόμετρο, την πεδινή γύρω από τις πόλεις τις Νεμέας και της Αρχαίας Νεμέας (260-350m), την ημιορεινή (350-600m) και την ορεινή στους πρόποδες της Κυλλήνης (600-800m). Σε γενικές γραμμές αυτός είναι ο διαχωρισμός που λάβαμε για το *L.thermotolerans* ανεξαρτήτως όμως γεωγραφικής προέλευσης. Χρειάζεται να γίνουν και άλλες δειγματοληψίες εντός της Νεμέας ή και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας με εύρος υψομετρικό ώστε είτε να απορριφθούν οι ενδείξεις ότι υπάρχει συσχέτιση του υψομέτρου με το είδος αυτό είτε να επιβεβαιωθεί κάτι που θα σήμαινε ότι υπάρχει συσχέτιση του υψομέτρου-αμπελουργικής υποζώνης με το γενετικό προφίλ των στελεχών . Θα μπορούσε τελικά, αν τα αποτελέσματα επιβεβαιωθούν, το *L.thermotolerans* να αποτελέσει έναν δείκτη γεωγραφικής και υψομετρικής προέλευσης του ελληνικού κρασιού, γεγονός που θα ενίσχυε την έννοια του terroir. Για αυτό το λόγο θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον να συγκριθούν ελληνικά στελέχη του είδους αυτού με στελέχη από άλλες χώρες ώστε να φανεί αν υπάρχει δυνατότητα γενικότερης προέκτασης των υποθέσεων που έγιναν παραπάνω.

Από όσο γνωρίζουμε με την παρούσα εργασία συνδέονται για πρώτη φορά στελέχη αγρίων ζυμών που μετέχουν στην οινοποίηση με την γεωγραφική τους προέλευση με τη χρήση γενετικών δεικτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Ciani, F. Comitini, I. Mannazzu, and P. Domizio, "Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking.," *FEMS Yeast Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 123–33, Mar. 2010.
- [2] G. H. Fleet, "Wine yeasts for the future.," *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 979–95, Nov. 2008.
- [3] K. C. Fugelsang, *Wine Microbiology*. 2007.
- [4] G. H. Fleet, "Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines," vol. 48, no. 5, 1984.
- [5] a Barata, M. Malfeito-Ferreira, and V. Loureiro, "The microbial ecology of wine grape berries.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 153, no. 3, pp. 243–59, Feb. 2012.
- [6] B. Esteve-Zarzoso, a Gostíncar, R. Bobet, F. Uruburu, and a Querol, "Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain).," *Food Microbiol.*, vol. 17, no. 5, pp. 553–562, Oct. 2000.
- [7] G. Beltran, M. J. Torija, M. Novo, N. Ferrer, M. Poblet, J. M. Guillamón, N. Rozès, and A. Mas, "Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study.," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 25, no. 2, pp. 287–93, Aug. 2002.
- [8] M. Combina, a Elía, L. Mercado, C. Catania, a Ganga, and C. Martinez, "Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 99, no. 3, pp. 237–43, Apr. 2005.
- [9] I. Andorrà, B. Esteve-Zarzoso, J. M. Guillamón, and A. Mas, "Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 144, no. 2, pp. 257–62, Dec. 2010.
- [10] E. Di Maro, D. Ercolini, and S. Coppola, "Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 117, no. 2, pp. 201–10, Jun. 2007.

- [11] D. Rossouw, N. Jolly, D. Jacobson, and F. F. Bauer, "The effect of scale on gene expression: commercial versus laboratory wine fermentations.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 3, pp. 1207–19, Feb. 2012.
- [12] G. Fleet, "Yeast interactions and wine flavour," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 86, no. 1–2, pp. 11–22, Sep. 2003.
- [13] A. a Nisiotou and G.-J. E. Nychas, "Yeast populations residing on healthy or botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 8, pp. 2765–8, Apr. 2007.
- [14] E. Ocón, a. R. Gutiérrez, P. Garijo, C. Tenorio, I. López, R. López, and P. Santamaría, "Quantitative and qualitative analysis of non-Saccharomyces yeasts in spontaneous alcoholic fermentations," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 230, no. 6, pp. 885–891, Feb. 2010.
- [15] M. J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamón, and a Mas, "Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years.," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 79, no. 3–4, pp. 345–52, Sep. 2001.
- [16] K. Zott, C. Miot-Sertier, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel, and I. Masneuf-Pomarede, "Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 125, no. 2, pp. 197–203, Jul. 2008.
- [17] P. Romano, "Function of yeast species and strains in wine flavour," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 86, no. 1–2, pp. 169–180, Sep. 2003.
- [18] J. a. Suárez-Lepe and a. Morata, "New trends in yeast selection for winemaking," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 23, no. 1, pp. 39–50, Jan. 2012.
- [19] I. Andorrà, M. Berradre, A. Mas, B. Esteve-Zarzoso, and J. M. Guillamón, "Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 1, pp. 8–13, Nov. 2012.
- [20] I. S. Pretorius, "Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.," *Yeast*, vol. 16, no. 8, pp. 675–729, Jun. 2000.
- [21] J. M. Guillamón, J. Sabaté, E. Barrio, J. Cano, and a Querol, "Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region.," *Arch. Microbiol.*, vol. 169, no. 5, pp. 387–92, May 1998.

- [22] S. S. González, E. Barrio, and a Querol, "Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain).," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 4, pp. 1018–25, Apr. 2007.
- [23] A. a Nisiotou, A. E. Spiropoulos, and G.-J. E. Nychas, "Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 21, pp. 6705–13, Nov. 2007.
- [24] C. D. Curtin, J. R. Bellon, P. a Henschke, P. W. Godden, and M. a de Barros Lopes, "Genetic diversity of Dekkera bruxellensis yeasts isolated from Australian wineries.," *FEMS Yeast Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 471–81, May 2007.
- [25] a. Capece, G. Salzano, and P. Romano, "Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-Saccharomyces wine species," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 84, no. 1, pp. 33–39, Jul. 2003.
- [26] B. Esteve-Zarzoso, N. Hierro, A. Mas, and J. M. Guillamón, "A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 10, pp. 1480–1484, Dec. 2010.
- [27] G. A. Pope, D. A. Mackenzie, M. Defernez, M. A. M. M. Aroso, L. J. Fuller, F. A. Mellon, W. B. Dunn, M. Brown, R. Goodacre, D. B. Kell, M. E. Marvin, E. J. Louis, and I. N. Roberts, "Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts," no. May, pp. 667–679, 2007.
- [28] J. G. Williams, a R. Kubelik, K. J. Livak, J. a Rafalski, and S. V Tingey, "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 18, no. 22, pp. 6531–5, Nov. 1990.
- [29] J. Welsh and M. McClelland, "genomes using PCR with arbitrary primers *," vol. 18, no. 24, pp. 6531–6535, 1990.
- [30] P. Vandenkoornhuysen, C. Leyval, and I. Bonnin, "High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 87, no. Pt 2, pp. 243–53, Aug. 2001.
- [31] Y. Tsumura, K. Ohba, and S. H. Strauss, "Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*).," *Theor. Appl. Genet.*, vol. 92, no. 1, pp. 40–5, Jan. 1996.
- [32] K. D. Reddy, J. Nagaraju, and E. G. Abraham, "Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 83 (Pt 6), no. June, pp. 681–7, Dec. 1999.

- [33] J. Provar, "Polymorphism revealed by simple sequence repeats w," vol. 1, no. 7, pp. 0–7, 1996.
- [34] T. M. Culley and a D. Wolfe, "Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 86, no. Pt 5, pp. 545–56, May 2001.
- [35] I. J. Chybicki, a Oleksa, and J. Burczyk, "Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 107, no. 6, pp. 589–600, Dec. 2011.
- [36] Zietkiewicz, "Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification," *Genomics*, vol. 20, pp. 176–183, 1993.
- [37] J. Welsh and M. McClelland, "Genomic fingerprints produced by PCR with tRNA gene primers consensus," vol. 19, no. 4, pp. 861–866, 1991.
- [38] L. Gauer and S. Cavalli-Molina, "Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. st.-hil., aquifoliaceae) using RAPD markers.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 84 (Pt 6), no. June 1999, pp. 647–56, Jun. 2000.
- [39] X. Zhou, O. Faktor, S. W. Applebaum, and M. Coll, "Population structure of the pestiferous moth *Helicoverpa armigera* in the eastern Mediterranean using RAPD analysis.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 85 Pt 3, no. March, pp. 251–6, Sep. 2000.
- [40] a C. Newton, T. R. Allnutt, W. S. Dvorak, R. F. Del Castillo, and R. a Ennos, "Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers.," *Heredity (Edinb.)*, vol. 89, no. 3, pp. 191–8, Sep. 2002.
- [41] A. Querol and D. Ramh, "The application of molecular techniques in wine microbiology," vol. 71, no. March, pp. 73–78, 1996.
- [42] D. Paffetti, C. Barberio, E. Casalone, D. Cavalieri, R. Fani, G. Fia, E. Mori, and M. Polsinelli, "DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing.," *Res. Microbiol.*, vol. 146, no. 7, pp. 587–94, Sep. 1995.
- [43] C. Andrichetto, E. Psomas, N. Tzanetakis, G. Suzzi, and a Lombardi, "Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products.," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 30, no. 1, pp. 5–9, Jan. 2000.

- [44] M. Barquet, V. Martín, K. Medina, G. Pérez, F. Carrau, and C. Gaggero, "Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-Saccharomyces subspecies.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 2, pp. 807–14, Jan. 2012.
- [45] D. Schuller, E. Valero, S. Dequin, and M. Casal, "Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains.," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 231, no. 1, pp. 19–26, Feb. 2004.
- [46] C. Miot-Sertier and a Lonvaud-Funel, "Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (Dekkera bruxellensis) at the strain level.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, no. 2, pp. 555–62, Feb. 2007.
- [47] P. Renault, C. Miot-Sertier, P. Marullo, P. Hernández-Orte, L. Lagarrigue, A. Lonvaud-Funel, and M. Bely, "Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 134, no. 3, pp. 201–10, Sep. 2009.
- [48] P. M. SCHLÜTER and S. A. HARRIS, "Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data," *Mol. Ecol. Notes*, vol. 6, no. 2, pp. 569–572, 2006.
- [49] L. Andrew, *Ecological Genetics*. Blackwell Publishing Ltd, 2007, p. 326.
- [50] P. R. Hunter and M. A. Gaston, "typing systems : an application of Simpson ' s Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems : an Application of Simpson ' s Index of Diversity," vol. 26, no. 11, pp. 2465–2467, 1988.
- [51] L. Excoffier, P. E. Smouse, and J. M. Quattro, "Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application," vol. 491, pp. 479–491, 1992.
- [52] L. L. Cavalli-Sforza and a W. Edwards, "Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 19, no. 3 Pt 1, pp. 233–57, May 1967.
- [53] L. a Zhivotovsky, "Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers.," *Mol. Ecol.*, vol. 8, no. 6, pp. 907–13, Jun. 1999.
- [54] M. Lynch and B. Milligan, "Analysis of population genetic structure with RAPD markers," *Mol. Ecol.*, 1994.
- [55] M. Ne, "ESTIMATION OF AVERAGE HETEROZYGOSITY AND," pp. 583–590, 1978.

- [56] D. Schuller, F. Cardoso, S. Sousa, P. Gomes, A. C. Gomes, M. a S. Santos, and M. Casal, "Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions.," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e32507, Jan. 2012.
- [57] J.-L. Souciet, B. Dujon, C. Gaillardin, M. Johnston, P. V Baret, P. Cliften, D. J. Sherman, J. Weissenbach, E. Westhof, P. Wincker, C. Jubin, J. Poulain, V. Barbe, B. Séguenès, F. Artiguenave, V. Anthouard, B. Vacherie, M.-E. Val, R. S. Fulton, P. Minx, R. Wilson, P. Durrens, G. Jean, C. Marck, T. Martin, M. Nikolski, T. Rolland, M.-L. Seret, S. Casarégola, L. Despons, C. Fairhead, G. Fischer, I. Lafontaine, V. Leh, M. Lemaire, J. de Montigny, C. Neuvéglise, A. Thierry, I. Blanc-Lenfle, C. Bleykasten, J. Diffsels, E. Fritsch, L. Frangeul, A. Goëffon, N. Jauniaux, R. Kachouri-Lafond, C. Payen, S. Potier, L. Pribylova, C. Ozanne, G.-F. Richard, C. Sacerdot, M.-L. Straub, and E. Talla, "Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*." *Genome Res.*, vol. 19, no. 10, pp. 1696–709, Oct. 2009.
- [58] C. O. S. Neal, A. O. Richardson, S. F. Hurst, A. M. Tortorano, M. A. Viviani, D. A. Stevens, and S. A. Balajee, "Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering," *BMC Microbiol.*, vol. 11, no. 1, p. 203, 2011.
- [59] E. Li, S. Yi, Y. Qiu, J. Guo, H. Peter, and C. Fu, "Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeography of two East Asian species in *Croomia* (*Stemonaceae*) inferred from chloroplast DNA and ISSR fingerprinting variation," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 49, no. 3, pp. 12–24, 2008.
- [60] G. Gaitanis, A. Velegraki, E. C. Alexopoulos, E. Kapsanaki-Gotsi, L. Zisova, Y. Ran, H. Zhang, G. Arsenis, I. D. Bassukas, and J. Faergemann, "Malassezia furfur fingerprints as possible markers for human phylogeography.," *ISME J.*, vol. 3, no. 4, pp. 498–502, Apr. 2009.
- [61] W. R. Graves and J. A. Schrader, "A T THE INTERFACE OF PHYLOGENETICS AND POPULATION GENETICS , THE PHYLOGEOGRAPHY OF D IRCA OCCIDENTALIS (T HYMELAEACEAE) 1," vol. 95, no. 11, pp. 1454–1465, 2008.
- [62] V. Gayevskiy and M. R. Goddard, "Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand.," *ISME J.*, vol. 6, no. 7, pp. 1281–90, Jul. 2012.
- [63] R. Marcon, G. Joa, L. Adami, S. V. Dutra, and R. Vanderlinde, "Geographic origin of southern Brazilian wines by carbon and oxygen isotope analyses," pp. 2943–2948, 2010.

- [64] E. S. King, M. Stoumen, F. Buscema, A. K. Hjelmeland, S. E. Ebeler, H. Heymann, and R. B. Boulton, "Regional sensory and chemical characteristics of Malbec wines from Mendoza and California.," *Food Chem.*, vol. 143, pp. 256–67, Jan. 2014.
- [65] M. L. Chiotta, M. L. Ponsone, D. M. Sosa, M. Combina, and S. N. Chulze, "Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination.," *Food Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 182–90, Dec. 2013.