

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

**“ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΑΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis Vinifera* L.)
ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ”**

ΚΑΡΒΟΥΝΑΚΗΣ Φ. ΦΡΑΓΚΙΣΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΝΟΛΗΣ Ν. ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΙΟΣ 2013
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

**“ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΑΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis Vinifera* L.)
ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ”**

ΚΑΡΒΟΥΝΑΚΗΣ Φ. ΦΡΑΓΚΙΣΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΑΝΟΛΗΣ Ν. ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Μ. ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ - Α. ΜΠΙΝΙΑΡΗ - Ε. ΔΡΟΣΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΙΟΣ 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την εργασία αυτή επιχειρήθηκε η διάκριση και ταυτοποίηση 14 ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα με την χρησιμοποίηση μοριακής μεθόδου.

Ο μεγάλος αριθμός των ποικιλιών του *Vitis vinifera* L., η γενετική ποικιλομορφία και η πολυκλωνικότητα που τις χαρακτηρίζει είναι οι βασικές αιτίες των προβλημάτων που παρουσιάζονται κατά τον προσδιορισμό και τη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου με τις αμπελογραφικές μεθόδους. Όπως είναι γνωστό οι αμπελογραφικοί χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των ποικιλιών επηρεάζονται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και την καλλιεργητική τεχνική. Τα προβλήματα εντείνονται και από την ακρίβεια της επιλογής του αντιπροσωπευτικού προς περιγραφή δείγματος, εξαιτίας τόσο των πολλών τύπων και παραλλαγών που αναφέρονται σε κάθε ποικιλία όσο και των πολλών συνωνύμων.

Για την αντιμετώπιση των ειδικών προβλημάτων που παρουσιάζονται, ιδιαίτερα κατά την μελέτη συγγενών ποικιλιών, χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια οι βιοχημικές και οι μοριακές μέθοδοι.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD. Ο πολυμορφισμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διάφορος καθώς και η αποτελεσματικότητά τους. Οι εκκινητές 1224, 1225, 1227 αποδείχθηκαν οι πιο αποτελεσματικοί στη διάκριση των ποικιλιών που μελετήθηκαν, όχι μόνο για την ποιότητα των ηλεκτροφορητικών ζωνών (ένταση και καθαρότητα) αλλά για τον αριθμό των ηλεκτροφορητικών φαινότυπων που σχημάτισαν. Ο πλέον χρήσιμος απ' αυτούς είναι ο εκκινητής 1224.

Λέξεις κλειδιά: μοριακές μέθοδοι, εκκινητής, RAPD, πολυμορφισμός, ηλεκτροφορητικές ζώνες

SUMMARY

This work attempts to identify and distinguish fourteen grape varieties grown in Greece by using the molecular method.

The large number of varieties and clones of *Vitis vinifera* L., and their genetic diversity are the root causes of the problems that occur for identifying and distinguishing them by using ampelography traces. As it is known the ampelographic characters that are used for the description of the varieties are affected by environmental factors and the growing techniques. The problems are intensified by the accuracy of the selection of the representative sample, due to the description of many types and variations mentioned in each variety and the plethora of their synonyms.

For addressing specific problems, biochemical and molecular methods are used, especially in the study of congenital varieties.

In this work the RAPD method is used. Primers' polymorphisms, as well as their effectiveness, have produced several results. Primers 1224, 1225, 1227 have proved to be the most effective to distinguish the varieties studied, not only due to the quality of electrophoretic zones (intensity and purity) but also because of the number of electrophoretic pattern formed. The most useful of these primers is 1224.

Keywords: molecular methods; primer; RAPD; polymorphism; electrophoretic zones

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αμπελολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Σπουδών των τμημάτων Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Φυτικής Παραγωγής.

Η υλοποίηση της εργασίας αυτής, τόσο στην ύλη, όσο και στη διάταξή της, δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την καταλυτική συμβολή του επιβλέποντα Καθηγητή κύριου Μ. Σταυρακάκη, αλλά και την πολύτιμη βοήθεια της κυρίας Αικ. Μπινιάρη. Τους αξίζουν ευχαριστίες για την ενθάρρυνση, τη βοήθεια, την καθοδήγηση, την υπομονή και την υποστήριξη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτωρα Μαρ. Σταυρακάκη για την βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη την πειραματική πορεία της μελέτης αλλά και για την πρόθυμη προσφορά πολύτιμων συμβουλών.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους τους υπεύθυνους των Τμημάτων Τεχνολογίας Τροφίμων και Φυτικής Παραγωγής, αλλά και γενικότερα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την παραχώρηση των αναγκαίων εργαστηριακών χώρων, υλικών και συσκευών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
Καταγωγή - Ιστορία.....	6
Στοιχεία συστηματικής της Αμπέλου.....	7
Διάκριση και ταξινόμηση.....	9
Συστήματα ταξινόμησης.....	10
Περιορισμοί.....	13
Διάκριση και ταυτοποίηση με βιοχημικές μεθόδους.....	15
Μοριακοί δείκτες.....	19
Τεχνικές μη βασισμένες σε PCR.....	24
Πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP).....	24
Τεχνικές βασισμένες σε PCR.....	26
Τεχνική PCR.....	26
Δείκτες βασισμένοι στην PCR με τυχαίους εκκινητές.....	27
Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD).....	27
Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP).....	30
Δείκτες που στηρίζονται στη PCR με εξειδικευμένες στοχευμένες αλληλουχίες.....	32
Δορυφορικό DNA (satellite DNA).....	32
Μινιδορυφόροι (Minisatellites).....	33
Μικροδορυφόροι (Microsatellites).....	33
Single nucleotide polymorphism (SNPs).....	33
Εξελιγμένες τεχνικές των μοριακών δεικτών.....	33
Πολυμορφισμός κομμένων ενισχυμένων αλληλουχιών. (Cleaved amplified polymorphic sequences- CAPS).....	34
Sequence characterized amplified regions - SCAR.....	34
Randomly amplified microsatellite polymorphisms - RAMP.....	34
Sequence-related amplified polymorphism - SRAP.....	35
Target region amplification polymorphism - TRAP.....	35
Single strand conformation polymorphism -SSCP.....	35
RNA-based μοριακοί δείκτες.....	35
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
Ποικιλίες.....	37
Συλλογή υλικού.....	37
Απομόνωση DNA.....	38
Υπολογισμός συγκέντρωσης DNA.....	39
Εκκινητές RAPD.....	40
Συνθήκες ενίσχυσης PCR.....	40
Ηλεκτροφόρηση.....	41
Στατιστική ανάλυση.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
RAPD-ανάλυση.....	47
Πολυμορφισμός εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.....	47
Δείκτες γενετικής ομοιότητας των ποικιλιών.....	49
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καταγωγή - Ιστορία.

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

Ο Κούσουλας (1995) αναφέρει ότι η τέχνη της αμπελουργίας εικάζεται ότι ξεκίνησε με την αγροτική επανάσταση και ότι η άμπελος στην άγρια μορφή της εμφανίστηκε πριν από 7500 χρόνια περίπου, ως θάμνος αναρριχημένος σε δασικές και παραποτάμιες περιοχές. Πριν ακόμη τη μεγάλη περίοδο των παγετώνων, όπως μαρτυρούν ευρήματα, υπήρχαν αμπέλια ακόμη και στις πολικές περιοχές. Κατά την περίοδο των παγετώνων το αμπέλι άρχισε να εκτοπίζεται από τις βόρειες με ψυχρό κλίμα περιοχές, και η ανάπτυξη του περιορίστηκε σ' αυτές με εύκρατο κλίμα, κατάλληλες κλιματολογικά, κυρίως στην περιοχή του Καυκάσου, που θεωρείται και η πατρίδα του, αλλά επίσης και στη Μεσοποταμία. Οι δύο αυτές περιοχές μαζί με την αρχαία Αίγυπτο πρέπει να θεωρηθούν οι κοιτίδες της αμπελουργίας και, φυσικά, οι πατρίδες του κρασιού.

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

Συγκεκριμένα, γύρω στο 600 π.Χ., οι Φοίνικες διέδωσαν την καλλιέργεια του αμπελιού στη Γαλλία και την περίοδο της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας το αμπέλι φτάνει στη Βρετανία. Τον 13^ο αιώνα μ.Χ. οι Άραβες προωθούν την καλλιέργεια του αμπελιού στην Ισπανία και Πορτογαλία και μέχρι το 17^ο αιώνα το αμπέλι ήταν γνωστό σε όλη σχεδόν την Ευρώπη. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν Ευρωπαϊκά αμπέλια στην Αμερική, αλλά καταστράφηκαν μετά από

μεγάλη επιδημία φυλλοξήρας, ενός εντόμου του εδάφους που προσβάλλει τις ρίζες του φυτού με αποτέλεσμα αυτό να ξεραίνεται. Συνέπεια αυτού ήταν να καλλιεργηθούν άγριες ποικιλίες ντόπιων αμπελιών ανθεκτικών στο έντομο, οι οποίες στις αρχές του 18^{ου} αιώνα έφτασαν να καλλιεργούνται στην Αγγλία και στη Γαλλία. Όμως τα αμπέλια αυτά προσβλήθηκαν από διάφορες άλλες ασθένειες που κατέστρεψαν το 70% των εκτάσεων. Η λύση δόθηκε με τον εμβολιασμό άγριων αμερικάνικων αμπελιών και τη δημιουργία ανθεκτικών υβριδίων.

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

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

Επίσης ο Σταυρακάκης αναφέρει ότι κάπου μεταξύ Ευξείνου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος Άμπελος η οينوφόρος (*Vitis vinifera*), που καλλιεργείται σήμερα. Το όνομα αυτό δόθηκε από τον Διοσκουρίδη τον 1^ο αιώνα μ.Χ. και αποδόθηκε κατόπιν στα λατινικά ως *Vitis vinifera L.*

Στοιχεία συστηματικής της Αμπέλου.

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

Η συστηματική των Αμπελοειδών παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα όχι μόνο για τα είδη εντός των γενών, αλλά και για τον ίδιο τον αριθμό των γενών. Κατά τον Planchon (1887), η οικογένεια των Αμπελοειδών περιλαμβάνει δέκα γένη, με 600 περίπου είδη. Ο Suessenguih (1953)

αναγνωρίζει δώδεκα γένη, ενώ οι Galet και Constantinescu (1968) τα εκτιμούν στα δεκατέσσερα.

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

Στο υπογένος *Euvitis* ανήκει το είδος *Vitis vinifera*, του οποίου οι καλλιεργούμενες ποικιλίες, που ανέρχονται περίπου στις 6.000, χρησιμοποιούνται αποκλειστικά σχεδόν για την παραγωγή πάσης φύσης αμπελουργικών προϊόντων. Σε αυτό το υπογένος υπάγονται και τα διάφορα είδη της βορειοαμερικανικής ηπείρου, από τα οποία άλλα (τα λιγότερα) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή οίνου ή νωπών σταφυλιών και άλλα για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού (υποκείμενα ανθεκτικά στη ριζόβια μορφή φυλλοξήρας, στα άλατα και στους νηματώδεις). Υπάγονται επίσης και αυτόχθονα είδη της Ασίας που καλλιεργούνται σε μικρές εκτάσεις. (Αναφέρεται από τον Νταβίδη, 1977)

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

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

Διάκριση και ταξινόμηση.

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

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

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

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

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

- I. **Αμπελογραφική περιγραφή:** αποβλέπει στην ταξινόμηση των ποικιλιών βάσει εξωτερικών χαρακτήρων των οργάνων (μορφολογία) και έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό αυτών.
- II. **Συγκριτική αμπελογραφία:** ασχολείται με τη μελέτη των προβλημάτων των συνωνύμων καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου σε διάφορους τόπους και με την έρευνα της κλωνικής σύνθεσης των πληθυσμών αυτών.
- III. **Πειραματική αμπελογραφία:** ασχολείται με την έρευνα και επίλυση των προβλημάτων προέλευσης των ποικιλιών, χρησιμοποιώντας γενετικές και φυτογεωγραφικές μεθόδους και ιστορικά δεδομένα.

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

Συστήματα ταξινόμησης.

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

Μέχρι τον 19^ο αιώνα η περιγραφή των ποικιλιών αμπέλου ήταν περιληπτική και θεωρείτο ότι η περιγραφή της ώριμης σταφυλής μπορούσε να οδηγήσει στον προσδιορισμό της ποικιλίας. Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα άρχισε η λεπτομερέστερη περιγραφή των ειδών και ποικιλιών αμπέλου, λόγω της ανάγκης που δημιουργήθηκε για εντοπισμό των

ανθεκτικών ειδών και ποικιλιών στη φυλλοξήρα, στο ωίδιο και στον περονόσπορο που έκαναν την εμφάνιση τους εκείνη την εποχή.

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

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

Οι Acerbi (1825), Milano (1829), Findelman (1836) και Liegel (1841) χρησιμοποίησαν το χρώμα των ραγών, τη γεύση του χυμού, το σχήμα του φύλλου και την πυκνότητα του σταφυλιού για να τις κατατάξουν σε τάξεις και κλάσεις. Στο παραπάνω σύνολο χαρακτήρων ο Rovascenda (1877) πρόσθεσε τους χαρακτήρες του χνοασμού των φύλλων και το χρώμα και χνοασμό της νεαρής βλάστησης.

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

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

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

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

Συνοπτικά, τα συστήματα ταξινόμησης που υπάρχουν είναι τα εξής :

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

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

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

Το 1938 ο Β. Κριμπάς προτείνει σύστημα ταξινόμησης των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου βασιζόμενος στη σχέση «μήκος ράγας προς μήκος γιγάρτου», χαρακτήρα σχετικά

σταθερό σε σχέση με τους άλλους αμπελογραφικούς χαρακτήρες του φύλλου (σχήμα, χνοασμός, αριθμός λοβών), το σχήμα και το χρώμα των ραγών.

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

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

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

Περιορισμοί.

Μέχρι πρόσφατα η διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών στηριζόταν αποκλειστικά στις παραδοσιακές μεθόδους οι οποίες βασίζονται κατεξοχήν στην αμπελογραφική περιγραφή, δηλαδή στους αμπελογραφικούς χαρακτήρες των οργάνων του πρέμνου, στις ιδιότητες της ποικιλίας, στην καλλιεργητική συμπεριφορά και την οικονομική

σημασία της ποικιλίας. Όπως γίνεται φανερό προκύπτουν κάποιοι περιορισμοί ως προς την ακεραιότητα της κάθε μεθόδου.

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

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

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

Οι φαινότυποι των φυτών επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στη συγκεκριμένη περιοχή, τη θρεπτική κατάσταση του πρέμνου καθώς και από την υγεία του. Οι διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν ποικιλομορφία στα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάζει η Αμπελογραφία καθώς και η ταυτοποίηση σε και τροφοπενικά και με ίωση φυτά, είναι επιρρεπής σε λανθασμένα συμπεράσματα.

Ο συνολικός αριθμός των ποικιλιών αμπέλου στις αμπελογραφικές συλλογές υπολογίζεται σε 15.000 και ο αριθμός των εν χρήσει ποικιλιών είναι πολύ μεγάλος. Ακόμα και αν τα πρέμνα είναι σε άριστη κατάσταση, είναι πολύ δύσκολο να διαφοροποιηθούν όλες οι ποικιλίες με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

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

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

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

Γι' αυτούς τους λόγους τα τελευταία χρόνια γίνεται εφαρμογή διαφόρων βιοχημικών και μοριακών μεθόδων για τη διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών χωρίς όμως να έχουν αντικαταστήσει την κλασική αμπελογραφική περιγραφή. Αντίθετα, αποτελούν ένα επιπλέον εργαλείο στα χέρια του αμπελογράφου, που του επιτρέπουν να παρουσιάζει τα αποτελέσματα του με μεγαλύτερη σταθερότητα και αξιοπιστία. Οι μέθοδοι αυτοί διευκρινίζουν καλύτερα τις διαφορές τους σε επίπεδο γονότυπων.

Διάκριση και ταυτοποίηση με βιοχημικές μεθόδους.

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

Από τις βιοχημικές μεθόδους μεγάλη εφαρμογή γνώρισε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών των φυτικών ιστών με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης και των φλαβονοειδών και καροτινοειδών με τη μέθοδο της χρωματογραφίας. Σε σύγκριση με άλλες βιοχημικές σημάνσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια διάκρισης, οι ηλεκτροφορητικά ανιχνευόμενοι ενζυμικοί πολυμορφισμοί υπερέχουν σημαντικά επειδή μελετώντας τη

σύσταση των πρωτεϊνών (τελικά προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων και επιτρέπουν τον προσδιορισμό της γενετικής σύνθεσης του οργανισμού), μπορούν ν' ανακαλυφθούν γενετικές ομοιότητες ή διαφορές μεταξύ των φυτών, αλλά και μεταξύ ειδών και ποικιλιών. Η χρήση γενετικών σημάνσεων προσφέρει το πλεονέκτημα του άμεσου προσδιορισμού της γενετικής σύνθεσης του οργανισμού, ανεξάρτητα των περιβαλλοντικών επιδράσεων με αποτέλεσμα να απαλλάσσει το μελετητή από κρίσεις βασισμένες σε φαινοτυπικούς χαρακτήρες.

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

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

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

Στον ελληνικό πειραματικό χώρο, οι ισοενζυμικοί πολυμορφισμοί χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της εντός και τη μεταξύ των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου και μερικών από τις ξενικές ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας ως υλικό τη γύρη και

ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αμύλου. Με τη χρήση 13 ενζυμικών συστημάτων, από τα οποία τα 11 ήταν πολυμορφικά, μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 40 ποικιλίες αμπέλου καθώς και ένα υποκείμενο, το 140 Ruggeri (140 Ru). Τα αποτελέσματα υπήρξαν ικανοποιητικά και αποδείχτηκε ότι η χρησιμοποίηση δύο ή τριών ενζυμικών συστημάτων είναι αρκετή για τη διάκριση των ποικιλιών αυτών. Χαρακτηριστική ήταν και η διαφοροποίηση του 140 Ru.

Το 1984 οι Σταυρακάκης και Λουκάς, σύγκριναν τέσσερις ποικιλίες αμπέλου που ανήκουν στην ομάδα των «Αητονυχιών». Εκτός από τις ποικιλίες "Αητονύχι άσπρο Γαργαλιάνων" και "Αητονύχι μαύρο", ο χαμηλός βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ των υπολοίπων συνδυασμών των υπόψη ποικιλιών ανά δύο, δεν ενισχύει την άποψη ότι οι ποικιλίες αυτές διαφοροποιήθηκαν με τη συσσώρευση μεταλλαγών. Από τα δεδομένα προκύπτει επίσης ότι οι ποικιλίες "Αητονύχι άσπρο Γαργαλιάνων" και "Αητονύχι κόκκινο", δεν είναι η μία γονεϊκή της άλλης, ενώ το ίδιο ισχύει και για τις ποικιλίες "Αητονύχι μαύρο" και "Αητονύχι κόκκινο".

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

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

Το 1990 με έξι ενζυμικούς πολυμορφισμούς παρατήρησε ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας ανά δύο των οκτώ ποικιλιών που ανήκουν στην ομάδα οινοποιίας "Μαυρούδια" παρουσιάζει σημαντική γενετική διαφοροποίηση και ταυτόχρονα με το γεγονός ότι δεν υπάρχουν κοινές ηλεκτροφορητικές ζώνες μεταξύ δύο ποικιλιών για ένα ή περισσότερα ενζυμικά συστήματα, ενισχύεται η υπόθεση ότι οι ποικιλίες αυτές αποτελούν απλά ή

πολλαπλά υβρίδια άλλων ποικιλιών και επομένως δεν προέρχονται από μία βασική ποικιλία ως αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλαγών (Σταυρακάκης, 1990).

Ακόμα, έγινε συγκριτική μελέτη των συνωνύμων της οινοποιήσιμης ποικιλίας Σαββατιανό-Κουντούρα άσπρη, Δουμπρένα άσπρη, Σταματιανό, Περαιχωρήτικο και Σακέικο με επτά ενζυμικά συστήματα και παρουσιάστηκαν ίδιοι ηλεκτροφορητικοί φαινότυποι, οπότε πρόκειται για την ίδια ποικιλία. Φάνηκε επίσης ότι οι ποικιλίες Κουντούρα μαύρη και Δουμπρένα μαύρη είναι διαφορετικές (Σταυρακάκης, 1991).

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

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

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

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

αναφέρεται τόσο στην απουσία ποιοτικών αλλαγών (εμφάνιση νέων ζωνών ή εξαφάνιση άλλων), όσο και ποσοτικών (διαφορετικός βαθμός έντασης των ηλεκτροφορητικών ζωνών) στο ηλεκτροφόρημα. Έλλειψη σταθερότητας, οφειλόμενη σε οντογενετικό στάδιο ή στις συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται οι ιστοί, κάνει πρακτικά αδύνατη την εφαρμογή της μεθόδου.

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

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

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

Μοριακοί δείκτες.

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

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

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

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

Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην ανάπτυξη των γενετικών δεικτών. Το γεγονός αυτό δεν είναι καινούργιο. Ο Mendel χρησιμοποίησε τον 19^ο αιώνα στα πειράματα του γενετικούς δείκτες βασισμένους στο φαινότυπο. Οι περιορισμοί των δεικτών αυτών οδήγησαν στην ανάπτυξη άλλων πιο χρήσιμων και με πιο ευρεία χρήση δεικτών βασισμένοι στο DNA και είναι γνωστοί ως μοριακοί δείκτες.

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

Χάρη στο επίτευγμα των μοριακών δεικτών, είναι τώρα δυνατόν να βγαίνουν άμεσα συμπεράσματα όσον αφορά στη γενετική ποικιλομορφία και στις σχέσεις μεταξύ οργανισμών στο επίπεδο DNA, χωρίς τις συγχέουσες επιδράσεις του περιβάλλοντος και/ή τα εσφαλμένα δεδομένα γενεαλογικών δέντρων. Γενετικές αναλύσεις σε πληθυσμούς και είδη

φυτών και ζώων για ταξινομικές, εξελικτικές και οικολογικές μελέτες επωφελήθηκαν τρομερά από την ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών με μοριακούς δείκτες. Κάθε τεχνική στηρίζεται σε διαφορετικές αρχές αλλά η εφαρμογή τους έχει να κάνει με το να αναδεικνύουν την παγκόσμια ποικιλομορφία.

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

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

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

	RFLP	RAPD	SSR	SSCP	CAPS	SCAR	AFLP	IRAP/ REMAP	RAMPO
Αφθονία	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια	Χαμηλή	Χαμηλή	Χαμηλή	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια
Επαναληψι- μότητα	Υψηλή	Μέτριος	Μέτρια	Μέτρια	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια
Βαθμός πολυ- μορφισμού	Μέτριος	Μέτριος	Μέτριος	Χαμηλός	Χαμηλός	Μέτριος	Μέτριος	Μέτριος	Μέτριος
Εξειδίκευση γενετικού τόπου	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι	Ναι	Ναι
Τεχνικός εξοπλισμός	Υψηλός	Χαμηλός	Μέτριος	Μέτριος	Υψηλός	Μέτριος	Μέτριος	Υψηλός	Υψηλός
Ποσότητα DNA	Μεγάλη	Μικρή	Μικρή	Μικρή	Μικρή	Μικρή	Μέτρια	Μικρή	Μικρή
Εφαρμογή	Φυσική Χαρτο- γράφηση	Σήμανση γονιδίου	Γενετική ποικιλο- μορφία	SNP Χαρτο- γράφηση αλληλο- μόρφων	Σήμανση γονιδίου	Φυσική Χαρτο- γράφηση	Σήμανση γονιδίου	Γενετική ποικιλο- μορφία	Γενετική ποικιλο- μορφία

Πίνακας 1. Σύγκριση Διάφορων συχνά χρησιμοποιούμενων τεχνικών μοριακών δεικτών. (Πηγή: Agarwal, 2008)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism - Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA.

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA - Τυχαίο Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism - Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυμένων Τμημάτων.

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

SSR: Simple Sequence Repeats.

SSCP: Single-strand Conformation Polymorphism.

CAPS: Cleavage Amplified Polymorphic Sequence. - Πολυμορφισμός κομμένων ενισχυμένων αλληλουχιών.

SCAR: Sequence Characterized Amplification Region.

Ο Μηνάς (1999) αναφέρει ότι κάποιοι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα εξέλιξης. Άλλοι, μπορούν να ανιχνεύσουν την “ποικιλότητα” σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, ενώ άλλοι έχουν μεγαλύτερη επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηρίων.

Σε γενικές γραμμές η επιλογή της τεχνικής θα πρέπει να εξασφαλίζει αξιοπιστία, ευκολία στην ανάλυση, στατιστική επεξεργασία και αποκάλυψη πολυμορφισμών.

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

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

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

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

Οι τεχνικές των νουκλεοτιδικής φύσης μοριακών δεικτών μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες:

- I. τις τεχνικές μη βασισμένες σε PCR (polymerase chain reaction) ή τεχνικές υβριδισμού και
- II. τις τεχνικές βασισμένες σε PCR.

Τεχνικές μη βασισμένες σε PCR.

Πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP).

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

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

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

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

Οι Striem *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991; Bourquin *et al.*, 1991; 1992; 1993; Mauro *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1994, χαρτογράφησαν επιτυχώς ποικιλίες, υποκείμενα και κλώνους της αμπέλου. Οι Bourquin *et al.*, (1992) χρησιμοποίησαν την ανάλυση RFLP, με DNA που απομονώθηκε από το ξύλο του φυτού, για να διακρίνουν 16 από τα πλέον σημαντικά

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

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

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

Παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα, η μέθοδος δεν εφαρμόστηκε ευρέως στη διάκριση ποικιλιών αμπέλου εξαιτίας των προβλημάτων που παρουσιάζει, όπως η δυσχέρεια στην εφαρμογή της (αναγκαία η χρησιμοποίηση ραδιενεργών σημασμένων ανιχνευτών για να γίνουν ορατά τα διαφορετικά τμήματα του DNA, που παράχθηκαν με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων) και η αναγκαιότητα της γνώσης της αλληλουχίας του DNA. Επίσης, επειδή η μεθοδολογία βασίζεται στον πολυμορφισμό των μοριακών δεικτών σε ορισμένα είδη είναι δύσκολο να βρεθεί πολυμορφισμός μεταξύ ποικιλιών ή ατόμων του ίδιου είδους και πρέπει να γίνουν αρκετοί συνδυασμοί ανιχνευτή και περιοριστικού ενζύμου για να βρεθεί κάποιος πολυμορφισμός που μπορεί να αξιοποιηθεί. Είναι μία μέθοδος χρονοβόρα, που

απαιτεί μεγάλες ποσότητες καλής ποιότητας γονιδιωματικού DNA όπως και ακριβά και ραδιενεργά/τοξικά στοιχεία. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν στην επινόηση μιας άλλης σειράς μεθόδων, γνωστές ως τεχνικές που βασίζονται στη PCR.

Τεχνικές βασισμένες σε PCR.

Τεχνική PCR.

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

Στάδιο αποδιάταξης

- Διάσπαση υδρογονικών δεσμών με ανύψωση θερμοκρασίας και σχηματισμός μονόκλωνων αλυσίδων.
- Ένα έως μερικά λεπτά στους 94-96°

Στάδιο πρόσδεσης

- Με μείωση θερμοκρασίας οι εκκινητές συνδέονται με τις αντίστοιχες συμπληρωματικές μονόκλωνες αλυσίδες
- Ένα έως μερικά λεπτά στους 50-65".

Στάδιο επιμήκυνσης

- Η DNA πολυμεράση συνθέτει μία συμπληρωματική αλυσίδα της μήτρας DNA με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3'. Επιλέγεται τέτοια θερμοκρασία ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη ή κοντά στη μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου.
- Ένα έως μερικά λεπτά στους 72"

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

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

- I. σ' αυτές που στηρίζονται στην PCR με τυχαίους εκκινήτες ή τεχνικές με μη-εξειδικευμένες αλληλουχίες (sequence non-specific techniques) και
- II. σ' αυτές που στηρίζονται στη PCR με εξειδικευμένες στοχευμένες αλληλουχίες (sequence targeted PCR-based techniques).

Δείκτες βασισμένοι στην PCR με τυχαίους εκκινήτες. Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD).

Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση τυχαίων εκκινήτων, κυρίως δεκαμερών. σε αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) με τη θερμοανθεκτική πολυμεράση *Taq* και ένα μόνο εκκινήτη ανά αντίδραση. Αντλεί (deduce) DNA πολυμορφισμούς που δημιουργούνται από επαναδιατάξεις ή διαγραφές στα ενδιάμεσα των δεσμευτικών άκρων των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων στο γονιδίωμα χρησιμοποιώντας μικρές τυχαίες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (μέχρι 10 βάσεις). Η μεθοδολογία αυτή είναι πολύ αποτελεσματική στη σάρωση πληθυσμών, στην εύρεση ποικιλομορφίας της αλληλουχίας και στην εύρεση μοριακών δεικτών σε εξειδικευμένες περιοχές του γονιδιώματος χωρίς την ανάγκη λεπτομερούς γενετικού χάρτη.

Τα ενισχυμένα τμήματα δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζει ο εκκινήτης με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια απόσταση 300 έως 3.000 βάσεις. Τα μονόκλιωνα μόρια του γονιδιωματικού DNA, μετά από αποδιάταξη, υβριδίζουν κατά προτίμηση με τον εκκινήτη λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης τους στο διάλυμα. Ακολούθως, η θερμοανθεκτική πολυμεράση, πολυμερίζει με κατεύθυνση 5'→3' όταν υπάρχει εκκινήτης με ελεύθερο 3'-OH και μήτρα (μονόκλινο DNA). Τα προϊόντα της ενίσχυσης του

πολυμερισμού διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση συνήθως βρωμιούχου αιθιδίου.

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

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

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

Οι πρώτες εφαρμογές της μεθόδου στην άμπελο έγιναν το 1993 (Buscher *et al.*; Bourquin *et al.*; Jean-Jaques *et al.*). Με τη βοήθεια των RAPDs δείχθηκε ότι η ποικιλία Silvaner δεν είναι ένας από τους γεννήτορες της γερμανικής ποικιλίας Muller-Thurgau. Επικρατούσε η θεωρία ότι η ποικιλία Muller-Thurgau είναι αποτέλεσμα της διασταύρωσης Silvaner x Riesling αλλά με τη μέθοδο αυτή αποκλείστηκε η ποικιλία Silvaner ως η γεννήτορας. (Buscher *et al.*, 1994).

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

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

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

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

Η μελέτη ποικιλιών που ανήκουν στα υπογένη Euvitis και Muscadinia έδειξε ότι ο πολυμορφισμός ήταν χαμηλότερος στις ποικιλίες που ανήκουν στο ίδιο υπογένος. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης DNA συμφωνούν με αυτά της ανάλυσης των ισοενζύμων, η οποία δείχνει ότι οι ποικιλίες των ειδών του Muscadinia παρουσιάζουν μικρό αριθμό αλληλομόρφων με τις ποικιλίες των ειδών του Euvitis (Qu *etal.*, 1996).

Όσον αφορά τα υποκείμενα της αμπέλου, οι This *et al.*, (1997) απομόνωσαν DNA από το ξύλο 30 υποκειμένων και χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές ταυτοποιήθηκαν 23 από τα 30 υποκείμενα ενώ με την προσθήκη ακόμη ενός εκκινητή ταυτοποιήθηκαν όλα τα υποκείμενα. Οι Bauer και Zyrrian (1997) χρησιμοποιώντας τις ειδικές αλληλουχίες των δεικτών, βρήκαν ότι τα πέντε υποκείμενα που χρησιμοποίησαν ήταν διαφορετικά μεταξύ τους, αν και τα τρία από αυτά (I25AA, 5BB, S04) προέρχονταν από τους ίδιους γονείς (*V. berlandieri* x *V. riparia*).

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

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

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

Η αντίδραση PCR με τυχαίους εκκινητές (Arbitrarily primed PCR/AP-PCR) και η μέθοδος ενίσχυσης αποτυπώματος DNA (DNA amplification fingerprinting/DAF) είναι δύο ανεξάρτητες τεχνικές, παραλλαγές της μεθόδου RAPD. Στην AP-PCR χρησιμοποιείται ένας εκκινητής (μήκους 10-15 νουκλεοτιδίων) και στην PCR οι δύο πρώτοι κύκλοι αφορούν επέκταση σε συνθήκες μη αυστηρές. Οι υπόλοιποι κύκλοι εκτελούνται με αυστηρές συνθήκες, αυξάνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης. Αυτή η παραλλαγή δεν χρησιμοποιήθηκε ευρέως γιατί ήταν απαραίτητη η χρήση αυτοραδιογραφίας, ακόμα και μετά την απλοποίηση της καθώς τα κομμάτια DNA μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Στην τεχνική DAF χρησιμοποιείται για ενίσχυση της αλληλουχίας ένας αυθαίρετος εκκινητής με μήκος μικρότερο από δέκα νουκλεοτίδια και τα αμπλικόνια αναλύονται σε πολυακρυλαμίδη με χρώση νιτρικού αργύρου.

Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP).

Για να ξεπεραστεί το μειονέκτημα της επαναληψιμότητας της RAPD αναπτύχθηκε η τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων AFLP. Η μεθοδολογία βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά την πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος. Έτσι, οι πολυμορφισμοί ταυτοποιούνται με μεγάλη αποτελεσματικότητα λόγω των διαφορών που προκύπτουν στο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων με

ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιορισμένων τμημάτων DNA σε μια αντίδραση PCR. Για μία προσέγγιση πιο υψηλής απόδοσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν φθορίζοντες εκκινητές.

Ο πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών με τη μέθοδο AFLP εντοπίζεται από την παρουσία ή απουσία κάποιας ζώνης που οφείλεται:

- I. στις διαφορές των θέσεων αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού (όπως συμβαίνει και στη μέθοδο RFLP),
- II. στις αλλαγές των βάσεων μέσω μεταλλάξεων κοντά στις θέσεις αναγνώρισης και διάκρισης λόγω των 'επιλεκτικών νουκλεοτιδίων' και
- III. στις ενθέσεις ή ελλείψεις μέσα στα τμήματα που ενισχύονται. Η διάκριση των ετεροζυγωτών ατόμων όπως και στη τεχνική RAPD, είναι δυνατή με τη σύγκριση της έντασης της ζώνης.

Η τεχνολογία AFLP είναι ένα ακόμα εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό γενετικής ποικιλομορφίας και βιοποικιλομορφίας. Μπορούν να διακριθούν στενά συνδεδεμένα άτομα στο επίπεδο του υποείδους και μπορούν όπως επίσης και να χαρτογραφηθούν γονίδια. Είναι δυνατόν να αποτυπωθεί DNA οποιασδήποτε φύσεως και χωρίς να είναι γνωστή η ακολουθία. Τα περισσότερα κομμάτια AFLP αντιστοιχούν σε μοναδικές θέσεις στο γονιδίωμα και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ορόσημο σε γενετική και φυσική χαρτογράφηση.

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

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

Δείκτες που στηρίζονται στη PCR με εξειδικευμένες στοχευμένες αλληλουχίες.

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

Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (sequences repeats)

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

Δορυφορικό DNA (satellite DNA).

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

Μινιδορυφόροι (Minisatellites).

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

Μικροδορυφόροι (Microsatellites).

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

Single nucleotide polymorfism (SNPs).

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

Εξελιγμένες τεχνικές των μοριακών δεικτών.

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

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

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

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

Sequence characterized amplified regions - SCAR.

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

Randomly amplified microsatellite polymorphisms - RAMP.

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

τις επαναλήψεις είναι σημασμένος, ανιχνεύονται μόνο τα προϊόντα από τον εκκινητή (Wu *et al.*, 1994).

Sequence-related amplified polymorphism - SRAP.

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

Target region amplification polymorphism - TRAP.

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

Single strand conformation polymorphism -SSCP.

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

RNA-based μοριακοί δείκτες.

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

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

Transposable elements-based molecular markers

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

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ποικιλίες.

Στον παρακατω πίνακα (Πίνακας 2) φαίνονται οι ποικιλίες που μελετήθηκαν και οι περιοχές δειγματοληψίας, ενώ για μεθοδολογικούς σκοπούς θεωρήθηκε ότι όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν αποτελούν ξεχωριστές ποικιλίες.

α/α	Ποικιλίες	Περιοχή δειγματοληψίας
1	Παριανό	Βοτανικός
2	Παριανό	Λυκόβρυση
3	Ποταμίσιο	Βοτανικός
4	Ποταμίσιο	Λυκόβρυση
5	Αγριογλυκάδα	Βοτανικός
6	Γλυκάδα	Λυκόβρυση
7	Γλυκερήθρα	Βοτανικός
8	Μονεμβασία	Βοτανικός
9	Μαλουκάτο	Λυκόβρυση
10	Τρυφέρα	Βοτανικός
11	Κατσανό	Λυκόβρυση
12	Πλυτό	Βοτανικός
13	Πλατάνι	Βοτανικός
14	Μπεγλέρι	Βοτανικός

Πίνακας 2: Ποικιλίες που μελετήθηκαν και περιοχές δειγματοληψίας.

Συλλογή υλικού.

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν τα νεαρά φύλλα των κυρίων βλαστών των πρέμνων. Αρχικά, έγινε αμπελογραφική περιγραφή και στη συνέχεια μακροσκοπικός έλεγχος της υγείας των πρέμνων, τόσο κατά την περίοδο βλάστησης όσο και κατά την πλήρη ωρίμανση του φορτίου, έτσι ώστε να επισημανθούν και τελικά να επιλεγούν υγιή και αντιπροσωπευτικά πρέμνα της κάθε ποικιλίας.

Η ηλικία των φύλλων επιδρά σημαντικά τόσο στην καθαρότητα όσο και στην ποσότητα του εξαγόμενου DNA. Μετά από σχετικές δοκιμές και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρατηρήθηκε ότι ο αποτελεσματικότερος χρόνος για τη συλλογή των φύλλων είναι η περίοδος της ταχείας αύξησης των βλαστών (Μπινιάρη, 2000).

Από το κάθε πρέμνο συλλέχθηκαν παραπάνω από τρία δείγματα, τα οποία και τοποθετήθηκαν σε διαφορετικές σακούλες. Αμέσως μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο με ξηρό πάγο (-80°C περίπου) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ψυγείο βαθείας κατάψυξης (-80°C).

Απομόνωση DNA.

Για την απομόνωση του DNA, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Thomas κ.ά. (1993), ύστερα από κάποιες τροποποιήσεις (Μπινιάρη, 2000). Χρησιμοποιήθηκε 1g φύλλων από κάθε πρέμνο, το οποίο μετά τη λειοτρίβηση με υγρό άζωτο, ομογενοποιήθηκε σε 12,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιείχε 0,25 M NaCl, 50 mM EDTA, 0,2 M TRIS-Cl (pH : 8,0), 0,1% v/v 2-μερκαπταιθανόλη, 2,5% w/v polyvinyl-pyrrolidone (MW 40.000) {ρυθμιστικό διάλυμα Α} (Thomas κ.ά. 1993). Μετά τη φυγοκέντρηση στις 7.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, δημιουργήθηκε ένα νουκλεϊνικό ίζημα το οποίο επαναδιαλύθηκε σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε 0,5 M NaCl, 0,2 M TRIS-Cl (pH : 8,0), 50 mM EDTA, 1% v/v 2-μερκαπταιθανόλη, 2,5% w/v polyvinyl-pyrrolidone (MW 40.000), 3% sarcosyl, 20% αιθανόλη {ρυθμιστικό διάλυμα Β}. Το μείγμα αυτό επώαστηκε στους 37°C για 45 λεπτά, με συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, προστέθηκε ίσος όγκος (2,5 ml) διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και αναμείχθηκε με ανάδευση. Οι φάσεις διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά παραλήφθηκε η υπερκείμενη υδάτινη φάση η οποία αναμείχθηκε με 1,6 ml ισοπροπανόλης (-20°C) για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA στις συνθήκες αυτές δημιουργεί σύμπλοκα που καθιζάνουν και απομονώνεται με γυάλινη ράβδο. Ακολούθως, διαλύθηκε σε 300 μl TE (10mM TRIS-Cl (pH : 7,4), 1mM EDTA) και προστέθηκε 1,5 μl RNase A (ελεύθερη από DNase I) συγκέντρωσης 1μg/μl και επώαστηκε στους 37°C για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 150 μl οξικού αμμωνίου (7,5 M), έγινε διαχωρισμός με φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 10 λεπτά (σε θερμοκρασία δωματίου) και η υπερκείμενη υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα όπου και προστέθηκαν 1,6 ml ισοπροπανόλης (-20°C). Τέλος, το μείγμα αναδεύτηκε με αργό ρυθμό και το DNA που εμφανίστηκε απομακρύνθηκε με γυάλινη ράβδο και επαναδιαλύθηκε σε 200 μl TE.

Υπολογισμός συγκέντρωσης DNA.

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα σε φασματοφωτόμετρο (HITACHI U-2001) στα 260 και στα 280 nm. Συγκεκριμένα, 10 μl δείγματος DNA διαλύθηκαν σε 1 ml dH₂O και η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο :

$$C \text{ (συγκέντρωση)} = \text{Αραίωση} \times \text{Ένδειξη (στα 260 nm)} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

Οι συγκεντρώσεις του DNA στα δείγματα ήταν περίπου 300 ng/μl και αναλογούσε σε περίπου 60 μg DNA/g φρέσκου ιστού. Σύμφωνα με αυτές τις συγκεντρώσεις του DNA έγινε αραίωση με dH₂O έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να κυμαίνονται στα 30 ng/μl σε DNA.

Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm δείχνει την καθαρότητα του DNA, η οποία στα δείγματα κυμαινόταν μεταξύ 1,55 και 1,87.

Οι συγκεντρώσεις και η καθαρότητα του DNA φαίνονται στον Πίνακα 3.

α/α	Ποικιλίες	Απορρόφηση		C (ng/ml)	260nm/280nm
		280nm	260nm		
1	Παριανό Β	0,061	0,106	530	1,74
2	Παριανό Λ	0,105	0,182	910	1,73
3	Ποταμίσιο Β	0,238	0,432	2160	1,82
4	Ποταμίσιο Λ	0,233	0,432	2160	1,85
5	Αγριογλυκάδα	0,079	0,142	710	1,8
6	Γλυκάδα	0,053	0,099	495	1,87
7	Γλυκερήθρα	0,073	0,135	675	1,85
8	Μονεμβασία	0,047	0,073	365	1,55
9	Μαλουκάτο	0,086	0,155	755	1,8
10	Τρυφέρα	0,161	0,288	1440	1,79
11	Κατσανό	0,078	0,138	690	1,77
12	Πλυτό	0,06	0,092	525	1,53
13	Πλατάνι	0,092	0,168	95	1,83
14	Μπεγλέρι	0,048	0,084	328	1,75

Πίνακας 3: Ποικιλίες, συγκεντρώσεις και καθαρότητα του DNA.

Εκκινητές.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA σε όλες τις ποικιλίες ήταν τυχαία δεκαμερή ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία προήλθαν από το Ίδρυμα Τεχνολογίας Έρευνας, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (ITE – IMBB) και την Operon Technologies Inc. Alameda CA, USA (OT). Συγκεκριμένα, τέσσερις εκκινητές ήταν από το ITE – IMBB, έξι εκκινητές από το kit F της Operon και τέσσερις εκκινητές από το kit M της Operon.

Οι εκκινητές και η αλληλουχία τους φαίνονται στον Πίνακα 4.

Εκκινητής (primer)	Αλληλουχία 5' → 3'
1224	CAGGCCCTTC
1225	AGGTGACCGT
1226	CGCAGGATGG
1227	GTGTGCCCCA
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-09	CCAAGCTTCC
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-14	TGCTGCAGGT
OPM-04	GGCGGTTGTC
OPM-12	GGGACGTTGG
OPM-13	GGTGGTCAAG
OPM-15	AGGGTCGTTT

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αλληλουχία των βάσεων.

Συνθήκες ενίσχυσης (PCR).

Η προετοιμασία της αντίδρασης γινόταν πάντα στους 4°C και ο τελικός της όγκος ήταν 25 μl. Σε ένα σωλήνα eppendorf των 1,5 ml γινόταν το βασικό μείγμα προσθέτοντας πρώτα το δισ-απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό και το ρυθμιστικό διάλυμα Qiagen PCR

Buffer 1x που περιείχε 50mM KCl, 10 mM TRIS-HCl (pH : 8,7 στους 20°C), 15 mM MgCl₂ και (NH₄)₂SO₄. Ακολούθησε προσθήκη 200 μM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 50ng εκκινητή και 1 unit *Taq* DNA πολυμεράση (Qiagen).

Το μείγμα αναμείχθηκε και μετά τη φυγοκέντρηση (14.000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου), μοιράστηκε σε μικρότερα eppendorf (0,2 ml) για τον θερμικό εναλλάκτη. Στο κάθε δείγμα προστέθηκαν 60ng DNA της ποικιλίας, στη συνέχεια αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε σε 14.000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά τα δείγματα τοποθετούνταν στο θερμικό εναλλάκτη (PCR) σε θερμοκρασία 94°C.

Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε κυκλικός εναλλάκτης θερμότητας (Perkin Elmer, DNA Thermal Cycler 9600) και οι συνθήκες ενίσχυσης για τη μέθοδο της τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA (RAPD) ήταν : 1 κύκλος για 5 λεπτά στους 94°C, 35 κύκλοι από 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό στους 44°C , 2 λεπτά στους 72°C και τέλος 1 κύκλος για 10 λεπτά στους 72°C.

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης στους 94°C. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνονται οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA. Στο δεύτερο βήμα, με μείωση της θερμοκρασίας (44°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA (καθώς οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές και μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, δεν υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA). Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Όταν τελειώνει η διαδικασία τα δείγματα αποθηκεύονται στο ψυγείο ή γινόταν ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση.

Για τη μέθοδο του τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA (RAPD), ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων, 20μl από κάθε δείγμα, έγινε με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TAE (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH : 8,0) και η χρώση του DNA έγινε με βρωμιούχο

αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 15 cm x 20 cm και πάχους 10 mm (για τη maxi ηλεκτροφόρηση) και 15 cm x 13 cm και πάχους 10 mm (για τη midi ηλεκτροφόρηση) και η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 160 Volt (maxi ηλεκτροφόρηση) και 120 Volt (midi ηλεκτροφόρηση) σταθερά με διάρκεια περίπου 2,5 ώρες.

Στο τέλος, τα ηλεκτροφορήματα φωτογραφήθηκαν στο Gel Doc 1000 (Biorad) και αποθηκεύτηκαν σαν εικόνες στον υπολογιστή.

Στατιστική ανάλυση.

Με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος NT-SYSTEM-PC 2.02i και με βάση τη μέθοδο UPGMA (μέθοδος μη σταθμισμένων ομάδων ανά δύο, χρησιμοποιώντας αριθμητικό μέσο), όπως αναπτύχθηκε από τον Rohlf (Exeter Software New York, 1993, USA), βρέθηκε ο βαθμός γενετικής ομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους ποικιλιών.

Στην Cluster ανάλυση του στατιστικού προγράμματος, εφαρμόστηκε ο συντελεστής Simple matching (Sm) καθώς και οι συντελεστές Dice (D) και Jaccard (J) οι οποίοι υπολογίζουν το βαθμό γενετικής ομοιότητας.

- Για το συντελεστή Simple Matching Sm ή I, ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (β.γ.ο.) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν υπολογίστηκε με τον τύπο :

$$S_m = n / m+n$$

όπου n ο αριθμός των κοινών ζωνών των χ και y ποικιλιών,

m ο αριθμός των μη κοινών ζωνών των χ και y ποικιλιών (Sokal and Sneath, 1963).

- Για το συντελεστή Jaccard (J), ο βαθμός γενετικής ομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν υπολογίστηκε με τον τύπο :

$$J = a / (n-d)$$

όπου a η παρουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης μεταξύ των ζευγών που συγκρίνονται,

n ο αριθμός των κοινών ζωνών μεταξύ των ζευγών των ποικιλιών,

d η απουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης μεταξύ των ζευγών που συγκρίνονται.

- Για το συντελεστή Dice (D), ο βαθμός γενετικής ομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν υπολογίστηκε με τον τύπο :

$$D = 2a / (2a + b + c)$$

όπου a η παρουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης μεταξύ των ζευγών που συγκρίνονται,

b+c ο συνολικός αριθμός των μη κοινών ζωνών.

Βάσει αυτών των δεδομένων σχηματίστηκαν στη συνέχεια τα δενδρογράμματα, τα οποία και απεικονίζουν τη συγγένεια των υπό μελέτη ποικιλιών. Για τον υπολογισμό των πινάκων όπου απεικονίζονται ο βαθμός γενετικής ομοιότητας ή ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας (ανάλογα με το συντελεστή) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα λογιστικών φύλλων (Excel). Σε κάθε ποικιλία και για κάθε ηλεκτροφορητική ζώνη, η απουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης χαρακτηριζόταν με τον αριθμό μηδέν (0), ενώ η παρουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης χαρακτηριζόταν με τον αριθμό ένα (1).

Για τους συντελεστές Simple matching, Jaccard και Dice, ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) που προκύπτει με βάση το συντελεστή κυμαίνεται από 0 (καμία κοινή ηλεκτροφορητική ζώνη) έως 1 (όλες οι ηλεκτροφορητικές ζώνες, του υπό μελέτη ζεύγους των ποικιλιών, κοινές). Επομένως, μεγάλη ή μικρή τιμή του I δείχνει αντίστοιχα μεγάλο ή μικρό βαθμό γενετικής ομοιότητας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

RAPD-ανάλυση.

Πολυμορφισμός εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζεται ο αριθμός των ενισχυμένων προϊόντων (ηλεκτροφορητικές ζώνες) για κάθε ένα από τους εκκινητές που μελετήθηκαν για τις δεκατέσσερις ποικιλίες με τη μέθοδο RAPD. Οι εκκινητές ανάλογα με τον πολυμορφισμό που εμφάνισαν μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες:

α. Εκκινητές με μέτριο πολυμορφισμό.

Μέτριο βαθμό πολυμορφισμού (από 10 έως 15 ηλεκτροφορητικές ζώνες) εμφάνισαν οι εκκινητές:

1224, 1225, 1227 (από το ITE – IMBB)

OPF-03, OPF-04, OPF-09 (από το kit F της Operon).

Ο εκκινητής 1224 αποδείχτηκε αρκετά πολυμορφικός, με 15 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 13 διαφορετικούς ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Μόνο οι ποικιλίες Κατσανό και Πλυτό είχαν κοινό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο ενώ οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής 1225 εμφάνισε λιγότερες ηλεκτροφορητικές ζώνες (10) που σχημάτισαν 13 διαφορετικούς ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Στην περίπτωση αυτή κοινό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο εμφάνισαν οι ποικιλίες Παριανό από τις δυο διαφορετικές περιοχές συλλογής. Οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Τον ίδιο αριθμό ηλεκτροφορητικών ζωνών με τον εκκινητή 1224 παρουσίασε ο εκκινητής 1227 (15 ηλεκτροφορητικές ζώνες), που σχημάτισαν 10 διαφορετικούς ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Ίδιο ηλεκτροφορητικό φαινότυπο παρουσίασαν, ανά ομάδα, οι ποικιλίες: α) Παριανό Βοτανικού, Παριανό Λυκόβρυσης, β) Ποταμίσιο Λυκόβρυσης, Τρυφέρα, γ) Αγριογλυκάδα, Γλυκάδα και δ) Κατσανό, Πλατάκι. Οι υπόλοιπες 6 ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής OPF-03 παρουσίασε 12 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 11 διαφορετικούς ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Ίδιο ηλεκτροφορητικό φαινότυπο εμφάνισαν ανά ομάδα οι ποικιλίες: α) Παριανό Βοτανικού, Παριανό Λυκόβρυσης, β) Μαλουκάτο, Πλατάκι και γ) Κατσανό, Πλυτό. Οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής OPF-04 αποδείχτηκε πολυμορφικός με 13 ηλεκτροφορητικές ζώνες που εμφάνισαν 13 διαφορετικούς ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Κοινό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο είχαν οι ποικιλίες Παριανό Βοτανικού και Παριανό Λυκόβρυσης. Οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Τέλος ο εκκινητής OPF-09 παρουσίασε 10 ηλεκτροφορητικές ζώνες που εμφάνισαν 11 διαφορετικούς ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Ίδιο ηλεκτροφορητικό φαινότυπο εμφάνισαν ανά ομάδα οι ποικιλίες: α) Γλυκερήθρα, Μονεμβασία, Μαλουκάτο και β) Παριανό Λυκόβρυσης και Μπεγλέρι.

β. Εκκινητές με χαμηλό πολυμορφισμό.

Χαμηλό βαθμό πολυμορφισμού (έως 10 ηλεκτροφορητικές ζώνες) εμφάνισαν οι εκκινητές:

1226 (από το ITE – IMBB)

OPF-02, OPF-10, OPF-14 (από το kit F της Operon)

OPM-04, OPM-12, OPM-13, OPM-15 (από το kit M της Operon).

Ο εκκινητής 1226 εμφάνισε 5 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 8 ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Τον ίδιο ηλεκτροφορητικό φαινότυπο ανά ομάδα παρουσίασαν οι παρακάτω ποικιλίες: α) Παριανό Βοτανικού, Παριανό Λυκόβρυσης, Κατσάνο, β) Τρυφέρα και Μπεγλέρι και γ) Γλυκάδα, Γλυκερήθρα, Μονεμβασία, Πλυτό. Οι υπόλοιπες 5 ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής OPF-02 παρουσίασε ομοίως 5 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 11 ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Τον ίδιο ηλεκτροφορητικό φαινότυπο ανά ομάδα παρουσίασαν οι παρακάτω ποικιλίες: α) Παριανό Βοτανικού, Παριανό Λυκόβρυσης, β) Κατσάνο, Πλυτό και γ) Μαλουκάτο, Πλατάκι. Οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής OPF-10 εμφάνισε 6 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 8 ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Κοινό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο είχαν οι ποικιλίες: α) Παριανό Βοτανικού και Παριανό Λυκόβρυσης, β) Ποταμίσιο Λυκόβρυσης, Γλυκερήθρα, Μαλουκάτο, Πλυτό, Πλατάκι, γ) Κατσάνο, Πλυτό. Οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής OPF-14 παρουσίασε 6 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 13 ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Κοινό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο είχαν οι ποικιλίες: Παριανό Βοτανικού και Παριανό Λυκόβρυσης. Οι υπόλοιπες ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Ο εκκινητής OPM-15 εμφάνισε 6 ηλεκτροφορητικές ζώνες που σχημάτισαν 7 ηλεκτροφορητικούς φαινότυπους. Κοινό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο είχαν ανά ομάδα οι

ποικιλίες: α) Παριανό Βοτανικού, Μπεγλέρι, β) Παριανό Λυκόβρυσης, Τρυφέρα, γ) Ποταμίσιο Λυκόβρυσης, Γλυκερήθρα, Μαλουκάτο, Πλυτό, Πλατάκι, δ) Μονεμβασιά, Κατσανό. Οι υπόλοιπες 3 ποικιλίες είχαν μοναδικό ηλεκτροφορητικό φαινότυπο.

Εκκινητής (primer)	Αριθμός ενισχυμένων προϊόντων
1224	15
1225	10
1226	5
1227	15
OPF-02	5
OPF-03	12
OPF-04	13
OPF-09	10
OPF-10	6
OPF-14	6
OPM-04	8
OPM-15	6
OPM-13	7
OPM-15	5

Πίνακας 5: Ηλεκτροφορητικές ζώνες των εκκινητών που μελετήθηκαν.

Δείκτες (συντελεστές) γενετικής ομοιότητας των ποικιλιών.

Τα ηλεκτροφορήματα των παραπάνω εκκινητών φαίνονται στο παράρτημα. Για την επεξεργασία και ανάλυση των ηλεκτροφορημάτων και τον προσδιορισμό του βαθμού γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι συντελεστές Simple matching, Jaccard και Dice. Πιο αναλυτικά:

Συντελεστής Simple matching.

Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν, με βάση τον συντελεστή Simple Matching δίνεται στον Πίνακα 6, ενώ το αντίστοιχο δένδρογραμμα φαίνεται στην Εικόνα 1.

Από τον Πίνακα 6 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 0,62 έως 0,96.

Συντελεστής Jaccard.

Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν, με βάση το συντελεστή Jaccard (J) δίνεται στον Πίνακα 7, ενώ το αντίστοιχο δενδρόγραμμα φαίνεται στην Εικόνα 2.

Από τον Πίνακα 7 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 0,51 έως 0,94.

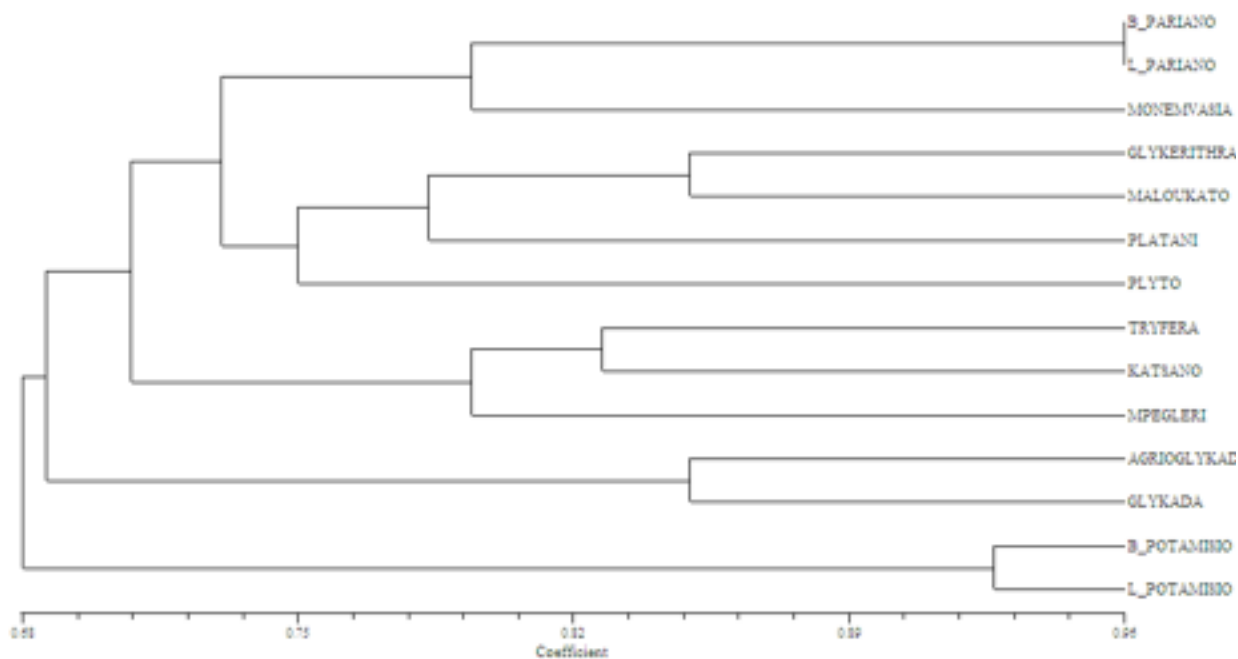
Συντελεστής Dice.

Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν, με βάση το συντελεστή Dice (D) δίνεται στον Πίνακα 8, και το αντίστοιχο δενδρόγραμμα φαίνεται στην Εικόνα 3.

Από τον Πίνακα 8 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 0,61 έως 0,97.

	Β ΠΑΡΙΑΝΟ	Λ ΠΑΡΙΑΝΟ	Β ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	Λ ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	ΑΓΡΙΟΓΛΥΚΑΔΑ	ΓΛΥΚΑΔΑ	ΓΛΥΚΕΡΗΘΡΑ	ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	ΜΑΛΟΥΚΑΤΟ	ΤΡΥΦΕΡΑ	ΚΑΤΣΑΝΟ	ΠΛΥΤΟ	ΠΛΑΤΑΝΙ	ΜΠΕΓΛΕΡΙ
Β_ΠΑΡΙΑΝΟ	1,00													
Λ_ΠΑΡΙΑΝΟ	0,96	1,00												
Β_ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	0,66	0,68	1,00											
Λ_ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	0,63	0,65	0,92	1,00										
ΑΓΡΙΟΓΛΥΚΑΔΑ	0,68	0,66	0,65	0,66	1,00									
ΓΛΥΚΑΔΑ	0,71	0,73	0,67	0,68	0,85	1,00								
ΓΛΥΚΕΡΗΘΡΑ	0,76	0,76	0,71	0,67	0,77	0,75	1,00							
ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	0,79	0,79	0,74	0,68	0,70	0,70	0,75	1,00						
ΜΑΛΟΥΚΑΤΟ	0,70	0,67	0,71	0,70	0,75	0,71	0,85	0,75	1,00					
ΤΡΥΦΕΡΑ	0,68	0,71	0,67	0,71	0,61	0,67	0,64	0,67	0,62	1,00				
ΚΑΤΣΑΝΟ	0,77	0,82	0,67	0,66	0,61	0,70	0,75	0,76	0,71	0,83	1,00			
ΠΛΥΤΟ	0,71	0,75	0,70	0,64	0,63	0,70	0,75	0,78	0,75	0,67	0,78	1,00		
ΠΛΑΤΑΝΙ	0,70	0,72	0,71	0,70	0,73	0,66	0,78	0,78	0,78	0,62	0,73	0,75	1,00	
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	0,70	0,72	0,68	0,70	0,62	0,66	0,70	0,66	0,72	0,82	0,77	0,75	0,70	1,00

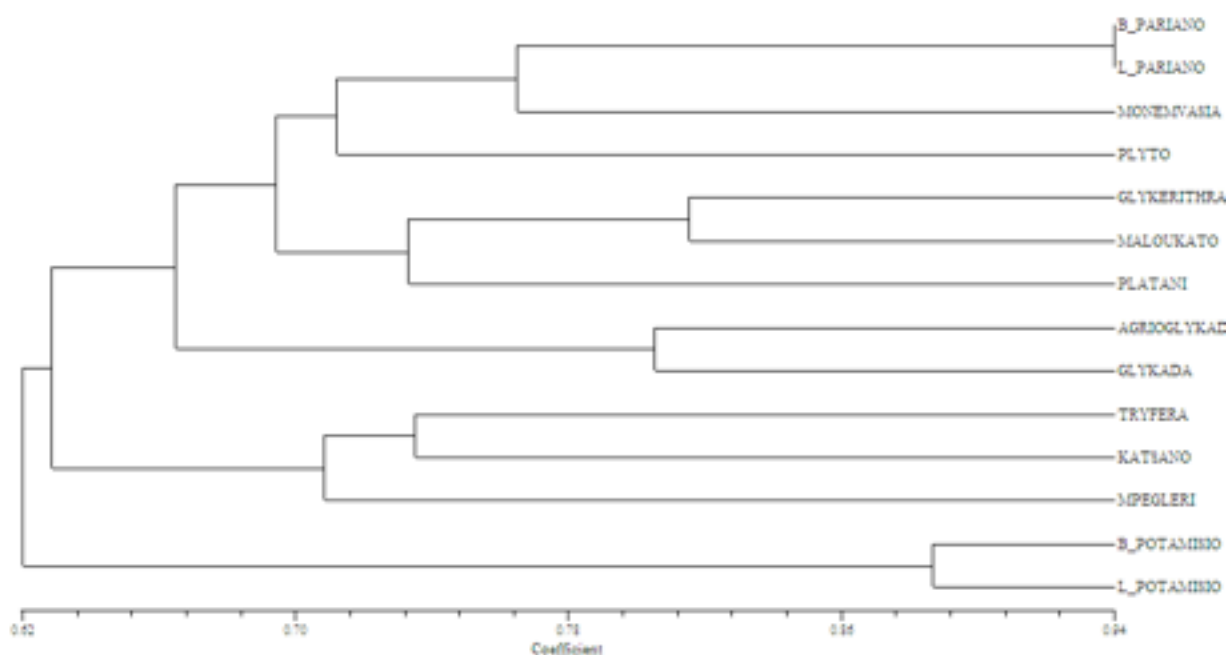
Πίνακας 6: Βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν βάση του συντελεστή Simple Matching



Εικόνα 1: Δενδρόγραμμα ποικιλιών που μελετήθηκαν βάση του συντελεστή Simple Matching.

	Β ΠΑΡΙΑΝΟ	Λ ΠΑΡΙΑΝΟ	Β ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	Λ ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	ΑΓΡΙΟΓΛΥΚΑΔΑ	ΓΛΥΚΑΔΑ	ΓΛΥΚΕΡΥΘΡΑ	ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	ΜΑΛΟΥΚΑΤΟ	ΤΡΥΦΕΡΑ	ΚΑΤΣΑΝΟ	ΠΛΥΤΟ	ΠΛΑΤΑΝΙ	ΜΠΕΓΛΕΡΙ
Β_ΠΑΡΙΑΝΟ	1,00													
Λ_ΠΑΡΙΑΝΟ	0,94	1,00												
Β_ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	0,62	0,63	1,00											
Λ_ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	0,58	0,59	0,89	1,00										
ΑΓΡΙΟΓΛΥΚΑΔΑ	0,65	0,63	0,60	0,60	1,00									
ΓΛΥΚΑΔΑ	0,66	0,68	0,61	0,61	0,81	1,00								
ΓΛΥΚΕΡΥΘΡΑ	0,73	0,73	0,66	0,62	0,73	0,71	1,00							
ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	0,77	0,76	0,70	0,64	0,67	0,66	0,72	1,00						
ΜΑΛΟΥΚΑΤΟ	0,66	0,64	0,65	0,64	0,71	0,66	0,82	0,72	1,00					
ΤΡΥΦΕΡΑ	0,61	0,63	0,57	0,60	0,53	0,58	0,57	0,61	0,54	1,00				
ΚΑΤΣΑΝΟ	0,71	0,76	0,59	0,57	0,54	0,62	0,69	0,71	0,64	0,73	1,00			
ΠΛΥΤΟ	0,67	0,71	0,64	0,58	0,60	0,65	0,71	0,75	0,71	0,59	0,72	1,00		
ΠΛΑΤΑΝΙ	0,65	0,66	0,64	0,62	0,67	0,60	0,73	0,68	0,73	0,51	0,64	0,69	1,00	
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	0,64	0,66	0,61	0,61	0,56	0,59	0,64	0,62	0,66	0,73	0,69	0,69	0,62	1,00

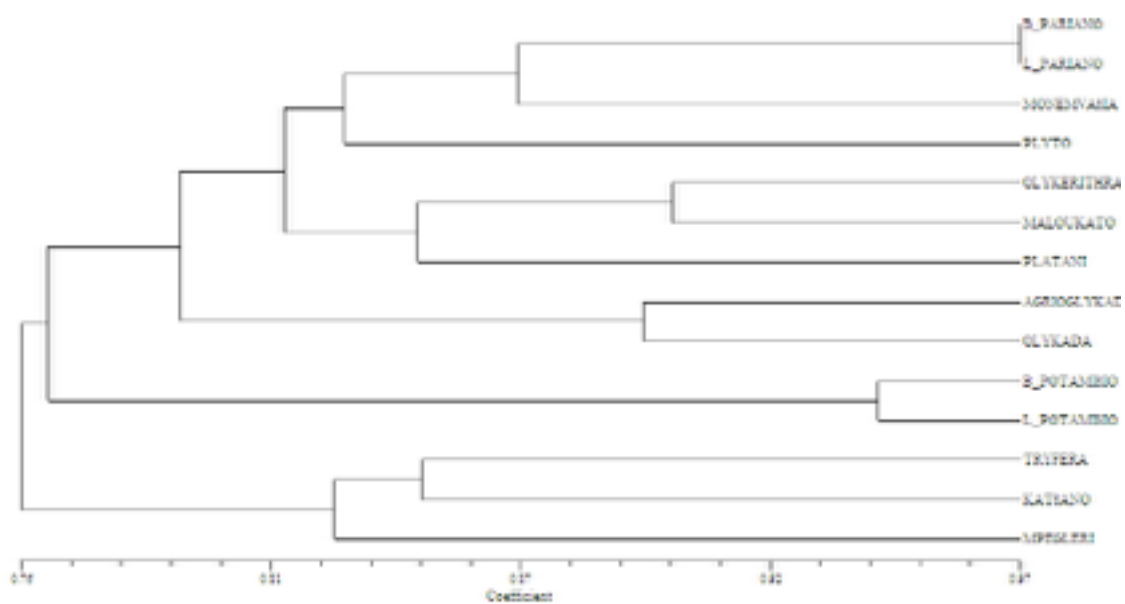
Πίνακας 7: Βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν βάση του συντελεστή Jaccard.



Εικόνα 2: Δενδρόγραμμα ποικιλιών που μελετήθηκαν βάση του συντελεστή Jaccard.

	Β ΠΑΡΙΑΝΟ	Λ ΠΑΡΙΑΝΟ	Β ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	Λ ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	ΑΓΡΙΟΓΛΥΚΑΔΑ	ΓΛΥΚΑΔΑ	ΓΛΥΚΕΡΗΘΡΑ	ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	ΜΑΛΟΥΚΑΤΟ	ΤΡΥΦΕΡΑ	ΚΑΤΣΑΝΟ	ΠΛΥΤΟ	ΠΛΑΤΑΝΙ	ΜΠΕΓΛΕΡΙ
Β_ΠΑΡΙΑΝΟ	1,00													
Λ_ΠΑΡΙΑΝΟ	0,97	1,00												
Β_ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	0,76	0,78	1,00											
Λ_ΠΟΤΑΜΙΣΙΟ	0,73	0,75	0,94	1,00										
ΑΓΡΙΟΓΛΥΚΑΔΑ	0,79	0,77	0,75	0,75	1,00									
ΓΛΥΚΑΔΑ	0,80	0,81	0,76	0,76	0,89	1,00								
ΓΛΥΚΕΡΥΘΡΑ	0,84	0,84	0,79	0,77	0,85	0,83	1,00							
ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΑ	0,87	0,87	0,82	0,78	0,80	0,79	0,84	1,00						
ΜΑΛΟΥΚΑΤΟ	0,80	0,78	0,79	0,78	0,83	0,79	0,90	0,84	1,00					
ΤΡΥΦΕΡΑ	0,76	0,77	0,73	0,75	0,69	0,73	0,72	0,75	0,70	1,00				
ΚΑΤΣΑΝΟ	0,83	0,86	0,74	0,73	0,70	0,76	0,82	0,83	0,78	0,85	1,00			
ΠΛΥΤΟ	0,80	0,83	0,78	0,74	0,75	0,79	0,83	0,86	0,83	0,74	0,84	1,00		
ΠΛΑΤΑΝΙ	0,78	0,80	0,78	0,76	0,80	0,75	0,85	0,81	0,84	0,68	0,78	0,82	1,00	
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	0,78	0,79	0,76	0,76	0,72	0,74	0,78	0,76	0,79	0,84	0,81	0,82	0,76	1,00

Πίνακας 8: Βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν βάση του συντελεστή Dice.



Εκόνα 3: Δενδρόγραμμα ποικιλιών που μελετήθηκαν βάση του συντελεστή Dice.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη συγκριτική μελέτη όλων των παραπάνω συντελεστών που προσδιορίζουν το βαθμό γενετικής ομοιότητας, από τους πίνακες της γενετικής ομοιότητας μεταξύ όλων των δυνατών ζευγών των ποικιλιών που μελετήθηκαν και από τα δενδρογράμματα που προκύπτουν, δε φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων .

Από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν υψηλό βαθμό γενετικής ομοιότητας ηλεκτροφορικά παρουσίασαν τα ζεύγη των ποικιλιών:

- Γλυκερήθρα - Μαλουκάτο ($I=0,85$),
- Αργιογλυκάδα - Γλυκάδα ($I=0,85$) και
- Τρυφέρα - Κατσανό ($I=0,83$).

Τα αποτελέσματα της RAPD ανάλυσης επιβεβαίωσαν τις αμπελογραφικές περιγραφές που έχουν πραγματοποιηθεί, ότι δηλαδή, παρά το σχετικά υψηλό βαθμό γενετικής ομοιότητας ($I=0,85$) η ποικιλία Αργιογλυκάδα είναι διαφορετική από την ποικιλία Γλυκάδα και η ποικιλία Γλυκερύθρα είναι διαφορετική από το Μαλουκάτο. Βέβαια η περαιτέρω έρευνα περισσότερων βιότυπων θα συμβάλλει στην πλήρη διελεύκανση του θέματος.

Οι ποικιλίες Παριανό Βοτανικού και Παριανό Λυκόβρυσης παρουσιάζουν ταυτότητα σε 9 από τους 14 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και βαθμό γενετική ομοιότητας $I=0,96$. Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύει ότι πρόκειται για δυο κλώνους της ίδιας ποικιλίας.

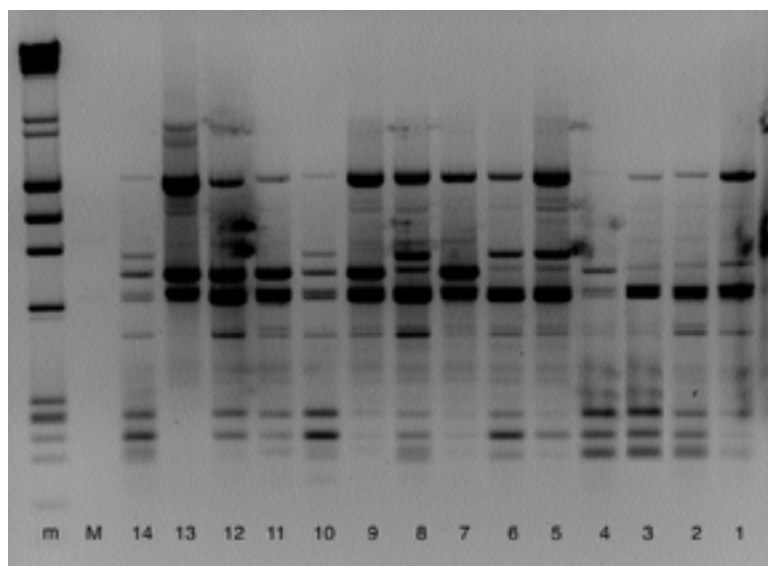
Όμοίως οι ποικιλίες Ποταμίσιο Βοτανικού και Ποταμίσιο Λυκόβρυσης παρουσίασαν β.γ.ο. ($I=0,92$). Ο πολύ ψηλός αυτός βαθμός γενετικής ομοιότητας υποδηλώνει ότι πρόκειται περί διαφορετικών κλώνων της ίδιας ποικιλίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

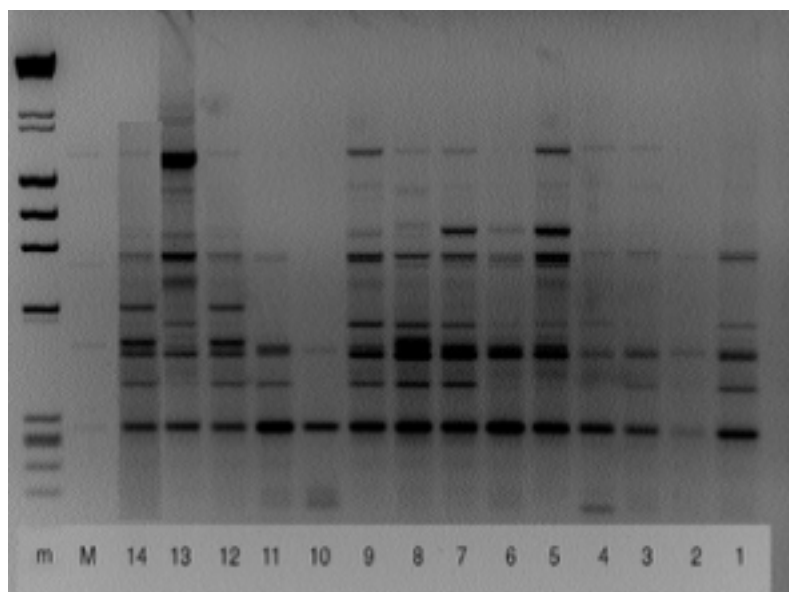
Πίνακας ποικιλιών:

α/α	Ποικιλίες
1	Παριανό
2	Παριανό
3	Ποταμίσιο
4	Ποταμίσιο
5	Αγριογλυκάδα
6	Γλυκάδα
7	Γλυκερήθρα
8	Μονεμβασία
9	Μαλουκάτο
10	Τρυφέρα
11	Κατσανό
12	Πλυτό
13	Πλατάνι
14	Μπεγλέρι
M	Μάρτυρας
m	Marker

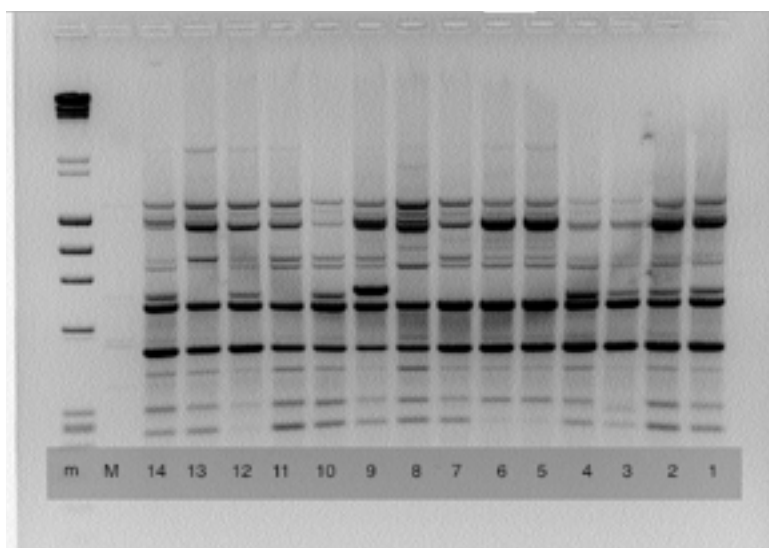
Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο RAPD:



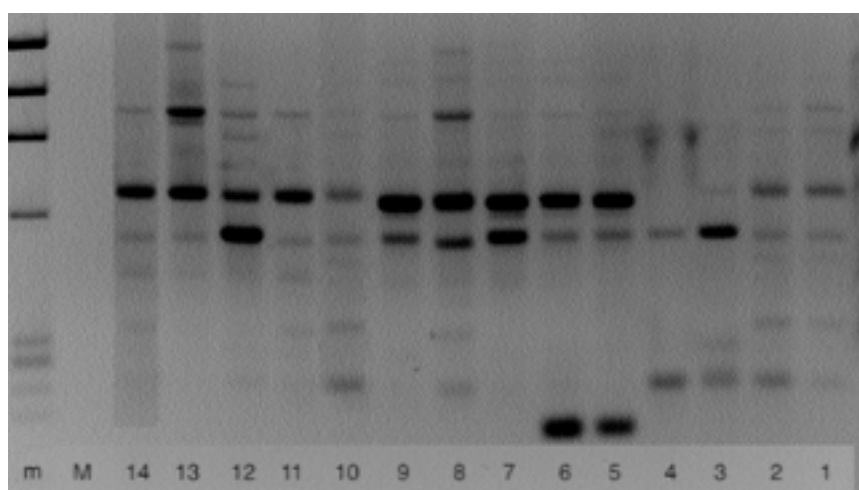
Εικ.4: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1224.



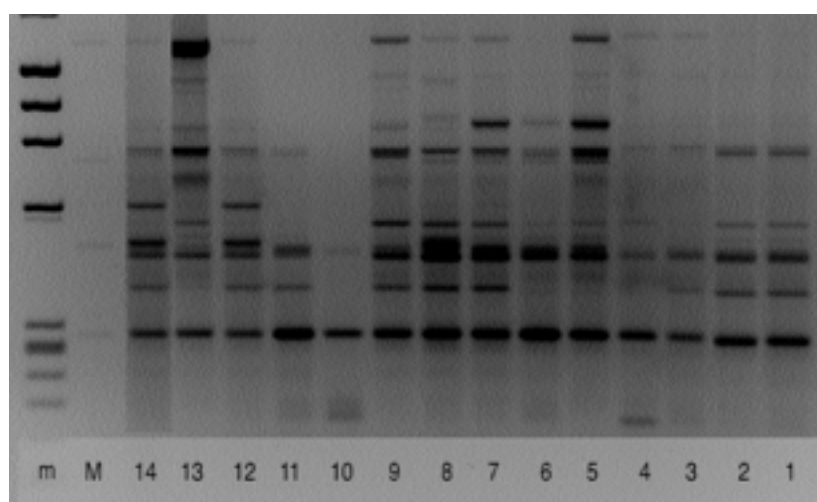
Εικ.4: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1226.



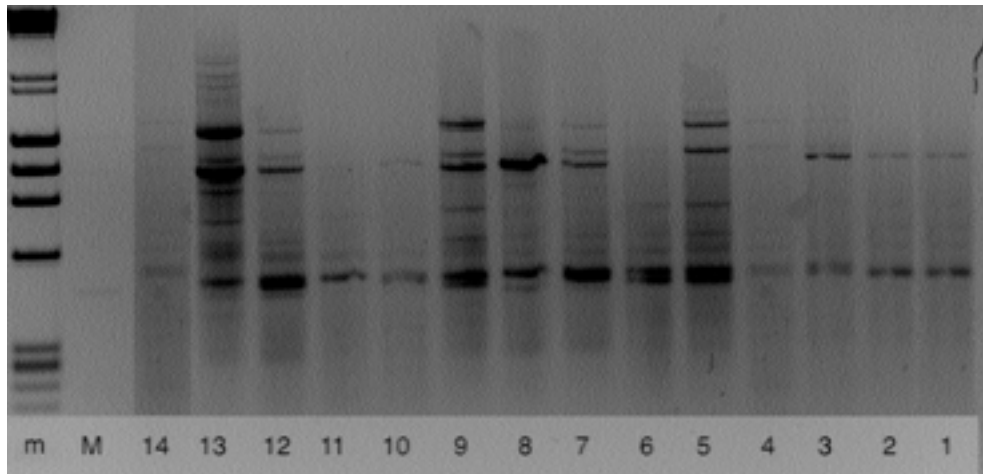
Εικ.4: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1227.



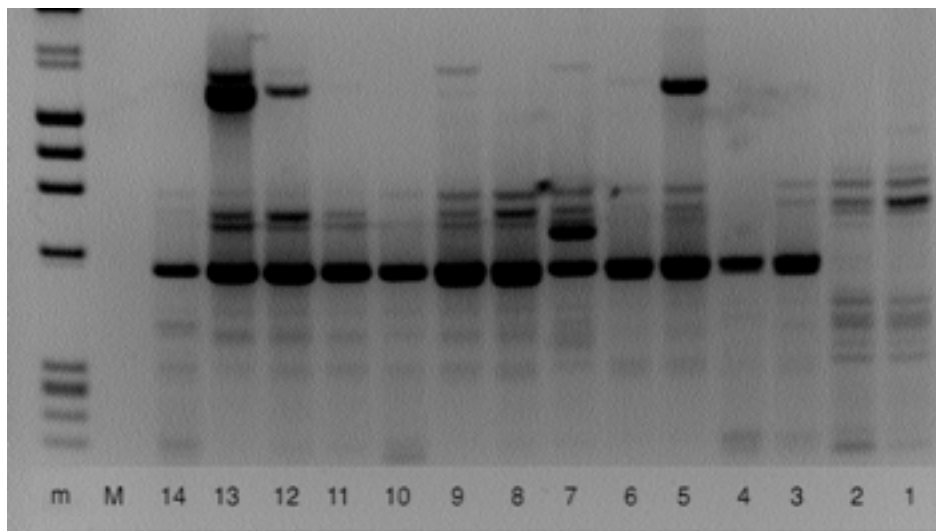
Εικ.6: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1225.



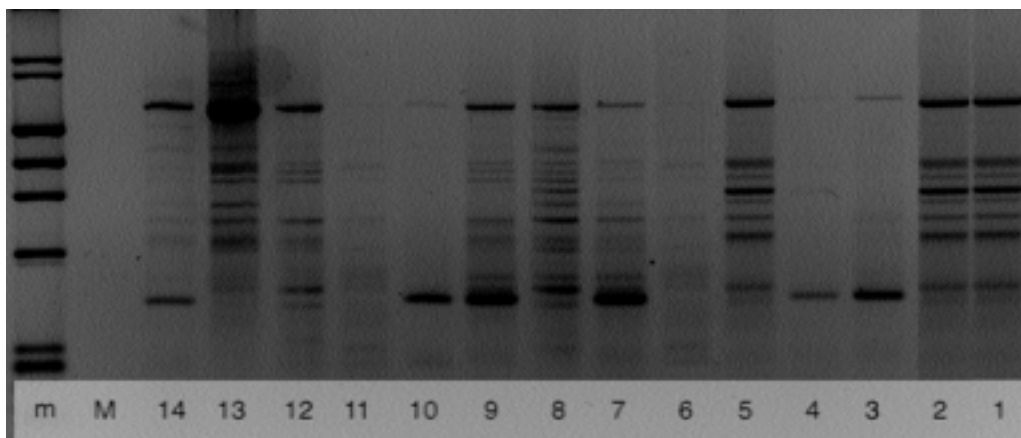
Εικ.7: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-9



Εικ.8: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή *OPM-15*



Εικ.9: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή *OPF-3*



Εικ.10: Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή *OPM-4*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal M, Shrivastava N and Padh H (2008) Andantes in molecular marker techniques and their applications in plant science. *Plant Cell Rep* **27**: 617-631
- Αλαχιώτης Σ (2007). Εισαγωγή στην εξέλιξη. Εκδόσεις Λιβάνη.
- Alleweldt, G. and Possingham, J.V., 1988. Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Gen.* 75: 669-73.
- Αμπαρτζίδης Σ (2007). Αμπελουργική μελέτη και αξιολόγηση ορισμένων Ελληνικών ποικιλιών αμπέλου. Μεταπτυχιακή μελέτη.
- Αναγωστόπουλος ΑΙ (2003). Μελέτη των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera L.*) με εφαρμογή μοριακών δεικτών (SSR). Μεταπτυχιακή μελέτη.
- Bassam BJ, Caetano-Anollos G and Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **196**: 80-83.
- Bourquin J.C., Otten L. and Walter B., 1995. PCR – RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Parthenocissus* and its application to the identification of rootstocks. *Vitis* 34(2): 103-108
- Bowers JE, Dangl GS, Vienna R, Meredith CP (1996) Isolation and characterisation of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera L.*). *Genom* **39**: 628-633
- Διαμαντόπουλος Η. (2006) Αμπελογραφική περιγραφή 23 γηγενών και ξενικής προέλευσης ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera L.*). Μεταπτυχιακή μελέτη.
- Δρακόπουλος Γ. (2000) Αμπελογραφική περιγραφή ποικιλιών αμπέλου. Μεταπτυχιακή μελέτη.
- Ζαρμπούτης ΒΓ και Τσιβεριώτου ΑΜ (2003). Στοιχεία Αμπελουργίας και Οινολογίας. Εκδόσεις Ίων.
- Hocquigny A., Pelsy F, Dumas V., Kindt S., Helloir M.C. and Merdinoglu D., 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* 47: 579-589.
- Jean – Jaques I., Defontaine A. and Hallet J.N., 1993. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Vitis* 32: 189-190
- Κούσουλας Ι.Κ (1995) Αμπελουργία. Εκδοτική Αγροτεχνική.
- Κριμπάς Β., 1938. Σύστημα ταξινόμησης των εν Ελλάδι φυομένων ποικιλιών Αμπέλου της οиноφόρου. Αθήνα
- Κριμπάς Β., 1943. Ελληνική Αμπελογραφία, τ. Ι. Αθήναι.
- Loukas M., Stavrakakis M.N. and Krimbas C.B., 1983. Inheritance of polymorphic isoenzymes in grape cultivars. *The Journal of Heredity* 74: 181-183
- Μηνάς Ι. (1999) Μοριακή ταυτοποίηση καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς (*Olea Europe L.*) Κύπρου με RAPSS. Μεταπτυχιακή μελέτη.

- Μπινιάρη Κ., 2000. Ταυτοποίηση και έλεγχος γνησιότητας καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών μεθόδων (RAPD-PCR). Διδακτορική διατριβή.
- Μπινιάρη Α, Σταυρακάκης ΜΝ και Χατζόπουλος Π (1996). Ταυτοποίηση των ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) με την μέθοδο RAPD-PCR. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών 5. 17^η Πανελλήνια Επιστημονική Συνεδρίαση, Αθήνα, 22-24 Νοεμβρίου 1995. 372-378.
- Νταβίδης ΟΞ (1977). Ελληνική Αμπελουργία, Τόμος Α-Στοιχεία Γενικής Αμπελουργίας. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- Νταβίδης ΟΞ (1982). Ελληνική Αμπελολογία, Τόμος Γ-Στοιχεία Αμπελογραφίας. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- Reisch, B.I., Ye, G.N., Lamboy, W.F., Weeden, N.F., Pool, R.M. and Soylemezoglu, G., 1998. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis* (37): 33-38
- Σταυρακάκη Μαριτίνα (2008). Γενετική μελέτη Ποικιλιών Οινοποιίας (*Vitis vinifera* L.) με τη χρήση των μοριακών μεθόδων RAPDs και SSR.
- Σταυρακάκης ΜΝ (2004). Αμπελουργία iv-Γιδικά θέματα. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- Σταυρακάκης ΜΝ (2000). Γενική Αμπελουργία. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- Σταυρακάκης ΜΝ (2004). Ειδική Αμπελουργία-ΠΙ. Θέματα Αμπελογραφίας. Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- Σταυρακάκης, Μ.Ν., 1982. Η χρήση των ενζυμικών πολυμορφισμών στη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Διδακτορική Διατριβή.
- Σταυρακάκης, Μ.Ν., 1988. Συγκριτική μελέτη οκτώ ενζυμικών συστημάτων σε διάφορους "τύπους" Σουλτανίνας. Γεωργική Έρευνα 12:215-222
- Σταυρακάκης, Μ.Ν. και Μπινιάρη, Κ., 1998/99. Γενετική μελέτη της ποικιλίας αμπέλου Ροδίτης με τη βοήθεια μοριακών σημάτων. Αγροτική Έρευνα 22: 45-52.
- Σταυρακάκης, Μ.Ν., Μπινιάρη, Κ. και Σκιπητάρης, Γ., 1998/99. Μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας της ποικιλίας Φιλέρι (*Vitis vinifera* L.) με μοριακούς σηματοδότες. Αγροτική Έρευνα 22: 53-60.
- Stavarakakis, M.N. and Loukas, M., 1983. The between and within grape cultivars genetic variation. *Scientia Horticulturae* 19:321-334.
- Stavarakakis, M.N., Biniari, K. and Hatzopoulos, P. 1997. Identification and discrimination of eight Greek grape cultivars (*V. vinifera* L.) by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Vitis* 36(4) 175-178.
- Stavarakakis, M.N. and Biniari, K., 1998β. Genetic study of grape cultivars belonging to the Muscat family by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Vitis* 37(3): 119-122.
- Tessier C., David J., This P., Boursiquot J.M. and Charrier A., 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* (1999) 98: 171-177

- This P., Cuisset C. and Boursiquot J. M., (1997). Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 492-501.
- Thomas MR, Cain P and Scott NS (1994) DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* 25: 939-949.
- Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P. and Scott N.S., 1993. Repetitive DNA of grapevine classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 86: 173-180
- Tschammer J. and Zyprian E., 1994. Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling – type and of closely related Burgundies. *Vitis* 33: 249-250.