

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΟΠΟΪΑΣ (*Vitis vinifera* L.)
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ RAPDs ΚΑΙ SSR

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΑΡΙΤΙΝΑ Μ. ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2008

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΟΠΟΪΑΣ (*Vitis vinifera* L.) ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ RAPDs ΚΑΙ SSR

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΑΡΙΤΙΝΑ Μ. ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗ

Πενταμελής Επιτροπή

Αικ. Μπινιάρη, Λέκτορας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιβλέπουσα.

Μ. Κωμαΐτης, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος.

Σ. Γιαννιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών, Μέλος.

Μ. Χατζηδημητρίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών, Μέλος.

Χ. Συμινής, Λέκτορας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής μου μελέτης κα Αικ. Μπινιάρη, Λέκτορα του Γ.Π.Α., για την καθοδήγηση, τις γνώσεις, και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της πενταμελούς επιτροπής κ. Μ. Κωμαΐτη, Καθηγητή του Γ.Π.Α., κ. Σ. Γιαννιώτη, Αναπλ. Καθηγητή του Γ.Π.Α., κα Μ. Χατζηδημητρίου, Επίκ. Καθηγήτρια του Γ.Π.Α. και κ. Χ. Συμινή, Λέκτορα του Γ.Π.Α. για τη βοήθειά τους στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω το Διευθυντή του Εργαστηρίου Αμπελολογίας Καθηγητή κ. Μ. Ν. Σταυρακάκη και τους κ.κ. Κ. Ζαχαράκη και Γ. Παπαδάκη, καθώς και τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Αμπελολογίας και του Εργαστηρίου Οινολογίας για την πρόθυμη συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	2
Γενικά	3
1. Βιοχημικές Μέθοδοι	5
2. Μοριακές Μέθοδοι	6
α. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).	7
β. Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)	8
γ. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)	8
δ. Μικροδορυφορικό DNA ή SSR (Single Sequence Repeats)	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	11
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
1. Ποικιλίες	12
2. Συλλογή υλικού	25
3. Απομόνωση DNA	25
4. Υπολογισμός συγκέντρωσης του DNA	26
5. Εκκινητές	28
6. Συνθήκες ενίσχυσης (PCR)	30
7. Ηλεκτροφόρηση	32
8. Στατιστική ανάλυση	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
Αποτελέσματα	36
Α. RAPD Ανάλυση	36
1. Πολυμορφισμός εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν	36
2. Δείκτες (συντελεστές) γενετικής ομοιότητας των ποικιλιών	38
α. συντελεστής Simple Matching	38
β. συντελεστής Jaccard	38
γ. συντελεστής Dice	38

3. Συγκριτική μελέτη των ποικιλιών που μελετήθηκαν	45
B. SSR Ανάλυση	47
Συζήτηση	48
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την εργασία αυτή, επιχειρήθηκε η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας τόσο εντός όσο και μεταξύ 28 ποικιλιών (τύπων και παραλλαγών) οινοποιίας (γηγενών και ξενικής προέλευσης) με τη χρήση των μεθόδων της τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA (RAPD) και του μικροδορυφορικού DNA (SSR) μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Χρησιμοποιήθηκαν τριάντα εκκινητές για τη μέθοδο RAPD, οι οποίοι αποδείχτηκαν αρκετά πολυμορφικοί, και οκτώ εκκινητές για τη μέθοδο SSR, οι οποίοι έδειξαν χαμηλή ικανότητα διαχωρισμού με βάση τον αριθμό των ενισχυμένων προϊόντων που έδωσαν. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια τριών συντελεστών που αποδίδουν το βαθμό γενετικής ομοιότητας, προσδιορίστηκε ο βαθμός γενετικής ομοιότητας για κάθε δυνατό ζεύγος των ποικιλιών που μελετήθηκαν και σχηματίστηκαν τα αντίστοιχα δένδρογράμματα. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε συγκριτική αξιολόγηση των δύο παραπάνω μοριακών μεθόδων, ως προς την αποτελεσματικότητά τους για τη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι: α) η μέθοδος RAPD - PCR αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας, της ταυτοποίησης και διάκρισης των ποικιλιών αμπέλου που μελετήθηκαν, β) απαιτείται περαιτέρω έρευνα με τη χρήση περισσότερων εκκινητών για τη μέθοδο SSR ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά της, ιδιαίτερα για συγγενείς ποικιλίες, και να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα σε σύγκριση με τη μέθοδο RAPD - PCR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΓΕΝΙΚΑ

Το φυτό της αμπέλου στην άγρια μορφή του εμφανίστηκε πριν από 7.500 χρόνια περίπου ως αναρριχώμενος θάμνος τόσο σε δασικές όσο και σε παραποτάμιες περιοχές.

Η άμπελος η οينوφόρος (*Vitis vinifera* L.), που περιλαμβάνει το σύνολο σχεδόν των παραγωγικών ποικιλιών, καλλιεργείται σε όλα τα μήκη και τα πλάτη της γης. Ανήκει στο γένος *Vitis* το οποίο μαζί με άλλα δώδεκα γένη περιλαμβάνονται στην οικογένεια των *Vitaceae* ή *Ampellidaceae* (Galet, 1988). Κατά μία άποψη, μόνο στο είδος *V. vinifera* L. περιλαμβάνονται περισσότερες από 10.000 ποικιλίες (Alleweldt and Possingham, 1988) στις οποίες αντιστοιχούν περισσότερα από 24.000 ονόματα ή συνώνυμα ποικιλιών. Οι ελληνικές ποικιλίες αμπέλου φαίνεται ότι υπερβαίνουν τις 500 χωρίς να υπολογίζονται τα συνώνυμα, οι τύποι και οι παραλλαγές τους που ούτως ή άλλως αποτελούν και ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα (Κριμπάς, 1938, 1943).

Η ύπαρξη του μεγάλου αριθμού ποικιλιών του είδους *Vinifera* μπορεί να αποδοθεί : α) στο μεγάλο αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n=38$), καθώς και στον υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας που οδηγεί στον έντονο πολυμορφισμό, β) στη μακράιωνη καλλιέργεια της αμπέλου και στη μεγάλη γεωγραφική εξάπλωσή της, γ) στις συχνές μεταλλάξεις που παρατηρούνται με το πέρασμα των ετών και τέλος δ) στις φυσικές και τεχνητές διασταυρώσεις. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πλειονότητα των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου αποτελούν απλά ή πολλαπλά υβρίδια άλλων ποικιλιών (Loukas et al., 1983).

Επομένως, η ανάγκη της διάκρισης και ταυτοποίησης των ποικιλιών είναι μεγάλη. Ήδη από το 1777 όταν και ξεκίνησαν οι προσπάθειες αμπελογραφικής περιγραφής με σκοπό τη διάκριση και ταξινόμηση των ποικιλιών της αμπέλου, έχουν προταθεί περισσότερα από 100 συστήματα αμπελογραφικής ταξινόμησης, τα περισσότερα από τα οποία στηρίζονται σε μορφολογικούς χαρακτήρες της νεαρής βλάστησης, των νεαρών φύλλων,

των ώριμων φύλλων, των σταφυλιών, των ραγών, των μεσογονατίων διαστημάτων κ.ά.

Σήμερα, και μετά από την απόφαση του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (O.I.V.), για την αμπελογραφική περιγραφή και τη διάκριση των ειδών και των ποικιλιών αμπέλου, χρησιμοποιείται ο διεθνής κώδικας αμπελογραφικής περιγραφής του παραπάνω οργανισμού που περιλαμβάνει περισσότερους από 120 αμπελογραφικούς χαρακτήρες.

Τα διάφορα προβλήματα περιγραφής και διάκρισης των ποικιλιών *vinifera* εντείνονται, ιδιαίτερα στη χώρα μας, εξαιτίας της ύπαρξης των συνωνύμων (της απόδοσης, δηλαδή, διαφορετικών ποικιλιών με το ίδιο όνομα π.χ. Μαυρούδι που συχνά συνοδεύεται από κάποιο τοπωνύμιο ή της ύπαρξης πολλών ονομάτων για μια και την αυτή ποικιλία) καθώς και από την πολυκλωνικότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου, οι οποίες, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν απλά ή πολλαπλά υβρίδια τα οποία διατηρούν το γονότυπό τους μέσω του αγενή πολλαπλασιασμού.

Τις τελευταίες δεκαετίες, για τη διάκριση και ταυτοποίηση των ειδών και των ποικιλιών της αμπέλου, χρησιμοποιήθηκαν επικουρικά οι βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι. Οι βιοχημικές μέθοδοι αναφέρονται στη χρήση των ενζυμικών πολυμορφισμών οι οποίοι ανιχνεύονται ηλεκτροφορητικά. Από τη στιγμή που τα ένζυμα είναι άμεσα προϊόντα των γονιδίων, επιτρέπουν τον προσδιορισμό της γενετικής σύνθεσης του οργανισμού. Οι μοριακές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση των ενζύμων περιορισμού (RFLP), την ανάλυση της τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RAPD- PCR), καθώς και τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στις οποίες ανήκουν οι μικροδορυφόροι (ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, Simple sequences repeat SSR). Με τις μοριακές μεθόδους μελετάται κατευθείαν το γενετικό υλικό του οργανισμού και όχι τα προϊόντα μετάφρασής του.

Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι τόσο οι βιοχημικές όσο και οι μοριακές μέθοδοι δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τις μεθόδους της κλασικής και σύγχρονης Αμπελογραφίας και ιδίως την αμπελογραφική περιγραφή. Ο συνδυασμός, αντίθετα, της αμπελογραφικής μεθοδολογίας (Αμπελογραφική Περιγραφή, Συγκριτική Αμπελογραφία, Πειραματική Αμπελογραφία) με τις μοριακές μεθόδους μπορεί να αποβεί ο πλέον

αποτελεσματικός τρόπος για την επίλυση των προβλημάτων ταυτοποίησης και διάκρισης ιδιαίτερα προκειμένου περί συγγενικών ποικιλιών αμπέλου ή ακόμη των κλώνων.

1. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στις ισοενζυμικές τους μορφές, ο οποίος πραγματοποιείται με τις κατάλληλες ηλεκτροφορητικές τεχνικές, αποτέλεσε ένα σημαντικό τρόπο γενετικής σήμανσης, διάκρισης και ταυτοποίησης πολλών ειδών φυτών καθώς και της αμπέλου. Στην άμπελο, η μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1976 από τον Wolfe, ο οποίος χρησιμοποίησε ως ηλεκτροφορητικό υλικό τον χυμό των σταφυλιών, ενώ αργότερα (Σταυρακάκης, 1982) χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτροφορητικό υλικό η γύρη. Η γύρη παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα όπως αυτά της ευχέρειας της εκχύλισης, της επαναληπτικότητας των ηλεκτροφορικών φαινοτύπων, χωρίς βέβαια να λείπουν τα μειονεκτήματα (απλοειδής χαρακτήρας, δυσχέρειες συλλογής και διατήρησης κ.ά.).

Η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου απαιτεί την εκπλήρωση δύο προϋποθέσεων οι οποίες αποτελούν και περιοριστικούς παράγοντες για την εφαρμογή της. Η πρώτη προϋπόθεση είναι η απουσία γενετικής ποικιλομορφίας εντός των καλλιεργούμενων ποικιλιών και ταυτόχρονα γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών. Η δεύτερη προϋπόθεση είναι η σταθερότητα των ηλεκτροφορητικών ζωνών των υπό μελέτη ιστών. Με άλλα λόγια, γίνεται λόγος για ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές που παρατηρούνται στο ηλεκτροφόρημα με την αύξηση και την ανάπτυξη του ατόμου ή ανάλογα με το στάδιο και τις συνθήκες ανάπτυξης των ιστών, που αποτελούν περιοριστικό παράγοντα στην εφαρμογή της μεθόδου. Οι ποιοτικές αλλαγές αναφέρονται σε εξαφάνιση ηλεκτροφορητικών ζωνών ή εμφάνιση νέων, ενώ οι ποσοτικές αλλαγές αναφέρονται στο βαθμό και την ταχύτητα αντίδρασης των αλλοζύμων, που εκφράζονται σαν διαφορές στην ένταση εμφάνισης των ηλεκτροφορητικών ζωνών. Το πρόβλημα των

ποσοτικών και ποιοτικών αλλαγών μπορεί να παρακαμφθεί με τη χρήση της γύρης ως ηλεκτροφορητικού γενετικού υλικού.

Οι βιοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα για την ταυτοποίηση πολλών ειδών φυτών, μεταξύ των οποίων και η άμπελος. Με την περαιτέρω πρόοδο της τεχνολογίας, όμως, η εφαρμογή των ενζυμικών πολυμορφισμών περιορίστηκε σημαντικά κυρίως λόγω του ότι οι πρωτεΐνες - δείκτες, ως προϊόντα μετάφρασης των γονιδίων, επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και οι περιβαλλοντικές συνθήκες.

2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, αναπτύχθηκαν δείκτες οι οποίοι αναφέρονται απευθείας στο γενετικό υλικό και βασίζονται σε διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (βάσεων) των μορίων DNA που περιέχονται στα κύτταρα των οργανισμών.

Τέτοιου είδους μέθοδοι είναι η μέθοδος RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) και η μέθοδος της ανάλυσης RAPD - PCR (Random Amplified Polymorphic DNA). Πρόκειται για ανάλυση DNA - δεικτών οι οποίοι διαφέρουν συνήθως σε ένα νουκλεοτίδιο το οποίο τυχαίνει να δημιουργεί ή να καταστρέφει μια θέση περιορισμού, δηλαδή μια μικρή ακολουθία νουκλεοτιδίων στην οποία το μόριο DNA θραύεται από ένα εξειδικευμένο ένζυμο περιορισμού. Οι εν λόγω δείκτες δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, ούτε από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το φυτό και είναι σταθεροί για ένα δεδομένο γονότυπο. Επομένως, η χρησιμοποίηση τέτοιων δεικτών που βασίζονται στο DNA μπορούν να αποκαλύψουν πολυμορφισμό στο γενετικό υλικό.

α) Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).

Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού, δηλαδή βασίζεται στα κομμάτια DNA που προκύπτουν όταν ένζυμα περιορισμού δράσουν πάνω στο DNA ενός οργανισμού (περιοριστικές ενδονουκλεάσες). Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Τα κομμάτια που προκύπτουν από τη δράση αυτή των περιοριστικών ενζύμων τοποθετούνται για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των παραπάνω μορίων σε φίλτρα τα οποία υβριδίζουν με σημασμένους ανιχνευτές κατά Southern, οι οποίοι είναι ομόλογοι με την αλληλουχία που μελετάται. Ο υβριδισμός αυτός επιτρέπει την ανίχνευση τυχόν διαφορών στις αλληλουχίες του DNA, ανιχνεύοντας ουσιαστικά διαφορές στο μήκος των κομματιών του DNA.

Η μέθοδος RFLP περιλαμβάνει : 1) την εξαγωγή του DNA από φυτικά κύτταρα χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο για την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, 2) τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων που αναγνωρίζουν και κόβουν τις συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, η κατανομή των οποίων είναι εντελώς τυχαία κατά μήκος του γονιδιώματος, 3) την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και την εν συνεχεία χρώση του πηγματος με βρωμιούχο αιθίδιο ώστε να είναι ορατό υπό ακτινοβολία UV μικρού μήκους κύματος, 4) τη μεταφορά των κομματιών του DNA από το gel (πήγμα ή πηκτή) σε νάιλον μεμβράνη και την εν συνεχεία σήμανσή τους με ραδιενεργούς ανιχνευτές (Southern blotting) και τέλος 5) τον υβριδισμό.

Η μέθοδος RFLP προϋποθέτει μεγάλη ποσότητα διαθέσιμου DNA και αρκετούς συνδυασμούς ανιχνευτή και ενζύμου περιορισμού ώστε να βρεθεί πολυμορφισμός που να μπορεί να αξιοποιηθεί (Reisch et al., 1998). Η συγκεκριμένη προϋπόθεση σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι αναγκαία η γνώση της αλληλουχίας του DNA που αναζητείται, καθώς και η δυσχέρεια εφαρμογής της μεθόδου, οδήγησε σε μια περιορισμένη εφαρμογή της μεθόδου RFLP για τη διάκριση ποικιλιών αμπέλου (Bourquin et al., 1995, Bowers and Meredith, 1996.).

β) Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).

Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί υβριδισμό με ραδιενεργούς ανιχνευτές, αλλά στηρίζεται στην ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), επομένως βασίζεται στην ενίσχυση ενός τυχαίου τμήματος DNA με απλούς εκκινητές οι οποίοι έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σειρά. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ουσιαστικά πολλαπλασιάζει μια επιλεγμένη από τους εκκινητές αλληλουχία νουκλεοτιδίων με τη βοήθεια της *Taq* DNA πολυμεράσης.

Η μέθοδος RAPD περιλαμβάνει : 1) την εξαγωγή του DNA, 2) τη χρήση των εκκινητών (primers), 3) την ενίσχυση του DNA (PCR) και 4) την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Thomas et al., 1993).

Η μέθοδος RAPD σε σχέση με τη μέθοδο RFLP παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα : α) είναι πιο γρήγορη, β) χρειάζεται μικρότερη ποσότητα DNA, γ) παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία, καθώς είναι ικανή να ανιχνεύει ακόμα και αλλαγές ενός ζεύγους βάσεων στο γονιδιωματικό DNA και παρέχει δείκτες για όλο το γονιδιωματικό υλικό του οργανισμού. Όμως, απαιτείται αυστηρή εφαρμογή του πρωτοκόλλου της μεθόδου ώστε να διασφαλίζεται η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων αφού οι παραμικρές αλλαγές στις συγκεντρώσεις DNA, εκκινητών και πολυμεράσης, αλλά και των συνθηκών ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA να μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα (Μπινιάρη, 2000).

γ) Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP).

Η μέθοδος AFLP αποτελεί ουσιαστικά συνδυασμό των μεθόδων RAPD και RFLP και βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων DNA που έχουν παραχθεί από την πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού (Reisch et al., 1998, Fanizza et al., 2005).

δ) Μικροδορυφορικό DNA ή SSR (Single Sequence Repeats).

Οι μικροδορυφόροι ή SSR (επαναλήψεις αλληλουχίας) αποτελούνται από μια ειδική αλληλουχία μονομερών (βάσεων) του DNA. Η επαναλαμβανόμενη αυτή αλληλουχία στους μικροδορυφόρους είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα γονιδιώματα των φυτικών και των ζωικών οργανισμών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, ειδικά τα τελευταία χρόνια, η χρήση των μικροδορυφόρων για τη γενετική διάκριση και ταυτοποίηση ποικιλιών αμπέλου, να κερδίζει συνεχώς έδαφος σε σχέση με τη χρήση των RFLP και RAPD.

Αυτές οι μοναδικές θέσεις - δείκτες χαρακτηρίζονται από μεγάλη μεταβλητότητα, από επαναληψιμότητα και από το μενδελιακό τρόπο κληρονομικότητας. Τα παραπάνω, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι μικροδορυφόροι παρουσιάζουν μεγάλη ετεροζυγωτία, έχουν ως αποτέλεσμα ο γενετικός πολυμορφισμός τους να είναι πολύ μεγάλος και έτσι να δίνουν πολλές φορές μοναδικά αποτελέσματα καταλήγοντας σε ένα ξεχωριστό αλληλομορφικό προφίλ ικανό να ξεχωρίσει τις ποικιλίες.

Στην εργασία αυτή, επιχειρήθηκε η διάκριση ομάδων συγγενών ποικιλιών με τη χρήση συνδυασμού των μεθόδων της τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού (γονιδιωματικού) DNA που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RAPD - PCR) και του μικροδορυφορικού DNA (SSR). Με τον τρόπο αυτό αφενός μεν θα ταυτοποιηθούν ποικιλίες συγγενείς μεταξύ των με δύο διαφορετικές μεθόδους, αφετέρου, τηρουμένων ορισμένων προϋποθέσεων, θα γίνει και μία συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων αυτών.

Η μέθοδος RAPD-PCR αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο για τη γενετική μελέτη των ποικιλιών, των τύπων και των παραλλαγών της αμπέλου και έχει εφαρμοστεί με εξαιρετικά αποτελέσματα για τη μελέτη και διάκριση μεγάλου αριθμού φυτικών ειδών. Με τη μέθοδο RAPD - PCR έχουν γίνει σειρά εργασιών για την ταυτοποίηση και διάκριση των ειδών και ποικιλιών του γένους *Vitis* σε ολόκληρο τον κόσμο (Jean - Jaques et al., 1993, Tschammer and Zyprian, 1994, This et al. 1997 Crespan and Milani, 2001).

Στην Ελλάδα, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για τη διάκριση ποικιλιών της Κρήτης (Stavrakakis et al. 1997) και ακολούθησαν

ερευνητικές εργασίες που αφορούσαν τη γενετική μελέτη, διάκριση και ταυτοποίηση των σημαντικότερων ποικιλιών αμπέλου (Μπινιάρη, 2000) ή ομάδων συγγενών ποικιλιών όπως ο Ροδίτης (Σταυρακάκης και Μπινιάρη, 1998/99α), τα Μοσχάτα (Stavrakakis and Biniari, 1998β), τα Φιλέρια (Σταυρακάκης κ.α. 1998/99) κ.ά.

Πρόσφατα άρχισε να εφαρμόζεται και η μέθοδος των μικροδορυφόρων (SSR) για τη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου (Vignan et al. 1996, Lin and Walker, 1998, Filippetti et al., 1999, Labra et al, 2001). Η μέθοδος θεωρείται αρκετά αποτελεσματική αν και εκφράστηκαν ορισμένες επιφυλάξεις για την αποτελεσματικότητα ανίχνευσης γενετικής ποικιλομορφίας εντός της καλλιεργούμενης ποικιλίας ή τη διάκριση κλώνων μιας ποικιλίας. Ερευνητικές εργασίες με τη χρήση των μικροδορυφόρων πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διάκριση ελληνικών ποικιλιών αμπέλου και στην Ελλάδα (Αναγνωστόπουλος, 2003, Αβαγιαννέλη, 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Στον πίνακα 1 φαίνονται οι ποικιλίες που μελετήθηκαν και οι περιοχές δειγματοληψίας, ενώ για μεθοδολογικούς σκοπούς θεωρήθηκε ότι όλες οι ποικιλίες που μελετήθηκαν αποτελούν ξεχωριστές ποικιλίες.

Πίνακας 1 : Ποικιλίες που μελετήθηκαν και περιοχές δειγματοληψίας.

α/α	Ποικιλίες	Περιοχή δειγματοληψίας
1.	Σκυλοπνίχτης Λευκός	Λυκόβρυση
2.	Σκυλοπνίχτης Μαύρος (Ερυθρός 1)	Λυκόβρυση
3.	Σκυλοπνίχτης (Ερυθρός 2)	Κεφαλονιά
4.	Σκυλοπνίχτης (Ερυθρός 3)	Βοτανικός (Γ11)
5.	Σκυλοπνίχτης (Ερυθρός 4)	Πύργος (B2 Δ42)
6.	Σκυλόκλημα	Λυκόβρυση (Γ16 R110)
7.	Λημνιό	Λυκόβρυση (Δ9 R110)
8.	Λημνιώνα	Λυκόβρυση (Δ15 R110)
9.	Gewürztraminer 1	Λυκόβρυση (Αγγ.)
10.	Gewürztraminer 2	Βοτανικός
11.	Mourvedre	Λυκόβρυση (B25 83)
12.	Pinot Noir	Λυκόβρυση (B17 Αγγ.)
13.	Pinot Meunier	Λυκόβρυση (B42 83)
14.	Pinot Gris	Λυκόβρυση (B39 83)
15.	Pinot Blanc	Λυκόβρυση (B23 83)
16.	Μαυροδάφνη	Ληξούρι, Κεφαλονιά
17.	Μαυροδάφνη 8/6	Πάτρα
18.	Μαυροδάφνη	Λυκόβρυση (B28 83)
19.	Χονδρομαυροδάφνη	Κεφαλονιά

20.	Μαυροδάφνη αγίγαρτη	Πάτρα
21.	Ρενιώ	Πάτρα
22.	Φιλέρι Τριπόλεως	Λυκόβρυση (B12)
23.	Μοσχοφίλερο Β19	Μαντινεία
24.	Μοσχοφίλερο 7/6	Μαντινεία
25.	Φιλέρι Α22	Βοτανικός
26.	Βόσσος 1	Λυκόβρυση (B3 83)
27.	Βόσσος 2	Λαγόποδο, Ζάκυνθος
28.	Θηνιάτικο	Κεφαλονιά

Για τις ποικιλίες αυτές, έχουν πραγματοποιηθεί αμπελογραφικές περιγραφές (Κριμπάς, 1943, Σταυρακάκης, 2008) από τις οποίες, για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν οι αμπελογραφικοί χαρακτήρες της αυξανόμενης κορυφής της νεαρής βλάστησης, του αναπτυγμένου φύλλου, της σταφυλής και της ράγας. Παρακάτω παρατίθενται τα δεδομένα της αμπελογραφικής περιγραφής. Να σημειωθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις τα δείγματα ορισμένων ποικιλιών (π.χ. Μαυροδάφνη) που συλλέχθηκαν από διάφορες αμπελουργικές περιοχές ή αμπελουργικές συλλογές, δεν περιγράφονται ξεχωριστά, γιατί δεν αποκλίνουν από την τυπική ποικιλία, όπως έχει προσδιοριστεί.

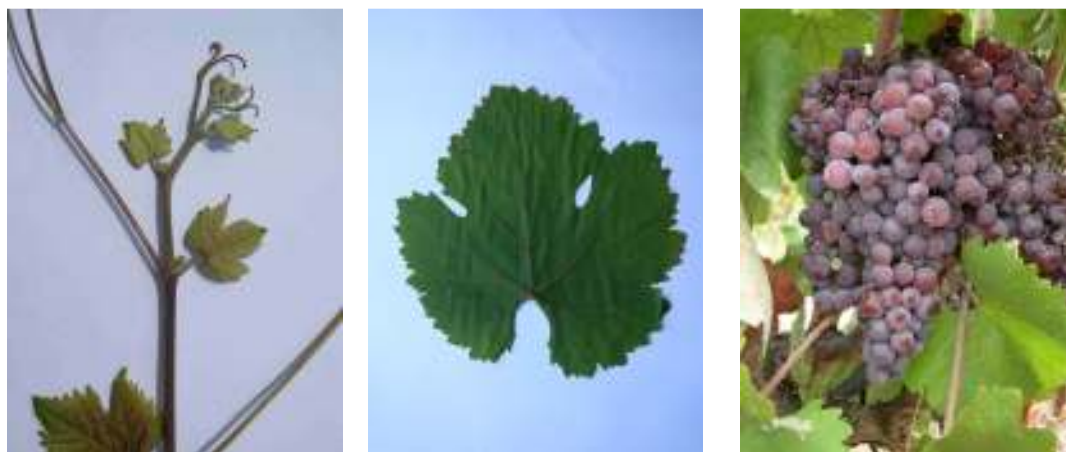
1. ΟΜΑΔΑ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ «ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ»

α. Σκυλοπνίχτης Λευκός

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λεία προς αραχνοϋφής
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, σφηνοειδές, πεπλατυσμένο, πεντάλοβο, ανοικτοπράσινο και κατά τόπους αραχνοϋφές στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος κλειστός με διασταυρούμενες πλευρές, σχήματος V
- *σταφυλή*: μέτρια, κυλινδροκωνική, πυκνή ράγα μέτρια, ελλειψοειδής, ωχροπράσινη

β. Σκυλοπνίχτης Μαύρος (Ερυθρός1)

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λεία προς αραχνοϋφής
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, σφηνοειδές, πεπλατυσμένο, πεντάλοβο, ανοικτοπράσινο και κατά τόπους αραχνοϋφές στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος κλειστός με διασταυρούμενες πλευρές, σχήματος V
- *σταφυλή*: μέτρια, κυλινδροκωνική, πυκνή· ράγα μέτρια, ελλειψοειδής, ερυθρομελανή έως μελανή



Εικ.1 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Σκυλοπνίχτης Μαύρος

γ. Σκυλοπνίχτης (Ερυθρός 2, Κεφαλονιά) (όπως Σκυλοπνίχτης Μαύρος)

δ. Σκυλοπνίχτης (Ερυθρός 3, Βοτανικός) (όπως Σκυλοπνίχτης Μαύρος)

ε. Σκυλοπνίχτης (Ερυθρός 4, Πύργος) (όπως Σκυλοπνίχτης Μαύρος)

2. Σκυλόκλημα

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, αραχνοϋφής προς βαμβακώδης
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, στρογγυλό, πεντάλοβο, πομφολυγώδες, βαθυπράσινο και βαμβακώδες στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος κλειστός, σχήματος λύρας
- *σταφυλή*: μέτρια, κωνική έως πτερυγωτή· ράγα μέτρια, σφαιρική, ωχροπράσινη έως κίτρινη

3. Λημνιό

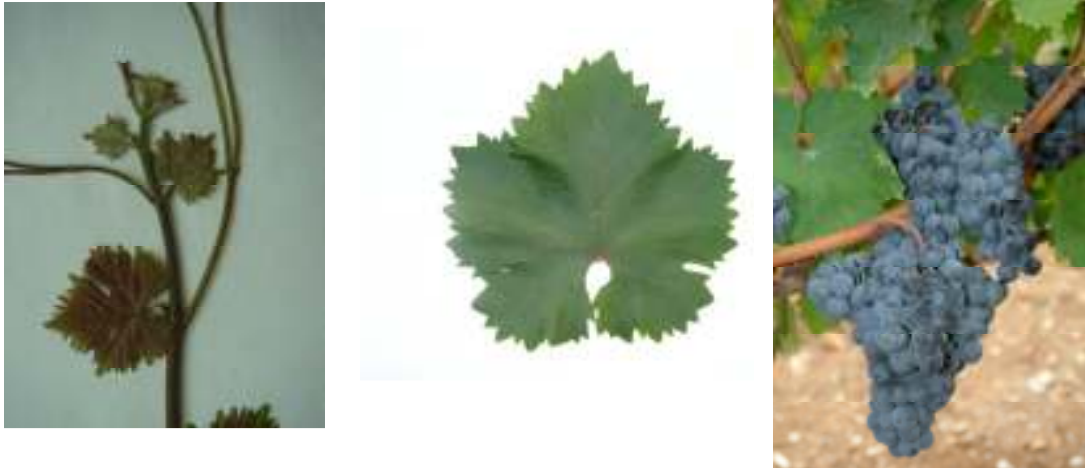
- *αυξανόμενη κορυφή*: μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, χαλκόχροη έως ερυθρωπή, βαμβακώδης
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, σφηνοειδές, πεντάκολπο, βαθύκολπο, ελαφρά πομφολυγώδες, βαθυπράσινο, χνοώδες και κατά τόπους αραχνοϋφές στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος κλειστός, μεγάλου βάθους, σχήματος U ή λύρας με λοβούς ασύμμετρους που επικαλύπτονται και σχηματίζουν χαρακτηριστική οπή.
- *σταφυλή*: μέτρια, απλή ενίοτε διπλή (πτερυγωτή), κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, πυκνή έως πολύ πυκνή, με ανισομεγέθεις και ανομοιόμορφου χρώματος ράγες· ράγα μέτρια, σφαιρική έως δισκοειδής, ερυθροϊώδης έως ερυθρομελανή



Εικ.2 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Λημνιό

4. Λημνιώνα

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοιχτή, πράσινη με ερυθρή παρυφή, αραχνοϋφής έως χνοώδης
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο έως μεγάλο, κυκλικό, συμμετρικό, πλήρες, ανοικτοπράσινο στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος ανοικτός σε σχήμα U με ελαφρά συγκλίνοντα χείλη
- *σταφυλή*: μέτρια έως μεγάλη, απλή, κωνική, συχνά με ακανόνιστο σχήμα και πτερυγώσεις, πυκνή με ανισομεγέθεις ράγες· ράγα μέτρια, σφαιρική έως ελαφρά ελλειψοειδής, κυανομελανή



Εικ.3 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Λημιώνα

5. Gewürztraminer

- *αυξανόμενη κορυφή* : ανοιχτή, βαμβακώδης, με ρόδινη ή πορφυρή παρυφή
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μικρό έως μέτριο, κυκλικό, πλήρες ή τρίκολπο, πομφολυγώδες, πράσινο, χνοώδες στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος κλειστός σχήματος V με συγκλίνοντα ή επικαλυπτόμενα χείλη
- *σταφυλή*: μικρή, κυλινδρική, ενίοτε πτερυγωτή, κανονικής πυκνότητας έως πυκνή ῥάγα μικρή, ωσειδής με ρόδινο έως ελαφρά πορφυρό χρώμα



Εικ.4 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Gewürztraminer

6. Mourvedre

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, βαμβακώδης με ρόδινες αποχρώσεις στην παρυφή
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, κυκλικό έως κόλουρο, πλήρες, χνοώδες στην κάτω επιφάνεια, ανοικτοπράσινο, μισχικός κόλπος ανοικτός σε σχήμα λύρας ή U
- *σταφυλή*: μέτρια, κωνική ενίοτε πτερυγωτή (οι δύο πρώτες διακλαδώσεις της σταφυλής είναι πολύ αναπτυγμένες δίνοντας συχνά σχήμα σταυρού), πυκνή ᾿ράγα μικρή, σφαιρική, μελανή έως ερυθρομέλανη



Εικ.5 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Mourvedre

7. ΟΜΑΔΑ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ «PINOT»

α. Pinot noir

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λευκή, χνοώδης έως βαμβακώδης, με ρόδινα στίγματα στην παρυφή
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, κυκλικό, πλήρες ή ολόκληρο ή ελαφρά τρίκολπο με αβαθείς κόλπους, ανοικτοπράσινο στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος σε σχήμα λύρας με συγκλίνοντα χείλη
- *σταφυλή*: μικρή, κυλινδρική, ενίοτε πτερυγωτή, πολύ πυκνή, ώστε να προκαλείται αλλοίωση του σχήματος των ραγών ᾿ράγα μικρή, σφαιρική, ελαφρά ωοειδής, κυανομέλανη



Εικ.6 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Pinot noir

β. Pinot Meunier

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοιχτή, κιτρινοπράσινη, με ρόδινα στίγματα στην παρυφή, χνοώδης στην άνω επιφάνεια, βαμβακώδης στην κάτω επιφάνεια
- *αναπτυγμένο φύλλο*: τρίκολπο, με αβαθείς κόλπους, βαθυπράσινο στην άνω επιφάνεια, ελαφρά πομφολυγώδες, μισχικός κόλπος σχήματος U
- *σταφυλή*: όμοιοι αμπελογραφικοί χαρακτήρες με Pinot noir



Εικ.7 Αυξανόμενη κορυφή και σταφυλή της ποικιλίας Pinot Meunier

γ. Pinot Gris

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, κιτρινοπράσινη, με ρόδινα στίγματα στην παρυφή, αραχνούφης στην κάτω επιφάνεια
- *αναπτυγμένο φύλλο*: κυκλικό, πλήρες, βαθυπράσινο στην άνω επιφάνεια, ελαφρά πομφολυγώδες, ανοικτοπράσινο και λείο στην κάτω επιφάνεια, μισικός κόλπος σχήματος V
- *σταφυλή*: όμοιοι αμπελογραφικοί χαρακτήρες με Pinot noir



Εικ.8 Αυξανόμενη κορυφή και φύλλο της ποικιλίας Pinot gris

δ. Pinot Blanc

- *αυξανόμενη κορυφή*: όμοιοι αμπελογραφικοί χαρακτήρες με Pinot noir
- *αναπτυγμένο φύλλο*: όμοιοι αμπελογραφικοί χαρακτήρες με Pinot noir
- *σταφυλή*: κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, πυκνή έως πολύ πυκνή, ράγα κιτρινοπράσινη



Εικ. 9 Σταφυλή και φύλλο της ποικιλίας Pinot blanc

8. ΟΜΑΔΑ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ «ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ»

α. Μαυροδάφνη τυπική (Τσιγκέλα - Πάτρα)

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λευκή, βαμβακώδης, άνω επιφάνεια αχνοπράσινη με πράσινες χνοώδεις νευρώσεις
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μεγάλο, κυκλικό προς σφηνοειδές, πεντάκολπο, λείο, πράσινο στην άνω επιφάνεια, χνοώδες στην κάτω επιφάνεια, μισοκός κόλπος βαθύς με κλειστό V με αναδιπλούμενα χείλη
- *σταφυλή*: σφαιρική ἴραγα με ανθηρότητα, κυανομελανή



Εικ.10 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Μαυροδάφνη

β. Μαυροδάφνη Ληξουρίου (όπως τυπική)

γ. Μαυροδάφνη Λυκόβρυσης (όπως τυπική)

δ. Χονδρομαυροδάφνη (όπως τυπική)

ε. Μαυροδάφνη αγίαρτη (όπως τυπική)

9. Ρενιώ

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λευκοπράσινη
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο έως μεγάλο (αλλά μικρότερο της Μαυροδάφνης), σφηνοειδές, πεντάκολπο προς ολόκληρο, χνοώδες έως βαμβακώδες με πράσινες, χνοώδεις νευρώσεις στην κάτω επιφάνεια, μισοκός κόλπος ερυθρός πάνω και κάτω, ανοικτό V
- *σταφυλή*: μέτρια έως μεγάλη, κυλινδρική (ενίοτε πτερυγωτή), κανονικής πυκνότητας έως αραιή (πιο αραιή από εκείνη της Μαυροδάφνης), ενίοτε εμφανίζει ανισορραγία ἴραγα μέτρια (μεγαλύτερη από εκείνη της Μαυροδάφνης), σφαιρική, ερυθρομελανή



Εικ.11 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Ρενιώ

10. ΟΜΑΔΑ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ «ΦΙΛΕΡΙΑ»

α. Μοσχοφίλερο Β19

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, βαμβακώδης με ελαφρά ρόδινη παρυφή
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μεγάλο έως πολύ μεγάλο, πλήρες ή τρίκολπο, πομφολυγώδες σφηνοειδές, λείο ή αραχνούφες και σχεδόν βαθυπράσινο στην άνω επιφάνεια, βαμβακώδες έως χνοώδες και ανοικτοπράσινο στην κάτω επιφάνεια, μισικός κόλπος συνήθως σχήματος U, ενίοτε λύρας με επικαλυπτόμενα χείλη.
- *σταφυλή*: συνήθως μεγάλη, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική ἄραγα μέτρια, σφαιρική, ερυθροϊώδης



Εικ.12 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Μοσχοφίλερο

β. Φιλέρι Τριπόλεως

- *αυξανόμενη κορυφή*: μετρίως ανοικτή έως ανοικτή, πράσινη ή πρασινέρυθρη με ρόδινη παρυφή, αραχνοϋφής
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μεγάλο, κόλουρο, πεντάκολπο, ανοικτοπράσινο και αραχνοϋφές στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος σχήματος λύρας ή V με επικαλυπτόμενα τα χείλη των λοβών
- *σταφυλή*: μεγάλη, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική, μετρίως πυκνή· ράγα σφαιρική, μεγάλη, ερυθροϊώδης

γ. Μοσχοφίλερο 7/6 (Ξανθοφίλερο)

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, βαμβακώδης
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μεγάλο έως πολύ μεγάλο, τρίκολπο ή πεντάκολπο, πομφολυγώδες, λείο στην άνω επιφάνεια, χνοώδες στην κάτω επιφάνεια. μισχικός κόλπος σχήματος V ή λύρας
- *σταφυλή*: μέτρια έως μεγάλη, κυλινδροκωνική, πυκνή· ράγα σφαιρική, μέτρια, ρόδινη έως ξανθωπή



Εικ.13 Σταφυλή της ποικιλίας Ξανθοφίλερο

11. Βόσσος Λυκόβρυσης

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λεία
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, σχεδόν πεντάκολπο, παχύ, βαθυπράσινο και έντονα βαμβακώδες στην κάτω επιφάνεια, μισχικός κόλπος ανοιχτός σχήματος U ή λύρας
- *σταφυλή*: μεγάλη, πυραμιδοειδής, πυκνή· ράγα μέτρια, σφαιρική, λευκοπράσινη



Εικ.14 Αυξανόμενη κορυφή, φύλλο και σταφυλή της ποικιλίας Βόσσος

12. Βόσσος Κεφαλονιάς

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λεία
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, δερματώδες, πομφολυγώδες, πεντάλοβο, κάτω κόλποι αβαθείς, μισχικός κόλπος κλειστός σχήματος V προς U, ελαφρά ρόδινος στα νεύρα κοντά στο μισχικό σημείο
- *σταφυλή*: μικρή, ανεπτυγμένη η πρώτη διακλάδωση· ράγα στρογγυλή, ελαφρώς πεπλατισμένη, λευκοπράσινη έως κιτρινωπή

13. Θηνιάτικο

- *αυξανόμενη κορυφή*: ανοικτή, λεία έως αραχνοϋφής
- *αναπτυγμένο φύλλο*: μέτριο, τρίλοβο με αβαθείς τους άνω κόλπους, μισχικός κόλπος σχήματος U πολύ ανοικτό
- *σταφυλή*: μικρή, κανονική ᾿ράγα κανονική, κιτρινιπράσινη



Εικ. 15 Φύλλο της ποικιλίας Θηνιάτικο

Η επισήμανση των παραπάνω ποικιλιών έγινε όπως φαίνεται στον πίν.1 στις διάφορες αμπελουργικές περιοχές της Ελλάδας, στο πλαίσιο ερευνητικού προγράμματος του Εργαστηρίου Αμπελολογίας.

2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΥΛΙΚΟΥ

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 εξαγώμενου 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 βαθιάς κατάψυξης (-80°C).

3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ 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 επωάστηκε στους

37°C για 45 λεπτά, με συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, προστέθηκε ίσος όγκος (2,5 ml) διαλύματος κλωροφορμίου/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.

4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ 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 (συγκέντρωση) = Αραίωση x Ένδειξη (στα 260 nm) x 50 μg/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 1,04 και 1,70.

Οι συγκεντρώσεις και η καθαρότητα του DNA φαίνονται στον πίν. 2.

Πίνακας 2 : Ποικιλίες, συγκεντρώσεις και καθαρότητα του DNA.

α/α	Ποικιλίες	Απορρόφηση		C ng/μl	260nm/280nm
		280 nm	260 nm		
1.	Σκυλοπνίχτης Λευκός	0,017	0,019	95	1,11
2.	Σκυλοπνίχτης Μαύρος	0,017	0,028	140	1,64
3.	Σκυλοπνίχτης Κεφαλονιά	0,075	0,114	570	1,52
4.	Σκυλοπνίχτης Βοτανικός	0,137	0,195	975	1,42
5.	Σκυλοπνίχτης Πύργος	0,153	0,180	900	1,17
6.	Σκυλόκλημα	0,102	0,111	555	1,08
7.	Λημνιό	0,126	0,144	720	1,14
8.	Λημνιώνα	0,074	0,077	385	1,04
9.	Gewürztraminer Λυκόβρυ	0,061	0,082	410	1,34
10.	Gewürztraminer Βοτανικ	0,061	0,083	415	1,36
11.	Mourvedre	0,072	0,097	485	1,34
12.	Pinot Noir	0,188	0,316	1580	1,68
13.	Pinot Meunier	0,045	0,050	250	1,11
14.	Pinot Gris	0,132	0,205	1025	1,55
15.	Pinot Blanc	0,185	0,303	1515	1,63
16.	Μαυροδάφνη Ληξούρι	0,049	0,051	255	1,04
17.	Μαυροδάφνη 8/6	0,069	0,093	465	1,34
18.	Μαυροδάφνη Λυκόβρυση	0,047	0,063	315	1,34
19.	Χονδρομαυροδάφνη	0,039	0,051	255	1,30
20.	Μαυροδάφνη αγίγαρτη	0,072	0,095	475	1,31
21.	Ρενιώ	0,035	0,048	240	1,37
22.	Φιλέρι Τριπόλεως	0,028	0,040	200	1,42
23.	Μοσχοφίλερο Β19	0,105	0,179	895	1,70
24.	Μοσχοφίλερο 7/6	0,076	0,126	630	1,65
25.	Φιλέρι Α22	0,088	0,141	705	1,60
26.	Βόσσοσ Λυκόβρυση	0,048	0,068	340	1,41
27.	Βόσσοσ Λαγόποδο	0,042	0,056	280	1,33
28.	Θηνιάτικο	0,074	0,116	580	1,56

5. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

α. RAPD

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, δώδεκα εκκινητές από το kit F της Operon, δώδεκα εκκινητές από το kit M της Operon, ένας εκκινητής από το Kit E της Operon και ένας εκκινητής από το kit Q της Operon.

Οι εκκινητές και η αλληλουχία τους φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αλληλουχία των βάσεων.

Εκκινητής (primer)	Αλληλουχία 5' → 3'
1224	CAGGCCCTTC
1225	AGGTGACCGT
1226	CGCAGGATGG
1227	GTGTGCCCCA
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-07	CCGATATCCC
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-09	CCAAGCTTCC
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-11	TTGGTACCCC
OPF-12	ACGGTACCAG

OPF-13	GGCTGCAGAA
OPF-14	TGCTGCAGGT
OPM-02	ACAACGCCTC
OPM-03	GGGGGATGAG
OPM-04	GGCGGTTGTC
OPM-07	CCGTGACTCA
OPM-08	TCTGTTCCCC
OPM-09	GTCTTGCGGA
OPM-11	GTCCACTGTG
OPM-12	GGGACGTTGG
OPM-13	GGTGGTCAAG
OPM-14	AGGGTCGTTC
OPM-15	GACCTACCAC
OPM-16	GTAACCAGCC
OPE-04	GTGACATGCC
OPQ-01	GGGACGATGG

B. SSR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA σε όλες τις ποικιλίες ήταν ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία προήλθαν από την Operon Technologies Inc. Europe, MGW - Biotech AG. Κατά τη διάρκεια της εργασίας δοκιμάστηκαν διάφοροι εκκινητές εκ των οποίων επιλέχθηκαν τελικά οι οκτώ. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και η αλληλουχία τους φαίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αλληλουχία των βάσεων και η θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε εκκινητή.

Εκκινητής (primer)	Αλληλουχία 5' → 3'	Θερμοκρασία υβριδισμού
VVMD25 [F]	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG	56,0 °C
VVMD25 [R]	TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	
ssrVrZAG79 [F]	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	50,0 °C
ssrVrZAG79 [R]	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	
VVS4 [F]	CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC	55.6 °C
VVS4 [R]	CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	56.7 °C
VVMD7 [F]	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	52,0 °C
VVMD7 [R]	CGAACCTTCACACGCTTGAT	
VVS29 [F]	CCCCAAGGCTCTGAAAACAAT	52,0 °C
VVS29 [R]	TGCAAAGCAAATAAAGCTTCC	
VVMD27 [F]	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	56 °C
VVMD27 [R]	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	
VVMD5 [F]	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	56 °C
VVMD5 [R]	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	
VVMD26 [F]	GAGACGACTGGTGACATTGAGC	56 °C
VVMD26 [R]	CCATCACCACCATTTCTACTGC	

6. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ (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), 50 ng 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 erpendorf (0,2 ml) για τον θερμικό εναλλάκτη. Στο κάθε δείγμα προστέθηκαν 60 ng 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 Cyclor 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. Για τη μέθοδο του μικροδορυφορικού DNA (SSR) οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν : 1 κύκλος για 5 λεπτά στους 94°C, 35 κύκλοι από 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό στη θερμοκρασία στην οποία υβριδίζει η κάθε φάση ζεύγους του εκκινήτη, 1,5 λεπτά στους 72°C και τέλος 1 κύκλος για 10 λεπτά στους 72°C . Ο χρόνος που χρειαζόταν για να ενισχυθεί το DNA και στις δύο περιπτώσεις ήταν περίπου 4 ώρες.

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 για τα RAPD και ανάλογα με τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινήτων για τα SSR) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινήτων με την αλληλουχία του DNA (καθώς οι εκκινήτες 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 για τη μέθοδο RAPD και σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για τη μέθοδο SSR. Ειδικότερα για τη μέθοδο SSR, πριν την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, τα δείγματα

θερμαίνονταν στους 94°C για 3 λεπτά, για καλύτερη αποδιάταξη. Προσθήκη φορμαμιδίου δε γινόταν.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

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.

Για τη μέθοδο του μικροδορυφορικού DNA (SSR), ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων, 20μl από κάθε δείγμα έγινε με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 10% (29 acrylamide : 1 N,N'-Methylene-bis-acrylamide), 7M Urea, το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TBE (Trizma base, Boric acid, 0,5 M EDTA), 0,4% Ammonium Persulfate (10%) και 0,036% TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine), ενώ η χρώση του DNA έγινε με 2 μεθόδους: με βρωμιούχο αιθίδιο και με νιτρικό άργυρο (Silver Stain). Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 13 cm x 12 cm και πάχους 2 mm και η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 160 Volt σταθερά με διάρκεια 3-4 ώρες.

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

8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος NT-SYSTEM-rc 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 :

$$Sm = n / m+n$$

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

m ο αριθμός των μη κοινών ζωνών των x 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 δένδρογράμματα, 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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. RAPD-ανάλυση

1. Πολυμορφισμός εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

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

α. Εκκινητές με υψηλό πολυμορφισμό.

Υψηλό βαθμό πολυμορφισμού (πάνω από 15 ηλεκτροφορητικές ζώνες) εμφάνισαν οι εκκινητές:

1224, 1225, 1226 (από το ITE - IMBB)

OPF-04, OPF-09, OPF-10, OPF-14 (από το kit F της Operon)

OPM-03, OPM-04, OPM-07, OPM-13, OPM-14, OPM-15, OPM-16 (από το kit M της Operon)

OPQ-01 (από το kit Q της Operon)

β. Εκκινητές με μέτριο πολυμορφισμό.

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

OPF-02, OPF-03, OPF-07, OPF-13, (από το kit F της Operon)

OPM-09, OPM-11, OPM-12 (από το kit M της Operon)

OPE-04 (από το kit E της Operon)

γ. Εκκινητές με χαμηλό πολυμορφισμό.

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

1227 (από το ITE - IMBB)

OPF-01, OPF-08, OPF-11, OPF-12 (από το kit F της Operon)

OPM-02, OPM-08 (από το kit M της Operon)

Πίνακας 5 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και αριθμός των ενισχυμένων προϊόντων.

Εκκινητής (primer)	Αριθμός ενισχυμένων προϊόντων
1224	15
1225	17
1226	18
1227	8
OPF-01	9
OPF-02	13
OPF-03	11
OPF-04	18
OPF-07	11
OPF-08	6
OPF-09	18
OPF-10	16
OPF-11	8
OPF-12	10
OPF-13	13
OPF-14	22
OPM-02	9
OPM-03	15
OPM-04	18
OPM-07	15
OPM-08	10
OPM-09	13
OPM-11	14
OPM-12	13
OPM-13	17
OPM-14	15
OPM-15	20
OPM-16	16
OPE-04	13
OPQ-01	16

2. 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:

α. συντελεστής Simple matching

Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν, με βάση το συντελεστή Simple Matching δίνεται στον Πίν. 6, ενώ το αντίστοιχο δενδρόγραμμα φαίνεται στην Εικ. 16.

Από τον Πίν. 6 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 0,68 έως 0,97.

β. συντελεστής Jaccard

Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν, με βάση το συντελεστή Jaccard (J) δίνεται στον Πίν. 7, ενώ το αντίστοιχο δενδρόγραμμα φαίνεται στην Εικ. 17.

Από τον Πίν. 7 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 0,64 έως 0,97.

γ. συντελεστής Dice

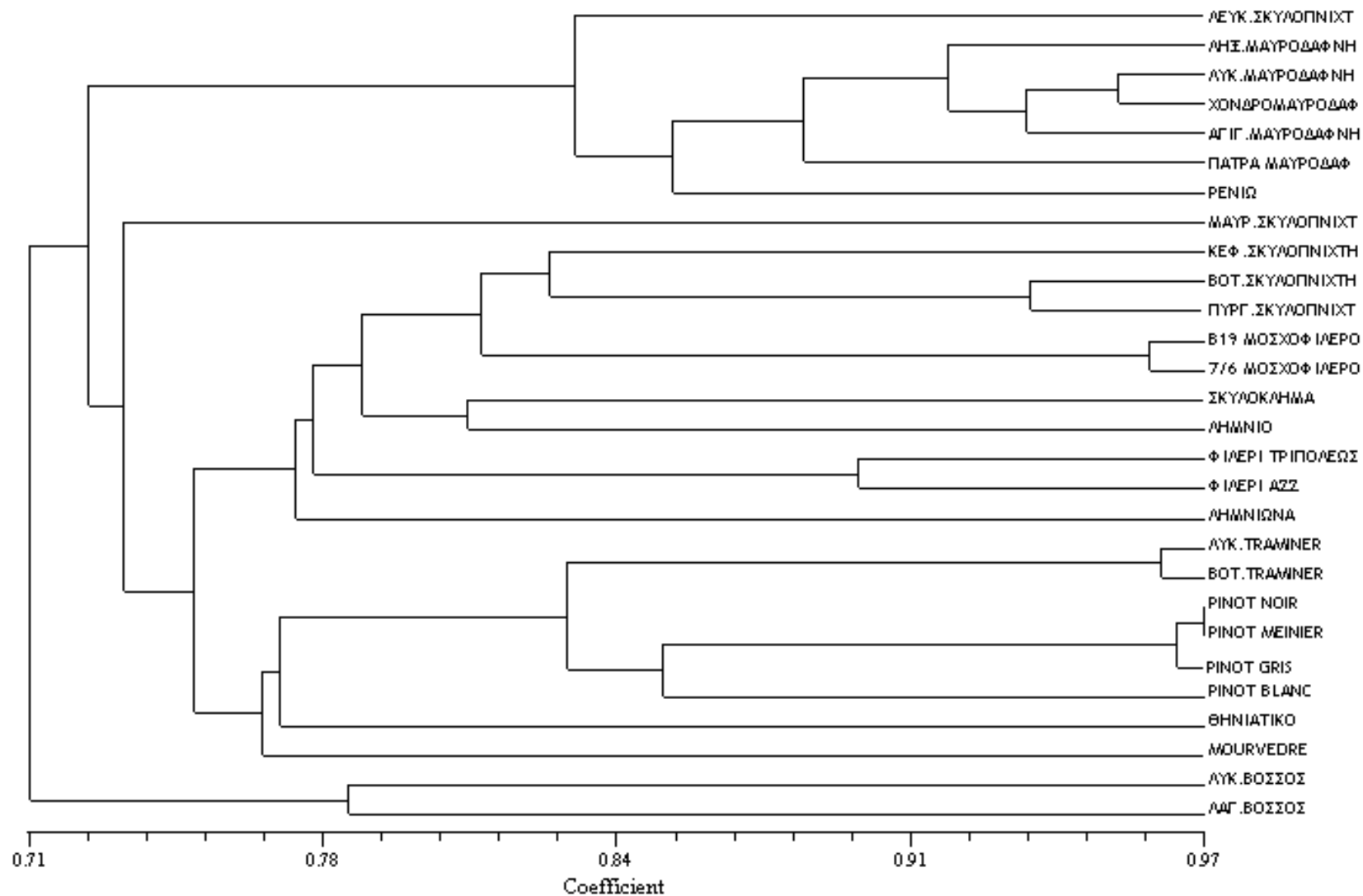
Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν, με βάση το συντελεστή Dice (D) δίνεται στον Πίν. 8, και το αντίστοιχο δενδρόγραμμα φαίνεται στην Εικ. 18.

Από τον Πίν. 8 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 0,78 έως 0,98.

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

	ΛΕΥΚΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	ΜΑΥΡΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΚΕΦ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΒΟΤ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΠΥΡ	ΣΚΥΛΟΚΛΗΜΑ	ΛΗΜΝΙΟ	ΛΙΜΝΙΩΝΑ	TRAMINER ΛΥΚ	TRAMINER ΒΟΤ	ΜΟΥΡΒΕΔΡΕ	PINOT_NOIR	PINOT_MEUNIER	PINOT_GRIS	PINOT_BLANC	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΞ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΚ	ΧΟΝΔΡΟΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΑΓΙΓ	ΡΕΝΙΩ	ΦΙΛΕΡΙ ΤΡΙΠΟΛΕΩΣ	ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ Β19	ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ 7/6	ΦΙΛΕΡΙ Α22	ΒΟΣΣΟΣ ΛΥΚ	ΒΟΣΣΟΣ ΛΑΓΟΠΟΔΟ	ΘΗΝΙΑΤΙΚΟ	
ΛΕΥΚΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	1.00																												
ΜΑΥΡΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	0.78	1.00																											
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΚΕΦ	0.73	0.75	1.00																										
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΒΟΤ	0.74	0.73	0.84	1.00																									
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΠΥΡ	0.74	0.73	0.82	0.94	1.00																								
ΣΚΥΛΟΚΛΗΜΑ	0.74	0.76	0.79	0.79	0.80	1.00																							
ΛΗΜΝΙΟ	0.76	0.76	0.82	0.80	0.81	0.81	1.00																						
ΛΙΜΝΙΩΝΑ	0.72	0.74	0.79	0.79	0.79	0.77	0.80	1.00																					
TRAMINER ΛΥΚ	0.69	0.71	0.75	0.76	0.74	0.72	0.75	0.75	1.00																				
TRAMINER ΒΟΤ	0.69	0.70	0.75	0.77	0.75	0.73	0.72	0.73	0.96	1.00																			
ΜΟΥΡΒΕΔΡΕ	0.75	0.76	0.78	0.76	0.76	0.75	0.76	0.76	0.77	0.76	1.00																		
PINOT_NOIR	0.69	0.73	0.78	0.76	0.76	0.76	0.73	0.73	0.83	0.85	0.76	1.00																	
PINOT_MEUNIER	0.69	0.72	0.77	0.77	0.76	0.75	0.72	0.72	0.84	0.86	0.76	0.97	1.00																
PINOT_GRIS	0.69	0.73	0.78	0.76	0.75	0.76	0.73	0.74	0.84	0.86	0.76	0.96	0.97	1.00															
PINOT_BLANC	0.69	0.71	0.78	0.76	0.76	0.75	0.73	0.74	0.79	0.79	0.78	0.85	0.86	0.85	1.00														
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΞ	0.83	0.71	0.71	0.73	0.73	0.72	0.74	0.72	0.70	0.71	0.70	0.71	0.71	0.71	0.72	1.00													
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑ	0.84	0.72	0.70	0.73	0.73	0.72	0.73	0.69	0.70	0.70	0.70	0.68	0.67	0.68	0.70	0.88	1.00												
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΚ	0.84	0.72	0.73	0.75	0.76	0.75	0.75	0.72	0.72	0.73	0.72	0.73	0.73	0.75	0.74	0.92	0.88	1.00											
ΧΟΝΔΡΟΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ	0.85	0.73	0.74	0.76	0.76	0.77	0.76	0.73	0.72	0.72	0.73	0.74	0.74	0.75	0.74	0.92	0.88	0.95	1.00										
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΑΓΙΓ	0.85	0.71	0.72	0.73	0.73	0.74	0.75	0.73	0.71	0.70	0.71	0.69	0.69	0.71	0.71	0.91	0.90	0.93	0.94	1.00									
ΡΕΝΙΩ	0.79	0.74	0.72	0.75	0.75	0.76	0.76	0.74	0.71	0.71	0.73	0.71	0.71	0.72	0.74	0.85	0.82	0.86	0.88	0.87	1.00								
ΦΙΛΕΡΙ ΤΡΙΠΟΛΕΩΣ	0.74	0.76	0.78	0.80	0.79	0.77	0.78	0.77	0.75	0.75	0.78	0.75	0.75	0.75	0.76	0.73	0.72	0.76	0.77	0.76	0.79	1.00							
ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ Β19	0.74	0.72	0.80	0.81	0.82	0.76	0.78	0.74	0.75	0.74	0.73	0.73	0.72	0.73	0.76	0.73	0.71	0.77	0.76	0.74	0.75	0.78	1.00						
ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ 7/6	0.73	0.72	0.81	0.82	0.83	0.76	0.78	0.75	0.74	0.74	0.73	0.74	0.73	0.75	0.76	0.72	0.71	0.75	0.76	0.73	0.74	0.74	0.96	1.00					
ΦΙΛΕΡΙ Α22	0.71	0.74	0.78	0.77	0.77	0.76	0.76	0.76	0.74	0.73	0.76	0.75	0.75	0.75	0.76	0.71	0.71	0.74	0.75	0.73	0.74	0.90	0.79	0.78	1.00				
ΒΟΣΣΟΣ ΛΥΚ	0.71	0.71	0.72	0.73	0.71	0.72	0.73	0.73	0.74	0.71	0.75	0.71	0.70	0.71	0.71	0.69	0.73	0.71	0.70	0.73	0.72	0.73	0.72	0.71	0.74	1.00			
ΒΟΣΣΟΣ ΛΑΓΟΠΟΔΟ	0.71	0.72	0.69	0.71	0.71	0.70	0.71	0.74	0.70	0.69	0.71	0.70	0.70	0.71	0.71	0.71	0.73	0.69	0.69	0.71	0.70	0.70	0.69	0.69	0.70	0.78	1.00		
ΘΗΝΙΑΤΙΚΟ	0.68	0.74	0.77	0.78	0.77	0.75	0.73	0.72	0.74	0.75	0.76	0.79	0.78	0.79	0.77	0.71	0.70	0.73	0.74	0.71	0.73	0.75	0.78	0.76	0.77	0.76	0.74	1.00	

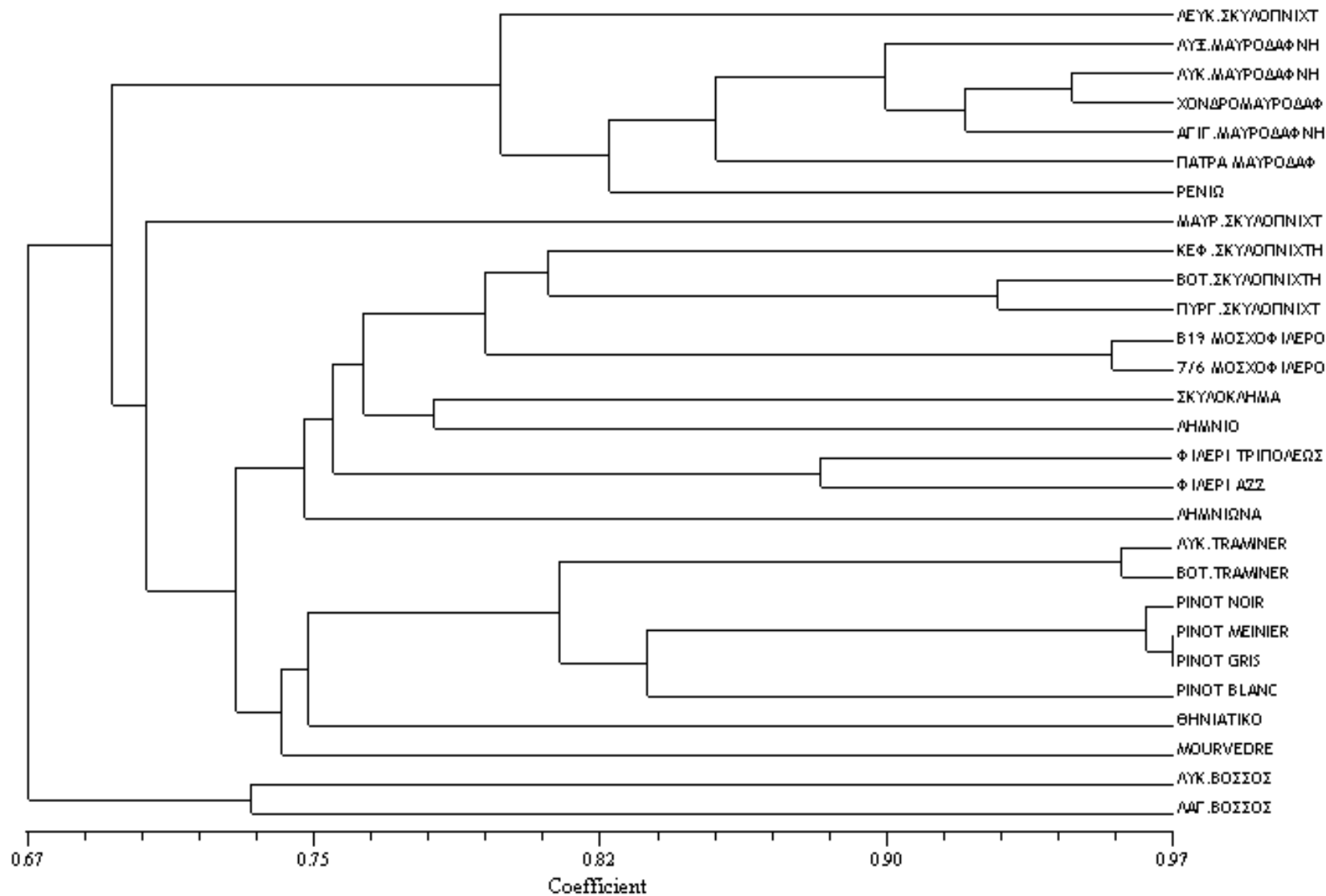
Εικόνα 16 : Δενδρόγραμμα των ποικιλιών που μελετήθηκαν με βάση το συντελεστή Simple Matching.



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

	ΛΕΥΚΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	ΜΑΥΡΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΚΕΦ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΒΟΤ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΠΥΡ	ΣΚΥΛΟΚΑΗΜΑ	ΛΗΜΝΙΟ	ΛΙΜΝΙΩΝΑ	TRAMINER ΛΥΚ	TRAMINER ΒΟΤ	MOURVEDRE	PINOT_NOIR	PINOT_MEUNIER	PINOT_GRIS	PINOT_BLANC	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΞ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΚ	ΧΟΝΔΡΟΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΑΓΙΓ	ΡΕΝΙΩ	ΦΙΛΕΡΙ ΤΡΙΠΟΛΕΩΣ	ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ Β19	ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ 7/6	ΦΙΛΕΡΙ Α22	ΒΟΣΣΟΣ ΛΥΚ	ΒΟΣΣΟΣ ΛΑΓΟΠΟΔΟ	ΘΗΝΙΑΤΙΚΟ	
ΛΕΥΚΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	1.00																												
ΜΑΥΡΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	0.73	1.00																											
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΚΕΦ	0.69	0.72	1.00																										
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΒΟΤ	0.70	0.71	0.82	1.00																									
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΠΥΡ	0.71	0.71	0.80	0.92	1.00																								
ΣΚΥΛΟΚΑΗΜΑ	0.70	0.72	0.77	0.77	0.78	1.00																							
ΛΗΜΝΙΟ	0.71	0.73	0.79	0.77	0.78	0.78	1.00																						
ΛΙΜΝΙΩΝΑ	0.68	0.71	0.77	0.76	0.76	0.74	0.77	1.00																					
TRAMINER ΛΥΚ	0.66	0.68	0.73	0.73	0.72	0.70	0.72	0.72	1.00																				
TRAMINER ΒΟΤ	0.66	0.67	0.73	0.75	0.73	0.71	0.70	0.71	0.96	1.00																			
MOURVEDRE	0.71	0.72	0.76	0.73	0.74	0.72	0.73	0.73	0.74	0.74	1.00																		
PINOT_NOIR	0.66	0.70	0.76	0.75	0.74	0.73	0.71	0.71	0.81	0.83	0.74	1.00																	
PINOT_MEUNIER	0.66	0.70	0.76	0.75	0.74	0.73	0.70	0.70	0.82	0.84	0.74	0.97	1.00																
PINOT_GRIS	0.67	0.70	0.76	0.75	0.74	0.74	0.71	0.72	0.82	0.84	0.74	0.95	0.97	1.00															
PINOT_BLANC	0.66	0.68	0.76	0.74	0.74	0.72	0.70	0.71	0.76	0.77	0.75	0.83	0.84	0.83	1.00														
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΞ	0.79	0.67	0.68	0.70	0.71	0.69	0.70	0.68	0.67	0.68	0.67	0.69	0.69	0.69	0.69	1.00													
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑ	0.80	0.68	0.67	0.69	0.70	0.68	0.68	0.65	0.66	0.66	0.65	0.65	0.64	0.65	0.66	0.85	1.00												
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΚ	0.80	0.69	0.70	0.72	0.73	0.72	0.72	0.69	0.70	0.70	0.69	0.71	0.71	0.72	0.71	0.89	0.85	1.00											
ΧΟΝΔΡΟΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ	0.82	0.70	0.72	0.73	0.74	0.74	0.73	0.70	0.70	0.70	0.70	0.72	0.72	0.73	0.72	0.90	0.84	0.94	1.00										
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΑΓΙΓ	0.81	0.67	0.69	0.70	0.70	0.70	0.71	0.70	0.67	0.67	0.68	0.67	0.67	0.68	0.68	0.89	0.86	0.91	0.92	1.00									
ΡΕΝΙΩ	0.75	0.70	0.69	0.72	0.72	0.73	0.73	0.71	0.68	0.68	0.70	0.69	0.69	0.70	0.71	0.82	0.77	0.83	0.85	0.84	1.00								
ΦΙΛΕΡΙ ΤΡΙΠΟΛΕΩΣ	0.71	0.73	0.75	0.77	0.77	0.75	0.75	0.74	0.72	0.73	0.75	0.73	0.73	0.73	0.74	0.70	0.68	0.73	0.75	0.73	0.76	1.00							
ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ Β19	0.71	0.69	0.77	0.79	0.80	0.73	0.75	0.72	0.73	0.72	0.71	0.72	0.71	0.72	0.74	0.70	0.68	0.74	0.74	0.71	0.72	0.76	1.00						
ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ 7/6	0.70	0.69	0.78	0.79	0.81	0.73	0.75	0.72	0.71	0.71	0.70	0.72	0.71	0.73	0.74	0.69	0.67	0.72	0.73	0.69	0.71	0.74	0.95	1.00					
ΦΙΛΕΡΙ Α22	0.68	0.71	0.76	0.75	0.75	0.74	0.73	0.73	0.71	0.71	0.74	0.74	0.73	0.74	0.74	0.69	0.67	0.71	0.73	0.70	0.71	0.88	0.76	0.75	1.00				
ΒΟΣΣΟΣ ΛΥΚ	0.66	0.66	0.68	0.70	0.67	0.68	0.68	0.69	0.70	0.67	0.71	0.68	0.67	0.69	0.67	0.65	0.67	0.67	0.66	0.68	0.68	0.69	0.69	0.68	0.70	1.00			
ΒΟΣΣΟΣ ΛΑΓΟΠΟΔΟ	0.66	0.67	0.66	0.68	0.68	0.66	0.67	0.69	0.66	0.66	0.67	0.67	0.67	0.68	0.67	0.67	0.67	0.65	0.65	0.66	0.66	0.66	0.65	0.66	0.67	0.73	1.00		
ΘΗΝΙΑΤΙΚΟ	0.65	0.71	0.75	0.76	0.75	0.72	0.70	0.69	0.72	0.72	0.73	0.77	0.76	0.77	0.74	0.68	0.66	0.71	0.71	0.68	0.70	0.73	0.75	0.73	0.75	0.73	0.70	0.73	1.00

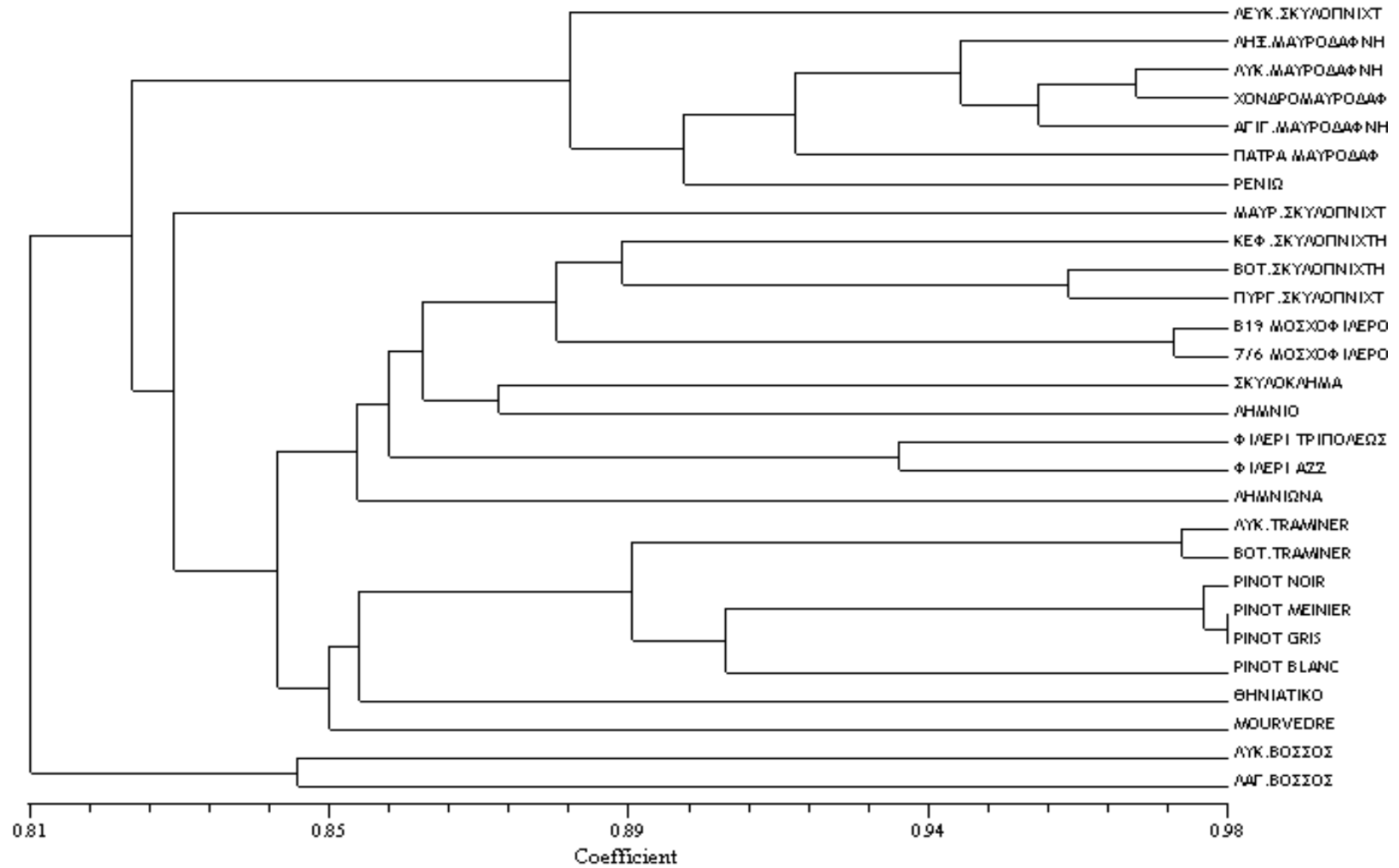
Εικόνα 17 : Δενδρόγραμμα των ποικιλιών που μελετήθηκαν με βάση το συντελεστή Jaccard.



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

	ΛΕΥΚΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	ΜΑΥΡΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΚΕΦ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΒΟΤ	ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΠΥΡ	ΣΚΥΛΟΚΛΗΜΑ	ΛΗΜΝΙΟ	ΛΙΜΝΙΩΝΑ	TRAMINER ΛΥΚ	TRAMINER ΒΟΤ	ΜΟΥRVEDRE	PINOT_NOIR	PINOT_MEUNIER	PINOT_GRIΣ	PINOT_BLANC	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΞ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΚ	ΧΟΝΔΡΟΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ	ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΑΓΙΓ	ΡΕΝΙΩ	ΦΙΛΕΡΙ ΤΡΙΠΟΛΕΩΣ	ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ Β19	ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ 7/6	ΦΙΛΕΡΙ Α22	ΒΟΣΣΟΣ ΛΥΚ	ΒΟΣΣΟΣ ΛΑΓΟΠΟΔΟ	ΘΗΝΙΑΤΙΚΟ	
ΛΕΥΚΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	1.00																												
ΜΑΥΡΟΣ ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ	0.85	1.00																											
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΚΕΦ	0.82	0.84	1.00																										
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΒΟΤ	0.83	0.83	0.90	1.00																									
ΣΚΥΛΟΠΝΙΧΤΗΣ ΠΥΡ	0.83	0.83	0.89	0.96	1.00																								
ΣΚΥΛΟΚΛΗΜΑ	0.82	0.84	0.87	0.87	0.87	1.00																							
ΛΗΜΝΙΟ	0.83	0.84	0.89	0.87	0.88	0.88	1.00																						
ΛΙΜΝΙΩΝΑ	0.81	0.83	0.87	0.87	0.87	0.85	0.87	1.00																					
TRAMINER ΛΥΚ	0.79	0.81	0.84	0.85	0.84	0.82	0.83	0.84	1.00																				
TRAMINER ΒΟΤ	0.79	0.81	0.84	0.85	0.84	0.83	0.82	0.83	0.98	1.00																			
ΜΟΥRVEDRE	0.83	0.84	0.86	0.84	0.85	0.84	0.84	0.84	0.85	0.85	1.00																		
PINOT_NOIR	0.80	0.83	0.86	0.85	0.85	0.85	0.83	0.83	0.89	0.90	0.85	1.00																	
PINOT_MEUNIER	0.80	0.82	0.86	0.86	0.85	0.85	0.82	0.83	0.90	0.91	0.85	0.98	1.00																
PINOT_GRIΣ	0.80	0.83	0.87	0.86	0.85	0.85	0.83	0.84	0.90	0.91	0.85	0.98	0.98	1.00															
PINOT_BLANC	0.79	0.81	0.86	0.85	0.85	0.84	0.83	0.83	0.86	0.87	0.86	0.91	0.91	0.91	1.00														
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΞ	0.88	0.80	0.81	0.82	0.83	0.82	0.83	0.81	0.81	0.81	0.80	0.81	0.81	0.82	0.82	1.00													
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΠΑΤΡΑ	0.89	0.81	0.80	0.82	0.82	0.81	0.81	0.79	0.80	0.80	0.79	0.78	0.78	0.79	0.79	0.92	1.00												
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΛΥΚ	0.89	0.82	0.83	0.84	0.85	0.83	0.84	0.82	0.82	0.82	0.82	0.83	0.83	0.84	0.83	0.94	0.92	1.00											
ΧΟΝΔΡΟΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ	0.90	0.82	0.84	0.85	0.85	0.85	0.84	0.83	0.82	0.82	0.83	0.84	0.83	0.84	0.84	0.95	0.91	0.97	1.00										
ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗ ΑΓΙΓ	0.89	0.80	0.82	0.83	0.82	0.83	0.83	0.82	0.80	0.80	0.81	0.80	0.80	0.81	0.81	0.94	0.93	0.95	0.96	1.00									
ΡΕΝΙΩ	0.86	0.83	0.82	0.84	0.84	0.84	0.84	0.83	0.81	0.81	0.82	0.82	0.81	0.83	0.83	0.90	0.87	0.91	0.92	0.91	1.00								
ΦΙΛΕΡΙ ΤΡΙΠΟΛΕΩΣ	0.83	0.85	0.86	0.87	0.87	0.86	0.86	0.85	0.84	0.84	0.86	0.85	0.84	0.85	0.85	0.82	0.81	0.84	0.85	0.84	0.87	1.00							
ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ Β19	0.83	0.82	0.87	0.88	0.89	0.84	0.86	0.84	0.84	0.84	0.83	0.83	0.83	0.84	0.85	0.82	0.81	0.85	0.85	0.83	0.84	0.86	1.00						
ΜΟΣΧΟΦΙΛΕΡΟ 7/6	0.82	0.82	0.88	0.88	0.90	0.84	0.85	0.84	0.83	0.83	0.83	0.84	0.83	0.84	0.85	0.82	0.80	0.84	0.84	0.82	0.83	0.85	0.98	1.00					
ΦΙΛΕΡΙ Α22	0.81	0.83	0.86	0.86	0.86	0.85	0.84	0.84	0.83	0.83	0.85	0.85	0.84	0.85	0.85	0.81	0.80	0.83	0.84	0.82	0.83	0.94	0.87	0.86	1.00				
ΒΟΣΣΟΣ ΛΥΚ	0.80	0.80	0.81	0.82	0.81	0.81	0.81	0.81	0.82	0.81	0.83	0.81	0.81	0.81	0.81	0.79	0.81	0.81	0.80	0.81	0.81	0.82	0.81	0.81	0.82	1.00			
ΒΟΣΣΟΣ ΛΑΓΟΠΟΔΟ	0.80	0.80	0.79	0.81	0.81	0.80	0.80	0.82	0.80	0.79	0.80	0.80	0.80	0.81	0.80	0.80	0.80	0.79	0.79	0.80	0.79	0.80	0.79	0.79	0.80	0.85	1.00		
ΘΗΝΙΑΤΙΚΟ	0.79	0.83	0.85	0.86	0.86	0.84	0.82	0.82	0.83	0.84	0.84	0.87	0.87	0.87	0.85	0.81	0.80	0.83	0.83	0.81	0.82	0.84	0.86	0.85	0.85	0.84	0.84	0.83	1.00

Εικόνα 18 : Δενδρόγραμμα των ποικιλιών που μελετήθηκαν με βάση το συντελεστή Dice.



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 των μεθόδων της Αμπελογραφικής Περιγραφής και της RAPD - PCR (η μέθοδος SSR δεν έδωσε, όπως αναφέρθηκε, πολυμορφικούς εκκινητές σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιτρέπει την αποτελεσματική διάκριση των ποικιλιών, τουλάχιστον για τα δείγματα και τους εκκινητές που μελετήθηκαν).

3. Συγκριτική μελέτη των ποικιλιών που μελετήθηκαν

Πιο αναλυτικά, σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική μελέτη των παρακάτω ποικιλιών ή ομάδων ποικιλιών:

α. Λημνιό και Λημνιώνα. Τα αποτελέσματα της RAPD ανάλυσης επιβεβαίωσαν τις αμπελογραφικές περιγραφές (Κριμπάς 1938, Σταυρακάκης 2008), ότι δηλαδή, παρά τον σχετικά υψηλό β.γ.ο. ($I=0,80$) η ποικιλία Λημνιώνα είναι διαφορετική από την ποικιλία Λημνιό. Βέβαια η περαιτέρω έρευνα περισσότερων βιότυπων θα συμβάλλει στην πλήρη διελεύκανση του θέματος.

β. Ομάδα ποικιλιών με το γενικό όνομα «Σκυλοπνίχτης»

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 μελετήθηκαν πέντε από διάφορες περιοχές της χώρας, μία λευκή και τέσσερις ερυθρές καθώς και η ισπανικής προελεύσεως ποικιλία Mourvedre, που καλλιεργείται στις περιοχές πλησίον των πόλεων Murviedro (Βαλέντσια) και Mataró (Καταλωνία) της Ισπανίας όπου κατά μία άποψη μεταφέρθηκε από τους Φοίνικες τον 5^ο π.Χ.. Η ποικιλία είναι γνωστή και ως *estrangle-chien* («dog-strangler») που παραπέμπει στην ελληνική ονομασία Σκυλοπνίχτης. Όλες αυτές οι ποικιλίες παρουσιάζουν γενετικό δείκτη ομοιότητας από $I=0,73$ έως $I=0,94$. Πιο συγκεκριμένα, ο σχετικά χαμηλός δείκτης γενετικής ομοιότητας μεταξύ των παραλλαγών του ερυθρού Σκυλοπνίχτη και της ποικιλίας Mourvedre, δε φαίνεται να επιβεβαιώνει την άποψη για την εξ ανατολών προέλευση της παλαιάς αυτής ποικιλίας. Επίσης ο σχετικά χαμηλός δείκτης γενετικής

ομοιότητας μεταξύ των παραλλαγών του ερυθρού Σκυλοπνίκτη και του λευκού Σκυλοπνίκτη δε συνηγορεί ότι πρόκειται για χρωματικές παραλλαγές που διαφοροποιήθηκαν από την ίδια, αρχική, ποικιλία με τη συσσώρευση μεταλλάξεων. Τέλος ο πολύ υψηλός δείκτης ($I=0,94$) μεταξύ δειγμάτων 3 και 4 (Σκυλοπνίκτης από Βοτανικό και Σκυλοπνίκτης από Πύργο) δείχνει ότι πρόκειται περί στενά συγγενών ποικιλιών.

γ. Gewurztraminer - Traminer

Οι δύο φαινότυποι που μελετήθηκαν έδειξαν πολύ υψηλό δείκτη ομοιότητας ($I=0.96$) που δείχνει ότι πρόκειται για την ίδια ποικιλία.

δ. Ομάδα Pinot

Η ομάδα αυτή των ποικιλιών με βασική την Pinot noir, από τις πιο παλαιές ποικιλίες της Δυτικής Ευρώπης, χαρακτηρίζεται από τη διαφοροποίηση τους ως προς ορισμένους αμπελογραφικούς χαρακτήρες (π.χ. κνοασμός αυξανόμενης κορυφής, νεαρού βλαστού κ.ά.) αλλά έρευνες με τη χρήση μοριακών μεθόδων (Bowers et al., 1996) δεν αποκάλυψαν γενετική ετερογένεια. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε σχετική διαφοροποίηση μόνο της ποικιλίας Pinot blanc ($I=085$) ενώ οι λοιπές παρουσίασαν πολύ υψηλό δείκτη ($I=0.96$), όχι όμως ταυτότητα. Αυτό σε σχέση με τις εργασίες που αναφέρθηκαν μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά δείγματα που μελετήθηκαν, δεδομένης και της πολυκλωνικότητας των ποικιλιών.

ε. Μαυροδάφνη και Ρενιώ.

Διαπιστώθηκε ότι μεταξύ της τυπικής Μαυροδάφνης (Τσιγκέλα) που καλλιεργείται στο ν. Αχαΐας και των υπόλοιπων βιότυπων ή παραλλαγών (Κεφαλονιάς, Αγίγερτη, Χονδρομαυροδάφνη) υπάρχει υψηλός δείκτης γενετικής ομοιότητας όχι όμως ταυτότητα. Η αγίγερτη Μαυροδάφνη που εντοπίστηκε στο ν. Αχαΐας σε αμπελώνες της τυπικής Μαυροδάφνης παρουσιάζει υψηλό βαθμό γενετικής ομοιότητας που επιτρέπει την διατύπωση της υπόθεσης ότι πιθανόν να προέρχεται από γενετική μετάλλαξη. Αντίθετα η Ρενιώ θα πρέπει να θεωρείται διαφορετική της τυπικής ποικιλίας Μαυροδάφνη η οποία διαφοροποιήθηκε με τη συσσώρευση μεταλλάξεων. Η ίδια υπόθεση θα μπορούσε να ισχύει και για τους βιότυπους της Χονδρομαυροδάφνης και της αγίγερτης με τη Ρενιώ.

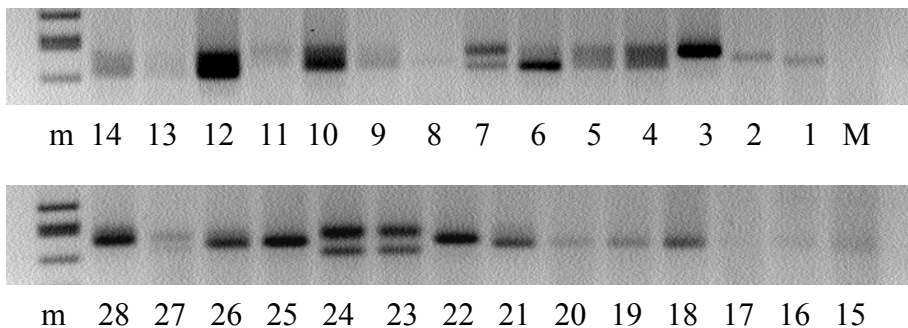
στ. Ομάδα Φιλέρια

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν προηγούμενη εργασία (Σταυρακάκης κ.α., 1998/99) ότι δηλαδή το Ξανθοφίλερο αποτελεί κλώνο ή παραλλαγή της ποικιλίας Μοσχοφίλερο που όμως διαφέρουν από την ποικιλία Φιλέρι Τριπόλεως.

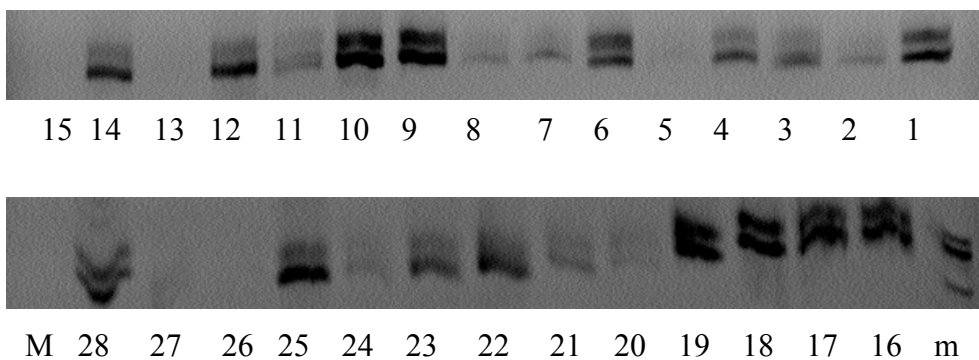
B. SSR-Ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε τα SSR δεν έδωσαν πολυμορφικά πρότυπα (όπως φαίνεται ενδεικτικά στις Εικ.19 και Εικ. 20) που να συμβάλλουν αποτελεσματικά στη διάκριση των ποικιλιών που μελετήθηκαν, τουλάχιστον στην παρούσα φάση της εργασίας. Είναι βέβαια δυνατή η διάκριση κάποιων ποικιλιών, αλλά τα αποτελέσματα είναι φτωχά σε σχέση με τα RAPDs.

Εικ.19 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή *ssrVrZAG7*



Εικ.20 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή *VVMD25*



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναμενόταν με βάση τις αμπελογραφικές περιγραφές που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε γενετική ετερογένεια μεταξύ των περισσότερων ποικιλιών που μελετήθηκαν με τη μέθοδο RAPD-PCR. Σημαντικά όμως είναι τα ευρήματα προκειμένου για τους τύπους, τα συνώνυμα και τις παραλλαγές της ποικιλίας Μαυροδάφνη αλλά και η διαφοροποίηση της Pinot blanc σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες της ομάδας ποικιλιών Pinot.

Για την τυπική ποικιλία Μαυροδάφνη, γνωστής και ως τσιγκέλα, στις αμπελουργικές περιοχές της Αχαΐας (αποτελεί το κύριο κέντρο καλλιέργειας της ποικιλίας), οι αμπελογραφικές περιγραφές και οι καλλιεργητικές ιδιότητες (Κριμπάς 1943, Νταβίδης 1982, Σταυρακάκης 2008) δεν παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις. Αν και ο δείκτης γενετικής ομοιότητας είναι πολύ υψηλός φαίνεται ότι υπάρχει γενετική διαφοροποίηση. Η αγίγαρτη παραλλαγή που έχει εντοπιστεί στην αμπελουργική περιοχή πλησίον των Λουσικών του νομού Αχαΐας από τον κ.Μαυραγάνη (2005, προσωπική επικοινωνία) μάλλον πρόκειται για σωματική μετάλλαξη αν και ο δείκτης γενετικής ομοιότητας είναι σχετικά χαμηλός ώστε να διατυπωθεί η υπόθεση αυτή. Τέλος, οι αμπελογραφικές φυσιολογικές διαφορές της τυπικής ποικιλίας Μαυροδάφνη με την παραλλαγή Ρενιώ μάλλον επιβεβαιώνονται από τη χρήση των μοριακών μεθόδων αφού ο δείκτης γενετικής ομοιότητας είναι σχετικά χαμηλός ($I=0.82$) σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες. Η χονδρομαυροδάφνη παρουσιάζει τον μεγαλύτερο δείκτη γενετικής ομοιότητας με την Ρενιώ, γεγονός που επιβεβαιώνει και τους όμοιους χαρακτήρες της σταφυλής και των ραγών. Είναι προφανές ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα στο θέμα της ταυτοποίησης μιας από τις πιο σημαντικές ποικιλίες της Πελοποννήσου και της Δυτικής Ελλάδας.

Όσον αφορά την ομάδα των Pinot η χρησιμοποίηση των RAPDs αποκάλυψε διαφορές ιδιαίτερα μεταξύ της Pinot blanc και των υπόλοιπων αν και σε εργασίες με τη χρήση των SSR δεν παρατηρήθηκαν διαφορές (Bowers et al., 1996). Και στην παρούσα εργασία ο μικρός βαθμός πολυμορφισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του μικροδορυφορικού

DNA δεν επέτρεψε τη διάκριση μεταξύ τους. Η διαφοροποίηση, μικρή έστω, μεταξύ των ποικιλιών της ομάδας αυτής μάλλον θα πρέπει να αποδοθεί κατά πρώτο λόγο στους βιότυπους που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και στον υψηλό βαθμό πολυμορφισμού των RAPDs. Και εδώ απαιτείται περαιτέρω έρευνα. Άλλωστε, διεθνώς, υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις για την ομάδα Pinot, που θεωρείται ότι καλλιεργείται από την εποχή του Κολουμέλλα και είναι πολυκλωνικής σύνθεσης με έντονη παραλλακτικότητα και με μεγάλο αριθμό κλώνων ή τύπων. Κυριότεροι από αυτούς οι Pinot blanc, Pinot gris, Pinot Meunier (που θεωρούνται ως σωματικές μεταλλάξεις της Pinot noir (Galet,1985). Η χρήση των μοριακών μεθόδων επέτρεψε τη διατύπωση διαφορετικών υποθέσεων ως προς την προέλευση και τη γενετική συγγένεια των μελών της ομάδας. Διατυπώθηκε η άποψη (Regner et al, 2000) ότι οι Pinot Noir, Pinot blanc, Pinot gris που δε διαφέρουν γενετικά (Bowers et al.,1996) είναι προϊόντα της διασταύρωσης Pinot Meunier X Traminer. Οι Franks et al. (2002) διατύπωσαν την άποψη ότι η Pinot Meunier είναι φυτό χίμαιρα και οι φαινοτυπικές διαφορές στο χρώμα και τον χνοασμό της οφείλονται στην αλληλεπίδραση των γενετικά διαφορετικών στοιβάδων L1, L2 ενώ οι Hocquingy et al.(2004) θεωρούν ότι όλη η ομάδα των Pinots προέρχεται από το Pinot gris που είναι φυτό χίμαιρα. Υποστηρίζεται ακόμη ότι η Pinot Noir είναι γεννήτορας αρκετών ποικιλιών αμπέλου μεταξύ των οποίων οι Chardonnay, Gamay Noir, Aligote, κ.ά. Η παράθεση των ερευνητικών αυτών δεδομένων δίνει και την πραγματική διάσταση του προβλήματος της ταυτοποίησης της ομάδας των ποικιλιών Pinot.

Ένα από τα αντικείμενα της παρούσας εργασίας ήταν και η συγκριτική αξιολόγηση των δύο μεθόδων (RAPDs και SSR). Όμως παρά τον μεγάλο αριθμό δοκιμών σε επίσης μεγάλο αριθμό εκκινητών της μεθόδου SSR , δεν κατέστη δυνατή, τουλάχιστον στην παρούσα φάση, αφού οι παραπάνω εκκινητές είχαν μικρό βαθμό πολυμορφισμού.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι η χρησιμοποίηση των μοριακών σημαντών στη διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών αμπέλου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική χάρη στην ακρίβεια των μεθόδων, αλλά και στον ικανοποιητικό βαθμό

πολυμορφισμού που έδωσαν οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά τη μέθοδο RAPD.

Οι μοριακές μέθοδοι, σε συνδυασμό πάντα με τις αμπελογραφικές, είναι σε θέση να δώσουν λύσεις σε σημαντικά αμπελογραφικά θέματα της διάκρισης των διαφόρων ποικιλιών αμπέλου.

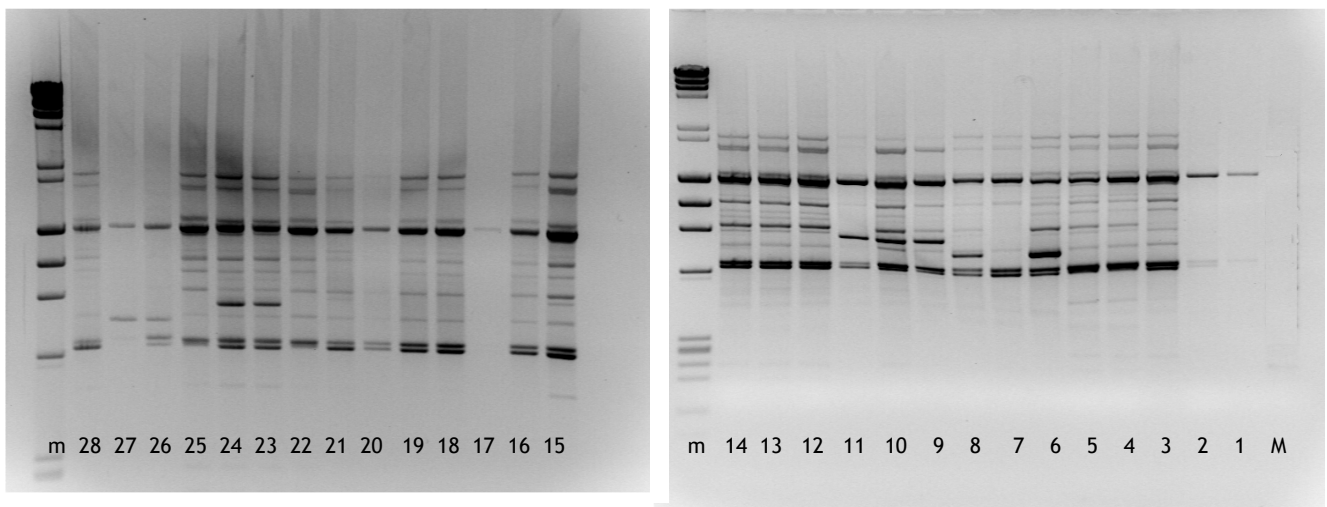
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Πίνακας ποικιλιών που μελετήθηκαν

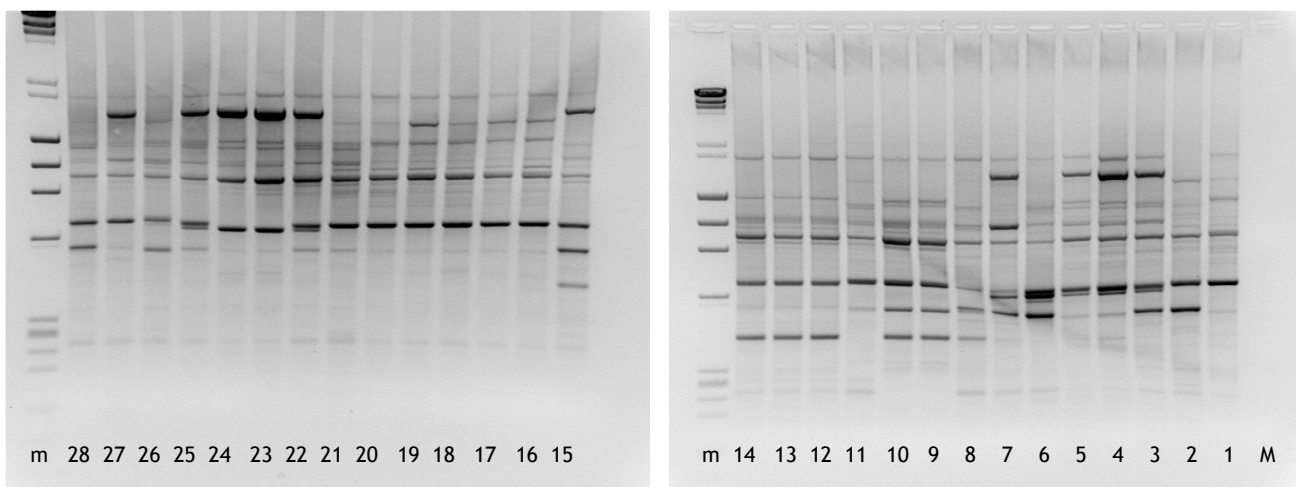
α/α	Ποικιλίες
1.	Σκυλοπνίχτης Λευκός
2.	Σκυλοπνίχτης Μαύρος
3.	Σκυλοπνίχτης Κεφαλονιά
4.	Σκυλοπνίχτης Βοτανικός
5.	Σκυλοπνίχτης Πύργος
6.	Σκυλόκλημα
7.	Λημνιό
8.	Λημνιώνα
9.	Traminer Λυκόβρυση
10.	Traminer Βοτανικός
11.	Mourvedre
12.	Pinot Noir
13.	Pinot Meiner
14.	Pinot Gris
15.	Pinot Blanc
16.	Μαυροδάφνη Ληξούρι
17.	Μαυροδάφνη 8/6 Πάτρα
18.	Μαυροδάφνη Λυκόβρυση
19.	Χονδρομαυροδάφνη
20.	Μαυροδάφνη αγίγαρτη
21.	Ρενιώ
22.	Φιλέρι Τριπόλεως
23.	Μοσχοφίλερο Β19
24.	Μοσχοφίλερο 7/6
25.	Φιλέρι Α22
26.	Βόσσος Λυκόβρυση
27.	Βόσσος Λαγόποδο
28.	Θηνιάτικο

M	Μάρτυρας
m	Marker

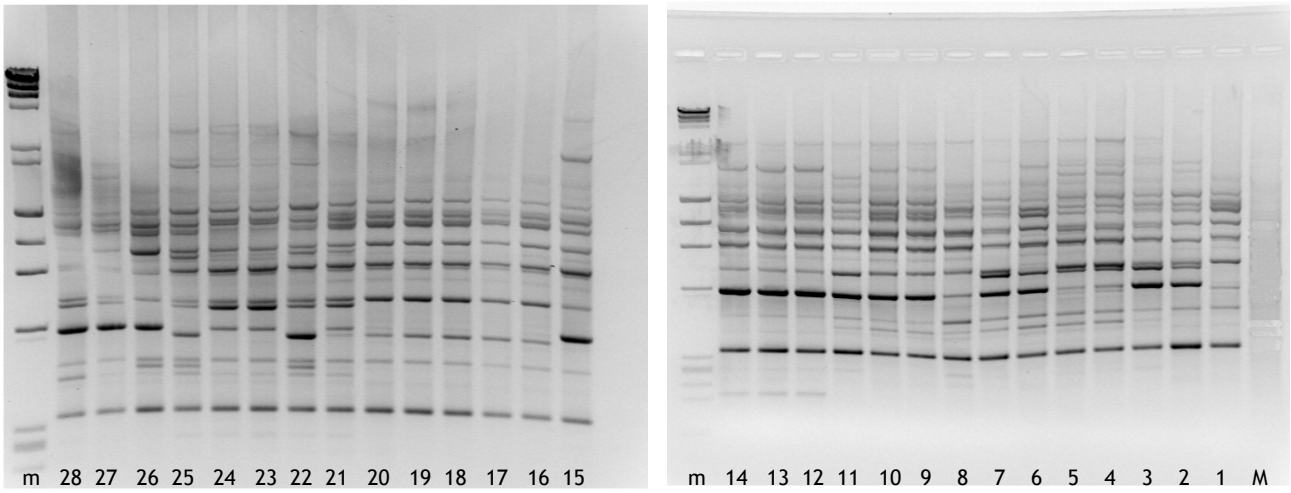
2. Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο RAPD



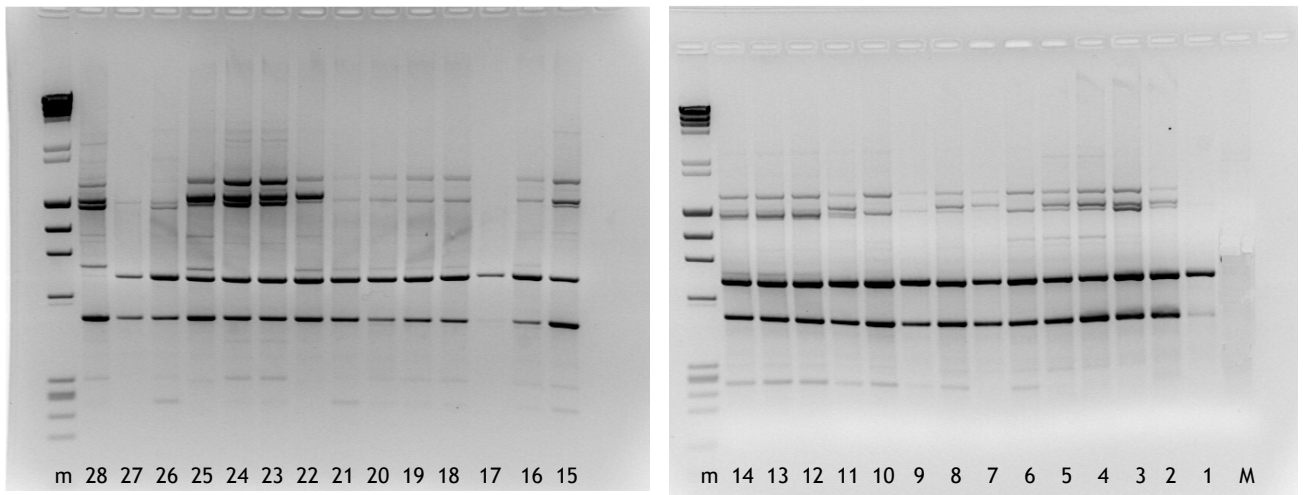
Εικ.1 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1224.



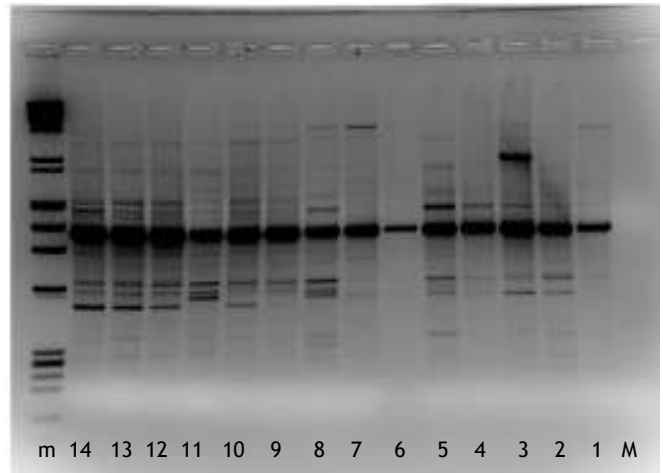
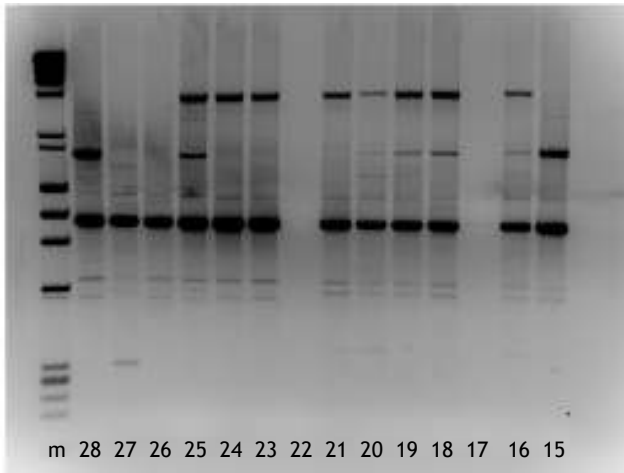
Εικ.2 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1225.



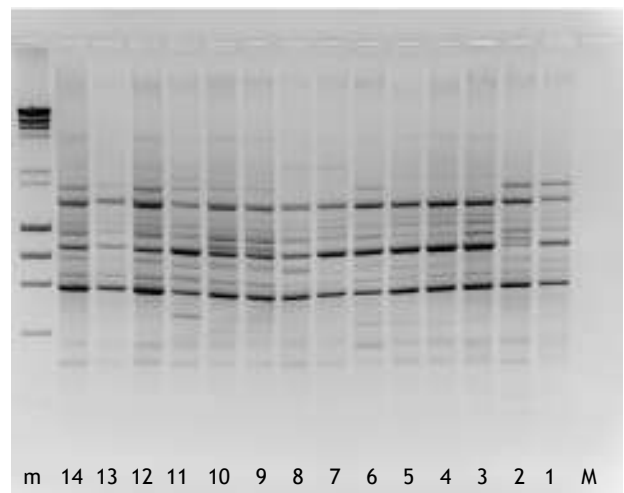
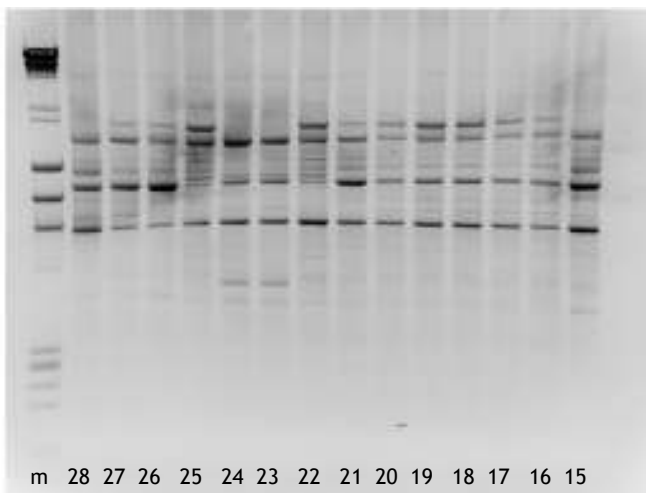
Εικ.3 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1226.



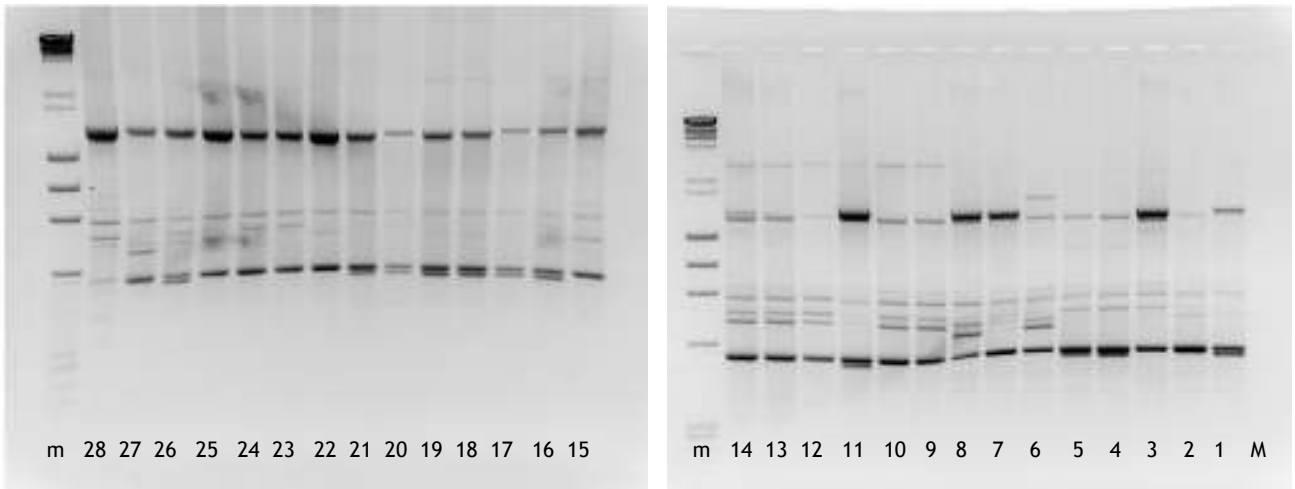
Εικ.4 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή 1227.



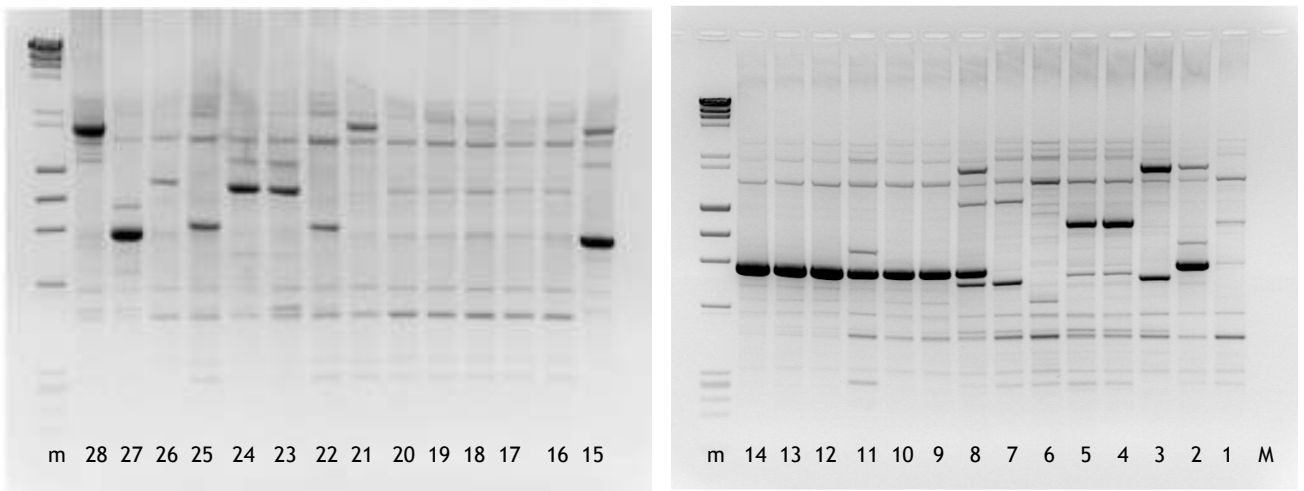
Εικ.5 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-01.



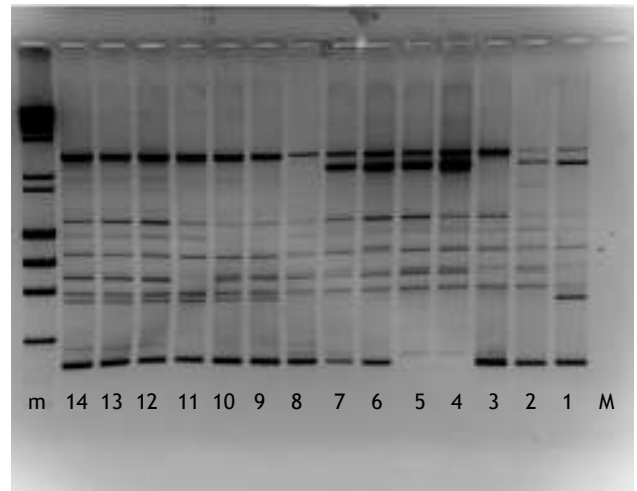
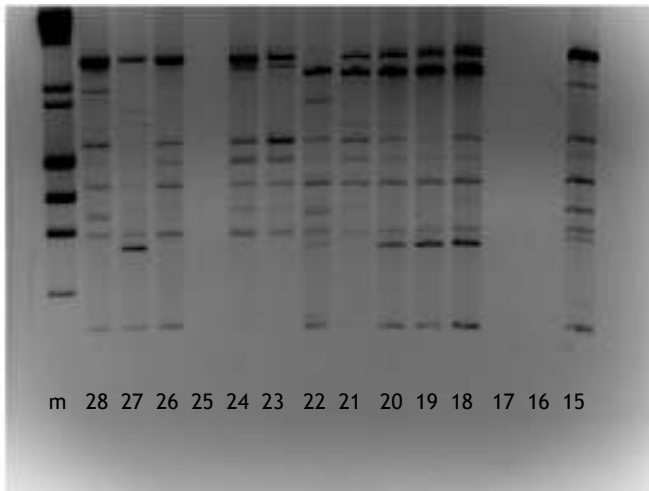
Εικ.6 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-02.



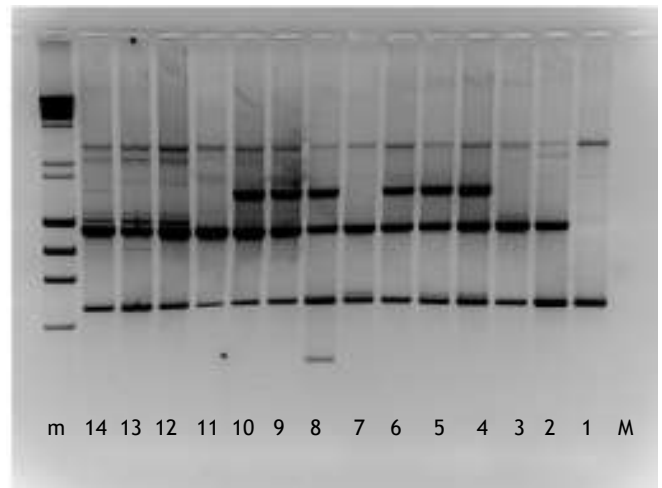
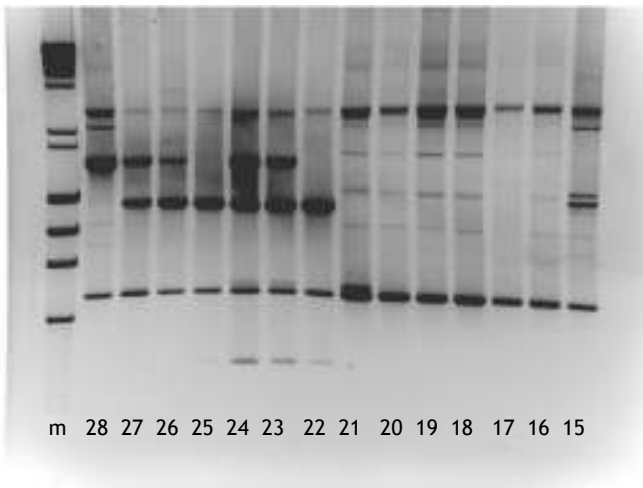
Εικ.7 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-03.



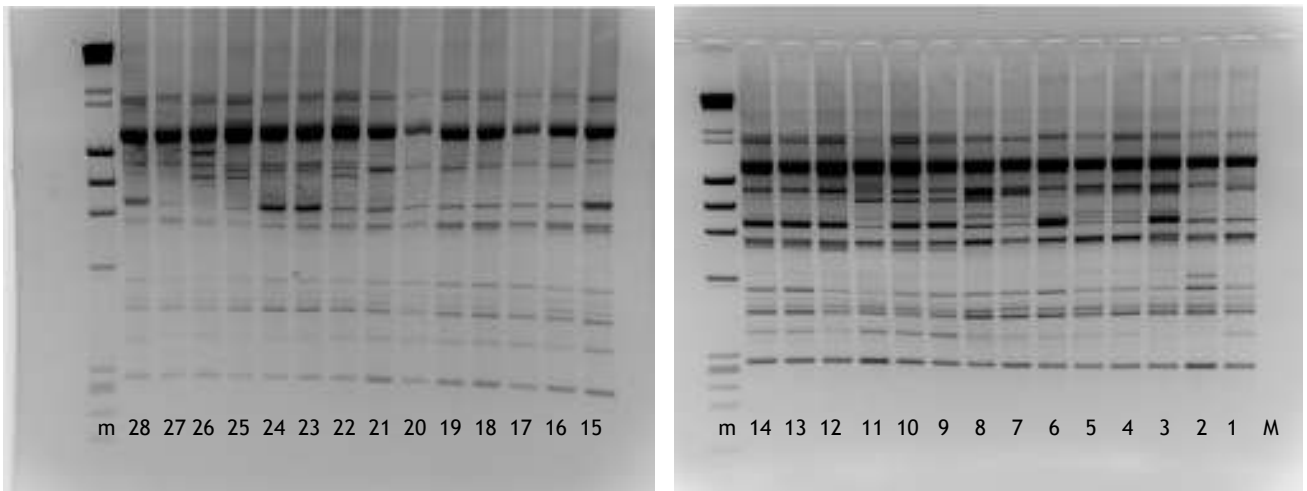
Εικ.8 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-04.



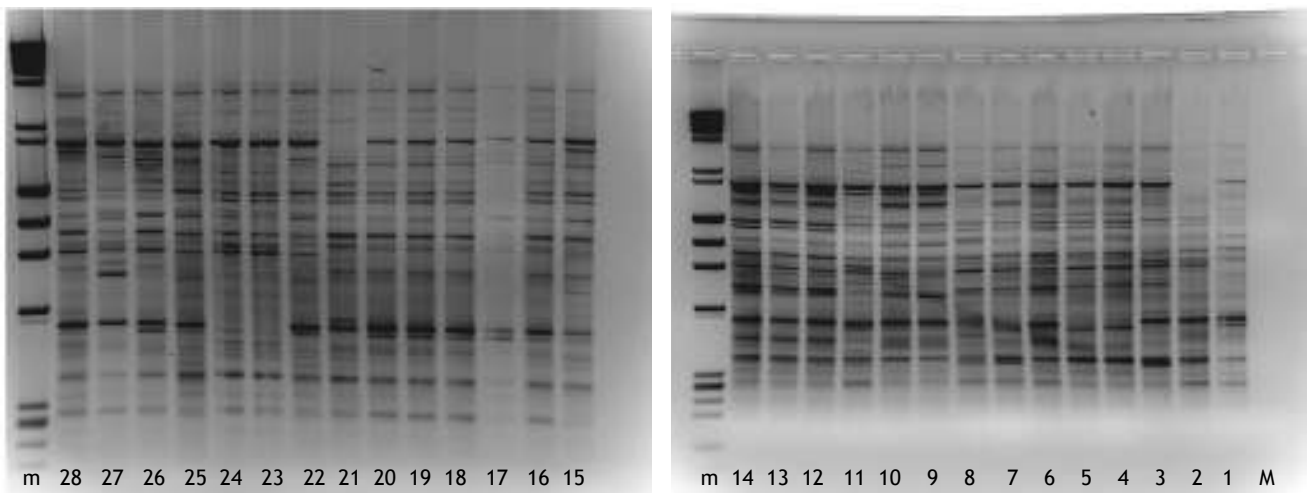
Εικ.9 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-07.



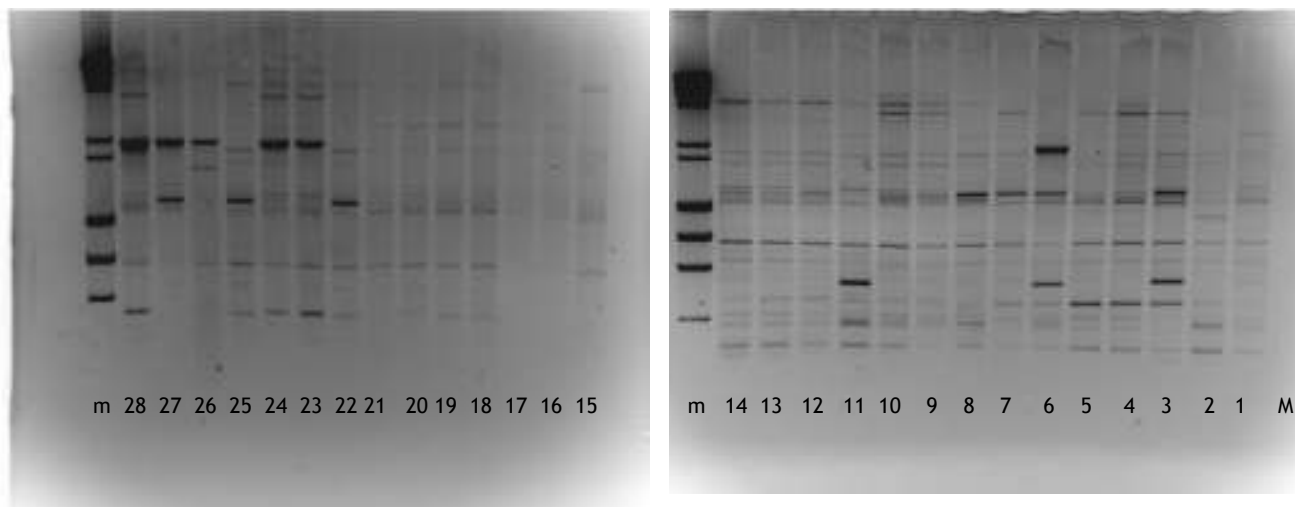
Εικ.10 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-08.



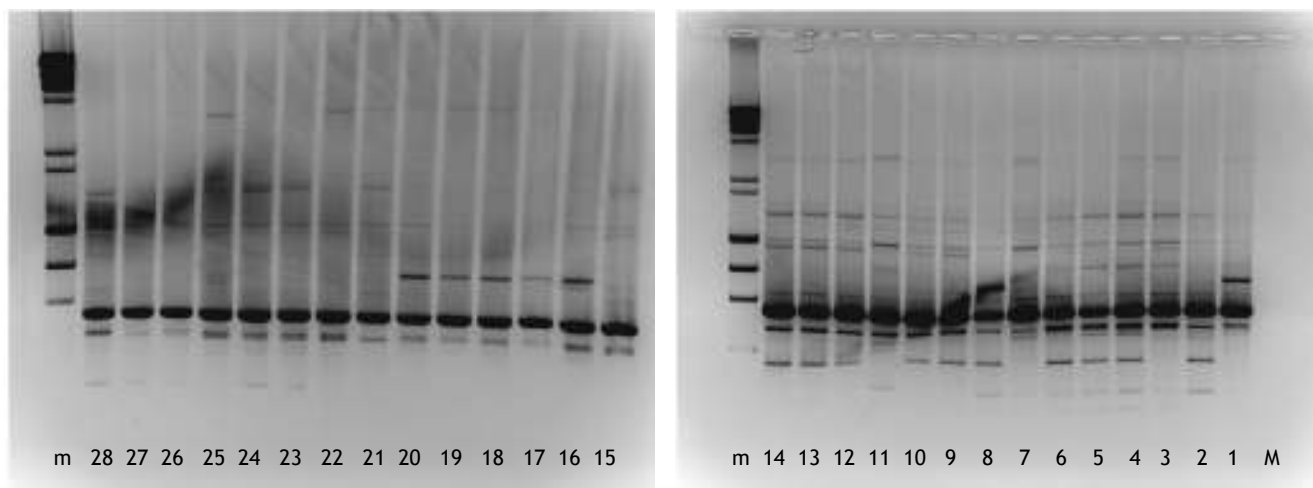
Εικ.11 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-09.



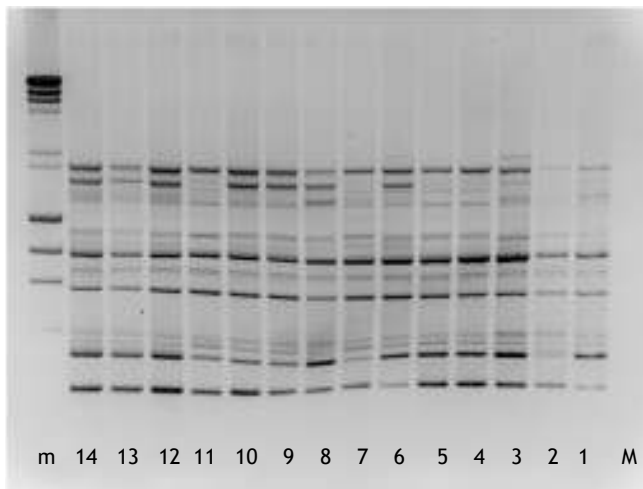
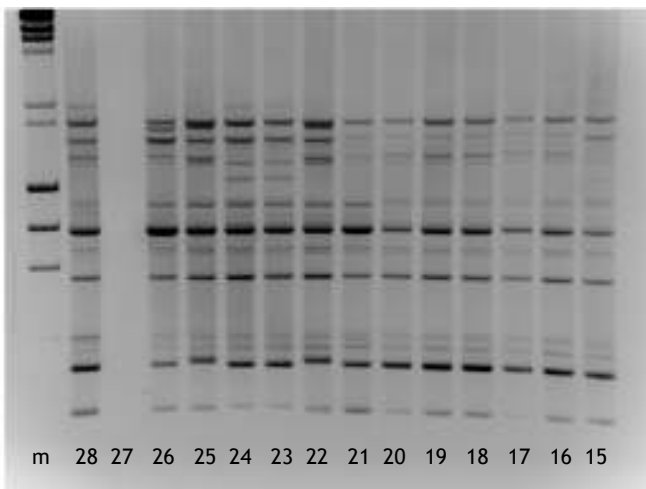
Εικ.12 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-10.



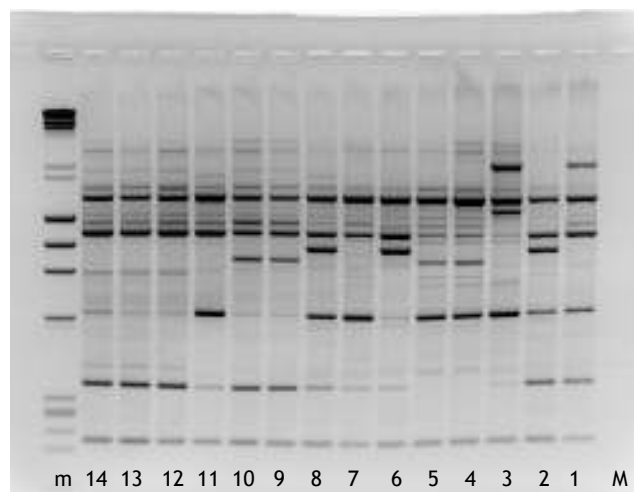
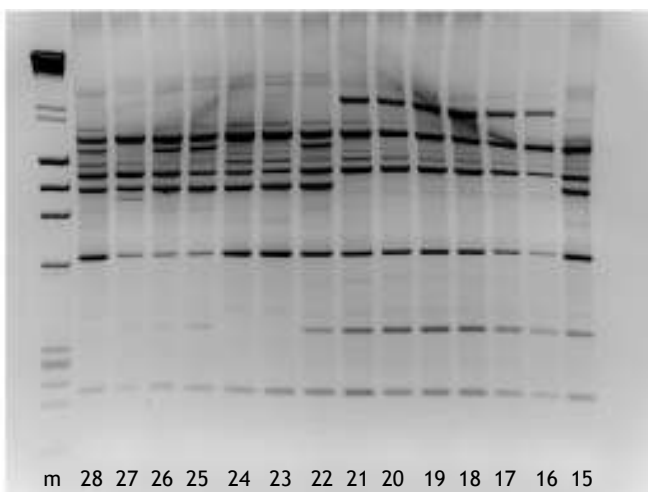
Εικ.13 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-11.



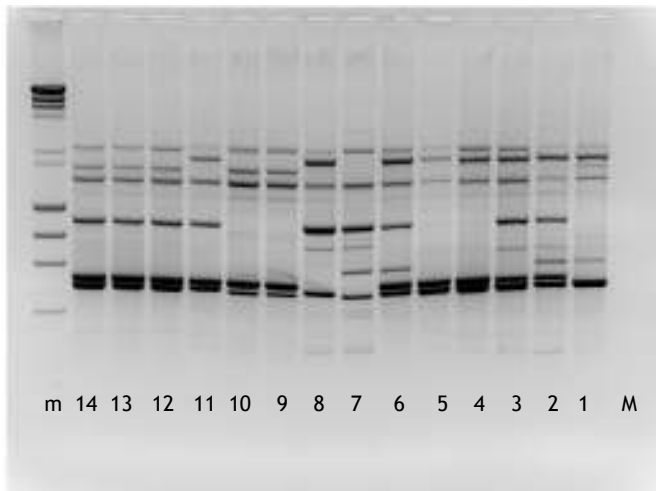
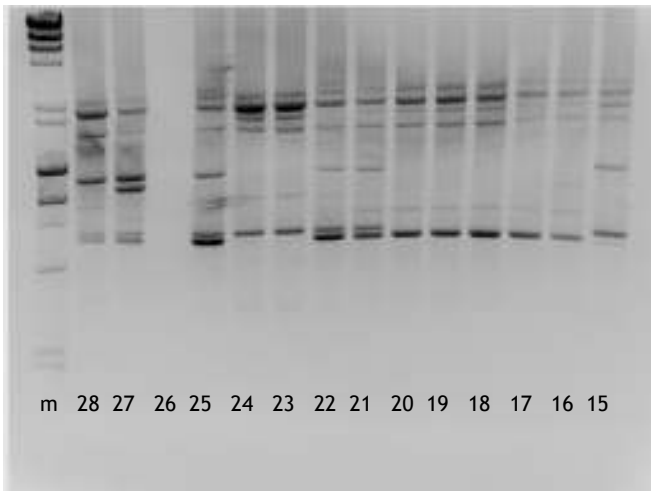
Εικ.14 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-12.



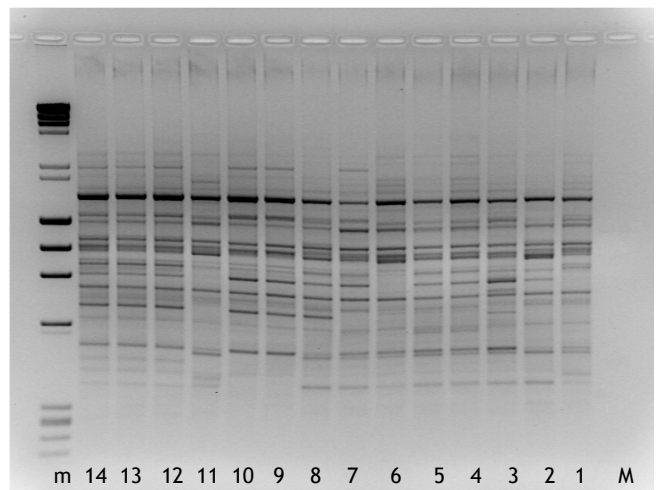
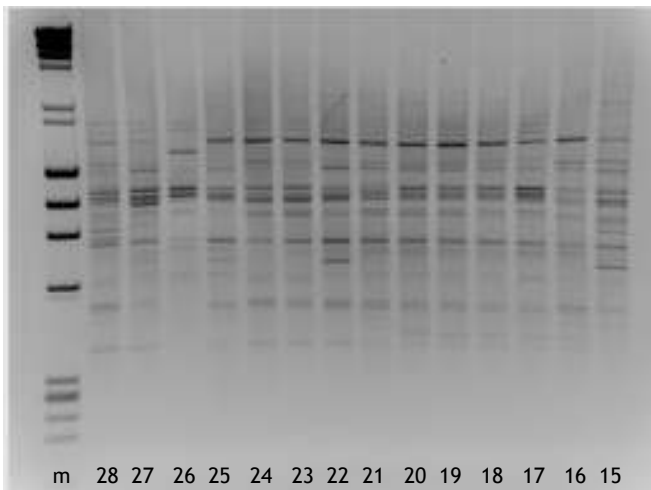
Εικ.15 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-13.



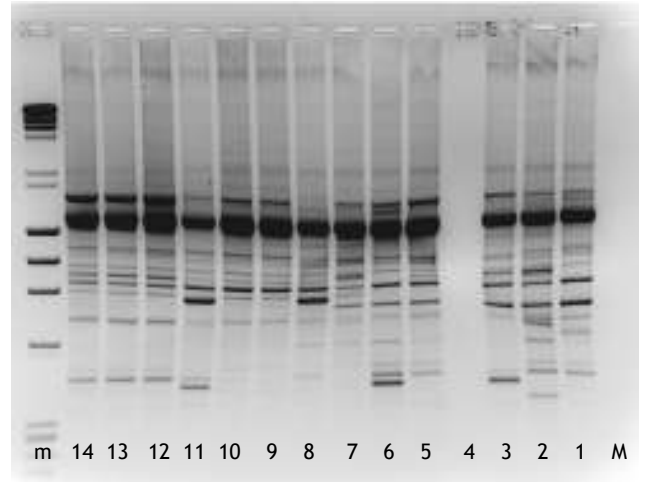
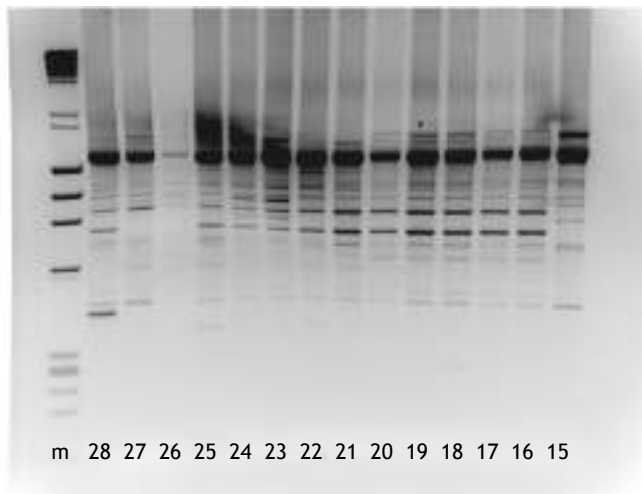
Εικ.16 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPF-14.



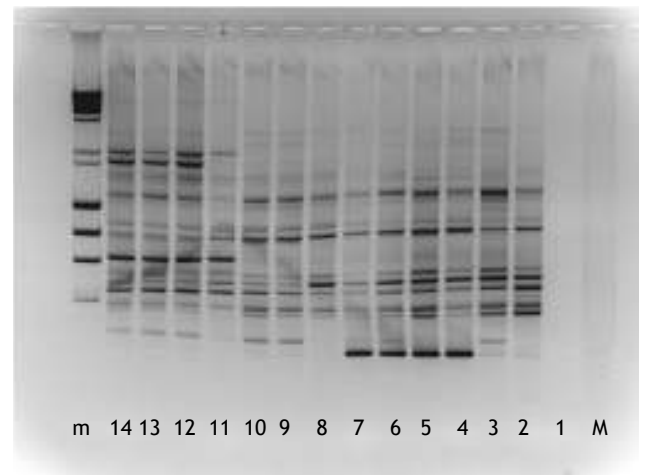
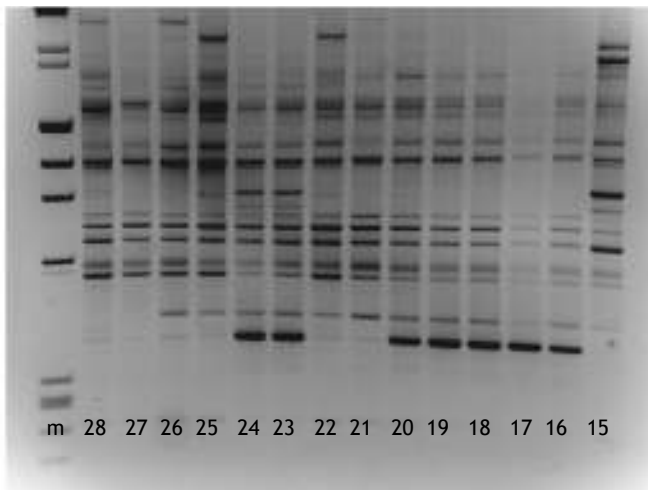
Εικ.17 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-02.



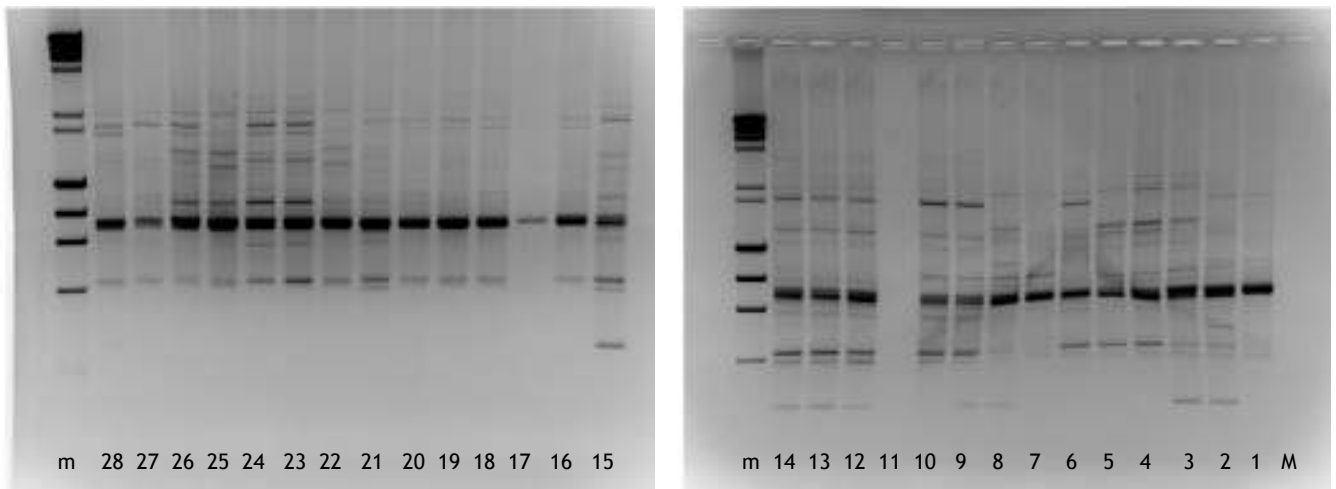
Εικ.18 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-03.



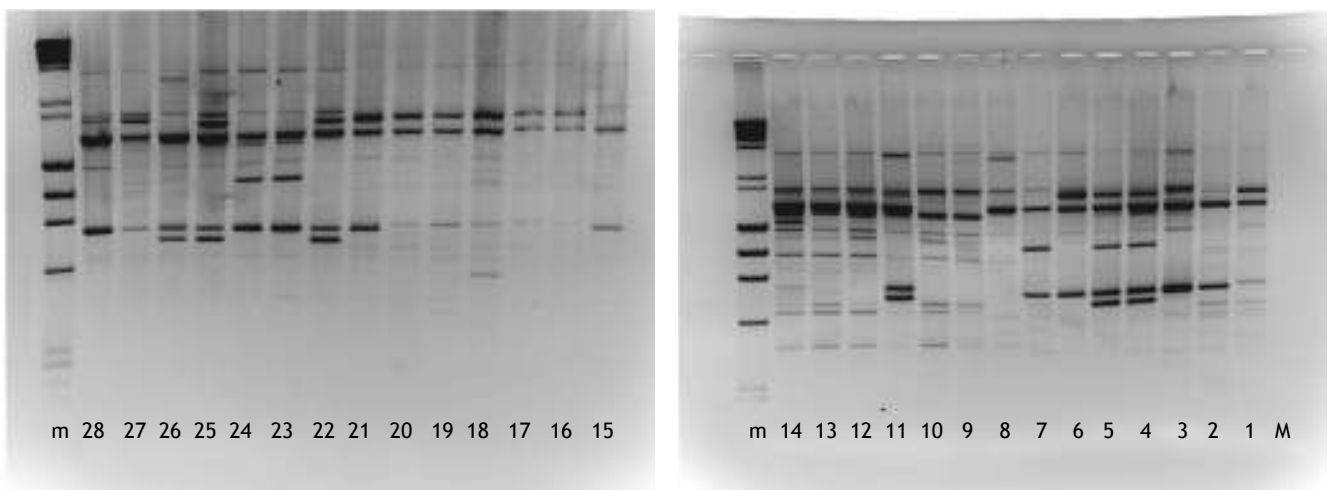
Εικ.19 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-04.



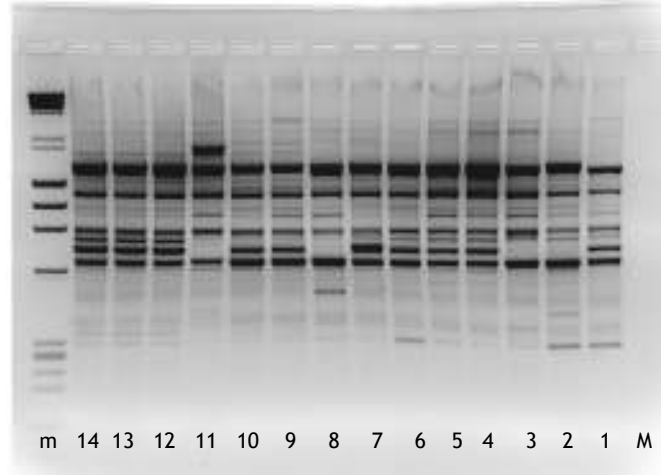
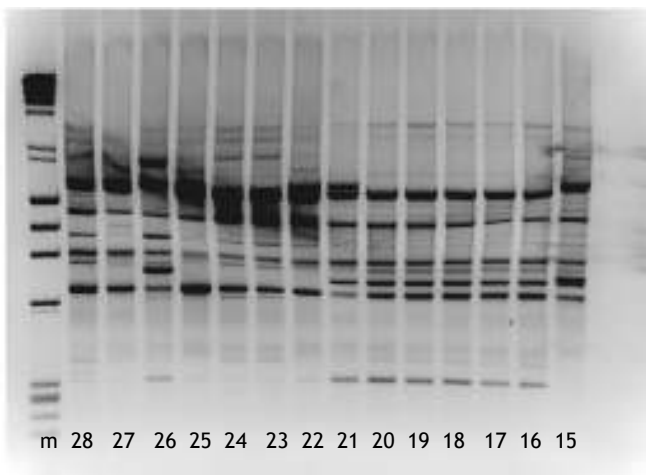
Εικ.20 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-07.



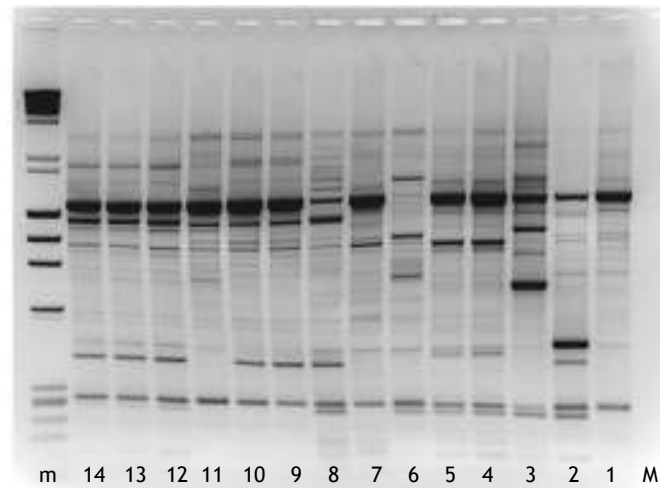
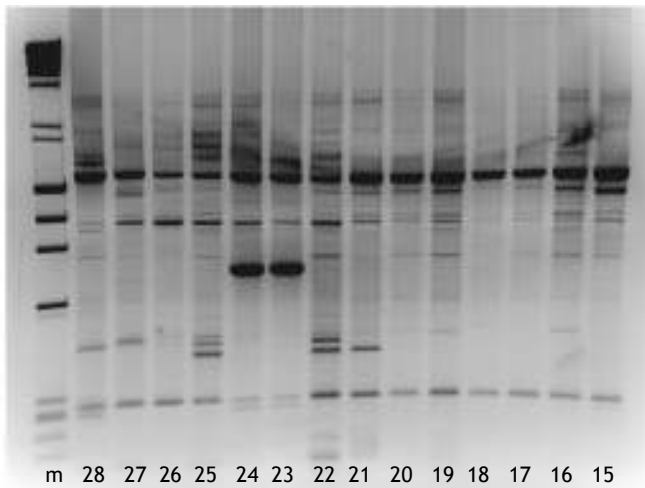
Εικ.21 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-08.



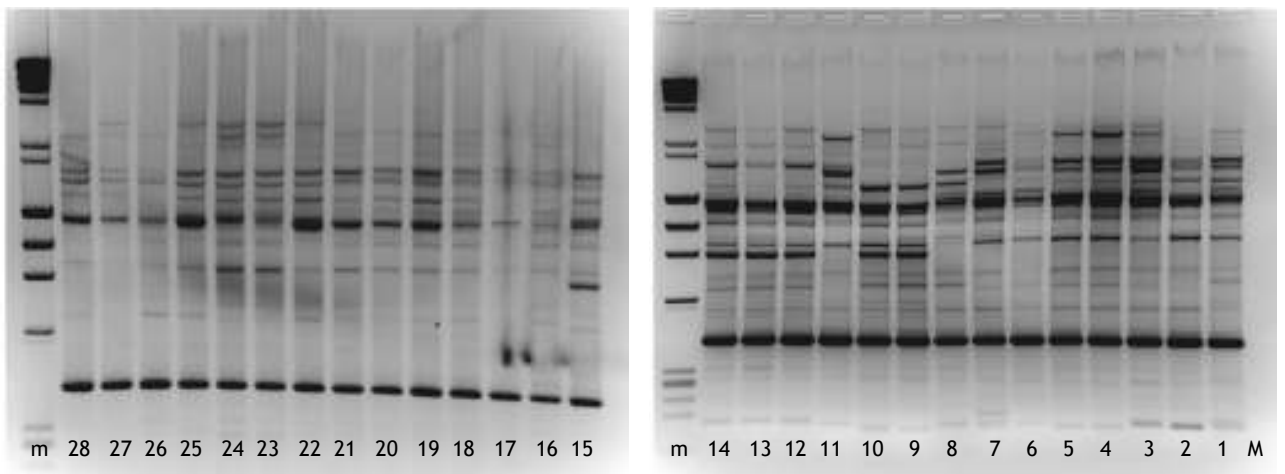
Εικ.22 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-09.



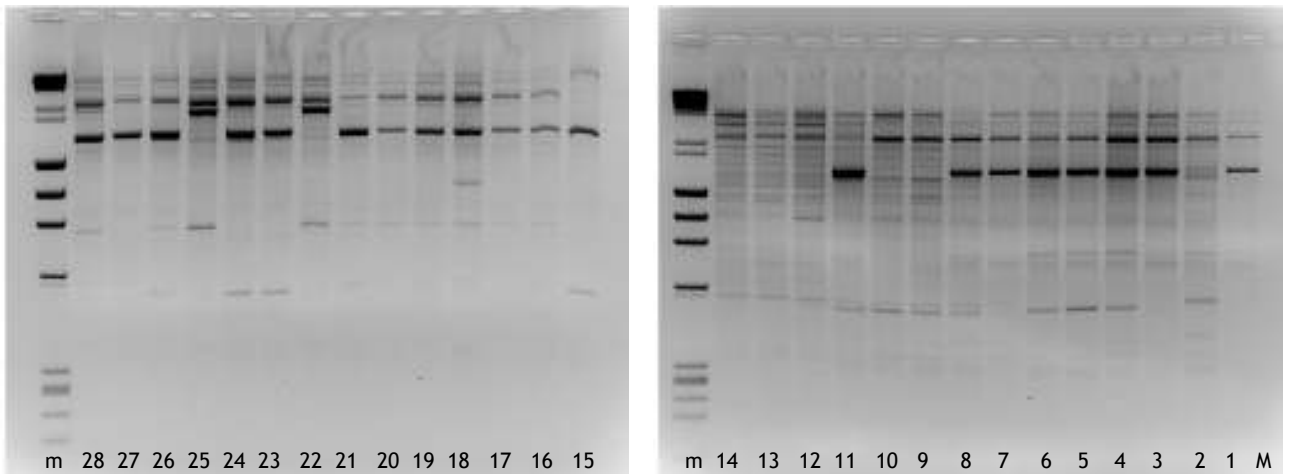
Εικ.23 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-11.



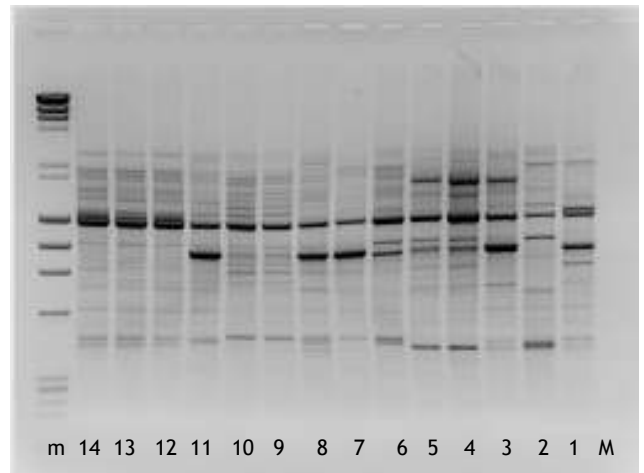
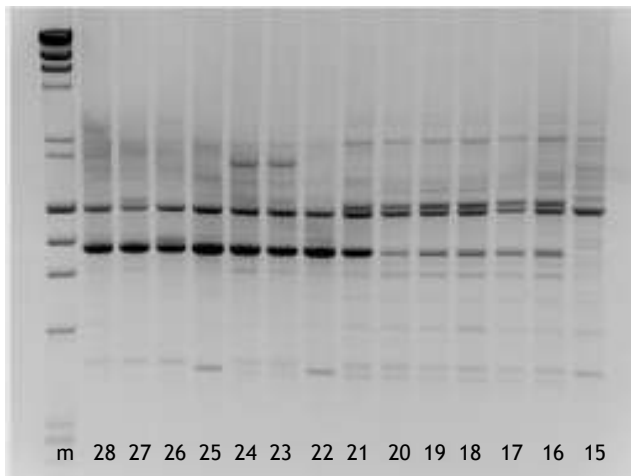
Εικ.24 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-12.



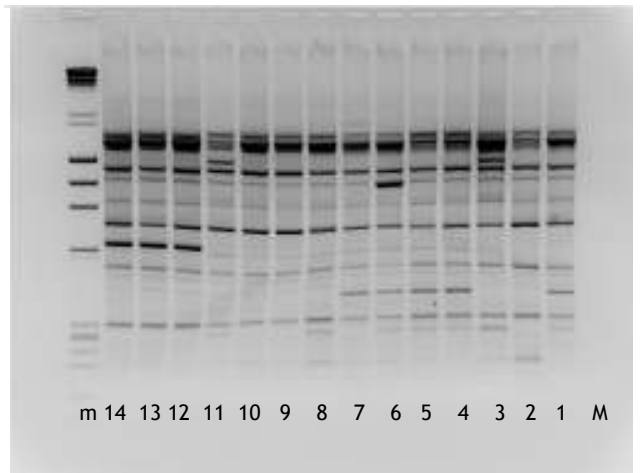
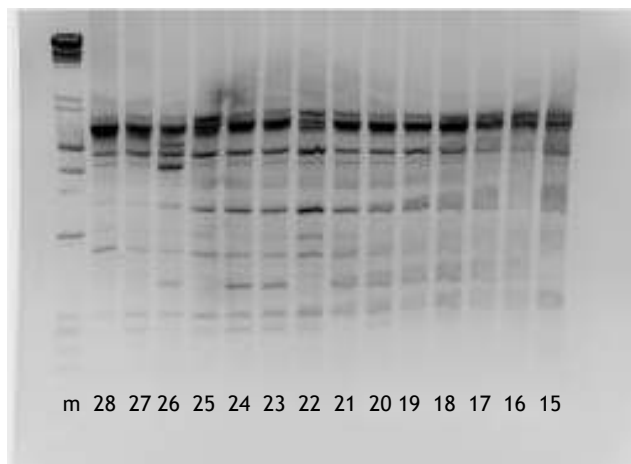
Εικ.25 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-13.



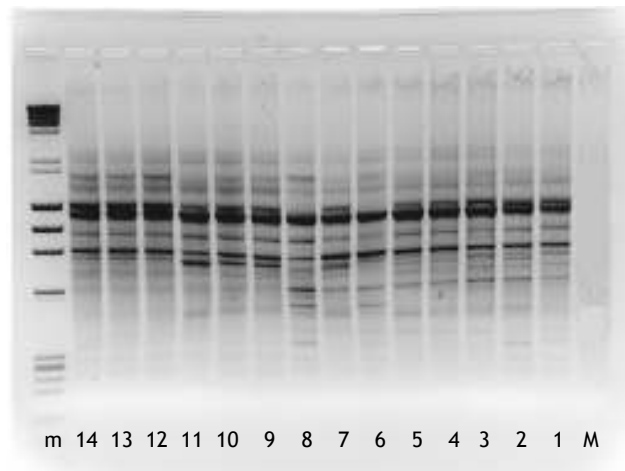
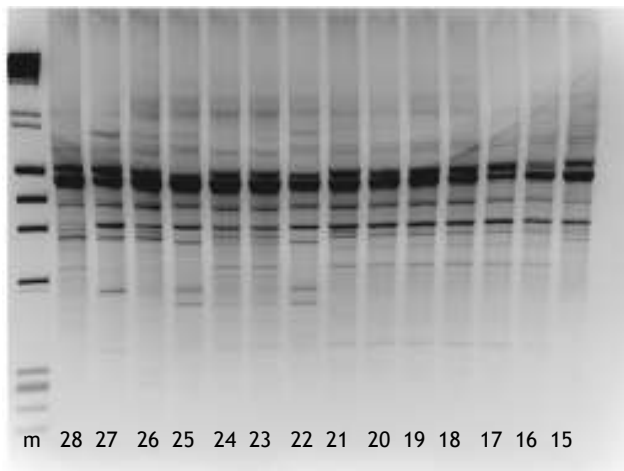
Εικ.26 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-14.



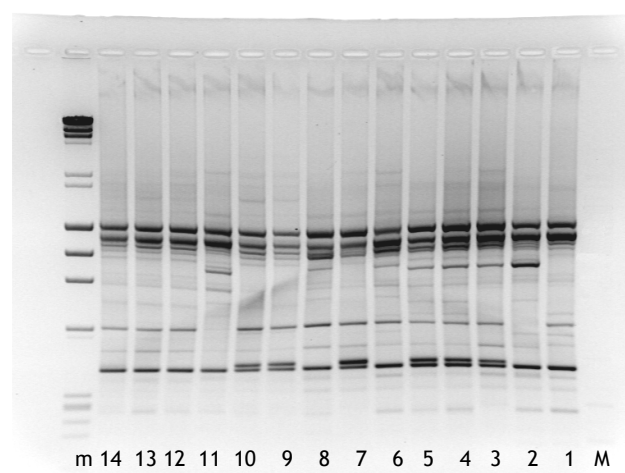
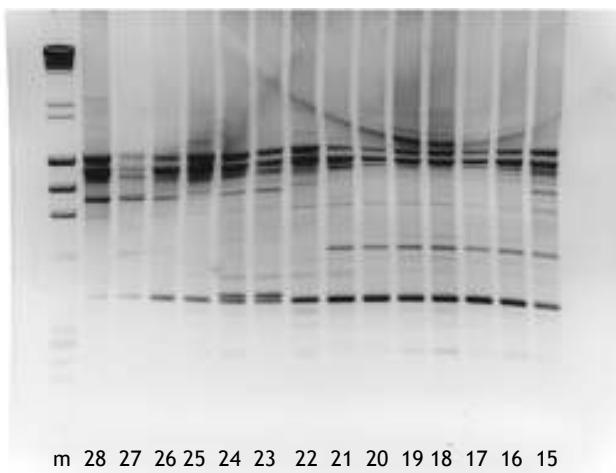
Εικ.27 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-15.



Εικ.28 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPM-16.



Εικ.29 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPE-04.



Εικ.30 Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή OPQ-01.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

Alleweldt, G. and Possingham, J.V., 1988. Progress in grapevine breeding. Theor. Appl. Gen. 75: 669-73.

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 J.E. and Meredith C.P., 1996. Genetic similarities among wine grape cultivars revealed by restriction fragment - length polymorphism (RFLP) analysis. *J. Amer.Soc.Hort.Sci.* 121(4): 620-624

Bowers J.E., Dangl G. S., Vignani R. and Meredith C. P., 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape. *Genome*, 39: 628-633.

Crespan M. and Milani N., 2001. The Muscats: A molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. *Vitis*, 40 (1): 23-30.

Fanizza G., Lamaj F., Resta P., Ricciardi L. and Savino V., 2005. Grapevine cvs Primitivo, Zinfandel and Crljenak kastelanski: Molecular analysis by AFLP. *Vitis* 44 (3) : 147-148.

Filippetti I., Silvestroni O., Thomas M. R. and Intrieri C., 1999. Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. *Vitis*, 38 (2): 67-71.

Franks T., Botta R and Thomas M.R., 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* 104:192-199.

Galet, P., 1979. A practical Ampelography - Grapevine Identification.

Galet, P., 1988. Cépages et Vignobles de France. Tome I. Les Vignes Américaines, 2e Ed. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France.

Galet P., 1985. Précis d' Ampélographie Pratique. 5th Edition. Montpellier.

Galet, P., 1990. Cépages et Vignobles de France. Tome II. L' Ampélographie Française, 2e Ed. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France.

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

Κριμπάς Β., 1938. Σύστημα ταξινόμησης των εν Ελλάδι φυομένων ποικιλιών Αμπέλου της οιοφόρου. Αθήνα

Κριμπάς Β., 1943. Ελληνική Αμπελογραφία, τ. Ι. Αθήναι.

- Labra M., Winfield M., Ghiani A., Grassi F., Sala F., Scienza A. and Failla O., 2001. Genetic studies on Trebbiano and morphologically related varieties by SSR and AFLP markers. *Vitis*, 40 (4): 187-190.
- Lin, H. and Walker M. A., 1998. Identifying grape rootstocks with Simple Sequence Repeat (SSR) DNA markers. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49 (4): 403-407.
- Loukas M., Stavrakakis M.N. and Krimbas C.B., 1983. Inheritance of polymorphic isoenzymes in grape cultivars. *The Journal of Heredity* 74: 181-183
- Μπινιάρη Κ., 2000. Ταυτοποίηση και έλεγχος γνησιότητας καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών μεθόδων (RAPD-PCR). Διδακτορική διατριβή.
- Νταβίδης Ο. Ξ., 1982. Ελληνική Αμπελολογία (Δοκίμιον). τ Γ', Στοιχεία Αμπελογραφίας, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα.
- 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
- Regner F., Stadlbauer A., Eisenheld C. and Kaserer H., 2000. Genetic Relationships Among Pinots and Related Cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 : 7-14.
- Rohlf, F.J., 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80. Exeter Software New York, USA

Sokal, R.R. and Sneath, P.H., 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman W.H. and Company, San Francisco and London.

Σταυρακάκης, Μ.Ν., 1982. Η χρήση των ενζυμικών πολυμορφισμών στη διάκριση των ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.). Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα, σελ. 95.

Σταυρακάκης, Μ.Ν., 2008. Ελληνική Αμπελογραφία. Ποικιλίες και Υποκείμενα του ελληνικού αμπελώνα. (υπό έκδοση)

Σταυρακάκης, Μ.Ν. και Μπινιάρη, Κ., 1998/99. Γενετική μελέτη της ποικιλίας αμπέλου Ροδίτης με τη βοήθεια μοριακών σημαντών. 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 σημαντές. Αγροτική Έρευνα 22: 53-60.

Stavrakakis, M.N. and Loukas, M., 1983. The between and within grape cultivars genetic variation. Scientia Horticulturae 19:321-334.

Stavrakakis, 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.

Stavrakakis, M.N. and Biniari, K., 1998B. 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 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.
- Vignani R., Bowers J. E. and Meredith C. P., 1996. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* «Sangiovese». *Scientia Horticulturae*, 65: 163-169