

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της φοιτήτριας

ΔΙΑΜΑΝΤΕΑ ΕΛΛΗΣ- ΛΟΥΛΑ

***Μοριακός χαρακτηρισμός και οινολογικό  
δυναμικό άγριων στελεχών και εργαστηριακών  
μεταλλαγμάτων *Saccharomyces cerevisiae****



**ΑΘΗΝΑ 2014**



## Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Οίνου του ΕΛ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ καθώς και στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την αποδοχή ένταξής μου στην εργαστηριακή του ομάδα και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την μοριακή βιολογία.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και ιδιαίτερα τον διδάκτορα Γεράσιμο Δάρρα για την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθειά του από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο.

Δεν μπορώ φυσικά να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην ερευνήτρια του Ινστιτούτου Οίνου Αθήνας του ΕΛ.Γ.Ο- ΔΗΜΗΤΡΑ, Ασπασία Νησιώτου και πλέον πολύ καλή φίλη για την καθοδήγηση, την αμέριστη βοήθεια και την καθημερινή υποστήριξη κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσα να παραλείψω τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ινστιτούτου Οίνου, Δήμητρα Δούρου, Μαρίλια Φιλιπούση, συνεργάτες που έχουν πλέον αποχωρήσει, καθώς και νέους, για την άριστη συνεργασία και το όμορφο κλίμα.

Ευχαριστώ πολύ επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή Γεώργιο Μπανίλα για τις χρήσιμες συμβουλές που μου προσέφερε.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την ηθική στήριξη καθώς και τον άνθρωπό μου για την υπομονή, τη στήριξη και την αγάπη που μου έδειξε όλον αυτόν τον καιρό.

## Περίληψη

Στις μέρες μας, οι οινοπαραγωγοί για να αποφύγουν ζύμες που μπορεί να παράγουν ανεπιθύμητες ενώσεις στο κρασί, εμβολιάζουν την πρώτη ύλη, το μούστο, γλεύκος με επιλεγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία είναι εμπορικά. Η πρακτική συνήθως οδηγεί στην πλήρη εξάντληση των σακχάρων, την ομογενοποίηση του τελικού προϊόντος αλλά και στην κάλυψη των ξεχωριστών ιδιοτήτων που μπορεί να χαρακτηρίσουν ορισμένα τοπικά κρασιά. Έτσι στην προσπάθεια να ενισχυθεί ο αρωματικός χαρακτήρας των κρασιών, οι ερευνητές έχουν εστιάσει στην επιλογή ζυμών από συγκεκριμένες περιοχές.

Η μελέτη και η αξιολόγηση της βιοποικιλότητας των γηγενών στελεχών είναι απαραίτητη για την ανακάλυψη στελεχών με νέα μοριακά και οινολογικά χαρακτηριστικά.

Επίσης η ανάπτυξη των τεχνικών της PCR έχει οδηγήσει στην αναγνώριση στελεχών ζύμης και στην μείωση του χρόνου σε σχέση με άλλες τεχνικές.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να αναλύσουμε την βιοποικιλότητα των άγριων στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* που απομονώθηκαν ύστερα από αυθόρμητες ζυμώσεις, σταφυλιών από την ζώνη της Νεμέας.

Με τη χρήση δύο μοριακών τεχνικών, της ανάλυσης μήκους θραυσμάτων περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA και την ενίσχυση των inter-delta περιοχών του γενωμικού DNA, βρέθηκε μια σημαντική βιοποικιλότητα. Τα ληφθέντα αποτελέσματα αποδεικνύουν την χρησιμότητα των διαφόρων μοριακών δεικτών για την αξιολόγηση της φυσικής βιοποικιλότητας μεταξύ των στελεχών του *S.cerevisiae*.

Συνολικά βρέθηκαν 89 διαφορετικά στελέχη, τα οποία στη συνέχεια αξιολογήθηκαν με βάση τα οινολογικά τους χαρακτηριστικά: αντοχή στην αιθανόλη, αντοχή στο θειώδες, παραγωγή βιογενών αμινών, παραγωγή β-γλυκοσιδάσης, παραγωγή υδρόθειου καθώς και το φαινότυπο killer. Μερικά στελέχη από αυτά παρουσίασαν μεγάλο οινολογικό ενδιαφέρον και θα αξιολογηθούν περαιτέρω.

Τέλος, ένας αριθμός μεταλλαγμένων στελεχών *S.cerevisiae*, τα οποία παρουσίασαν το φαινότυπο της κροκίδωσης εξετάστηκαν ώστε να προσδιοριστεί το σημείο στο οποίο έγινε η ένθεση.

## **Abstract**

In our days, wine producers to avoid yeasts that can produce undesirable compounds in wine, inoculate the must with selected strains *S.cerevisiae*, the so-called commercial starters.

This practice usually leads to the full depletion of sugars and homogeneity in the final product, but also leads to the mask of individuals properties that may characterize Iregonal wines.

In an attempt to enhance the aromatic character of the wines, the researchers have focused on the selection of vineyard yeasts (wild yeasts) from different regions.

The study and evaluation of biodiversity of indigenous yeasts is essential towards the discovery of strains with altered molecular and enological characteristics.

The development of PCR techniques has led to the accurate and rapid identification of yeast strains as compared to the conventional techniques.

The aim of this work was to analyse the genetic diversity of wild *Saccharomyces cerevisiae* isolates from spontaneous fermented grape must of the Agiorgitiko cultivars from the Nemea region.

By using two molecular typing techniques, mtDNA restriction analysis and inter-delta amplification analysis, a significant genetic variability was found. The obtained results demonstrate the usefulness of different molecular markers for the evaluation of natural biodiversity among *S.cerevisiae* strains.

A total of 89 different strains recovered, were further evaluated as per major enological characteristics: resistance to ethanol, sulfite resistance, production of biogenic amines, production of  $\beta$ - glucosidase, production of hydrogen sulfide and phenotype killer. Some of these strains showed great enological interest and are thus quite promising for utilization as starters.

Finally, a number of transposon insertion *S.cerevisiae* mutant strains (BY4741 genetic background) exhibiting strong flocculation phenotype was examined in order to detect the specific site of insertion.

# Περιεχόμενα

<b>Εισαγωγή.....</b>	<b>10</b>
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , η ζύμη του κρασιού .....	11
2. Αυθόρμητη και ελεγχόμενη ζύμωση .....	12
3. Ποικιλομορφία και βιογεωγραφικός χαρακτηρισμός του πληθυσμού του <i>S.cerevisiae</i> .....	13
4. Μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης και διαχωρισμού στελεχών <i>S.cerevisiae</i> .....	14
4.1. Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες (Array CGH).....	17
4.2. Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού μιτοχονδριακού DNA (mtDNA- RFLP) .....	18
4.3. Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (PFGE) .....	19
4.4. Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD).....	20
4.5. Μικροδορυφορικό DNA (Microsatellites) .....	20
4.6. Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας DNA (Multilocus Sequence Typing)....	21
4.7. Ανάλυση Interdelta .....	22
5. Οινολογικά (Τεχνολογικά) Χαρακτηριστικά των ζυμών .....	22
5.1. Αντοχή στην αιθανόλη (EtOH) .....	23
5.2. Αντοχή στο θειώδες (SO <sub>2</sub> ) .....	23
6.3. Βιογενείς αμίνες (BA) .....	24
6.4. Παραγωγή υδρόθειου (H <sub>2</sub> S) .....	25
6.5. Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης .....	26
6.6. Φαινόμενο killer .....	26
7. Κροκίδωση (flocculation) .....	27
7.1. Μηχανισμοί προσκόλλησης .....	29
<b>Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>29</b>
1. Στελέχη ζύμης .....	30
1.1. Απομόνωση DNA για την ταυτοποίηση των στελεχών <i>S.cerevisiae</i> .....	31
1.1.1. Ενίσχυση της 5.8S ITS περιοχής του rDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	31
1.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....	32
1.1.3. Ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού της 5.8S ITS περιοχής .....	32
1.2. Διαχωρισμός στελεχών <i>S.cerevisiae</i> με την ανάλυση πολυμορφισμών μήκους θραυσμάτων περιορισμού μιτοχονδριακού DNA (mtDNA – RFLP) .....	32

1.2.1.	Πρωτόκολλο Yeast DNA Miniprep (DNA EXTRACTION) .....	33
1.2.2.	Διαλύματα πρωτοκόλλου DNA extraction .....	35
1.3.	Διαχωρισμός στελεχών <i>S.cerevisiae</i> με την ενίσχυση των interdelta περιοχών τους με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	36
1.3.1.	Ενίσχυση των interdelta περιοχών του <i>S.cerevisiae</i> .....	36
2.	Οιολογικά –Τεχνολογικά τεστ .....	37
2.1.	Ethanol Tolerance .....	37
2.2.	SO <sub>2</sub> Resistance .....	37
2.3.	Βιογενείς Αμίνες .....	38
2.4.	Παραγωγή Υδροθείου .....	38
2.5.	Παραγωγή β- γλυκοσιδάσης .....	39
2.6.	Killer Test .....	40
3.	Μεταλλαγμένα στελέχη που παρουσιάζουν το φαινόμενο της κροκίδωσης .....	41
3.1.	Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίου "Plasmid rescue" .....	41
3.2.	Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.3.	Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> με πλασμιδιακό DNA (Transformation of E. coli by Electroporation) .....	43
3.4.	Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> με αλκαλική λύση (Plasmid DNA miniprep) .....	43
3.5.	Διαλύματα πρωτοκόλλου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA .....	45
4.	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης .....	47
4.1.	Παρασκευή gel αγαρόζης .....	47
4.2.	Διαλύματα ηλεκτροφόρησης .....	48
4.3.	Ποσοτικοποίηση DNA .....	49
	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>51</b>
1.	Ταυτοποίηση των ζυμών με τη μέθοδο RFLP της 5.8s- ITS περιοχής του DNA .....	52
2.	Μελέτη της ποικιλομορφία των στελεχών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
2.1.	Διαχωρισμός των στελεχών με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) .....	53
2.2.	Γονοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> με την ενίσχυση των inter-delta περιοχών .....	57
2.3.	Παρουσία εμπορικών στελεχών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στη ζώνη Π.Ο.Π. της Νεμέας .....	62



3. Οινολογικό δυναμικό γηγενών στελεχών <i>S.cerevisiae</i> .....	63
4. Μεταλλαγμένα στελέχη .....	67
4.1. Διάσωση πλασμιδίου των μεταλλαγμένων στελεχών .....	67
<b>Συζήτηση .....</b>	<b>70</b>
1. Μοριακή σχέση μεταξύ των άγριων στελεχών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	71
2. Βιοποικιλότητα των απομονωθέντων στελεχών .....	73
3. Οινολογικά χαρακτηριστικά των γηγενών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	74
4. Μεταλλαγμένα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και το φαινόμενο της κροκίδωσης .....	76
<b>Μελλοντικοί στόχοι .....</b>	<b>78</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>80</b>

# Εισαγωγή

## **1. *Saccharomyces cerevisiae*, η ζύμη του κρασιού**

Παρά τα 70 χρόνια έρευνας, η βιογεωγραφία του *S.cerevisiae* παραμένει υπό διερεύνηση. Στην πραγματικότητα, λίγα είναι γνωστά για την οικολογία, την προέλευση, την εξέλιξη και την κατανομή του στη φύση (Wang et al., 2012). Οι Naumov et al. (2006) υπέθεσαν ότι ο αρχαιότερος πληθυσμός του *S.cerevisiae* προέρχεται από τη Μαλαισία. Δείγματα από DNA *S.cerevisiae* ανακαλύφθηκε σε κεραμικά κινεζικά βάζα (7.000- 5.500π.Χ.) (McGovern et al., 2004). Επίσης, ριβοσωμικό DNA από *S.cerevisiae* βρέθηκε σε ορισμένα πιθάρια που αποθήκευαν κρασί στο τάφο του βασιλιά Scorpion στην Άβυδος, της Αιγύπτου, αποδεικνύοντας ότι αυτή η μαγιά ήταν υπεύθυνη για τη ζύμωση του κρασιού από το 3150π.Χ. (Cavaliere et al., 2003).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* ή αλλιώς “ζύμη του κρασιού”, είναι το σημαντικότερο είδος από τις ζύμες, που εμπλέκεται και πραγματοποιεί την αλκοολική ζύμωση, αφού είναι σε θέση να μετατρέψει τη ζάχαρη σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub> μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Στην πραγματικότητα, είναι ένας καλά προσαρμοσμένος μικροοργανισμός σε αυτή τη διαδικασία. (Martini and Vaughan-Martini, 1990).

Αυτή η ζύμη είναι παρούσα στα σταφύλια σε πολύ μικρούς πληθυσμούς, μικρότερους από 10-100 CFU/g σταφυλιών (Fleet, 2003). Στην επιφάνεια ακέραιων σταφυλιών, η συγκέντρωση του *S.cerevisiae* είναι μικρότερη από 0- 1 %, ενώ στα τραυματισμένα σταφύλια από τα έντομα ή τα πουλιά, η συγκέντρωση του πληθυσμού του μπορεί να φτάσει έως και 25%. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι οι πληθυσμοί των ζυμών στα σταφύλια αυξάνουν από 10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> cfu/g στα άγουρα σταφύλια σε 10<sup>3</sup> – 10<sup>6</sup> cfu /g στα ώριμα. Τα έντομα και τα πουλιά είναι σημαντικοί παράγοντες για τη διασπορά των ζυμών στα διαφορετικά ενδιαιτήματα. Όσον αφορά το ρόλο των εντόμων ως φορείς διασποράς του *S.cerevisiae*, ο Mortimer Polsinelli (1999) έδειξε την παρουσία των κυττάρων *S.cerevisiae* μεταξύ του φυσικού περιβάλλοντος και των κελαριών. Και αυτό γιατί αυτή η ζύμη δεν είναι αερομεταφερόμενη, αλλά χρειάζεται ένα φορέα για να μετακινηθεί.

Το είδος *S.cerevisiae*, είναι ένα από τα καλύτερα μοντέλα που χρησιμοποιείται για την κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας και της εξελικτικής γενετικής. Πολλά προγράμματα λειτουργικής ανάλυσης ήταν αφιερωμένα στην έρευνα της μοριακής βιολογίας από τότε που το γονιδίωμα του αλληλουχίστηκε για πρώτη φορά, πριν από περίπου 10 χρόνια. Σήμερα, ένα μεγάλο ποσοστό των γονιδιωμάτων στοιχείων από διάφορα στελέχη *S.cerevisiae* είναι διαθέσιμο (Borneman et al., 2013).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών, ένας μεγάλος αριθμός παρατηρήσεων απέδειξε ότι τα στελέχη του *S.cerevisiae* είναι ιδιαίτερα ποικίλα. Έτσι, η εμφάνιση των συγκεκριμένων φυσικών στελεχών και η μικροβιολογική χλωρίδα του σταφυλιού γενικότερα, εξαρτάται πιθανόν από πολλούς παράγοντες όπως οι κλιματικές συνθήκες, η γεωγραφική θέση του αμπελώνα, η ωρίμαση των σταφυλιών, η ηλικία του αμπελώνα, ο τύπος του εδάφους, η ποικιλία του σταφυλιού, η εφαρμογή αντιμυκητοκτόνων, καθώς και η τεχνική που χρησιμοποιείται για τη συγκομιδή των σταφυλιών (Nisiotou and Nychas, 2007).

## **2. Αυθόρμητη και ελεγχόμενη ζύμωση**

Η ποιότητα του οίνου επηρεάζεται έντονα από τις ζύμες που συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Το σώμα, το ιξώδες, το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα του καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από αυτές (Rainieri, et al., 2000).

Αρχικά όλοι οι οίνοι γινόντουσαν με την αξιοποίηση της φυσικής μικροχλωρίδας των σταφυλιών και δε γινόταν κανένας σκόπιμος εμβολιασμός για να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της αυθόρμητης ζύμωσης, πληθυσμοί από διαφορετικά γένη ζύμης ζουν μαζί και διαδέχονται η μία την άλλη.

Τα πρώτα στάδια της ζύμωσης συνήθως κυριαρχούνται από τα γένη *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida* και συχνά δείχνουν την παρουσία τους *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* και *Torulasporea*, ενώ η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώνεται συνήθως από στελέχη του γένους *Saccharomyces*. Άλλες ζύμες, όπως το είδος της *Brettanomyces*, *Kluveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* και *Zygosaccharomyces*, μπορούν επίσης να είναι παρόντες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και στη συνέχεια το κρασί, μερικά δε από τα οποία είναι ικανά να βλάψουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Pretorius, et al., 2000).

Η πρακτική των αυθόρμητων ζυμώσεων παραμένει ακόμα διαδεδομένη σε πολλές οινοπαραγωγικές περιοχές λόγω της δημοφιλής πεποίθησης ότι ανώτερα στελέχη ζυμών συνδέονται με συγκεκριμένους αμπελώνες (περιοχές) προσδίδοντας ένα ξεχωριστό άρωμα και πολυπλοκότητα στο κρασί, συμβάλλοντας στην ποιότητά του. Αναμφίβολα εκτός από τα μοναδικά χαρακτηριστικά που μπορούν να προσδώσουν στο κρασί οι γηγενείς ζύμες, το αποτέλεσμα δεν είναι πάντα το αναμενόμενο. Η έλλειψη προβλεψιμότητας και επαναληψιμότητας είναι παράγοντες που έχουν οδηγήσει τους περισσότερους οινοπαραγωγούς στην χρήση εμπορικών στελεχών ζύμης ως εναρκτήριες καλλιέργειες.

Έτσι, ζύμες με βελτιωμένα χαρακτηριστικά επιλέχθηκαν και ήδη από το 1890, ο Mueller-Thurgau εισήγαγε την έννοια του εμβολιασμού του μούστου με καθαρές καλλιέργειες ζυμών. Ως αποτέλεσμα, η ποιότητα παραγωγής κρασιού να είναι σημαντικά βελτιωμένη και προβλέψιμη (Pretorius, et al., 1991).

Η τεχνική του εμβολιασμού, συνήθως οδηγεί σε πλήρη κατανάλωση των σακχάρων, όμως η χρήση εμπορικών στελεχών μπορεί να καλύψει ξεχωριστές ιδιότητες ορισμένων κρασιών που τα χαρακτηρίζουν, χάνοντας με αυτόν τον τρόπο την γεωγραφική τους ταυτότητα, εντοπιότητα και μετατρέποντάς τα σε κρασιά ευρείας κατανάλωσης, με παρόμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, η αλκοολική ζύμωση με ενδογενή στελέχη μπορεί να εξασφαλίσει την παραγωγή ενός προϊόντος με έντονο τοπικό χαρακτήρα, πρωτότυπο και πολύ ανώτερο ποιοτικά.

### **3. Ποικιλομορφία και βιογεωγραφικός χαρακτηρισμός του πληθυσμού του *S.cerevisiae***

Ένας από τους στόχους των οικολογικών μελετών είναι ο προσδιορισμός της μικροβιακής ποικιλότητας και η κατανόηση του κατά πόσο οι μικροοργανισμοί που μελετούνται είναι κοσμοπολίτικοι, ενδημικοί είτε ξενιστές (Ramette et al., 2007).

Βιογεωγραφία είναι ο κλάδος της βιολογίας που ασχολείται με την γεωγραφική κατανομή των οργανισμών. Το ενδιαφέρον για τη γεωγραφική κατανομή των μικροοργανισμών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, αν και τα ερωτήματα τα είχαν θέσει οι βιολόγοι από τον 18 αιώνα. Στόχος της βιογεωγραφίας είναι να αποκαλύψει πού ζουν οι μικροοργανισμοί, την αφθονία και την κατανομή τους και τις διαφορές τους σε ταξινομικές και χωρικές κλίμακες. Στην πραγματικότητα, η γενετική απόσταση μπορεί να συσχετιστεί με τη γεωγραφική απόσταση ή και τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά (π.χ., η αλατότητα, το βάθος κ.α.) (Schuller et al., 2012).

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει τον ρόλο της γεωγραφικής απομόνωσης στη διαφοροποίηση του πληθυσμού του *S.cerevisiae* στη φύση, υποδεικνύοντας ότι ο *S.cerevisiae* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την εξελικτική βιολογία και τη βιογεωγραφία (Carreto et al., 2008, Liti et al., 2009).

Η αλληλούχιση και ο φυλογενετικός χαρακτηρισμός πολλαπλών απομονώσεων *S.cerevisiae* προσκόμισαν αποδεικτικά στοιχεία σημαντικής γενετικής και φαινοτυπικής ποικιλότητας (Liti et al., 2009).

Πρόσφατες οικολογικές και γεωγραφικές μελέτες έχουν αναδείξει μοναδικά στελέχη τα οποία συνδέονται με συγκεκριμένες ποικιλίες σταφυλιών σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Έτσι επιβεβαιώνεται η σημαντική ποικιλομορφία και ο τοπικός χαρακτήρας το λεγόμενο ‘terroir’ στη διαδικασία της οινοποίησης, προσδίδοντας υψηλή ποιότητα και μοναδική γεύση στα κρασιά (Schuller et al., 2005).

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες και αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους οργανισμούς και το περιβάλλον επηρεάζουν την αναδιάταξη του γονιδιώματος και έτσι την εξέλιξη των φαινοτύπων (Camarasa et al., 2011, Warringer et al., 2011).

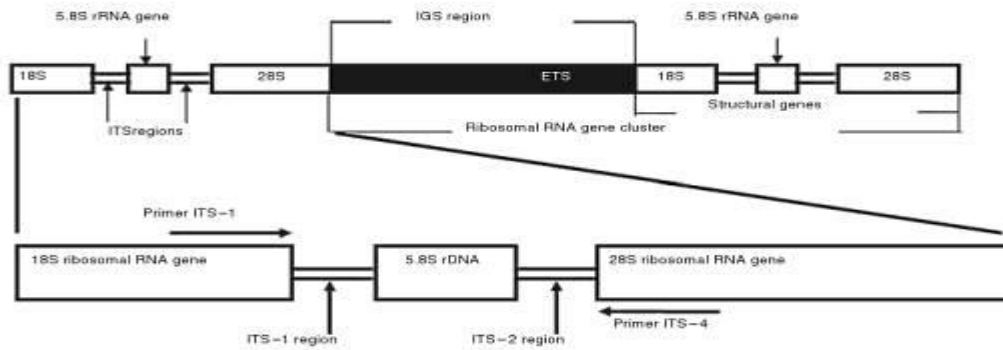
Τα στελέχη του *S.cerevisiae* που σχετίζονται με την οινοποίηση παρουσιάζονται ως μια γενετικά διαφοροποιημένη ομάδα σε σχέση με στελέχη που απομονώθηκαν από άλλους οικοτόπους (π.χ. έδαφος, άλλοι τύποι ζυμώσεων κ. α.). Πολλοί συγγραφείς εξηγούν τις διαφορές τους ως συνέπεια της εξημέρωσης από τον άνθρωπο (Fay and Benavides, 2005, Legras et al., 2007, Schacherer et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια διάφορες μοριακές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για τη μελέτη των διαφορών πληθυσμών του *S.cerevisiae* ως προς την γεωγραφική τους κατανομή καθώς επίσης και τη μελέτη στελεχών *S.cerevisiae* που βρίσκονται στους αμπελώνες σε σχέση με αυτούς που χρησιμοποιούνται στα οινοποιεία.

#### **4. Μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης και διαχωρισμού στελεχών *S.cerevisiae***

Για να προσδιοριστούν τα είδη ζυμών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη χρησιμοποιούνται πρότυπα περιορισμού που δημιουργούνται από την περιοχή που εκτείνονται οι εσωτερικοί μεταγεγραμμένοι διαχωριστές (ITS1 και ITS2) και το γονίδιο 5.8S rRNA (B. Esteve- Zarzoso et al., 1999). Σε πολλές περιπτώσεις, το μέγεθος των προϊόντων της PCR και τα μοτίβα περιορισμού που λαμβάνονται με ενδονουκλεάσες *Cfol*, *Haelll* και *Hinfl* δίνουν ένα μοναδικό προφίλ για κάθε είδος.

Η μέθοδος ταυτοποίησης των ζυμών της 5.8 ITS περιοχής, έχει αποδείξει ότι είναι αναπαραγώγιμη και προτείνεται ως μια ταχεία και εύκολη μοριακή προσέγγιση αναγνώρισης και ταυτοποίησης ζυμών. Οι ριβοσωματικές περιοχές εξελίσσονται με έναν εναρμονισμένο τρόπο, παρουσιάζουν χαμηλό ενδο-ειδικό πολυμορφισμό, και μια υψηλή μεσο-ειδική διακύμανση (Li, 1997).



**Εικόνα 1: Γενικός χάρτης του γονιδίου rRNA σε γονιδίωμα ζυμομύκητα, όπου απεικονίζεται η περιοχή του 5,8 ITS (Gherbamy et al., 2005).**

Έτσι, έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμες για την ταξινόμηση των ειδών του *Saccharomyces* (Huffman et al., 1992, Molina et al., 1992) και για την ταυτοποίηση άλλων ειδών ζυμών του κρασιού (Guillamon et al., 1998). Οι εκκινητές ITS1 και ITS4 χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν την περιοχή της επαναλαμβανόμενης μονάδας rDNA που περιλαμβάνει το γονίδιο 5.8S rRNA και τις δύο μη κωδικοποιημένες περιοχές που ορίζονται οι εσωτερικοί μεταγεγραμμένοι διαχωριστικές (ITS1 και ITS2) (White et al., 1990). Στον πίνακα 1, βλέπουμε ενδεικτικά τα μεγέθη των προϊόντων PCR και των θραυσμάτων περιορισμού που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *CfoI*, *HaeIII* και *HinfI* από διάφορα είδη ζυμών.

Species*	CECT strain no.	AP <sup>†</sup>	Restriction fragments		
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
<i>Pichia guilliermondii</i>	1019, 1021, 1438, 1456 <sup>†</sup>	625	300+265+60	400+115+90	320+300
<i>Pichia jadinii</i>	1060	575	280+230	390+145+40	300+275
<i>Pichia kluyveri</i>	11023 <sup>†</sup>	450	175+115+80+80	370+80	250+200
<i>Pichia membranifaciens</i>	1115, 10570, 10568	500	175+110+90+75	330+90+50	275+200
	10037, 10113	500	260+110+75	330+90+50	275+200
<i>Pichia pastoris</i>	11078	380	360	380	250+130
<i>Pichia pipseri</i>	10662 <sup>†</sup>	650	300+300	425+140+85	310+190+120
<i>Pichia scolzi</i>	10661	650	300+300	425+140+85	310+310
<i>Pichia segobienis</i>	10210 <sup>†</sup>	650	300+285	490+140	310+310
<i>Pichia stipitis</i>	1922 <sup>†</sup>	650	300+285	490+140	310+310
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1941 <sup>†</sup> , 1969	880	385+365	500+220+145	365+155
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1942 <sup>†</sup> , 1971	880	385+365	320+230+180+150	365+155
<i>Saccharomyces exiguus</i>	11192 <sup>†</sup>	675	320+200+90	400+200+75	400+275
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	1939 <sup>†</sup> , 11143	880	385+365	320+230+180+150	440+440
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1940 <sup>†</sup> , 1320	880	385+365	500+220+145	365+155
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	10450 <sup>†</sup> , 11141, 11191	750	360+350	700	450+275
<i>Saccharomycesopsis capulata</i>	10653 <sup>††</sup>	675	600	500+95+80	335+335
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> var. <i>pombe</i>	1379, 11197	1050	600+400	1050	600+450
	1378, 10685	950	525+375	950	500+425
<i>Tarulispora defibracii</i>	1880, 10558, 10589, 10651, 10676, 10683, 10693, 10694, 11146, 11199	800	330+220+150+100	800	410+380
<i>Tarulispora globosa</i>	10655	650	300+300	425+150+90	325+325
<i>Tarulispora pretoriensis</i>	10679, 10680	825	375+330+110	800	380+290+125
<i>Wickerhamiella almerquiae</i>	11173 <sup>†</sup>	825	300+250	525	275+275
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1240	380	210+170	380	190+190
<i>Zygosaccharomyces hellenicus</i>	11163	650	325+325	625	350+170+130
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	10674, 11042, 11043	790	320+270+95+95	690+90	340+225+160+55
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	11055 <sup>†</sup>	790	300+275+110+90	690+100	390+225+150
<i>Zygosaccharomyces cidii</i>	10657	700	310+280+90	300+210+95+95	340+340
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	10382, 10478, 11056 <sup>†</sup>	700	310+280+90	300+210+95+95	340+340
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	11200 <sup>†</sup>	600	275+185+80	590	295+295
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	11057 <sup>††</sup>	850	350+250+210	560+200+90	400+270+180
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	11198 <sup>†</sup>	825	350+285+100+90	725+100	425+400
	10039	825	330+220+150+100	800	425+400
<i>Zygosaccharomyces msakii</i>	10656 <sup>†</sup>	650	290+280+80	390+115+80	300+190+130
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1230, 1232, 10137, 11136, 11189	750	290+280+170+90	400+210+90	350+260+140

**Πίνακας 1: Μέγεθος σε bp των προϊόντων της pcr και των θραυσμάτων περιορισμού των ενδονουκλεασών *CfoI*, *HaeIII* και *HinfI* για διάφορα είδη ζύμης. (B. Esteve- Zarzoso et al., 1999).**

Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές μοριακής βιολογίας που αναπτύχθηκαν, νέες φυλογενετικές σχέσεις αναγνωρίστηκαν, ο αριθμός των ξεχωριστών ομάδων μειώθηκε και η ποικιλομορφία εντός των ομάδων αυξήθηκε (McCullough et al., 1998). Επιπλέον, μοριακές μέθοδοι αναβίωσαν τη μελέτη της βιογεωγραφίας και επηρέασαν θετικά την τελική ερμηνεία των βιογεωγραφικών προτύπων (Ramette and Tiedje, 2007). Ειδικότερα, μια καλύτερη γνώση της μικροβιακής οικολογίας των τοπικών οικοσυστημάτων είναι σημαντική για να κατανοήσουμε τη διαδικασία της οινοποίησης και την παραγωγή προϊόντων με τοπικό χαρακτήρα, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη των σύγχρονων οινολογικών πρακτικών και τη διαφοροποίηση των αμπελοοινικών προϊόντων.

Διάφορες μοριακές μέθοδοι επιτρέπουν την ταυτοποίηση του *S. cerevisiae* σε επίπεδο στελέχους, και καλούνται όχι μόνο να ερευνήσουν την ποικιλομορφία αυτού του είδους, αλλά και για να επιλέξουν στελέχη ώστε να χρησιμοποιηθούν ως καθαρές καλλιέργειες, μια ευρέως διαδεδομένη πρακτική στη βιομηχανία οινοποίησης, όπου στελέχη συμβάλλουν στον ειδικό χαρακτηριστικό του τελικού προϊόντος (Dequin, 2001, Suzzi et al., 2012).



Ο Sipiczki (2011) τόνισε ότι τα στελέχη του κρασιού *S.cerevisiae* είναι πολύκλωνα και ότι οι κλώνοι μπορεί να διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά την οινολογική τους απόδοση και τον γονότυπο. Τα γονιδιώματα των ζυμών υποβάλλονται σε επαναλήψεις, διαγραφές και αναδιατάξεις που μπορεί να προκαλέσουν την απόκτηση νέων λειτουργιών και γονιδίων εξειδίκευσης (Cubillos et al., 2011).

Οι Carreto et al. (2008) έδειξαν ότι τα στελέχη του κρασιού διέφεραν δραματικά από το εργαστήριο στέλεχος αναφοράς σε Ty μεταθετά στοιχεία, ενώ κλινικά στελέχη ήταν παρόμοια με το εργαστηριακό στέλεχος S288C. Έτσι, είναι πιθανό τα κλινικά στελέχη και το S288C να είχαν έναν κοινό πρόγονο και οι διαφορές που βρέθηκαν σε στελέχη του κρασιού μπορεί να οφείλεται στις επιλεκτικές πιέσεις που επηρεάζουν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος σε απόκριση προς τη προσαρμογή στο περιβάλλον.

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τη δομή του πληθυσμού των στελεχών *S.cerevisiae*, οι οικολογικές μελέτες χρησιμοποιώντας μια πολυφασική προσέγγιση, προκειμένου να καθοριστούν τα βιογεωγραφικά πρότυπα έχουν πραγματοποιήσει: μια αυστηρή συνεργασία μεταξύ φυλογενετιστών και των οικολόγων και την ανάπτυξη νέων στατιστικών εργαλείων που παρέχουν μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των παραγόντων που ελέγχουν την βιοποικιλότητα του *S.cerevisiae* και τη βιοχημεία. Οι κύριες μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για βιογεωγραφικές μελέτες αναλύονται παρακάτω.

#### **4.1. Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός σε μικροσυστοιγίες (Array CGH)**

Η συγκριτική γενωμική υβριδοποίηση (CGH) έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την απώλεια, την απόκτηση και την ενίσχυση του αριθμού αντιγράφων σε επίπεδο χρωμοσώματος. Η ανίχνευση των ενισχύσεων είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητη σε λιγότερο από 1 Mb. Αυτή η προσέγγιση έχει εφαρμοστεί πρόσφατα, ώστε να μελετηθεί η εξελικτική σημασία του μεγέθους του γονιδιώματος του *S.cerevisiae* (Edwards - Ingram et al., 2004, Dunn et al., 2005, Gerstein et al., 2006). Οι Dunn et al. (2012) χρησιμοποίησαν αυτή την τεχνική για να μελετήσουν τις παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (CNVs) σε όλες τις υποτελομερικές περιοχές, μη - S288C γενωμικές περιοχές, ρетроμεταθετόνια, μη πυρηνικό mtDNA και πλασμίδια 2mm από 83 στελέχη *S.cerevisiae* που απομονώθηκαν από διαφορετικά βιομηχανικά και φυσικά περιβάλλοντα. Οι ληφθέντες συστάδες για τους διάφορους τύπους χαρακτηριστικών έδειξαν ότι οι περισσότερες από τις παραλλαγές αριθμού

αντιγράφων (CNVs) είτε εμφανίστηκαν σε υποτελομερικές περιοχές είτε μεταξύ των κατηγοριών των μεταθετών στοιχείων και ότι δεν υπήρχαν εμπορικά στελέχη του κρασιού που να είναι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Έτσι, αυτές οι παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs) δεν παράγουν καμία σαφή φυλογένεση, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη είναι αποτέλεσμα της διασταύρωσης μεταξύ των βιομηχανικών και των άγριων στελεχών .

#### **4.2. Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού μιτοχονδριακού DNA (mtDNA-RFLP)**

Ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει ένα μικρό σχετικά γονιδίωμα, ένα μεγάλο αριθμό χρωμοσωμάτων (16 στο σύνολο), λίγο επαναλαμβανόμενο DNA και μερικά εσώνια. Τα απλοειδή στελέχη περιέχουν περίπου 12-13 μεγαβάσεις (Mb) πυρηνικού DNA, το οποίο είναι κατανομημένο κατά μήκος των 16 γραμμικών χρωμοσωμάτων. Το γονιδίωμα του εργαστηριακού στελέχους *S.cerevisiae* S2828C που αλληλουχήθηκε πλήρως το 1997 βρέθηκε ότι περιέχει 12.156.677 ζεύγη βάσεων (bp) και 6.275 γονίδια από τα οποία μόνο τα 5.800 περίπου γονίδια είναι λειτουργικά (Petering JE, et al., 1991).

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους γενετικό σύστημα και το δικό τους μηχανισμό πρωτεϊνοσύνθεσης. Ο *S.cerevisiae* έχει ένα από τα μεγαλύτερα μιτοχονδριακά DNA (mtDNA) από κάθε άλλο μικροοργανισμό.

Η πολυμεράση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) στερείται της ικανότητας διόρθωσης, με αποτέλεσμα να υπάρχει ένα πολύ μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων εντός του μιτοχονδριακού DNA και εν συνεχεία γρηγορότερη εξέλιξη, απ' ό,τι στο εσωτερικό των πυρηνικών γονιδίων (GueÅgrin B., 1991).

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) του *S.cerevisiae* χαρακτηρίζεται από ένα αυξημένο ρυθμό μετάλλαξης. Ειδικότερα , οι μεταλλάξεις υποκατάστασης βάσης και οι πολυμορφισμοί μήκους μπορεί να επισημανθεί με τον περιορισμό των δακτυλικών αποτυπωμάτων του mtDNA με τη χρήση ενδονουκλεασών με διαφορετικές θέσεις (π.χ. *DdeI*, *HinfI*, *AvaI* και *RsaI*). Η αξιοπιστία και η διακριτική ικανότητα αυτής της τεχνικής είναι παρόμοια με εκείνη της PFGE. Η χρήση του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού mtDNA (RFLP) αποκάλυψε ένα ευρύ φάσμα των πολυμορφισμών σε μιτοχονδριακά γονιδιώματα και μιτοχονδριακά γονίδια (Vezinhel et al., 1990, Querol et al., 1994, Versavaud et al., 1995, Lopez et al., 2003). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε από

κοινού με PFGE από τον Vezinhet (1992) για τη μελέτη της εξέλιξης στελεχών *S.cerevisiae* που απομονώθηκαν από διάφορες αμπελουργικές περιοχές άνω των 6 ετών. Η μελέτη έδειξε ότι ορισμένα στελέχη είχαν διανεμηθεί ευρέως στις μελετώμενες περιοχές και παρουσιάζονταν (εμφανίζονταν) επί σειρά ετών, αναφέροντας ότι είναι ενδημικά σε αυτή την περιοχή. Πιο πρόσφατα, οι Di Maio et al. (2012), χρησιμοποίησαν αυτήν τη μέθοδο για τη διερεύνηση της βιοποικιλότητας των πληθυσμών ζύμης του κρασιού που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια αρκετών ετών από τα οινοποιεία της Σικελίας, όπου εμπορικά στελέχη ζύμης δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ποτέ. Από τα 918 στελέχη ζύμης τα 209 ήταν διαφορετικά. Μεγάλη βιοποικιλότητα του *S.cerevisiae* παρατηρήθηκε και στην περιοχή Vinho Verde της Πορτογαλίας όταν απομονώθηκαν 1620 στελέχη από 54 αυθόρμητες ζυμώσεις και εντοπίστηκαν 297 διαφορετικά γενετικά μοτίβα (Schuller et al., 2005).

Στις μέρες μας, η εφαρμογή της έχει σε μεγάλο βαθμό αντικατασταθεί από νεότερες και πιο εξελιγμένες μεθόδους, εξαιτίας ορισμένων περιορισμών, όπως η μεγάλη ποσότητα DNA που απαιτεί καθώς και η δυσκίνητη και χρονοβόρα τεχνολογία που χρησιμοποιεί.

#### **4.3. Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (PFGE)**

Τα στελέχη του *S.cerevisiae* εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία στον αριθμό και το μέγεθος των χρωμοσωμάτων τους. Η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (PFGE) μπορεί και διαχωρίζει τα χρωμοσώματα διαφορετικού μεγέθους. Η μέθοδος αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Schwartz και Cantor (1984) και εξακολουθεί να είναι ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία για τη διερεύνηση της βιογεωγραφίας και της φυλογένεσης των ζυμών. Η ανάλυση των χρωμοσωμάτων στελεχών ζύμης με PFGE έδειξε την παρουσία πολυμορφισμών, οι οποίοι προέρχονται από χρωμοσωματικές αναδιατάξεις, όπως μεταθέσεις και διαγραφές (Carro et al., 2003).

Επίσης πολλοί συγγραφείς έχουν αποδείξει ότι αναλύοντας τον καρυότυπο μπορούμε ταυτοποιήσουμε καλύτερα τις ζύμες, επειδή είναι σε θέση να αναδείξει τους πολυμορφισμούς των χρωμοσωμικών προφίλ φυσικών πληθυσμών *S.cerevisiae* από σχεδόν όλες τις αμπελουργικές περιοχές του κόσμου ( Johnston and Mortimer, 1986, Vezinhet et al., 1990, Biddenne et al., 1992, Frazier and Dubourdieu, 1992, Briones et al., 1996, Egli et al., 1998, Povhe et al., 2001, Schuller et al., 2004, Sipiczki et al., 2004, Antunovics et al., 2005, Wang et al., 2012).

Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο για προκαρυωτικούς όσο και για ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς καθώς και για την κατασκευή φυσικών χαρτών, αφού παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια.

Αρνητικός παράγοντας είναι το υψηλό κόστος εξοπλισμού και αναλωσίμων και η απαίτηση σε άριστα εκπαιδευμένους χειριστές.

#### **4.4. Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD)**

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη χρήση ενός μονού σύντομου εκκινητή (8-12 νουκλεοτίδια) που ενισχύει τυχαίες DNA αλληλουχίες και αντιπροσωπεύει μία ικανή μέθοδο ταυτοποίησης για πολλές ζύμες και βακτήρια ( Quesada and Cenis, 1995, Martinez et al., 2007, Tofalo et al., 2007).

Χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του ότι δεν απαιτεί ειδικούς εκκινητές, είναι γρήγορη, απλή, αποτελεσματική και χρειάζεται μόνο μικρές ποσότητες DNA. Επίσης δίνει μεγάλο αριθμό θραυσμάτων και το κόστος της είναι χαμηλό σε σχέση με άλλες μεθόδους.

Το μειονέκτημά της είναι ότι ίσως κάποιες φορές να είναι δύσκολη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς μπορεί να μην γίνει σωστή αντιστοίχιση μεταξύ του εκκινητή και της αλληλουχίας των βάσεων.

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τους Cavalieri et al. (1998) για να διαφοροποιήσουν 166 στελέχη *S.cerevisiae* τα οποία απομόνωσαν από δύο ιταλικές περιφέρειες, την Τοσκάνη και τη Σικελία. Η τυχαία ενίσχυση του πολυμορφικού DNA (RAPD)-PCR επέτρεψε την αναγνώριση 16 προτύπων.

Επίσης οι Tofalo et al. (2007) χρησιμοποίησαν την προσέγγιση αυτή ώστε να διαχωρίσουν γενετικά διαφορετικά στελέχη *S.cerevisiae*, από τέσσερις διαφορετικές οινοπαραγωγικές περιοχές της Ιταλίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γενετικές διαφορές αντικατοπτρίζουν στην φαινοτυπική βιοποικιλότητα.

#### **4.5. Μικροδορυφορικό DNA (Microsatellites)**

Το Μικροδορυφορικό DNA ή μικροδορυφόροι, είναι μικρές διαδοχικές επαναλήψεις νουκλεοτιδικών μοτίβων, των οποίων οι επαναλαμβανόμενες μονάδες έχουν μήκος 1 έως 6 βάσεις. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του DNA χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού.

Οι μικροδορυφόροι είναι άφθονοι στο γονιδίωμα των στελεχών *S.cerevisiae*, είναι υψηλά πολυμορφικοί και για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ως δείκτες σε πειράματα γενετικής χαρτογράφησης, παρουσιάζει μεγάλη διακριτική ικανότητα, δεν είναι όμως ιδιαίτερα χρήσιμοι για την εκτίμηση εξελικτικών γεγονότων που συνέβησαν στο μακρινό παρελθόν (Gallego et al., 1998, Richards et al., 2009, Hennequin et al., 2001, Schuller et al., 2004, Bradbury et al., 2005, Legras et al., 2005).

Αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει αυτή την προσέγγιση για την ταυτοποίηση στελεχών *S.cerevisiae* διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων (Ness et al., 1993, Versavaud et al., 1995, Gallego et al., 1998, Hennequin et al., 2001, Bradbury et al., 2005, Legras et al., 2005, Schuller et al., 2005, Muller and McCusker, 2009b).

#### **4.6. Πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας DNA (Multilocus Sequence Typing)**

Ο Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας DNA (MLST) είναι μια μέθοδος τυποποίησης, η οποία τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται σε βακτήρια και μύκητες, με σκοπό το χαρακτηρισμό των στελεχών τους σε μοριακό επίπεδο (Aa et al., 2006, Ayoub et al., 2006). Η μέθοδος MLST ταυτοποιεί τα στελέχη *S.cerevisiae*, με την χρήση αλληλουχιών DNA εσωτερικών θραυσμάτων πολλαπλών housekeeping γονιδίων (γονίδια κυτταρικής οικονομίας ή γονίδια βασικού μεταβολισμού). Τα γονίδια βασικού μεταβολισμού, δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής και για το λόγο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες τυποποίησης και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών ενός είδους μυκήτων. Είναι εξαιρετικά αξιόπιστη και με σημαντική διακριτική ικανότητα επειδή βασίζεται σε ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Πρόσφατα, αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε για να μελετηθεί η δομή του πληθυσμού και η εξέλιξη του *S.cerevisiae* (Fay and Benavides, 2005, Aa et al., 2006). Οι Ayoub και οι συνεργάτες του το 2006 εξέτασαν μια σειρά από επτά θέσεις 84 στελεχών *S.cerevisiae* διαφορετικών προελεύσεων από τα οποία: 65 στελέχη απομονώθηκαν από παραδοσιακά οινοποιεία στο Λίβανο, και τα υπόλοιπα ήταν εμπορικά στελέχη και στελέχη απομονωμένα από την Ασία. Από τα προφίλ που προέκυψαν φαινόταν να διαφοροποιούνται τα στελέχη ανάλογα με την προέλευσή τους.

#### **4.7. Ανάλυση Interdelta**

Οι δ αλληλουχίες είναι πλευρικές αλληλουχίες μεγέθους περίπου 300 bp οι οποίες συχνά σχετίζονται με τα Ty1 και Ty2 μεταθετά στοιχεία όπως ονομάζονται και βρίσκονται διάσπαρτα σε όλο το γονιδίωμα και είναι ιδιαίτερα συχνά στα άκρα των χρωμοσωμάτων (Franco - Duarte et al., 2011). Εντοπίζονται επίσης και ως μεμονωμένα στοιχεία. Ο αριθμός τους από 35 έως 55 και η θέση τους διαφέρει ανάμεσα στα είδη και για το λόγο αυτό αποτελούν σημαντικοί γενετικοί δείκτες για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών. Η ενίσχυση των "interdelta" περιοχών μεταξύ γειτονικών δ αλληλουχιών έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται ειδικά πρότυπα. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό μεγάλου αριθμού στελεχών, επειδή είναι εύκολη να εκτελέσει, είναι φθηνή και γρήγορη. Το 2003 οι Legras και Karst σχεδίασαν τους εναλλακτικούς εκκινητές d12 και d21, οι οποίοι αντικατέστησαν τους εκκινητές d1 και d2 με απώτερο σκοπό την βελτίωση της μεθόδου. Ο συνδυασμός αυτών των εκκινητών ( d12/δ21 ή d12/d2 ) αύξησε την διακριτική ικανότητα της μεθόδου (Legras et al., 2003). Ειδικότερα, η χρήση των εκκινητών d12 και d2 έδειξε την ίδια διακριτική ικανότητα και άλλες μεθόδους, όπως mtDNA, RFLP, ανάλυση μικροδορυφόρων και PFGE, για την ταυτοποίηση στελεχών (Schuller et al., 2004). Η ανάλυση των δ αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ στελεχών του *S.cerevisiae* 16 αμπελώνων όπου και διαπιστώθηκε ένας μεγάλος συσχετισμός μεταξύ του γονοτύπου και της ποικιλίας αμπέλου (Schuller et al., 2012).

#### **5. Οινολογικά (Τεχνολογικά) χαρακτηριστικά των ζυμών**

Από τη στιγμή που οι οινολόγοι συνειδητοποίησαν ότι η αλκοολική ζύμωση δεν είναι ένα φαινόμενο καθαρά χημικό, αλλά είναι αποτέλεσμα της δράσης των ζυμών, έστρεψαν τις προσπάθειές τους στην επιλογή ζυμών οι οποίες θα βελτίωναν την ποιότητα των οίνων.

Οι ζύμες λοιπόν διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο, διότι όχι μόνο εκτελούν την αλκοολική ζύμωση (AF), δηλαδή τη μετατροπή του γλεύκους σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub>, αλλά επίσης επηρεάζουν τη γεύση και την ποιότητα του οίνου με την παραγωγή και την απέκκριση των μεταβολιτών τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους μέχρι την μετέπειτα αυτόλυσή τους (Fleet GH, 1993).

Κάποια κριτήρια θετικής επιλογής των ζυμών σύμφωνα με τα οινολογικά τους χαρακτηριστικά είναι: αντοχή στην αιθανόλη (EtOH), αντοχή στο θειώδη ανυδρίτη (SO<sub>2</sub>),

μη- παραγωγή βιογενών αμινών (BA), μη- παραγωγή υδρόθειου (H<sub>2</sub>S), παραγωγή β-γλυκοσιδάσης και φαινότυπο killer.

### **5.1. Αντοχή στην αιθανόλη (EtOH)**

Η αιθανόλη είναι γνωστό ότι λειτουργεί σαν αναστολέας της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Έχει αναφερθεί ότι βλάπτει το μιτοχονδριακό DNA σε κύτταρα ζύμης (Ibeas et al., 1997) και ότι μπορεί να προκαλέσει την απενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων, όπως της εξοκινάσης (Augustin et al., 1965) και της αφυδρογονάσης (Nagodawithana et al., 1976).

Επίσης από πολλές μελέτες έχει τεκμηριωθεί η αλλοίωση της σύνθεσης των κυτταρικών λιπιδίων όταν γίνεται έκθεση σε αιθανόλη (Chi et al., 1999).

Παρ' όλα αυτά, ο *S.cerevisiae* εμφανίζει μεγάλη αντοχή στην αιθανόλη και κάποια στελέχη του μπορούν να προσαρμοστούν σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Είναι άλλωστε και το είδος που τελικά επιβιώνει και ολοκληρώνει την αλκοολική ζύμωση.

Πρόσφατα ο Mauriello et al. (2009) αξιολόγησε ως προς το οινολογικό τους ενδιαφέρον, 36 στελέχη *S.cerevisiae*, τα οποία απομονώθηκαν από αμπελώνες της βορείου και νοτίου Ιταλίας. Από αυτά το 30% άντεξε σε 18% αιθανόλη, το 64% των στελεχών παρουσίασε υψηλή αντοχή στο θειώδες (SO<sub>2</sub>), ενώ το 61% εμφάνισε χαμηλή ή και καθόλου παραγωγή υδρόθειου (H<sub>2</sub>S) χαρακτηριστικά που περιγράφονται στη συνέχεια.

### **5.2. Αντοχή στο θειώδες (SO<sub>2</sub>)**

Σήμερα, η χρήση του πρόσθετου διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) είναι μια σχεδόν καθολικά αποδεκτή πρακτική οινοποίησης. Είναι μια ένωση που έχει μια απλή χημική δομή: δύο άτομα οξυγόνου δεσμευμένα σε ένα άτομο θείου. Στο καταναλωτικό κοινό είναι γνωστή ως συντηρητικό και χρησιμοποιείται σε τρόφιμα και ποτά. Κατά την αλκοολική ζύμωση διοξείδιο του θείου παράγεται φυσικά σε μικρές ποσότητες από τις ζύμες, ενώ το μεγαλύτερο μέρος προστίθεται από τους οινοποιούς σε μορφή σκόνης (potassium metabisulfite, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ή τροφοδοτείται απ' ευθείας στο κρασί ως αέριο.

Παρόλο που το διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) δεν έχει βρεθεί να έχει καρκινογόνο ή μεταλλαξιογόνο δράση, ωστόσο μπορεί να δημιουργεί σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις σε ορισμένους ανθρώπους.

Είναι δύσκολο να φτιάξουμε ποιοτικό κρασί χωρίς την προσθήκη SO<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, καθότι παίζει δύο πολύ σημαντικούς ρόλους. Πρώτον αναστέλλει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, όπως αλλοιογόνες ζύμες και βακτήρια που μπορεί να προκαλέσουν διάφορες βλάβες στο κρασί και δεύτερον δρα ως αντιοξειδωτικό και προστατεύει το κρασί από την αμαύρωση (Garde-Cerdan et al., 2007).

Σε μια πρόσφατη μελέτη των Capece et al. (2012), για την ποικιλομορφία των ζυμών *S.cerevisiae*, οι οποίες απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις (συνολικά 132 στελέχη), εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα στο θειώδες (μεταξύ 200 και 300mg/l SO<sub>2</sub>), υψηλή ανθεκτικότητα στην αλκοόλη (αντοχή σε 16% v/v), μέτρια έως υψηλή παραγωγή υδρόθειου ενώ το 30% βρέθηκε θετικό στην παραγωγή β-γλυκοσιδάσης και στην παραγωγή βιογενών αμινών.

### **5.3. Βιογενείς αμίνες (BA)**

Οι βιογενείς αμίνες είναι αζωτούχες οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με αλειφατικές, αρωματικές και ετεροκυκλικές δομές. Βρίσκονται στα τρόφιμα όπως ψάρια, κρέας, τυρί, λαχανικά και κρασιά και οι πιο κοινές είναι η ισταμίνη, τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη, πουτρεσκίνη, σεροτονίνη και καδαβερίνη. Σχηματίζονται με την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων ιστιδίνη, τυροσίνη, φαινυλαιθυλαμίνη, ισταμίνη, τρυπτοφάνη, αργινίνη και προκαλούν στους καταναλωτές αλλεργικές αντιδράσεις όπως δυσκολία στην αναπνοή, φαγούρα, εξάνθημα, έμετο, πυρετό, υπέρταση και πονοκεφάλους (Aishath Naila et al., 2010).

Η παρουσία των βιογενών αμινών στους οίνους γίνεται ολοένα και πιο σημαντική για τους καταναλωτές όσο και τους παραγωγούς, λόγω των πιθανών απειλών τοξικότητας που μπορεί να προκαλέσουν στον άνθρωπο και κατ'επέκταση των αρνητικών επιπτώσεων στο εμπόριο.

Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή βιογενών αμινών είναι οι συνθήκες αποθήκευσης (Komprda et al., 2001), διαδικασίες παραγωγής (Rivas et al., 2008), πρακτικές παραγωγής (Komprda et al., 2001) το ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού με δραστηριότητα αποκαρβοξυλίωσης (Santos 1996), η ποιότητα των πρώτων υλών (Maijala et al., 1995b), καθώς και η διαθεσιμότητα των ελεύθερων αμινοξέων (Maijala et al., 1995a).

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Goñi & Ancín Azpilicueta (2001) εξέτασαν τη συγκέντρωση βιογενών αμινών που παράγονται από διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* σε ροζέ κρασιά. Βρήκαν μια μικρή αύξηση σε βιογενείς αμίνες εξαρτώμενη από το στέλεχος.



Οι Torrea & Ancín (2002) προχώρησαν με παρόμοιες μελέτες και διαπίστωσαν ότι εμβολιάζοντας γλεύκη, παράγονται κρασιά με υψηλή συγκέντρωση βιογενών αμινών σε σύγκριση με τις αυθόρμητες ζυμώσεις που εκτελούνται από τις αυτόχθονες ζύμες. Το γεγονός αυτό το αποδίδουν στην μεγαλύτερη κατανάλωση πρόδρομων αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τις εμπορικές ζύμες, και το χαμηλότερο πληθυσμό ζύμης στις αυθόρμητες ζυμώσεις.

Στελέχη ζύμης διαφορετικών ειδών, τα οποία απομονώθηκαν από σταφύλια και κρασί μελετήθηκαν από τους Caruso et al. (2002) ως προς την παραγωγή τους σε βιογενείς αμίνες. Τα στελέχη του *B. Bruxellensis* σχημάτισαν στο σύνολο την υψηλότερη συγκέντρωση σε βιογενείς αμίνες και ακολούθησαν στελέχη του *S.cerevisiae*.

#### **5.4. Παραγωγή υδρόθειου (H<sub>2</sub>S)**

Το άρωμα του κρασιού και ιδιαίτερα ο χαρακτήρας του διαμορφώνεται από τρεις κατηγορίες αρωματικών ενώσεων. Τα πρωτογενή αρώματα είναι αυτά που προκύπτουν άμεσα από τα σταφύλια (άνθη, φρούτα), δευτερογενή είναι αυτά που παράγονται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση ενώ τριτογενή είναι αυτά που προκύπτουν ύστερα από παλαίωση, ωρίμανση του κρασιού το λεγόμενο "μπουκέτο" (μπαχαρικά, ξύλο κ.α.). Οργανικά οξέα, ανώτερες αλκοόλες, χαμηλές πτητικές οργανικές ενώσεις του θείου και εστέρες αποτελούν συστατικά του κρασιού που προκύπτουν κατά την αλκοολική ζύμωση.

Η συγκέντρωση αυτών των συστατικών στο τελικό προϊόν εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης, τις συνθήκες ζύμωσης και τις θρεπτικές ουσίες (Ana Mendes-Ferreira et al., 2011).

Οι πτητικές ενώσεις θείου, όπως το υδρόθειο (H<sub>2</sub>S) και άλλες, παράγονται από τις ζύμες κατά τη ζύμωση και οι περισσότερες συνδέονται με δυσάρεστες οσμές και γεύσεις (Swiegers et al., 2007). Το υδρόθειο (H<sub>2</sub>S) προσδίδει μια οσμή από κλούβιο αυγό και έχει εξαιρετικά αρνητικές επιπτώσεις στον οργανοληπτικό χαρακτήρα και κατά συνέπεια στην ποιότητα του κρασιού, όταν υπερβαίνει το όριο αντίληψης (50 έως 80 mg l<sup>-1</sup>). Αντίθετα σε χαμηλότερα επίπεδα, 20 έως 30 mg l<sup>-1</sup>, η ένωση έχει θετικό αποτέλεσμα, προσδίδοντας μια μυρωδιά από ζύμες (Rauhut et al., 1993).

Επίσης η έλλειψη αζώτου στο μούστο, μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την υπερβολική παραγωγή υδρόθειου (H<sub>2</sub>S) (Wang, et al., 2003).

Οι Sabina Di Maio et al. (2012) σε μελέτη που πραγματοποίησαν για τη διαφύλαξη της βιοποικιλότητας των ενδογενών πληθυσμών *S.cerevisiae* σε περιοχή της Ιταλίας, όπου οι

παραδοσιακές οινοποιητικές πρακτικές εξακολουθούν να υφίστανται, προσδιόρισαν και την παραγωγή τους σε υδρόθειο και σε β-γλυκοσιδάση, η οποία θα αναφερθεί παρακάτω. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τα 129 στελέχη το 11,6% δεν παρουσίασε παραγωγή υδρόθειου, το 16,3% είχε χαμηλή παραγωγή, το 57,4% είχε μεσαία παραγωγή ενώ το 14,7% είχε υψηλή παραγωγή. Επίσης δεν παρουσίασαν καμία παραγωγή β-γλυκοσιδάσης.

### **5.5. Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης**

Μέχρι τώρα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ζύμες που εμπλέκονται στην διαδικασία της οινοποίησης έχουν δραστικότητα β-γλυκοσιδάσης, και ότι αυτή η δραστικότητα είναι μεγαλύτερη σε στελέχη ζυμών μη *Saccharomyces* από ό, τι σε *Saccharomyces cerevisiae* (Manzanares, et al., 2000).

Οι ζύμες και κυρίως οι μη *S.cerevisiae* παράγουν και εκκρίνουν διάφορα ένζυμα όπως εστεράσες, γλυκοσιδάσες, λιπάσες, πρωτεάσες, β-γλυκοσιδάσες στον περιπλασματικό χώρο. Τα ένζυμα αυτά μπορούν και αλληλεπιδρούν με πρόδρομες ενώσεις των σταφυλιών και να παράγουν με τη σειρά τους αρωματικές ενώσεις, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο ποικιλιακό άρωμα (Charoenchai, et al., 1997).

Παρόλα αυτά, άλλοι συγγραφείς αναφέρουν την παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης από στελέχη *S.cerevisiae* και τη δυνατότητα των ενζύμων αυτών να ενισχύουν το άρωμα των οίνων (Delcroix, et al., 1994).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η σύνθεση της β-γλυκοσιδάσης στα διάφορα είδη ζυμών, ενισχύεται υπό αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης, εμφανίζεται κατά την διάρκεια της εκθετικής τους φάσης (G.Fia et al., 2005) και αναστέλλεται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Rosi, et al., 1994).

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη μελέτη του G.Fia (2005) επιβεβαίωσαν ακόμα μια φορά ότι η παραγωγή β-γλυκοσιδάσης από στελέχη *S.cerevisiae* είναι πολύ μικρότερη από εκείνη που παρατηρείται στις άγριες (non-*Saccharomyces*).

### **5.6. Φαινόμενο killer**

Το φαινόμενο killer δεν είναι ένα νέο βιολογικό φαινόμενο. Ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 1963 σε στελέχη *S.cerevisiae* (Bevan, et al., 1963). Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να

ελευθερώνουν πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες σκοτώνουν τα ευαίσθητα στελέχη και για το λόγο αυτό ονομάζονται παράγοντες killer.

Στα στελέχη *S.cerevisiae* σχετίζεται με την παρουσία μη - μολυσματικών, ενδοκυτταρικών σωματιδίων που προσομοιάζουν με ιό (VLP). Τα σωματίδια αυτά (VLP) κληρονομούνται στο κυτταρόπλασμα των ζυμών killer και περιέχουν δύο γραμμικά διπλής έλικας ριβονουκλεϊκά οξέα (dsRNA), το L και M γονιδίωμα (Wickner RB. 1996). Το γονιδίωμα L- dsRNA κωδικοποιεί ένα RNA – μια εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και την ιική πρωτεΐνη που συμπυκνώνει τα δύο γονιδιώματα. Το γονιδίωμα M κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική ουσία, μια τοξίνη (zymocin) και έναν παράγοντα ανοσίας. Η τοξίνη αυτή εκκρίνεται από τα στελέχη "zymocidal" και είναι θανατηφόρα για ευαίσθητα στελέχη του ίδιου είδους. Η ίδια ζύμη που παράγει αυτήν την τοξίνη έχει ανοσία σε αυτήν, όμως μπορεί να είναι ευαίσθητη σε κάποια άλλη τοξίνη.

Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί πέντε τύποι *S.cerevisiae* που παράγουν την τοξίνη killer, η K1, η K2, η K3, η K 28 και η K3GR1 (Wickner RB., 1996), ενώ υπάρχουν και οι τοξίνες K<sub>4</sub>-K<sub>11</sub> που βρίσκονται μεταξύ άλλων γενών (G.A. da Silva., 1996).

Υπάρχουν και κάποια στελέχη τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην τοξίνη killer, χωρίς όμως να μπορούν να την παράγουν. Αυτά τα στελέχη ονομάζονται ουδέτερα και περιέχουν τα L και τα M dsRNA γονιδιώματα, με το M γονιδίωμα να κωδικεύει μόνο τον παράγοντα ανοσίας. Τα στελέχη όσον αφορά τον παράγοντα killer ταξινομούνται σε: killer (K), sensitive (S) και neutral (N).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Silva (1996) για το φαινόμενο killer σε 85 στελέχη του *S.cerevisiae* διαπιστώθηκε ότι το 24,7% των στελεχών παρουσίασαν δραστηριότητα killer (K<sup>+</sup>R<sup>+</sup>), το 70,6% ήταν ανθεκτικά σε τοξίνη killer (K<sup>-</sup>R<sup>+</sup>) και μόλις το 7,1% ήταν ευαίσθητα σε αυτήν (K<sup>-</sup>R<sup>-</sup>) (G.A. da Silva., 1996).

## **6. Κροκίδωση (flocculation)**

Τα κύτταρα ζύμης έχουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα να προσκολλώνται σε αβιοτικές επιφάνειες, τα κύτταρα και ιστούς (Kojic and Darouiche, 2004). Αυτές οι προσκολλητικές ιδιότητες έχουν μεγάλη σημασία στην ιατρική και τη βιομηχανία.

Στην οινοποίηση, η προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου (κροκίδωση) είναι μια επιθυμητή ιδιότητα των βιομηχανικών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* που επιτρέπει τον εύκολο

διαχωρισμό των κυττάρων από το τελικό προϊόν της ζύμωσης, το κρασί (Verstrepen et al., 2003).

Η προσκόλληση οφείλεται σε μια κατηγορία ειδικών πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος, που ονομάζονται «προσκολλητίνες». Τα κύτταρα φέρουν πολλές διαφορετικές προσκολλητίνες, επιτρέποντας την προσκόλλησή τους σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Αρκετές αλληλουχίες μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένης της Ras / cAMP / PKA και MAP κινάση (MAPK) εξαρτώμενα νηματοειδή μονοπάτια ανάπτυξης, ελέγχουν στενά τη σύνθεση διαφόρων προσκολλητίνων.

Μαζί, αυτά τα μονοπάτια ενεργοποιούν την προσκόλληση ως απάντηση στο στρες, στο περιορισμένο θρεπτικό μέσο ή στα μικρά μόρια που παράγονται από τον ξενιστή, όπως η αυξίνη στα φυτά και NAD στα θηλαστικά. Επίσης, οι προσκολλητίνες υπόκεινται σε υποτελομερικές επιγενετικές αλλαγές, με αποτέλεσμα να έχουμε στοχαστικά πρότυπα έκφρασης. Εσωτερικές διαδοχικές επαναλήψεις μέσα στα γονίδια των προσκολλητίνων μπορεί να προκαλέσουν ανασυνδυασμό και σχηματισμό νέων προσκολλητίνων.

Το κυτταρικό τοίχωμα εκτός του ότι παρέχει σταθεροποίηση και θωρακίζει το κύτταρο από μηχανικές δυνάμεις, χρησιμεύει και ως εργαλείο για την αλληλεπίδρασή του με το περιβάλλον. Μια από τις πιο σημαντικές λειτουργίες της επιφάνειας του κυττάρου είναι η ικανότητα του να προσκολλάται σε άλλα κύτταρα και επιφάνειες.

Στο τέλος της διαδικασίας ζύμωσης, όταν όλα τα διαθέσιμα σάκχαρα έχουν μετατραπεί σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, τα κύτταρα ζύμης αρχίζουν να προσκολλούνται το ένα στο άλλο και σχηματίζουν μακροσκοπικά «κροκιδώσεις» οι οποίες συνιστώνται από πολλές χιλιάδες κύτταρα. Ανάλογα με το στέλεχος οι κροκιδώσεις είτε καθιζάνουν γρήγορα στον πυθμένα (στελέχη «lager»), είτε επιπλέουν στην επιφάνεια (στελέχη «ale») διευκολύνοντας έτσι την απομάκρυνσή τους από το μέσο. Τα κύτταρα ζύμης είναι σε θέση να προσαρμόζουν γρήγορα τις ιδιότητες προσκόλλησης τους σε νέα περιβάλλοντα.

Τα διαφορετικά είδη ζύμης φέρουν διαφορετικές οικογένειες προσκολλητίνων οι οποίες αντικατοπτρίζουν τον τρόπο ζωής τους, καθώς επίσης και συγγενικά είδη μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (Guo et al., 2000; Verstrepen et al., 2004a).

Όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* που φέρει πέντε γονίδια κροκιδώσης (FLO): FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 και FLO11 (Teunissen and Steensma, 1995). Οι FLO1, FLO5, FLO9 και FLO10 είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου (κροκιδώση), ενώ η FLO11 είναι υπεύθυνο για την προσκόλληση σε υποστρώματα (Guo et al., 2000).

## **6.1. Μηχανισμοί προσκόλλησης**

Υπάρχουν δύο τρόποι προσκόλλησης που καθιστούν τα κύτταρα ζύμης ικανά να συνδέονται με άλλα κύτταρα ή με άλλες επιφάνειες. Like- λεκτίνη προσκόλληση (ευαίσθητη στα σάκχαρα) και προσκόλληση αδρανείς στα σάκχαρα. Η προσκόλληση like-λεκτίνη, ακολουθεί την υπόθεση της λεκτίνης σύμφωνα με την οποία οι προσκολλητίνες ενώνονται με αμινοξέα ή σάκχαρα γειτονικών κυττάρων (Stratford, 1992; Guo et al ., 2000). Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχουμε δύο κατηγορίες. Την FLO1 και την NewFLO. Η FLO κατηγορία δεσμεύει μόνο σάκχαρα μαννόζης, ενώ η NewFLO εκτός της μαννόζης δεσμεύει και άλλα σάκχαρα όπως γλυκόζη και μαλτόζη (Sato et al ., 2002). Τα περισσότερα εμπορικά στελέχη που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία είναι τύπου NewFLO, όπου τα σάκχαρα στο μέσο εμποδίζουν τον σχηματισμό κροκιδωμάτων πριν τα ζυμώμενα σάκχαρα μετατραπούν σε αιθανόλη, στοιχείο που επιζητούν οι ζυθοποιοί και οι οινοποιοί.

Από τη άλλη πλευρά η προσκόλληση ανεξάρτητα από τα σάκχαρα, πραγματοποιείται από προσκολλητίνες που δεσμεύουν πεπτίδια αντί για σάκχαρα ή αυξάνουν την κυτταρική τους επιφάνεια υδροφοβικά με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και των αβιοτικών επιφανειών.

Επίσης τα γονίδια που κωδικοποιούν το φαινόμενο της κροκίδωσης ελέγχονται από διάφορα ρυθμιστικά μονοπάτια και ενεργοποιούνται από διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως έλλειψη αζώτου ή άνθρακα, μεταβολές στο pH και αύξηση των επιπέδων της αιθανόλης. Η μετάβαση στο φαινόμενο της κροκίδωσης πιθανώς προστατεύει τις ζύμες από το έντονο στρες και τους επιτρέπει να προσαρμοστούν (Sampermans et al ., 2005).

# Υλικά και μέθοδοι

## 1. Στελέχη ζύμης

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας αξιολογήθηκαν 309 άγρια στελέχη, από δείγματα σταφυλιών της ποικιλίας "Αγιωργίτικου" που συλλέχθηκαν από τη ζώνη της Νεμέας και τα διέθετε στη συλλογή του το Ινστιτούτο Οίνου.

Τα δείγματα των σταφυλιών προήλθαν από 18 διαφορετικούς αμπελώνες (Ασπρόκαμπος, Αρχαία Νεμέα, Κούτσι, Άγιος Βασίλειος, Κουτσομόδι, Νεμέα και Λεόντειο) και τα στελέχη απομονώθηκαν ύστερα από δειγματοληψίες στο τέλος των αυθόρμητων ζυμώσεων.

Τα στελέχη είχαν συλλεχθεί από το θρεπτικό υπόστρωμα YPD agar και ESA και ήταν αποθηκευμένα στους -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης 30% v/v.

Θρεπτικά υποστρώματα:

<b><u>YPD agar (per liter)</u></b>	
Yeast extract Powder (LAB M)	10g
Bacteriological peptone (OXOID)	20g
Glucose (ROQUETTE)	20g
Bacto agar (Agar Bacteriological-OXOID)	20g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

<b><u>ESA (per liter)</u></b>	
Yeast extract Powder (LAB M)	5g
Bacteriological peptone (OXOID)	5g
Glucose (ROQUETTE)	20g
Bacto agar (Agar Bacteriological- OXOID)	20g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε αιθυλική αλκοόλη 12% και μεταθειώδες νάτριο (sodium metabisulfite) 0.015% w/v.

### **1.1. Απομόνωση DNA για την ταυτοποίηση των στελεγών *S.cerevisiae***

Τα στελέχη ανανεώθηκαν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα YPD agar και επώστηκαν στους  $28^{\circ}\text{C}$ . Η απομόνωση του DNA των ζυμών πραγματοποιήθηκε με βρασμό σε PCR tube 0,2ml όπου προστέθηκε 3μl NaOH 0,02N και μικρή ποσότητα βιομάζας από κάθε στέλεχος. Στη συνέχεια τέθηκαν για βρασμό για 10min στους  $99^{\circ}\text{C}$ .

#### **1.1.1. Ενίσχυση της 5.8S ITS περιοχής του rDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Η ενίσχυση της 5.8S ITS rDNA περιοχής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εκκινητών ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') και ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Η ενίσχυση της αντίδρασης έγινε σε τελικό όγκο 50 μl το οποίο περιλάμβανε 1x buffer Kara A, 0.5 μM από τους εκκινητές ITS1 και ITS4, 200 μM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση (KAPATaq DNA Polymerase, KAPABIOSYSTEMS)

Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή BioRad (MJ Mini™ Personal Thermal Cycler) σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

1x	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 3min στους $94^{\circ}\text{C}$
35x	Αποδιάταξη στους $94^{\circ}\text{C}$ για 30sec Υβριδισμός των εκκινητών στους $52^{\circ}\text{C}$ για 30sec Επιμήκυνση στους $74^{\circ}\text{C}$ για 1min
1x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους $74^{\circ}\text{C}$ για 10min
Διατήρηση στους $10^{\circ}\text{C}$	



### **1.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Τα προϊόντα της αντίδραση αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) (1,2 % w/v) με TAE, οπτικοποιήθηκαν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Applichem) 5μl/100 ml και φωτογραφήθηκαν παρουσία UV ακτινοβολίας.

Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100 bp DNA Ladder, New England, Biolabs).

### **1.1.3. Ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού της 5.8S ITS περιοχής**

Για τις αντιδράσεις περιορισμού της 5.8S ITS περιοχής, τα προϊόντα PCR επώαστηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HhaI*, *HaeIII*, *HinfI* (Takara, Japan). Κάθε φορά περίπου 400ng προϊόντος PCR επώαστηκαν με 10 Units από το ένζυμο και 1x από το buffer σε τελικό όγκο 20 μl για 1h στους 37 °C.

Τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 2.5% w/v και ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας βρωμιούχο αιθίδιο παρουσία UV ακτινοβολίας. Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100bp DNA Ladder, New England, Biolabs).

## **1.2. Διαχωρισμός στελεγών *S.cerevisiae* με την ανάλυση πολυμορφισμών μήκους θραυσμάτων περιορισμού μιτοχονδριακού DNA (mtDNA – RFLP)**

Από τα ανανεωμένα στελέχη *S.cerevisiae* σε τρυβλία petri ελήφθη βιομάζα και εμβολιάστηκαν σωληνάκια με 5ml YDP broth. Έπειτα από 24h επώασης στους 28 °C, ελήφθησαν 30μl από κάθε σωληνάκι και εμβολιάστηκαν κωνικές με YPD broth. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

### **1.2.1. Πρωτόκολλο Yeast DNA Miniprep (DNA EXTRACTION)**

1. Κύτταρα (ζύμης) αναπτύσσονται overnight στους 28°C σε 25ml YPD broth
2. Τα κύτταρα συλλέγονται σε eppendorf των 2ml, με φυγοκέντριση στα 8.000g για 1 min. Το υπερκείμενο αφαιρείται

3. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου πάρουμε βιομάζα από 6ml καλλιέργεια
4. Στη συνέχεια επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 0,5 ml sorbitol buffer και κάνουμε vortex
5. Προσθέτουμε 25μl lyticase (50 Units) και επωάζουμε για 1 ώρα στους 37°C
6. Φυγοκεντρούμε max speed για 1 min
7. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 0,5 ml 50mM Tris-Cl (pH 7,4), 20mM Na<sub>2</sub> EDTA (επαναδιάλυση με tip)
8. Προσθέτουμε 0,05 ml 10% SDS (καλό χτύπημα)
9. Επώαση στους 65°C για 30 minutes
10. Στη συνέχεια προσθέτουμε 0,2 ml 5M potassium acetate, ανακινούμε και τοποθετούμε τα eppendorf για 1 ώρα στον πάγο
11. Φυγοκεντρούμε 2 φορές για 15 min max speed. (Φυγοκεντρώ για 15 λεπτά, μεταφέρω το υπερκείμενο σε eppendorf των 1.5ml, ξαναφυγοκεντρώ και μεταφέρω για δεύτερη φορά το υπερκείμενο σε καινούριο eppendorf)
12. Προσθέτουμε ίσο όγκο (700μl) isopropanol 100%, σε θερμοκρασία δωματίου. Ανακινούμε για 5 λεπτά με το στατό. Φυγοκεντρούμε για 10 sec, αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε να στεγνώσει το pellet
13. Επαναδιαλύουμε το pellet σε 300μl TE (pH 7,4)
14. Προσθέτουμε 15μl RNase A 1mg/ml και επωάζουμε για 30min στους 37°C. (πριν μπουν στους 37°C mix)
15. Προσθέτουμε 0,03μl sodium acetate 3M και ανακινούμε. Προσθέτουμε 0,2ml isopropanol 100% και ανακινούμε ελαφρά με στατό για 5 min
16. Φυγοκεντρούμε για 10 sec, αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε να στεγνώσει το pellet (10-15min)
17. Επαναδιαλύουμε το pellet σε 45μl ddH<sub>2</sub>O (mix)
18. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του DNA
19. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πέψη overnight στους 37°C, σε τελικό όγκο 35μl με 2-2,5μg γενωμικού DNA, 1μl από το ένζυμο περιορισμού *HinfI* 10U (Taqaqa) και 1x από το buffer.

Τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 1% w/v και ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας βρωμιούχο αιθίδιο παρουσία UV ακτινοβολίας. Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100bp DNA Ladder, New England, Biolabs).

### **1.2.2. Διαλύματα πρωτοκόλλου DNA extraction**

<b><u>YPD broth (per liter)</u></b>	
Yeast extract Powder (LAB M)	10g
Bacteriological peptone (OXOID)	20g
Glucose (ROQUETTE)	20g
dH <sub>2</sub> O	1000ml

<b><u>Sorbitol buffer</u></b>
Sorbitol 1M (APPLICHEM)
EDTA 0.1M (pH 7.5) (APPLICHEM)
dH <sub>2</sub> O

Αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου.

<b><u>Potassium acetate (5M) (100ml)</u></b>	
5M potassium acetate (APPLICHEM)	60ml
Glacial acetic acid (APPLICHEM)	11.5ml
dH <sub>2</sub> O	28.5ml

Αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου.

<b><u>Tris EDTA (TE) pH 7.4</u></b>
100mM Tris-Cl (pH 7.4) (Tris ultrapure-APPLICHEM)
10mM EDTA (pH 8.0) (Disodium salt dehydrate, molecular biology grade-APPLICHEM)

dH<sub>2</sub>O

Αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου

### **Sodium acetate 3M, pH 5.2**

Διαλύουμε 408,3g από το sodium acetate·3H<sub>2</sub>O σε 800ml dH<sub>2</sub>O. Ρυθμίζουμε το pH στο 5,2 με glacial acetic acid. Φτάνουμε τον όγκο στο 1 λίτρο με dH<sub>2</sub>O. Σπάμε σε μικρότερα κλάσματα και αποστειρώνουμε.

### **Lyticase (from *Arthrobacter luteus* – SIGMA)**

Δίνεται σε στερεή μορφή. Αραιώνουμε σε ddH<sub>2</sub>O την στερεή μορφή έτσι ώστε να φτιάξουμε 2.000Units/ml. Μοιράζουμε σε κλάσματα των 0,5ml σε erpendorf. Φυλάσσεται στους -20 °C.

### **SDS (solution 10%, molecular biology grade-APPLICHEM)**

### **Isopropanol 100% (2-propanol, molecular biology grade-APPLICHEM)**

### **RNase A 1mg/ml (APPLICHEM)**

Stock 20mg/ml

### **TAE 50X (per liter)**

242g Tris base

57.1ml glacial acetic acid

100ml EDTA 0.5M (pH 8.0)

Ζυγίζουμε το Tris base και προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως dH<sub>2</sub>O 500ml. Προσθέτουμε το EDTA και το glacial acetic acid (η προσθήκη γίνεται στον επαγωγό και με γάντια). Αναδεύουμε μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα και διορθώνουμε τον όγκο προσθέτοντας dH<sub>2</sub>O μέχρι τα 1000ml

### **TAE 1X (per liter)**

20ml TAE 50X

980ml dH<sub>2</sub>O

### **EDTA 0.5M (pH 8.0)**

Σε 800ml dH<sub>2</sub>O προσθέτουμε 186,1g disodium EDTA · 2H<sub>2</sub>O. Αναδεύουμε μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα, στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 8.0 με NaOH ( -20g NaOH pellets) και αποστειρώνουμε.

### **1.3. Διαχωρισμός στελεγών *S.cerevisiae* με την ενίσχυση των interdelta περιοχών τους με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την απομόνωση του DNA των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* προστέθηκαν σε PCR tube 0,2ml, 3μl NaOH 0,02N και μικρή ποσότητα βιομάζας από κάθε στέλεχος. Στη συνέχεια τέθηκαν για βρασμό για 10min στους 99 °C σε κυκλοποιητή Thermal-cycler (Thermo Electro's Px2, Thermo Electron Corporation, Canada).

#### **1.3.1. Ενίσχυση των interdelta περιοχών του *S.cerevisiae***

Για την ενίσχυση των interdelta περιοχών του *S.cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') και delta 21 (5'- CATCTTAACACCGTATATGA-3') (Legras et al., 2003). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl με 1x buffer Kapa A, 2.5mM MgCl<sub>2</sub> (Biolabs), 2x BSA (KAPABIOSYSTEMS), 1μM από κάθε εκκινητή, 200mM από κάθε dNTP και 1U DNA πολυμεράσης (KAPATaq DNA Polymerase, KAPABIOSYSTEMS). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Thermal-cycler (Thermo Electro's Px2, Thermo Electron Corporation, Canada) σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

1x	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 3min στους 94 °C
	Αποδιάταξη στους 94 °C για 30sec

35x	Υβριδισμός των εκκινητών στους 46 °C για 30sec Επιμήκυνση στους 72 °C για 90min
1x	Τελική επιμήκυνση προϊόντος στους 72 °C για 10min
Διατήρηση στους 10 °C	

Τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης (Invitrogen) 2% w/v και ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας βρωμιούχο αιθίδιο παρουσία UV ακτινοβολίας. Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100kb DNA Ladder, New England, Biolabs).

## **2. Οινολογικά –Τεχνολογικά τεστ**

### **2.1.Ethanol Tolerance (Αντοχή στην αιθανόλη) (per liter)**

1 λίτρο μούστος διηθημένος (με ντουλπάνι), το οποίο δεν περιέχει metabisfoulfit  
15g/l Bacteriological Agar (OXOID)  
Ethanol absolute (Merck)

Φιλτράρουμε 1 λίτρο μούστο και προσθέτουμε 15g/l agar. Αφού ομογενοποιηθεί το διάλυμα, ρυθμίζουμε το pH στο 3,6 με HCl (4N). Παστεριώνουμε για 20min στους 100 °C. Στη συνέχεια προσθέτουμε αιθανόλη, 10-18% vol (10%, 12%, 14%, 16% και 18% αντίστοιχα).

Τα στελέχη "σποτάρονται" πάνω στο θρεπτικό μέσο και τα τρυβλία επωάζονται για 24h στους 26 °C. Ο βαθμός ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους αναφέρεται ως η ελάχιστη δόση η οποία επιτρέπει την ανάπτυξή της. Αξιολογούμε την ανάπτυξη των αποικιών στα τρυβλία, συγκρίνοντας τα με τρυβλία τα οποία δεν περιέχουν αιθανόλη (ως control). (Mauriello, et al. 2009).

### **2.2.SO<sub>2</sub> Resistance (Αντοχή στο Διοξείδιο του Θείου) (per liter)**

1 λίτρο μούστος διηθημένος (με ντουλπάνι), το οποίο δεν περιέχει metabisfoulfit  
15g/l Bacteriological Agar (OXOID)

### Potassium Metabisulfite

Φιλτράρουμε 1 λίτρο μούστο και προσθέτουμε 15g/l agar. Αφού ομογενοποιηθεί το διάλυμα, ρυθμίζουμε το pH στο 3,6 με HCl (4N). Παστεριώνουμε για 20min στους 100 °C.

Στη συνέχεια προσθέτουμε διαφορετικές ποσότητες potassium metabisulfite (100mg/l , 150mg/l, 200mg/l, 250mg/l, 300mg/l) αφού αποστειρωθεί με φίλτρο 0,2μm. Στρώνουμε το θρεπτικό μέσο σε τρυβλία petri.

Αξιολογούμε την ανάπτυξη των αποικιών στα τρυβλία μετά από 24h στους 26 °C, συγκρίνοντας τα με τρυβλία τα οποία δεν περιέχουν Potassium Metabisulfite ως control (R. Pando Bedriñana et al 2009).

### **2.3.Βιογενείς Αμίνες, YEPD AGAR (per liter)**

Yeast Extract Powder (LAB M) 10g/l

Bacteriological Peptone (OXOID) 20g/l

Dextrose (glucose) (ROQUETTE) 20g/l

Bacteriological Agar (OXOID) 20g/l

Bromocresol Purple (SIGMA) 0.006%

Επιλεγμένο αμινοξύ 10g/l

(Ιστιδίνη, Ισταμίνη, Φαινυλαλανίνη, Τυροσίνη (no autoclave), Τρυπτοφάνη (no autoclave), Αργινίνη)

dH<sub>2</sub>O

Αποστειρώνουμε το υλικό μας στους 121°C για 20 λεπτά. Τα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη προστίθενται μετά την αποστείρωση αφού αποστειρωθούν με φίλτρο 0,2μm.

Εναποθέτουμε βιομάζα από κάθε στέλεχος σε τρυβλία με διαφορετικό αμινοξύ. Ο σχηματισμός βιογενών αμινών υποδεικνύεται με ένα μοβ "φωτοστέφανο" γύρω από την αποικία ως αποτέλεσμα της αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων. (De Benedictis et al. 2011).

### **2.4.Παραγωγή Υδρόθειου (H<sub>2</sub>S), BIGGY AGAR (per liter)**

Ammonium Bismuth Citrate (for microbiology – FLUKA) 5g/l

Sodium Sulfite 3g/l

Dextrose (glucose) (ROQUETTE) 10g/l

Glycine (SIGMA) 10g/l

Yeast Extract Powder (LAB M) 1g/l

Bacteriological Agar (OXOID) 16g/l

dH<sub>2</sub>O

Ρυθμίζουμε το pH στο 6,8±0,2. Δεν αποστειρώνεται. Μετά την ομογενοποίηση του υλικού, ακολουθεί βρασμός και στρώνουμε το θρεπτικό μέσο σε τρυβλία petri.

Η παραγωγή υδρόθειου προσδιορίζεται σε BIGGY AGAR. Επωάζουμε τα τρυβλία με τις αποικίες από τα στελέχη στους 28°C για 24h. Έπειτα παρατηρούμε το χρωματισμό των αποικιών.

Η αξιολόγηση γίνεται με την ακόλουθη κλίμακα. White: καθόλου παραγωγή, Light brown: χαμηλή παραγωγή, Dark brown μεσαία παραγωγή, Black: υψηλή παραγωγή υδρόθειου (R. Pando Bedriñana et al 2009).

Για όλα τα παραπάνω τεστ χρησιμοποιούμε φρέσκοις καλλιέργειες των στελεχών σε YPD broth.

### **2.5. Παραγωγή β- γλυκοσιδάσης (b- glucosidase)**

Όλα τα προς εξέταση στελέχη αναπτύχθηκαν σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα YPD

#### **YPD AGAR (per liter)**

Yeast Extract Powder (LAB M) 1g/l

Bacteriological Peptone (OXOID) 2g/l

Dextrose (glucose) (ROQUETTE) 2g/l

Bacteriological Agar (OXOID) 2g/l

Αποστειρώνουμε το υλικό μας στους 121°C για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια παίρνουμε βιομάζα 48h και κάνουμε streaking στο GPY θρεπτικό μέσο για την ανίχνευση της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης

#### **GPY AGAR (per liter)**

Yeast Extract Powder (LAB M) 1g/l

Arbutin (SIGMA) 5g/l

Iron Chloride (SIGMA) (no autoclave) 1,4g/l

Bacteriological Agar (OXOID) 20g/l

dH<sub>2</sub>O

Διόρθωση pH στο 5,0



Αποστειρώνουμε το υλικό μας στους 121°C για 20 λεπτά. Το Iron Chloride προστίθεται μετά την αποστείρωση αφού αποστειρωθεί με φίλτρο 0,2μm.

Μετά από 15μέρες επώασης στους 28°C, στελέχη με δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης υδρολύουν την αρβουτίνη (η οποία είναι η μόνη πηγή άνθρακα), με αποτέλεσμα ένα καφέ σκούρο χρώμα να αναπτύσσεται γύρω από το streaking.

Ο χαρακτηρισμός που χρησιμοποιείται είναι White: για τα streaking που δεν έχουν αλλάξει χρώμα και παραμένουν λευκά, Yellow: για τα streaking που έχουν αλλάξει χρώμα και έχουν πάρει το χρώμα της ώχρας και Brown: για τα streaking που έχουν αλλάξει χρώμα και έχουν γίνει σκούρο καφέ χρώμα (De Benedictis et al. 2011).

## **2.6.Killer Test, YEPD – MB AGAR (per liter)**

Yeast extract (LAB M) 10g/l

Peptone (OXOID) 20g/l

Dextrose (glucose) (ROQUETTE) 20g/l

Bacteriological Agar (OXOID) 20g/l

Methylene Blue (SIGMA) (no autoclave) 0,003g/l

Αντί για dH<sub>2</sub>O, προσθέτουμε citrate phosphate buffer 0,1M pH 4,5. Μετά την αποστείρωση διορθώνουμε το pH στο 4,5 με citrate και προσθέτουμε την χρωστική, η οποία έχει αποστειρωθεί με φίλτρο 0,2μm.

Όλα τα στελέχη ανανεώνονται από τρυβλίο σε YPD broth (24h) και εν συνεχεία γίνεται δεύτερη ανανέωση σε YPD broth (14h).

Ενσωματώνουμε στο YPD-MB agar το ευαίσθητο στέλεχος σε πληθυσμό 10<sup>5</sup> cells/ml (pour).

Αφού σταθεροποιηθεί το θρεπτικό μέσο "σποτάrouμε" (20μl) τα στελέχη που θέλουμε να ελέγξουμε. Επωάζουμε στους 18°C για 5 μέρες.

Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως killer (k<sup>+</sup>), όταν το "spot" περιβάλλεται από μια ευκρινή ζώνη αναστολής. Τα υπόλοιπα στελέχη ελέγχονται ως προς την αντοχή (R<sup>+</sup> - R<sup>-</sup>).

Ακολουθείται η ίδια μέθοδος.

Όλα τα στελέχη ανανεώνονται από τρυβλίο σε YPD broth (24h) και εν συνεχεία γίνεται δεύτερη ανανέωση σε YPD broth (14h). Τα στελέχη killer ανανεώνονται σε τρυβλία έτσι να έχουμε φρέσκια καλλιέργεια. Ενσωματώνουμε στο YPD-MB agar το στέλεχος που θέλουμε να ελέγξουμε ως προς την αντοχή στα στελέχη killer σε πληθυσμό 10<sup>5</sup> cells/ml. Μόλις το θρεπτικό μέσο σταθεροποιηθεί εναποθέτουμε βιομάζα από το στέλεχος που είναι χαρακτηρισμένο ως killer. Επωάζουμε στους 18°C για 5 μέρες. Τα στελέχη χαρακτηρίζονται

ως ευαίσθητα ( $K^R^-$ ) όταν γύρω από το στέλεχος killer δημιουργηθεί μία ευδιάκριτη ζώνη αναστολής. Τα υπόλοιπα χαρακτηρίζονται ως  $R^+$  ( $K^R^+$ ) (De Ullivarrri MF, et al. 2011).

### **3. Μεταλλαγμένα στελέχη που παρουσιάζουν το φαινόμενο της κροκίδωσης**

Μεταλλαγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* ανανεώθηκαν από τους  $-80^\circ\text{C}$  σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα YPD agar και επώαστηκαν στους  $28^\circ\text{C}$ . Ακολούθησε απομόνωση του DNA των ζυμών σύμφωνα με το πρωτόκολλο Yeast DNA Miniprep (DNA EXTRACTION), το οποίο αναφέρεται παραπάνω μέχρι το στάδιο της ποσοτικοποίησης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο για την διάσωση του πλασμιδίου.

#### **3.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδίου "Plasmid rescue"**

1. Βάζουμε 5μg γενομικού DNA για πέψη με 5units από το ένζυμο (EcoRI, HindIII, Sall, ClaI, XhoI or KpnI) overnight στους  $37^\circ\text{C}$ , σε ποσότητα ίση με 40μl
2. Τρέχουμε 20μl σε ένα τζελ για να ελέγξουμε την πέψη. Το υπόλοιπο θερμαίνεται στους  $65^\circ\text{C}$  για 25min για να απενεργοποιήσουμε το ένζυμο. Στη συνέχεια προσθέτουμε 215μl ddH<sub>2</sub>O, 25μl 10X ligase buffer και 1μl ligase(400 units). Για να αποφύγουμε ενδομοριακές αντιδράσεις, η συγκέντρωση του DNA στη λιγοποίηση, δεν πρέπει να είναι πάνω από 10μg/ml και κάτω από 2 μg/ml
3. Μετά την λιγοποίηση τους  $4^\circ\text{C}$  overnight, προσθέτουμε 125μl NH<sub>4</sub>Ac 7.5M και 375μl ισοπροπανόλη. Ανακινούμε αρκετές φορές και φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 20min
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε μια φορά το pellet με 70% αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε, max speed για 30sec, αφαιρούμε το υπερκείμενο με τη βοήθεια πιπέτας, αφήνουμε να στεγνώσει καλά το pellet και το επαναδιαλύουμε σε 6μl TE. Μετασηματίζουμε κύτταρα E.coli με 3μl από το DNA pellet, χρησιμοποιώντας electroporation (το πρωτόκολλο αναφέρεται στη συνέχεια). Κάνουμε minipreps (το πρωτόκολλο αναφέρεται στη συνέχεια) σε αρκετές αποικίες από το κάθε στέλεχος
5. Rescued plasmid μπορεί να αναλυθεί με διπλή πέψη χρησιμοποιώντας το ένζυμο BamHI και το "recovery" ένζυμο. Το επιθυμητό πλασμίδιο έχει μία μάλιστα μεγέθους

2,85kb μαζί με το φορέα αλληλούχισης (3,9kb για το EcoRI) και επιπρόσθετες μπάντες από το γενομικό DNA. Εάν πάρουμε "mystery" πλασμίδιο, προσπαθούμε με διαφορετικό "recovery" ένζυμο

6. Αλληλουχούμε τα DNA preparations χρησιμοποιώντας έναν primer συμπληρωματικό

### **3.2. Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli***

1. Μονή αποικία κατάλληλου βακτηριακού στελέχους (DH5a) αναπτύσσεται σε 10ml θρεπτικού μέσου LB ύστερα από επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες με ανάδευση (250rpm)
2. Μεταφορά όγκου αρχικής καλλιέργειας σε 2 φλάσκες του λίτρου που περιέχουν 250ml θρεπτικού μέσου LB (προθερμασμένο), έτσι ώστε η οπτική πυκνότητα να γίνει ίση με 0,05 ( $O.D._{600}=0.05$ )
3. Επωάζουμε τις 2 φλάσκες στους 37°C με ανάδευση (250rpm). Μετράμε οπτική πυκνότητα κάθε 20min ( $O.D._{600}$ )
4. Όταν  $O.D._{600}=0,5$  αμέσως μεταφέρουμε τις φλάσκες στον πάγο για 30min. Αναδεύουμε τις καλλιέργειες στις φλάσκες έτσι ώστε να κρυώνουν ομοιόμορφα. Παράλληλα βάζουμε 4 μποτίλιες φυγοκέντρισης στον πάγο, ανοίγουμε την φυγόκεντρο και την ψύχουμε
5. Μεταφέρουμε τις καλλιέργειες σε 2 παγωμένες μποτίλιες φυγοκέντρισης
6. Φυγοκέντριση για 15min στους 4°C στα 2800g (5000rpm για GSA rotor της Sorvall)
7. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 250ml 10% γλυκερόλη
8. Φυγοκέντριση για 15min στους 4°C στα 2800g
9. Αποχύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 125ml 10% γλυκερόλη. Σε αυτό το σημείο αλλάζουμε μποτίλιες (παγωμένες-καθαρές)
10. Φυγοκεντρούμε για 15min στους 4°C στα 2800g
11. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε απαλά σε 62,5ml 10% γλυκερόλη
12. Μετά την επαναδιάλυση ομογενοποιούμε τις 2 μποτίλιες σε μια
13. Φυγοκέντριση για 15min στους 4°C στα 2800g
14. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε απαλά σε 2ml διαλύματος 10% γλυκερόλη, 150mM trehalose
15. Μοιράζω σε κλάσματα των 40μl σε ήδη παγωμένα tubes. Τα tubes βυθίζονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80 °C

### **3.3. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* με πλασμιδιακό DNA (Transformation of *E. coli* by Electroporation)**

1. Μεταφέρουμε όσα κλάσματα με τα ηλεκτροδεκτικά κύτταρα χρειαζόμαστε και τις κυβέτες ηλεκτροπόρωσης στον πάγο
2. Προσθέτουμε σε κάθε tube 10pg έως 25ng πλασμιδιακού DNA τα οποία βρίσκονται σε όγκο 1-2μl, αναδεύουμε με την πιπέτα χωρίς να γίνονται φυσαλίδες και αφήνουμε στον πάγο για 30-60sec
3. Ρυθμίζουμε την συσκευή ηλεκτροπόρωσης στα 25μF, 200ohm και 1,6kV
4. Μεταφέρουμε τα κύτταρα και το DNA στην κυβέτα ηλεκτροπόρωσης και σκουπίζουμε την εξωτερική πλευρά της κυβέτας ώστε να μην έχει υγρασία
5. Κάνουμε ηλεκτροπόρωση και αμέσως μετά τον παλμό προσθέτουμε 1ml υγρό θρεπτικό LB προθερμασμένο στους 42 °C και ομογενοποιούμε με την πιπέτα χωρίς να γίνονται φυσαλίδες
6. Μεταφορά σε αποστειρωμένα erppendorf του 1,5ml και επωάζουμε για 1hour στους 37 °C (ανά 15min ανακινούμε τα erppendorf)
7. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB το οποίο περιέχει αμπικιλίνη (50μg/ml), σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Στρώνουμε 100μl και τα υπόλοιπα 900μl τα φυγοκεντρούμε σε 3.000rpm για 5min, αφαιρώ τα 800μl και στρώνω τα άλλα 100μl)
8. Αφήνουμε τα τρυβλία να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επωάζουμε τα τρυβλία στους 37 °C για 12-16 hours, όπου και θα εμφανιστούν οι μετασηματισμένες αποικίες

### **3.4. Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli* με αλκαλική λύση (Plasmid DNA miniprep)**

1. Εμβολιάζουμε μονή αποικία σε 5ml θρεπτικού μέσου LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό 25μg/ml (στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται αμπικιλίνη)
2. Το εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο επωάζεται overnight στους 37°C με ανάδευση

3. Μεταφέρουμε 1,4ml σε eppendorf των 1,5ml και φυγοκεντρούμε για 30 sec, max speed
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία
5. Προσθέτουμε 300μl από το διάλυμα P1
6. Βόρτεξ μέχρι το pellet να επαναδιαλυθεί
7. Προσθέτουμε 300μl από το διάλυμα P2 και γυρίζουμε το χρονόμετρο
8. Κλείνουμε το eppendorf και ανακινούμε 1 φορά "ευγενικά"
9. Ανοίγουμε το eppendorf και όταν το χρονόμετρο δείξει 5 λεπτά ακριβώς, προσθέτουμε 300μl από το διάλυμα P3 (ένα λευκό σύννεφο θα εμφανιστεί με την προσθήκη) (Μην χρησιμοποιήσετε sodium acetate)
10. Κλείνουμε το eppendorf και ανακινούμε 1 φορά "ευγενικά"
11. Φυγοκεντρούμε για 20 min (max speed/ room temperature)
12. Όσο φυγοκεντρούμε, γράφουμε καινούρια eppendorf
13. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο eppendorf (Η μεταφορά μπορεί να γίνει και με πιπέτα) (Μην ανησυχείτε για τις βρωμιές)
14. Φυγοκεντρούμε για 20 min, max speed, room temperature
15. Μεταφέρουμε 700μl -800μl με πιπέτα σε καινούριο eppendorf. Προσοχή το διάλυμά μας πρέπει να είναι πολύ καθαρό
16. Προσθέτουμε 400μl cold isopropanol και ανακινούμε αρκετές φορές
17. Φυγοκεντρούμε για 20 min (max speed/room temperature)
18. Πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500μl 70% παγωμένη αιθανόλη (Το DNA δεν είναι ορατό. Μην ανησυχείτε)
19. Φυγοκεντρούμε για 5 min (max speed/room temperature)
20. Αποχύνουμε το υπερκείμενο
21. Φυγοκεντρούμε για 1 min και αφαιρούμε το υπερκείμενο με πιπέτα. Αφήνουμε το pellet να στεγνώσει
22. Προσθέτουμε 30μl ddH<sub>2</sub>O για να επαναδιαλύσουμε το DNA

### 3.5. Διαλύματα πρωτοκόλλου απομόνωσης πλασμιδιακού DNA

<b>P1</b>	
Tris-HCl (pH 8) 50 mM	500μl of 1M stock
EDTA (pH 8) 10 mM	200μl of 0,5M stock
RNase 100μg/ml	50μl of 20mg/ml stock
ddH <sub>2</sub> O	10ml (αρκούν για 30 minipreps)

**RNase πρέπει να είναι φρέσκια και το stock πρέπει να φυλάσσεται στους -20°C σε eppendorf των 100μl**

<b>P2</b>	
NaOH 200mM	1ml of 2M stock
SDS 1%	1ml of 10% stock
ddH <sub>2</sub> O	10ml (αρκούν για 30 minipreps)

<b>P3</b>	
Potassium acetate 3M p H 5.5	
Ρυθμίζουμε το pH με glacial acetic acid	

#### **Ethanol 70% (Ethanol absolute, purity ≥99.5% - MERCK CCHEMICALS)**

#### **Ampicillin (ampicillin sodium salt BioChemica – APPLICHEM)**

Stock solution 100 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Φιλτράρεται με φίλτρο 0,2μm (pore size filter).  
Φυλάσσεται στους -20 °C.

#### **Γλυκερόλη 10% (molecular biology grade, purity ≥99% - SIGMA)**

Αραιώνουμε 1 μέρος 100% γλυκερόλη με 9 μέρη υπερκάθαρο νερό. Αποστειρώνουμε και αποθηκεύουμε στους 4°C.

#### **LB broth (per liter)**

Tryptone (BIOKAR DIAGNOSTICS) 10g

Yeast Extract (LAB M) 5g

NaCl (Sodium Chloride-PANREAC) 10g

950ml dH<sub>2</sub>O

Αναδεύουμε όλες τις ουσίες μέχρι να διαλυθούν. Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 7.0 με 5N NaOH ( 0.2ml). Στη συνέχεια πάμε τον όγκο του διαλύματος στο 1 λίτρο με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Αποστείρωση για 20min 15psi.

### **LB agar (per liter)**

Tryptone (BIOKAR DIAGNOSTICS) 10g

Yeast extract (LAB M) 5g

NaCl (Sodium Chloride-PANREAC) 10g

Bacto agar (Agar Bacteriological- OXOID) 15g

950ml dH<sub>2</sub>O

Αναδεύουμε όλες τις ουσίες μέχρι να διαλυθούν. Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 7.0 με 5N NaOH ( 0.2ml). Στη συνέχεια πάμε τον όγκο του διαλύματος στο 1 λίτρο με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Αποστείρωση για 20min 15psi. Υπό ασηπτικές συνθήκες γεμίζουμε τα τρυβλία με περίπου 20ml θρεπτικού υποστρώματος. Τα τρυβλία αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου στερεοποιηθούν. Στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4 °C.

### **Ampicillin (ampicillin sodium salt BioChemica – APPLICHEM)**

Stock solution 100 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Φιλτράρεται με φίλτρο 0,2μm (pore size filter).

Φυλάσσεται στους -20 °C.

### **Ammonium acetate (NH<sub>4</sub>Ac) 7.5M (250ml)**

Προσθέτουμε 144,375g σε 200ml dH<sub>2</sub>O. Ομογενοποιούμε το διάλυμα μας και συμπληρώνουμε με dH<sub>2</sub>O μέχρι τα 250ml. Φιλτράρεται με φίλτρο 0,22μm (pore size filter). Φυλάσσεται στους 4 °C.

### **Ethanol 70% (Ethanol absolute, purity ≥99.5% - MERCK CCHEMICALS)**

70 μέρη ethanol absolute

30 μέρη ddH<sub>2</sub>O

## **Tris-EDTA (TE) 1X (pH 7.5)**

10mM TrisCl pH 7.5 (Tris ultrapure-APPLICHEM)

1mM EDTA pH 8 (Disodium salt dehydrate, molecular biology grade-APPLICHEM)

### **4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Για να αναλύσουμε τα κλάσματα νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων, χρησιμοποιήσαμε την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Με την βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), η οποία είναι μια χρωστική που παρεβάλλεται μεταξύ των βάσεων, τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων γίνονται ορατά. Η χρωστική αυτή έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) (φωτός). Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν και ποικίλλει από 0.8% ως 3% αγαρόζη w/v ανάλογα με το τι θέλουμε να διαχωρήσουμε. (Sambrook, Fritsch et al., 1982)

0.8% αγαρόζη w/v : ολικό DNA (ποσοτικοποίηση) συγκρίνοντας ένταση των ζωνών τους με τους Μάρτυρες Μοριακού Βάρους που πάντα έχουν συγκεκριμένη περιεκτικότητα.

#### **4.1. Παρασκευή gel αγαρόζης**

1. Σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος 1xTAE προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης
2. Θερμαίνουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το μίγμα καταστεί διαφανές
3. Στη συνέχεια προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v
4. Αφού περάσουν λίγα λεπτά και κρυώσει το μίγμα με την αγαρόζη, η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και το αφήνουμε να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου
5. Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα χρωστικής loading dye και ddH<sub>2</sub>O
6. Μετά την πήξη της αγαρόζης απομακρύνουμε την χτένα και προσθέτουμε κατάλληλο όγκο από το 1xTAE το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο 0,005% v/v και το οποίο



αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (σε περίπτωση ποσοτικοποίησης δεν προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο στο buffer)

7. Τα δείγματα φορτώνονται στις ειδικές θέσεις της πηκτής, οι οποίες διαμορφώθηκαν από την χτένα
8. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα με την παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος συνεχούς τάσης 50 – 170V, ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού, το μέγεθος της πηκτής, το μέγεθος της συσκευής ηλεκροφόρησης και την περιεκτικότητα της αγαρόζης . Το DNA αφού είναι ο αρνητικά φορτισμένο μεταναστεύει από τον αρνητικό προς τον θετικό.

#### **4.2. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης**

##### **Βρωμιούχο αιθίδιο**

5mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε σκούρο μπουκάλι στους 4°C

##### **50x TAE πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (per liter)**

242g Tris-base (APPLICHEM)

57,1ml glacial acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH)

100ml 0,5M EDTA pH 8,0

Ζυγίζουμε το Tris-base και προσθέτουμε σε ποτήρι ζέσεως 500ml dH<sub>2</sub>O. Προσθέτω το EDTA και το CH<sub>3</sub>COOH με γάντια και τον επαγωγό σε λειτουργία. Αναδεύω μέχρι να διαλυθεί καλά το Tris και διορθώνω τον όγκο προσθέτοντας dH<sub>2</sub>O μέχρι τα 1000ml σε ογκομετρικό.

##### **1x TAE ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (per liter)**

20ml TAE 50x

980ml dH<sub>2</sub>O

#### **4.3. Ποσοτικοποίηση DNA**

Πραγματοποιείται σε πηκτή αγαρόζης 0,8 % μετά από σύγκριση των δειγμάτων με πρότυπα δείγματα του φάγου λ γνωστής συγκέντρωσης 50 ng/μl- 300 ng/μl.

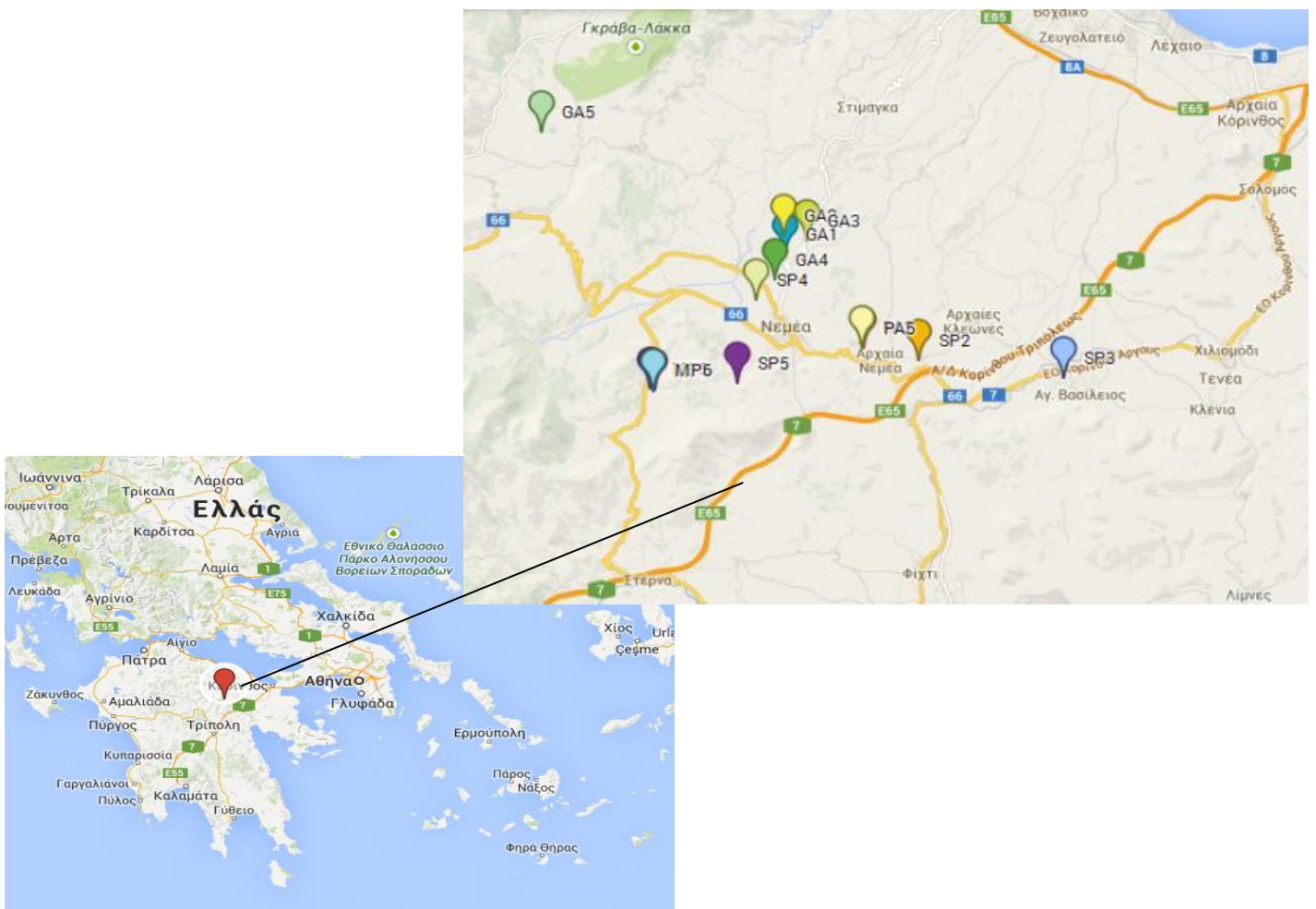
Η ένταση των ζωνών του DNA συγκρίνεται με την ένταση των ζωνών από τους μάρτυρες.

# Αποτελέσματα

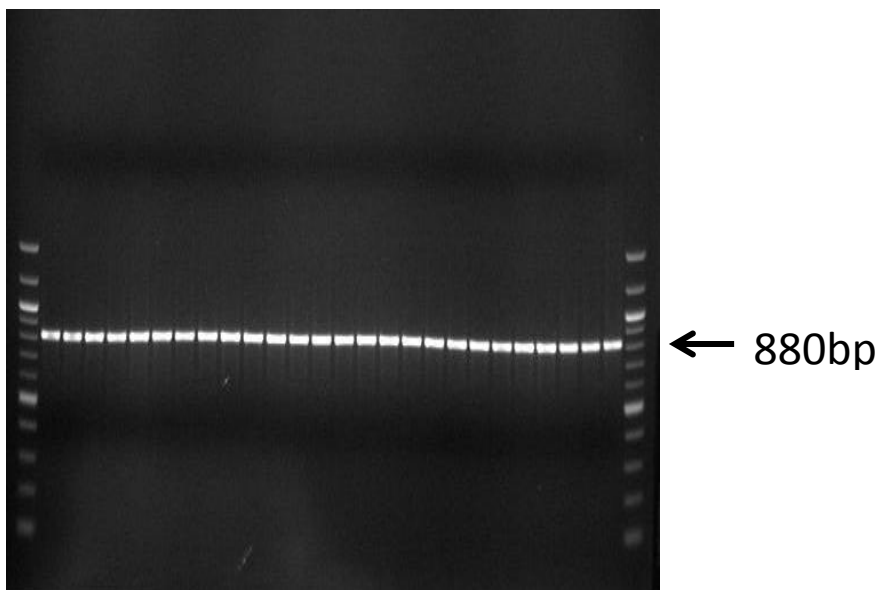
## 1. Ταυτοποίηση των ζυμών με τη μέθοδο RFLP της 5.8s- ITS περιοχής του DNA

Στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από το τέλος αυθόρμητων ζυμώσεων της ποικιλίας «Αγιωργίτικου» ταυτοποιήθηκαν ως προς το είδος. Τα στελέχη προέκυψαν ύστερα από δειγματοληψίες σε 18 διαφορετικούς αμπελώνες των περιοχών: Νεμέα, Άγιο Βασίλειο, Κουτσομόδι, Αρχαία Νεμέα, Κούτσι, Ασπρόκαμπος και Λεόντειο της ζώνης της Νεμέας (εικόνα 1). Πρότυπα περιορισμού της 5.8s- ITS περιοχής χρησιμοποιήθηκαν για να διαφοροποιηθούν οι ζύμες που ανήκουν σε διαφορετικό είδος. Σε όλες τις περιπτώσεις, το μέγεθος των προϊόντων της PCR (πίνακας 1) και τα πρότυπα περιορισμού που ελήφθησαν με τις ενδονουκλεάσες *HhaI*, *HaeIII* και *HinfI* (εικόνα 3) έδωσαν το ίδιο προφίλ.

Συνολικά 301 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ότι ανήκουν στο είδος του *Saccharomyces cerevisiae*.



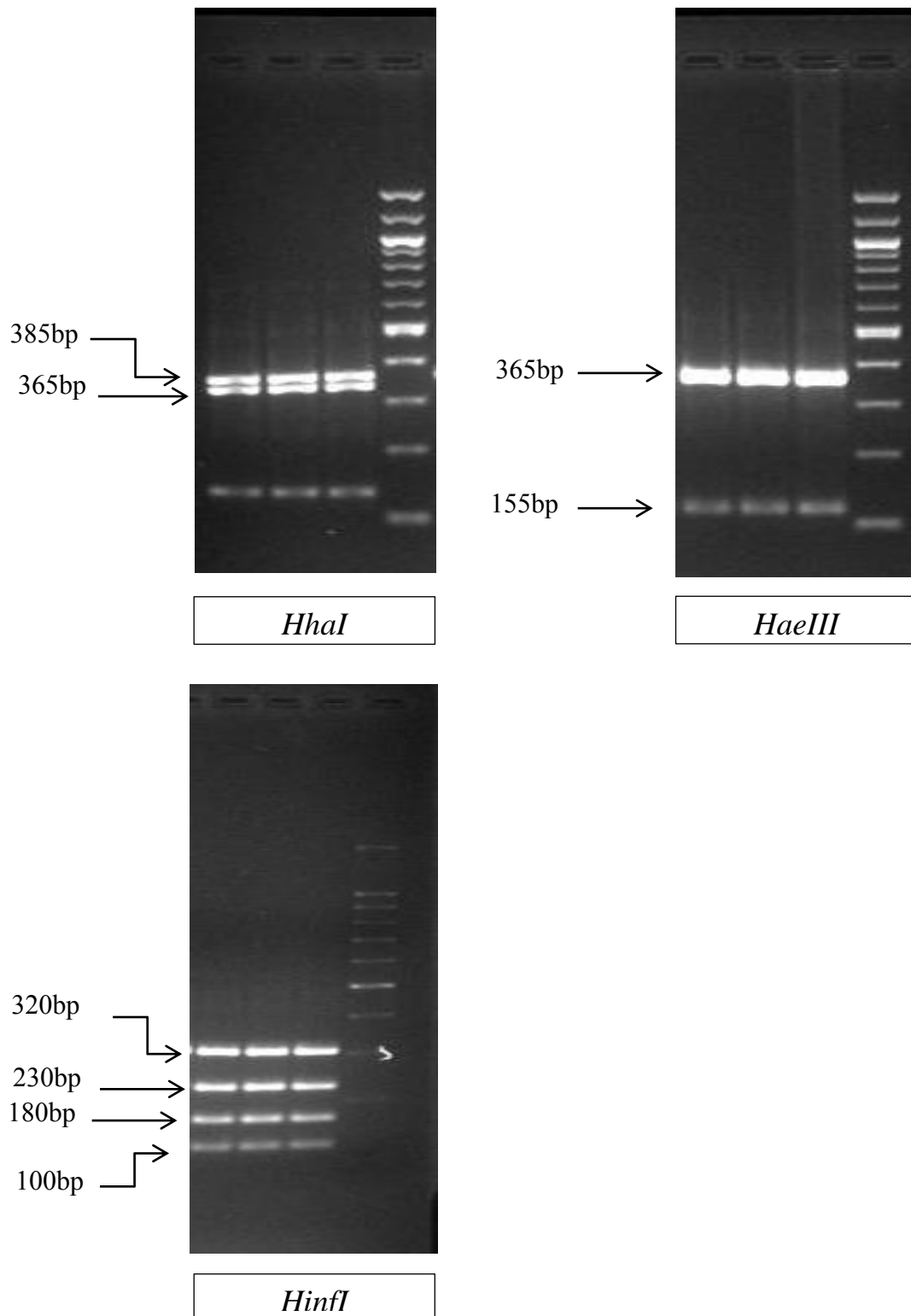
Εικόνα1: Τοποθεσία των αμπελώνων απ' όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες.



**Εικόνα 2:** Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1,2% των προϊόντων της PCR.

	PCR product size (bp)	Restriction fragment size(s) bp		
		<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
<i>S.cerevisiae</i>	880	385, 365	320, 230, 180, 150	365, 155

**Πίνακας 1:** Μέγεθος σε bp των προϊόντων της PCR και των θραυσμάτων περιορισμού των ενδονουκλεασών *HhaI*, *HaeIII* και *HinfI* για τον *S.cerevisiae*.



**Εικόνα 3: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 2,5% των προτύπων που ελήφθησαν από τα ένζυμα περιορισμού *HhaI*, *HaeIII* και *HinfI***

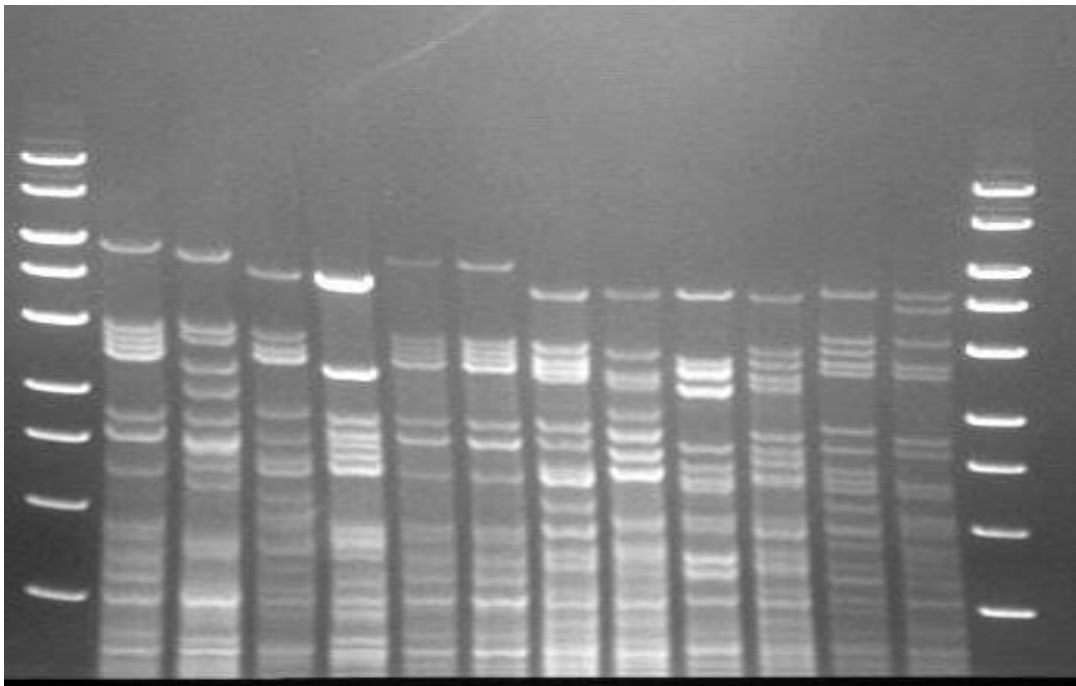
## **2. Μελέτη της ποικιλομορφία των στελεχών *S.cerevisiae***

Ένας από τους σκοπούς της παρούσας εργασίας ήταν να αναλυθεί η ποικιλομορφία των άγριων στελεχών *S.cerevisiae* της ζώνης της Νεμέας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δυο μοριακές τεχνικές, η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) του μιτοχondριακού DNA (mtDNA) και η ενίσχυση των interdelta περιοχών του DNA με την τεχνική PCR.

### **2.1. Διαχωρισμός των στελεχών με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) του μιτοχondριακού DNA (mtDNA)**

Αρχικά αφού επιβεβαιώθηκε ότι τα προς εξέταση στελέχη ανήκουν στο είδος του *Saccharomyces cerevisiae* ακολούθησε απομόνωση του γενομικού DNA από όλα τα στελέχη, σύμφωνα με το πρωτόκολλο DNA extraction για τις ζύμες.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο περιορισμού *HinfI*. Τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης. Τα πρότυπα που προέκυψαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους (εικόνα 4).



**Εικόνα 4: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα που ελήφθησαν ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1% από διαφορετικά στελέχη *S.cerevisiae* με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού του μιτοχondριακού DNA.**

Από τη σύγκριση των γονοτύπων προέκυψαν 70 διαφορετικά πρότυπα, εκ των οποίων τα 55 ήταν μοναδικά, δηλαδή απαντήθηκαν σε μόνο έναν αμπελώνα ενώ τα υπόλοιπα 14 πρότυπα βρέθηκαν σε παραπάνω από έναν αμπελώνα είτε γειτονικούς είτε σε κοντινή απόσταση ο ένας με τον άλλο (πίνακας 2). Επίσης όλες οι μπάντες όλων των προτύπων φάνηκαν να είναι πολυμορφικές και καμία δεν βρέθηκε να είναι μη πολυμορφική.

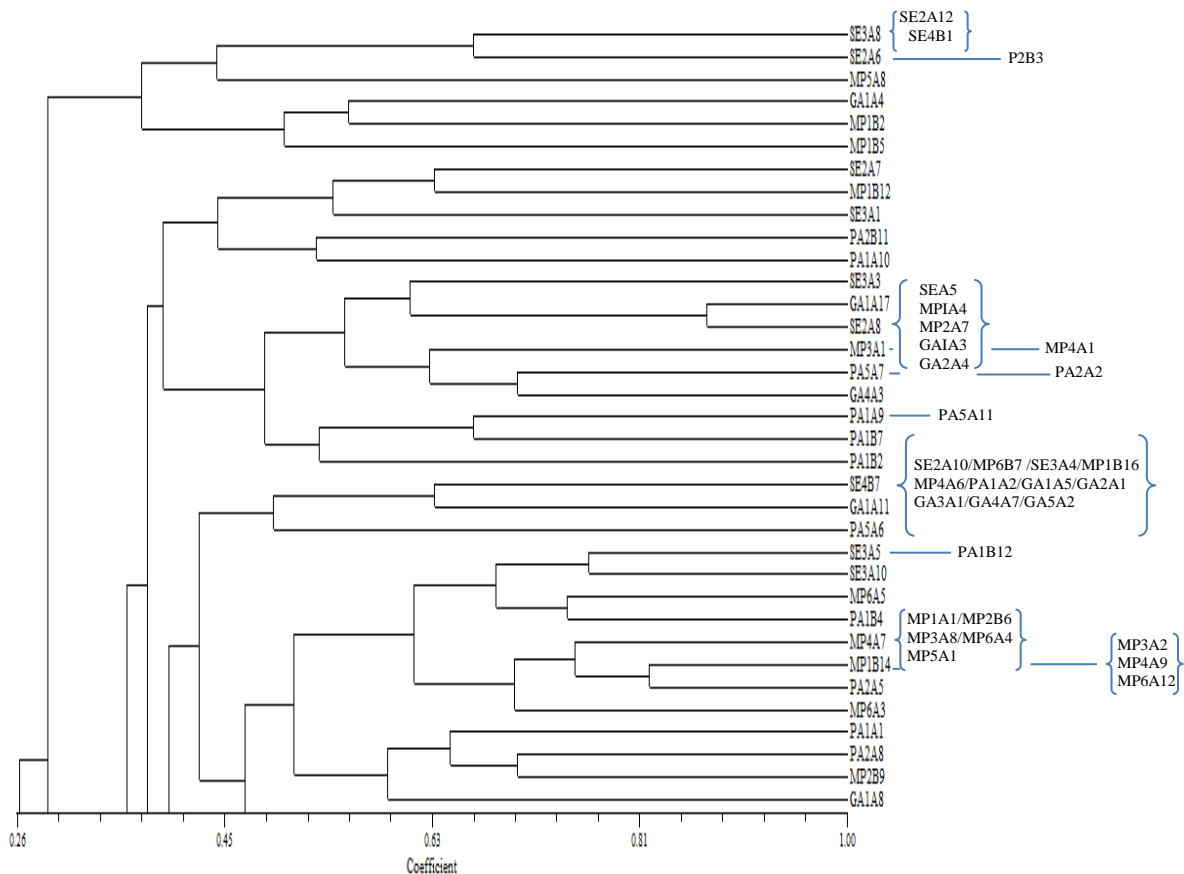
ΑΜΠΕΛΩΝΕΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΝΑΔΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	ΚΟΙΝΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ
1. SE2	ΑΡΧΑΙΑ ΝΕΜΕΑ	16	6	1	5	37,5
2. SE3	ΑΓΙΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ	12	6	3	3	50
3. SE4	ΝΕΜΕΑ	20	3	1	2	15
4. SE5	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	4	2	1	1	50
5. MP1	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	24	9	4	5	37,5
6. MP2	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	19	5	1	4	26,32
7. MP3	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	17	5	1	4	29,41
8. MP4	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	20	7	2	5	35
9. MP5	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	12	2	1	1	16,67
10. MP6	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	23	8	3	5	34,78
11. PA1	ΚΟΥΤΣΟΜΟΔΙ	26	20	14	6	76,92
12. PA2	ΚΟΥΤΣΟΜΟΔΙ	22	12	9	3	54,54
PA5	ΚΟΥΤΣΟΜΟΔΙ	12	5	2	3	41,67
13. GA1	ΚΟΥΤΣΙ	19	11	8	3	57,89
14. GA2	ΚΟΥΤΣΙ	12	5	3	2	41,67
15. GA3	ΚΟΥΤΣΙ	12	1	0	1	8,3
16. GA4	ΚΟΥΤΣΙ	12	2	1	1	16,67
17. GA5	ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	18	2	1	1	11,11

**Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των πληθυσμών του *Saccharomyces cerevisiae* από 18 αμπελώνες της ζώνης ΠΟΠ Νεμέας (σύμφωνα με το mtDNA).**

Στον παραπάνω πίνακα δίνονται τα εξής στοιχεία: οι αμπελώνες, απ' όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες των σταφυλιών (σύντομος κωδικός και περιοχή), ο αριθμός των απομονώσεων που σύμφωνα με την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους αντιστοιχούσαν στο είδος του *Saccharomyces cerevisiae*, ο αριθμός των διαφορετικών προτύπων που λάβαμε ύστερα από τη σύγκριση μεταξύ τους, ο αριθμός των μοναδικών προτύπων που απαντάται σε έναν και μόνο αμπελώνα, ο αριθμός των κοινών προτύπων μεταξύ των αμπελώνων και το ποσοστό βιοποικιλότητας που αντιστοιχεί στον αριθμό προτύπων προς τον αριθμό των απομονώσεων.

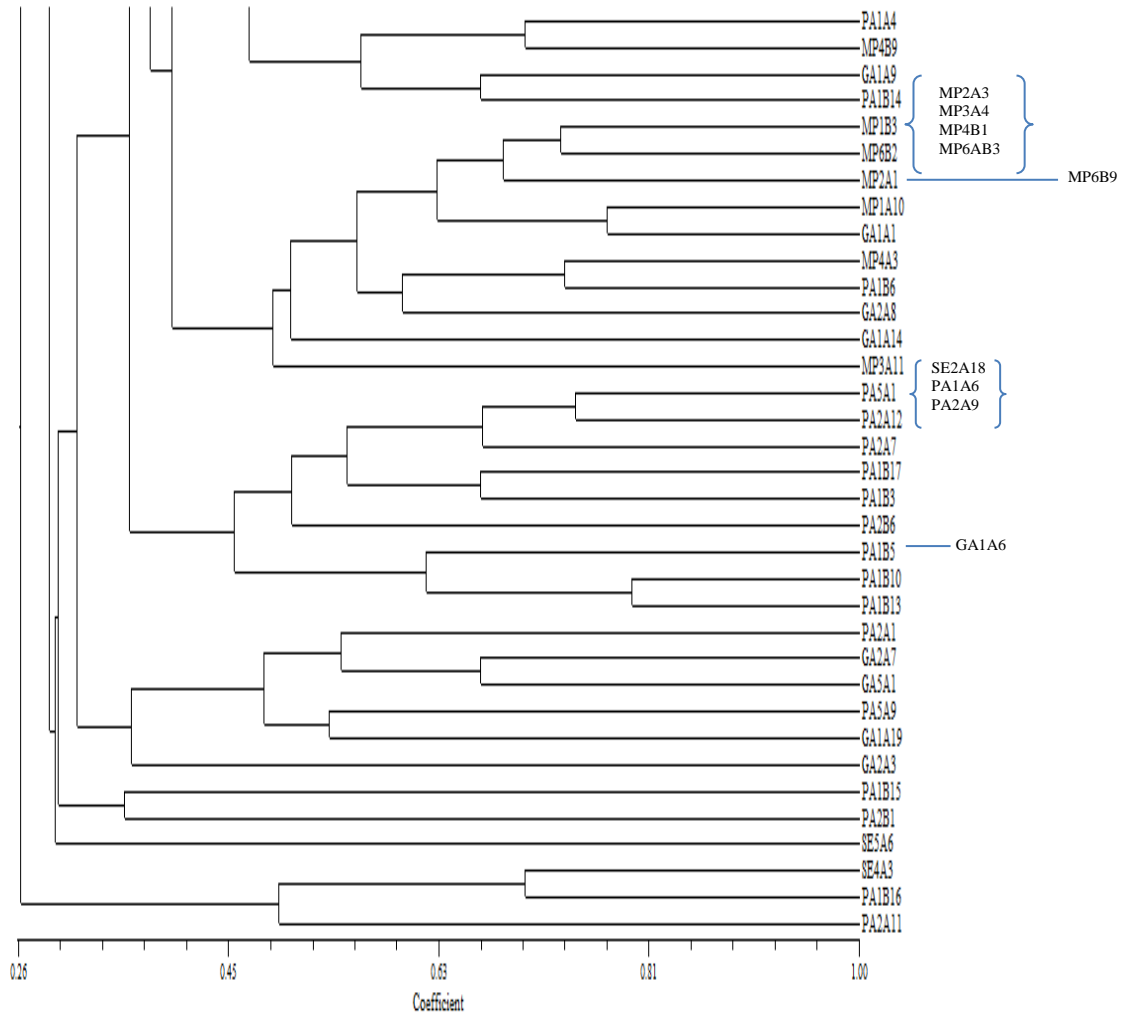
Από τον πίνακα μπορούμε να ταξινομήσουμε τους αμπελώνες, σε αμπελώνες με υψηλό ή με χαμηλό πολυμορφισμό. Οι αμπελώνες SE2, SE3, MP1, MP4, MP6, PA1, PA2 και GA1 παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό με παραπάνω από 5 διαφορετικά πρότυπα *Saccharomyces cerevisiae*, σε σχέση με τους υπόλοιπους που παρουσιάζουν μέτριο ή χαμηλό. Σε 3 αμπελώνες (PA1, PA2, GA1) φαίνεται να υπάρχει πολύ υψηλό ποσοστό μοναδικών προτύπων, στον αμπελώνα "GA3" όλα τα απομονωθέντα στελέχη είχαν το ίδιο προφίλ, το οποίο απαντάται και σε άλλους αμπελώνες, ενώ στους αμπελώνες SE2, SE4, SE5, MP1, MP4, GA4 και GA5 βρέθηκε από 1 μοναδικό πρότυπο.

Για κάθε μοναδικό στέλεχος δημιουργήσαμε έναν πίνακα με τιμές 0 και 1 δηλώνοντας έτσι την παρουσία ή την απουσία κάθε μπάντας ξεχωριστά. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό NTSYSpc (έκδοση 2.0, copyright 1997 Applied Biostatistics Inc, New York) για να δούμε τη γενετική απόσταση των προτύπων με τη δημιουργία δενδρογραμμάτων (εικόνα 5 και 6).



**Εικόνα 5: Δενδρόγραμμα (part1) Δεξιά αναγράφονται στελέχη με τα οποία βρέθηκαν να είναι όμοια και σε άλλους αμπελώνες. Τα υπόλοιπα είναι μοναδικά.**

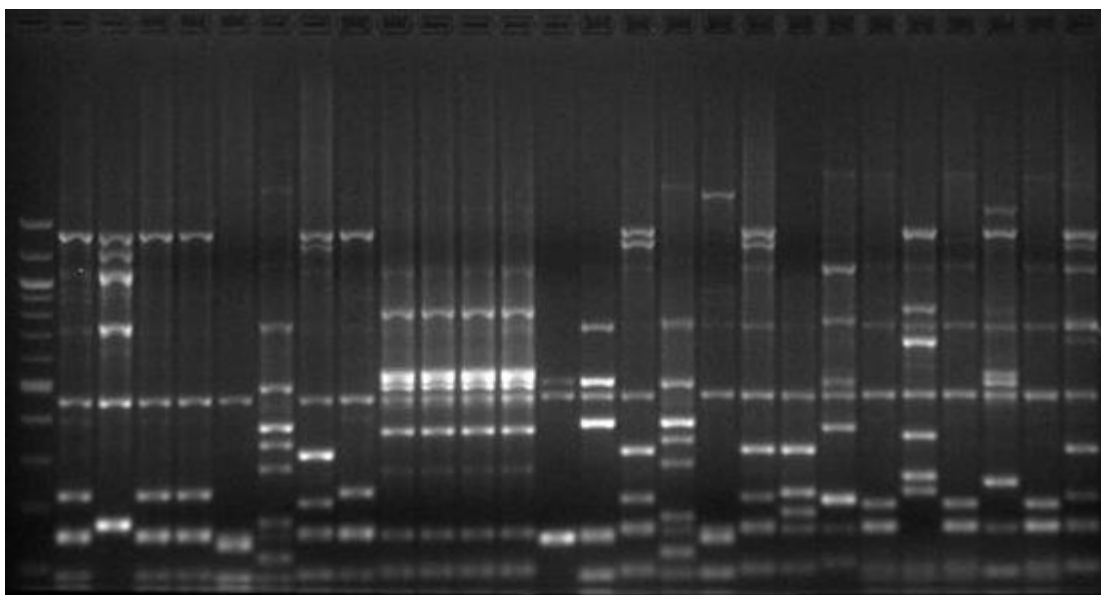




Εικόνα 6: Συνέχεια του δενδρογράμματος με τα υπόλοιπα στελέχη (part 2).

## **2.2. Γονοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών *S.cerevisiae* με την ενίσχυση των interdelta περιοχών**

Με την ολοκλήρωση της μοριακής μεθόδου, θελήσαμε να συγκρίνουμε τα ίδια στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* με την ανάλυση των δ αλληλουχιών. Η ενίσχυση των δ περιοχών πραγματοποιήθηκε απευθείας από την αποικία, χωρίς προηγουμένως να κάνουμε απομόνωση γενομικού DNA (DNA extraction). Για την διεξαγωγή της PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές d12 και d21. Τα λαμβανόμενα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και τα πρότυπα που προέκυψαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους (εικόνα 7). Όλες οι μπάντες φάνηκαν να είναι πολυμορφικές.



**Εικόνα 7:** Αντιπροσωπευτικό gel που δείχνει διαφορετικά πρότυπα μπαντών που ελήφθησαν ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% από διαφορετικές απομονώσεις *S.cerevisiae* με ανάλυση των ενισχυμένων interdelta περιοχών.

Από τη σύγκριση όλων των γονοτύπων προέκυψαν 89 διαφορετικά πρότυπα, εκ των οποίων τα 72 ήταν μοναδικά, ενώ τα υπόλοιπα 18 πρότυπα βρέθηκαν να απαντώνται σε παραπάνω από έναν αμπελώνα (πίνακας 3).

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι αμπελώνες με κωδικό, η περιοχή όπου βρίσκονται οι αμπελώνες, ο αριθμός των απομονώσεων για κάθε αμπελώνα, που σύμφωνα με την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους αντιστοιχούσαν στο είδος του *Saccharomyces cerevisiae*, ο αριθμός των διαφορετικών προτύπων που λάβαμε ύστερα από τη σύγκριση μεταξύ τους, ο αριθμός των μοναδικών προτύπων που απαντάται σε έναν και μόνο αμπελώνα, ο αριθμός των κοινών προτύπων μεταξύ των αμπελώνων και το ποσοστό βιοποικιλότητας που αντιστοιχεί στον αριθμό προτύπων προς τον αριθμό των απομονώσεων.

Ταξινομούμε τους αμπελώνες με υψηλό και χαμηλό πολυμορφισμό. 11 αμπελώνες (SE2, SE3, MP1, MP2, MP4, MP6, PA1, PA2, PA5, GA1, GA2) παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό με παραπάνω από 5 διαφορετικά πρότυπα *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ οι αμπελώνες SE5, MP5, GA4 παρουσιάζουν 2 διαφορετικά πρότυπα και ο GA3 μόλις 1.

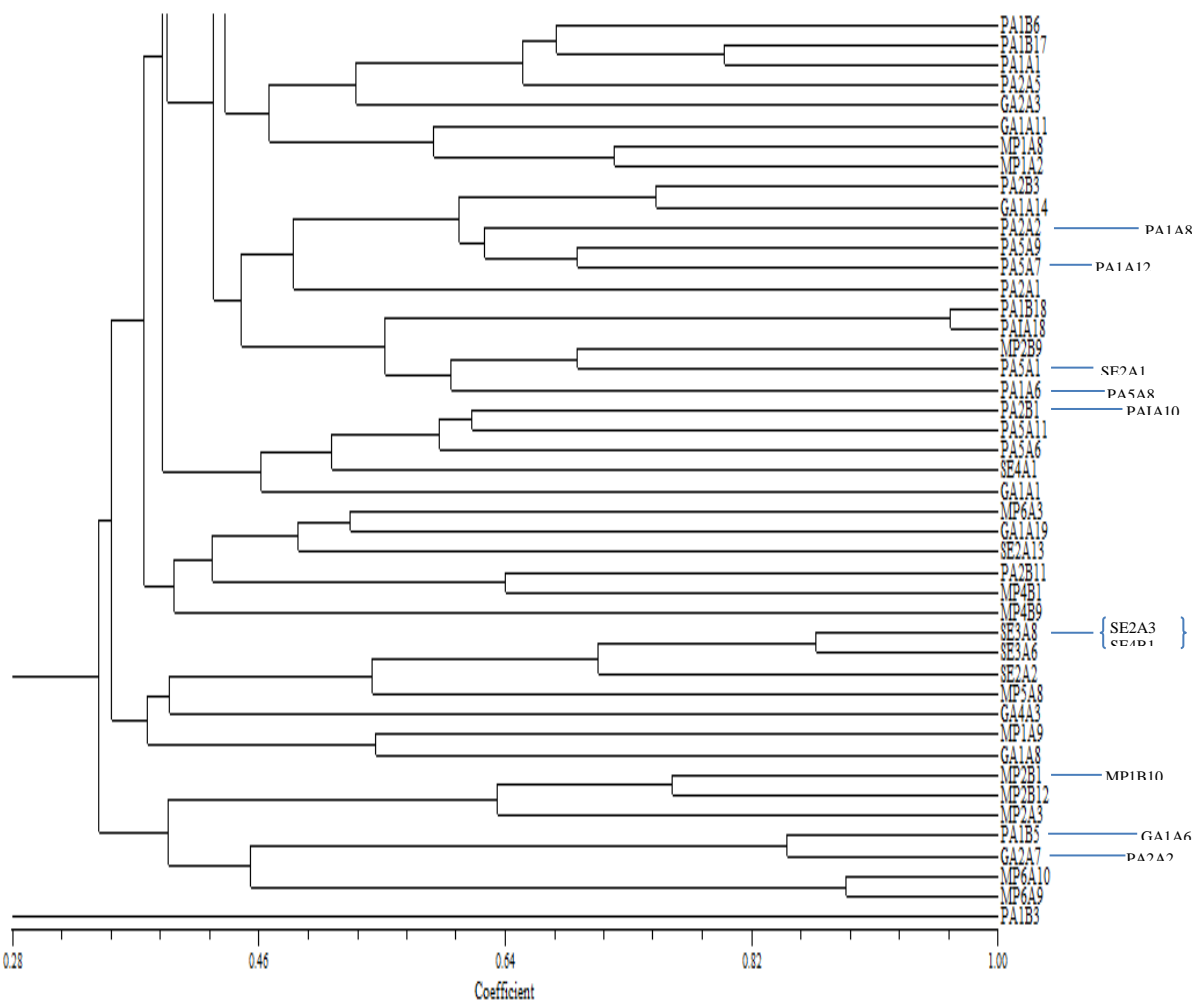
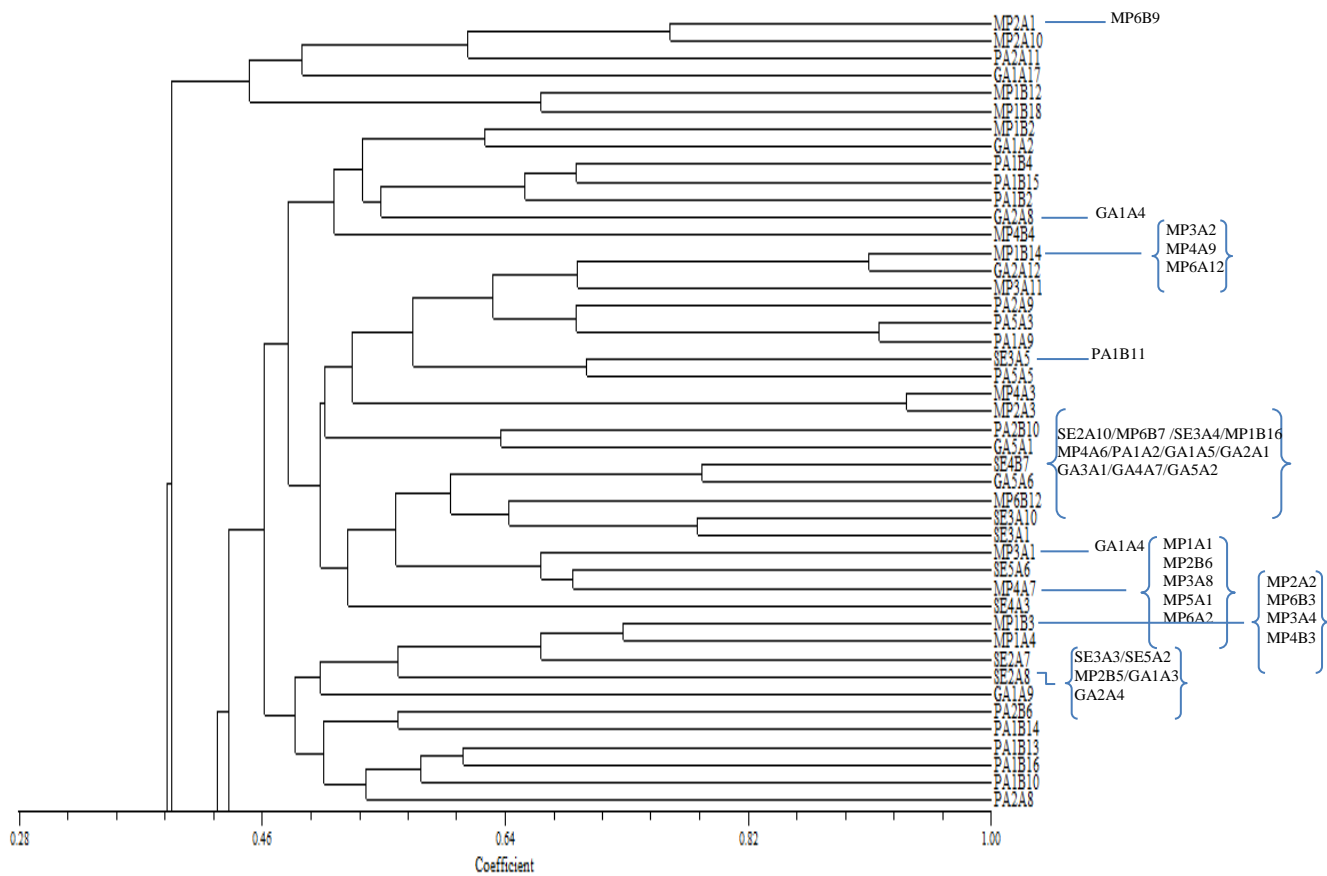
Οι αμπελώνες PA1, PA2, PA5 της περιοχής Κουτσομόδι φαίνεται να ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους αμπελώνες των άλλων περιοχών με το υψηλό ποσοστό βιοποικιλότητας 80.77, 59.09 και 66.67 αντίστοιχα. Ιδιαίτερα παρατηρούμε ότι στον αμπελώνα PA1 από τα 26 απομονωθέντα στελέχη τα 21 ήταν διαφορετικά.

ΑΜΠΕΛΩΝΕΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΝΑΔΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	ΚΟΙΝΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ
SE2	ΑΡΧΑΙΑ ΝΕΜΕΑ	16	7	3	4	43,75
SE3	ΑΓΙΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ	12	7	3	4	58,33
SE4	ΝΕΜΕΑ	20	4	2	2	20
SE5	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	4	2	1	1	50
MP1	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	24	14	8	6	58,33
MP2	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	20	8	3	5	40
MP3	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	17	5	1	4	29,41
MP4	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	20	8	4	4	40
MP5	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	12	2	1	1	16,67
MP6	ΛΕΟΝΤΕΙΟ	23	9	4	5	39,13
PA1	ΚΟΥΤΣΟΜΟΔΙ	26	21	13	8	80,77
PA2	ΚΟΥΤΣΟΜΟΔΙ	22	13	10	3	59,09
PA5	ΚΟΥΤΣΟΜΟΔΙ	12	8	5	3	66,67
GA1	ΚΟΥΤΣΙ	19	12	8	4	63,16
GA2	ΚΟΥΤΣΙ	12	6	2	4	50
GA3	ΚΟΥΤΣΙ	12	1	0	1	8,3
GA4	ΚΟΥΤΣΙ	12	2	1	1	16,67
GA5	ΑΣΠΡΟΚΑΜΠΟΣ	18	3	2	1	16,67

**Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των πληθυσμών του *Saccharomyces cerevisiae* από 18 αμπελώνες της ζώνης ΠΟΠ Νεμέας (σύμφωνα με το inter-delta).**

Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο για κάθε μοναδικό στέλεχος δημιουργήσαμε έναν πίνακα με τιμές 0 και 1, δηλώνοντας έτσι την παρουσία ή την απουσία κάθε μπάντας ξεχωριστά.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό NTSYSpc (έκδοση 2.0, copyright 1997 Applied Biostatistics Inc, New York) για να υπολογιστεί η γενετική ομοιότητα μεταξύ των διαφορετικών στελεχών.



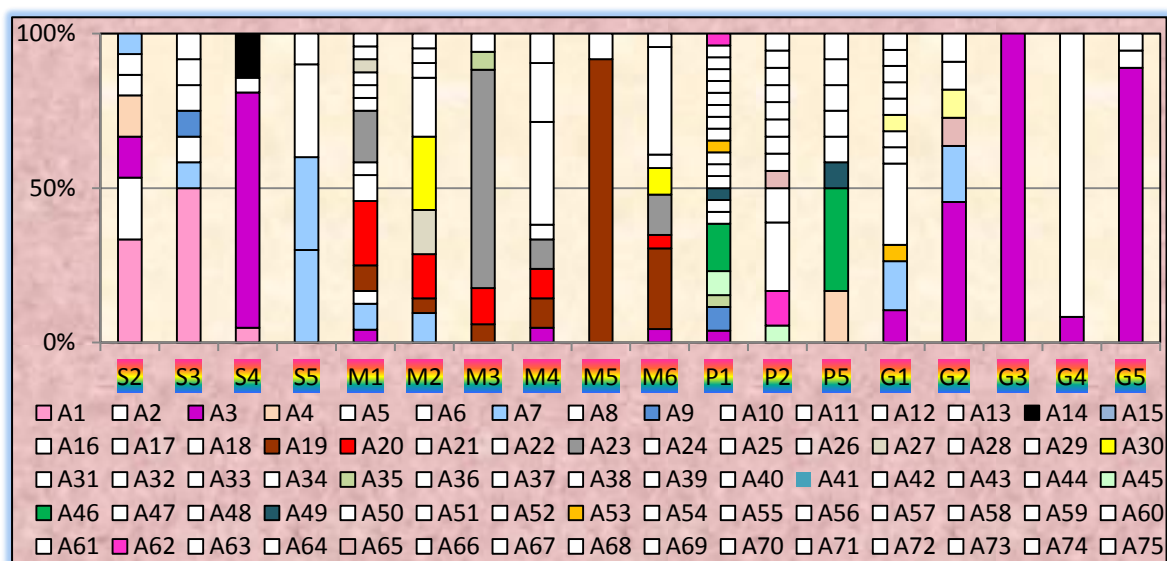
**Εικόνα 8: Δενδρογράμμα που προέκυψε με την μέθοδο inter- delta. Δεξιά αναγράφονται στελέχη με τα οποία βρέθηκαν να είναι όμοια και σε άλλους αμπελώνες. Τα υπόλοιπα είναι μοναδικά.**

Στο διάγραμμα παρακάτω (διάγραμμα 1) μπορούμε να διακρίνουμε την κατανομή της βιοποικιλότητας στον καθένα αμπελώνα ξεχωριστά. Τα μοναδικά στελέχη που απαντώνται σε έναν και μόνο αμπελώνα διακρίνονται με λευκό, ενώ με χρώμα τα στελέχη που απαντώνται σε περισσότερο από 1 αμπελώνα.

Το στέλεχος με το μοβ χρώμα φαίνεται να είναι το πιο διαδεδομένο αφού το διακρίνουμε σε 12 από τους 18 αμπελώνες και γι' αυτό μπορεί να χαρακτηριστεί ως κοσμοπολίτικοι. Αυτό που ακολουθεί είναι το στέλεχος με γαλάζιο χρώμα και φαίνεται να απαντάται σε 7 από τους 18 αμπελώνες.

Επίσης παρατηρούμε αμπελώνες της ίδιας περιοχής, να διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους άλλων περιοχών με στελέχη που υπάρχουν μόνο σε εκείνη την περιοχή. Παράδειγμα αποτελεί η περιοχή του Λεοντείου με τους αμπελώνες MP1, MP2, MP3, MP4, MP5, MP6 όπου εμφανίζονται τα στελέχη με γκρι, κόκκινο, κίτρινο και καφέ χρώμα καθώς και η περιοχή Κουτσομόδι με τους αμπελώνες PA1, PA2, PA5 που εμφανίζουν τα στελέχη με πράσινο, πράσινο σκούρο και βεραμάν χρώμα.

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν και στελέχη που απαντώνται σε αμπελώνες με χιλιομετρική απόσταση μεταξύ τους 2-8 χιλιόμετρα. Όπως στην περίπτωση του στελέχους με ροζ χρώμα όπου εμφανίζεται στις περιοχές Νεμέα (αμπελώνας SE3), Αρχαία Νεμέα (αμπελώνας SE2) και Άγιος Βασίλειος (αμπελώνας SE4).

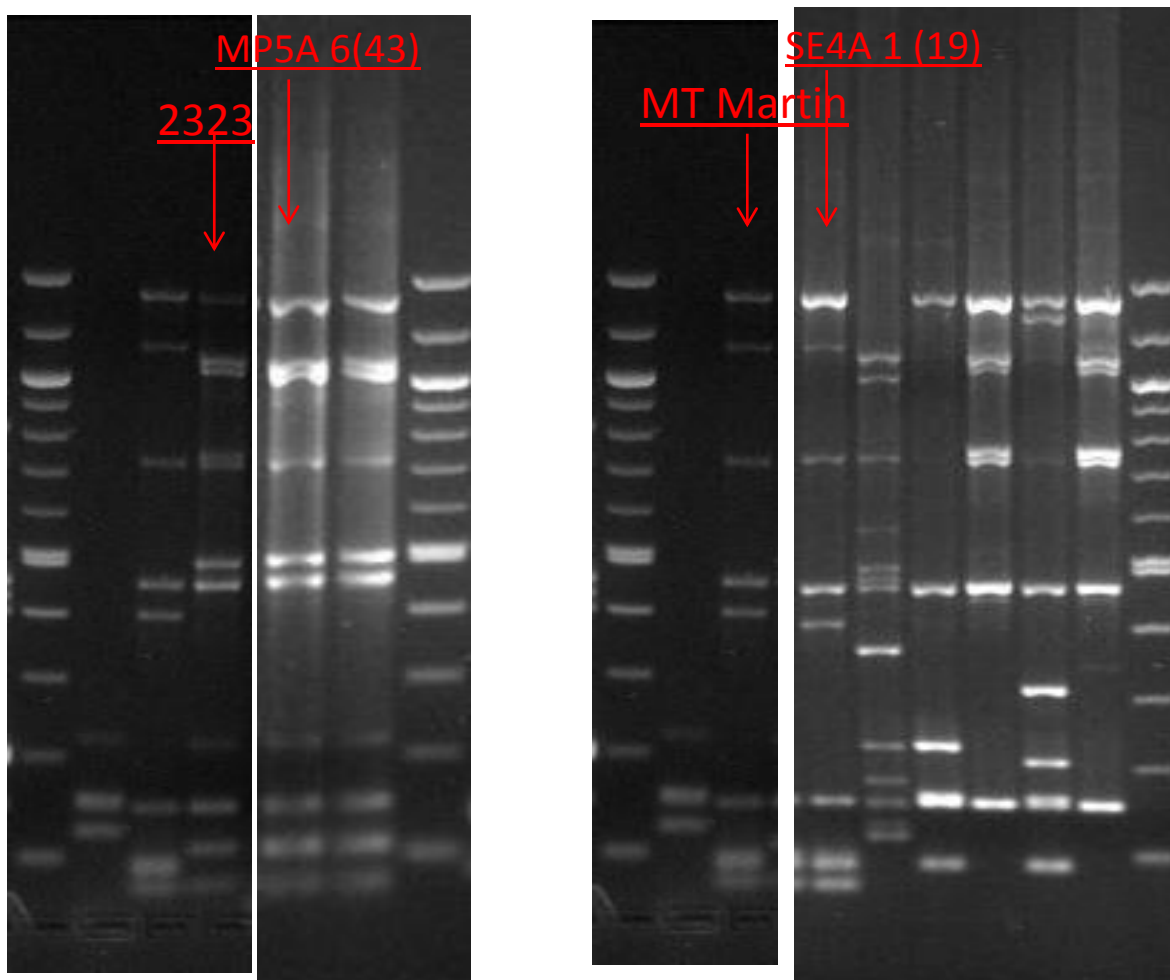


Διάγραμμα 1: Στον οριζόντιο άξονα κάτω από κάθε στήλη αναγράφεται ο αμπελώνας. Στον κάθετο άξονα το ποσοστό των στελεχών ενώ από τον αριθμό A1- A89 τα διαφορετικά πρότυπα.

### 2.3. Παρουσία εμπορικών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* στη ζώνη Π.Ο.Π. της Νεμέας

Τα 89 διαφορετικά στελέχη που λάβαμε από τη μέθοδο inter-delta, τα συγκρίναμε στη συνέχεια με 7 ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιούνται εκτενώς στην περιοχή αυτή. Τα εμπορικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση είναι τα εξής: Vin 13, GY Martin, NEM, 58W3, Vin Blanc, MT Martin και 2323.

Από τη σύγκριση βρέθηκαν 2 πρότυπα να είναι όμοια με 2 εμπορικά (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα εμπορικών στελεχών (2323, MT Martin) και στελεχών από τους αμπελώνες (MP5, SE4).

Ο εμπορικός *S.cerevisiae* MT Martin βρέθηκε στον αμπελώνα SE4, έναν αμπελώνα με χαμηλή ποικιλομορφία, μόλις 4 πρότυπα. Επίσης από τα 20 συνολικά απομονωθέντα στελέχη τα 4 είχαν αυτό το προφίλ.

Το εμπορικό στέλεχος 2323 βρέθηκε ότι είναι διαδεδομένο και στους 6 αμπελώνες (MP1, MP2, MP4, MP5, MP6) της περιοχής του Λεοντείου. Συγκεκριμένα στους αμπελώνες MP5 και MP6 σε πολύ μεγάλο ποσοστό (στον αμπελώνα MP5 τα 11 από τα 12 στελέχη είχαν το πρότυπο του εμπορικού στελέχους και στον αμπελώνα MP6 τα 6 στελέχη από τα 23).

Κανένα από τα 2 εμπορικά στελέχη δεν φαίνεται να έχει διαδοθεί μέχρι στιγμής σε αμπελώνες με μεγάλη χιλιομετρική απόσταση μεταξύ τους.

### **3. Οινολογικό δυναμικό γηγενών στελεχών *S.cerevisiae***

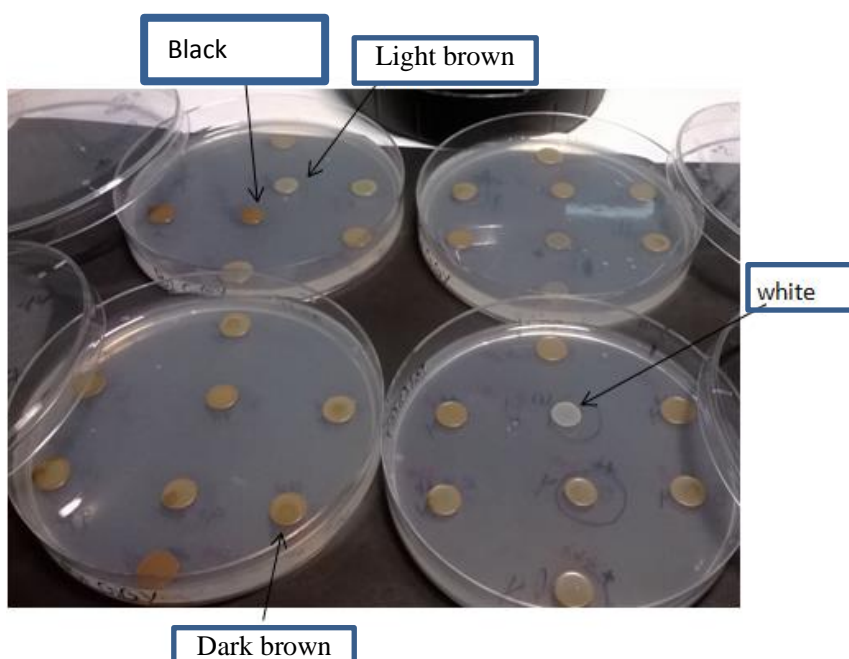
Τα διαφορετικά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν ύστερα από αυθόρμητες ζυμώσεις σταφυλιών της ζώνης Π.Ο.Π Νεμέας αξιολογήθηκαν ως προς τα τεχνολογικά και οινολογικά τους χαρακτηριστικά όπως ανθεκτικότητα σε χημικές ενώσεις που δυνητικά παρουσιάζονται στο κρασί (αιθανόλη και θειώδη ανυδρίτη) και την παραγωγή σε υδρόθειο. Επιπλέον ελέγχθησαν ως προς την παραγωγή β-γλυκοσιδάσης, μιας ενζυματικής δραστηριότητας που επηρεάζει θετικά το άρωμα του κρασιού, εφόσον υπάρχει και την παρουσία βιογενών αμινών που φέρουν αρνητικές επιπτώσεις στο κρασί. Τέλος αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή και την αντοχή τους σε τοξίνη killer.

Τα στελέχη παρουσίασαν πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη με το 95% των στελεχών να είναι ικανά να αναπτυχθούν σε μούστο με 18% συγκέντρωση αιθανόλης. Επίσης η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα σε μούστο συμπεριλαμβανομένου θειώδη ανυδρίτη σε συγκεντρώσεις 200-300mg/l με ποσοστό 85% (πίνακας 4).

SO <sub>2</sub> (mg/l)	100	150	200	250	300
Ανθεκτικότητα %	100	89	85	85	85

**Πίνακας 4: Ποσοστό ανθεκτικότητας των στελεχών *S.cerevisiae* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θειώδους ανυδρίτη.**

Η παραγωγή διοξειδίου του θείου αξιολογήθηκε με τη χρώση των διαφορετικών στελεχών σε Biggy agar (εικόνα 10). 17% των στελεχών ανέπτυξε black αποικίες όπου θεωρείται υψηλή παραγωγή υδρόθειου, 17% δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στο χρώμα άρα και καθόλου παραγωγή υδρόθειου, ενώ το 67% ταξινομήθηκε σε χαμηλή και μεσαία παραγωγή (πίνακας 5).



**Εικόνα 10: "Spotting" σε τρυβλία από διαφορετικά στελέχη. Παρατηρούμε τον διαφορετικό χρωματισμό των αποικιών ανάλογα με την παραγωγή τους σε υδρόθειο.**

H <sub>2</sub> S classes	0	1	2	3
Παραγωγή %	17	35	32	17

**Πίνακας 5: Ποσοστό των στελεχών που παρουσιάζουν παραγωγή H<sub>2</sub>S στις διαφορετικές παραγωγικές τάξεις. 0: White (καθόλου παραγωγή), 1:Light brown (χαμηλή παραγωγή), 2: Dark brown (μεσαία παραγωγή), 3: Black (υψηλή παραγωγή)**

Όσον αφορά την παραγωγή β-γλυκοσιδάσης, της ενζυματικής δραστηριότητας που σχετίζεται με την απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων και συγκεκριμένα τερπενικών ενώσεων, το 11% των στελεχών φάνηκαν να είναι θετικά στην παραγωγή αυτών των ενώσεων με αλλαγή του χρώματός τους σε καφέ σκούρο, ενώ το 56% δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στο χρώμα τους.



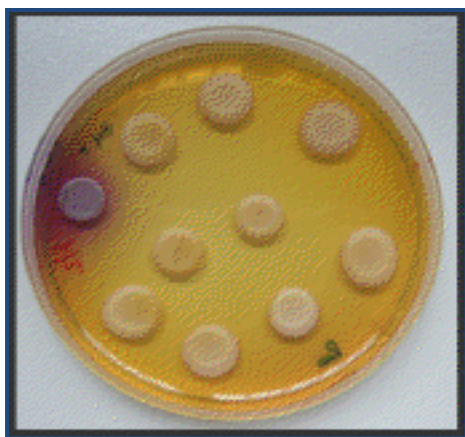
<b>b-glucosidase classes</b>	0	1	2
<b>Παραγωγή %</b>	56	33	11

**Πίνακας 6: Ποσοστό των στελεχών που παρουσιάζουν παραγωγή β-γλυκοσιδάσης στις διαφορετικές παραγωγικές τάξεις. 0: white (καθόλου παραγωγή), 1: yellow (μεσαία παραγωγή) και 2: brown (υψηλή παραγωγή)**

Το 20% των στελεχών βρέθηκε θετικό σε χαμηλή αποκαρβοξυλίωση κάποιων αμινοξέων και κατά συνέπεια χαμηλή παραγωγή των αντίστοιχών βιογενών αμινών (πίνακας 7). Η αλλαγή χρώματος γύρω από την αποικία ήταν ένδειξη για την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος (εικόνα 11).

<b>Biogenic amines</b>	Histamine	Tyramine	Putrescine	Cadaverine	Phenylethylamine	Tryptamine	Isoamylamine
<b>Παραγωγή %</b>	3	19	8	13	19	6	3

**Πίνακας 7: Ποσοστό των στελεχών που παράγουν βιογενείς αμίνες**

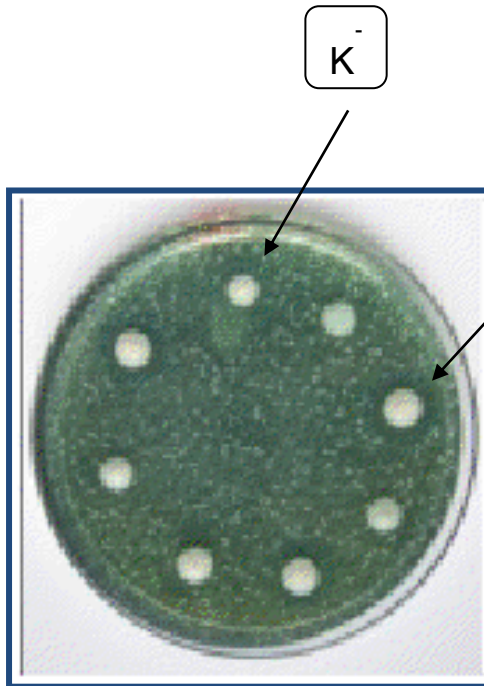


**Εικόνα 11: Τρυβλίο με "spotting" από διαφορετικά στελέχη και η εμφάνιση μοβ χρώματος γύρω από την αποικία ως ένδειξη της αποκαρβοξυλίωσης του αμινοξέος.**

Τέλος τα στελέχη προσδιορίστηκαν ως προς την τοξίνη killer. Η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίασαν ουδέτερο φαινότυπο, ανθεκτικότητα στην τοξίνη killer χωρίς όμως να μπορούν να παράγουν ( $K^-R^+$ ). Το 20% των στελεχών ανιχνεύτηκαν με killer φαινότυπο ( $K^+R^+$ ), ενώ το 22% είχαν ευαίσθητο φαινότυπο ( $K^-R^-$ ) (πίνακας 8, εικόνα 12).

Killer phenotype	killer	neutral	sensitive
Παραγωγή %	20	58	22

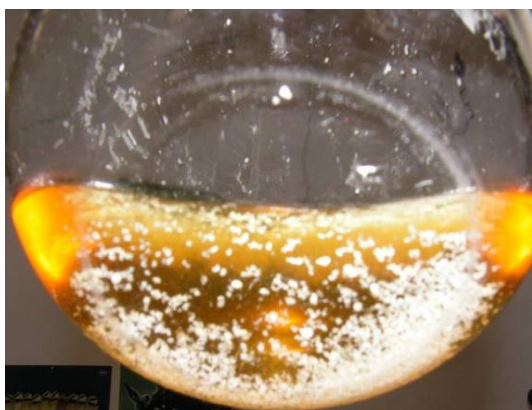
**Πίνακας 8: Ποσοστό των στελεχών που παρουσιάζουν το φαινόμενο killer.**



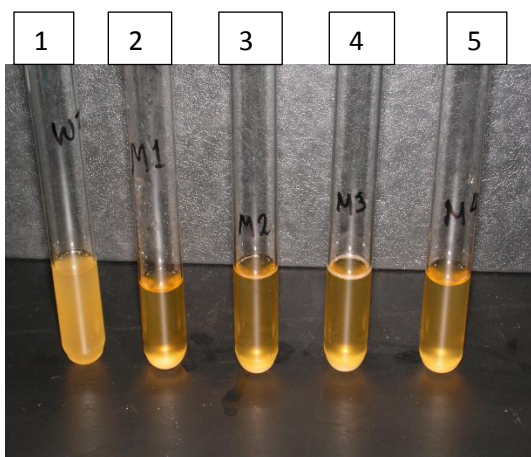
**Εικόνα 12: Τρυβλίο στο οποίο έχει ενσωματωθεί ευαίσθητο στέλεχος ζύμης και με "spotting" τα προς εξέταση στελέχη.  $K^+$  χαρακτηρίστηκαν τα στελέχη τα οποία εμφάνισαν μια ευδιάκριτη ζώνη γύρω από την αποικία, ένδειξη παραγωγής τοξίνης, ενώ  $K^-$  χαρακτηρίστηκαν αυτά που δεν παρήγαγαν καμία τοξίνη.**

#### 4. Μεταλλαγμένα στελέχη

Στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* ύστερα από εργαστηριακή μετάλλαξη που υπέστησαν, παρουσίασαν ικανότητα σχηματισμού κροκιδωμάτων σε αντίθεση με τον άγριο φαινότυπο (εικόνα: 13 και 14).



Εικόνα 13: Σχηματισμός κροκιδωμάτων από μεταλλαγμένο στέλεχος

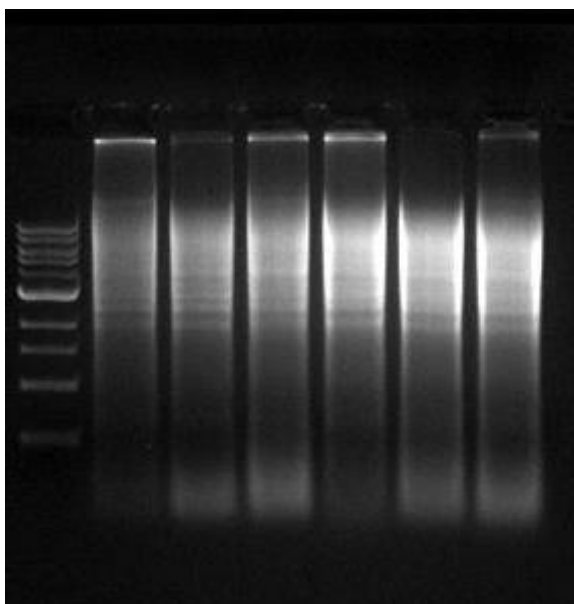


Εικόνα 14: Ύστερα από στατική επώαση 2μh παρατηρούμε ότι το στέλεχος 1 διατηρείται σε αιώρηση (άγριος τύπος), ενώ τα στελέχη 2, 3, 4 και 5 (μεταλλαγμένα στελέχη) καθιζάνουν στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα

##### 4.1. Διάσωση πλασμιδίου των μεταλλαγμένων στελεχών

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα σημεία στα οποία έγινε η ένθεση, τα μεταλλάγματα υποβλήθηκαν σε διάσωση πλασμιδίου.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε DNA extraction των μεταλλαγμένων ζυμών και στη συνέχεια το γενομικό DNA υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (εικόνα 15).

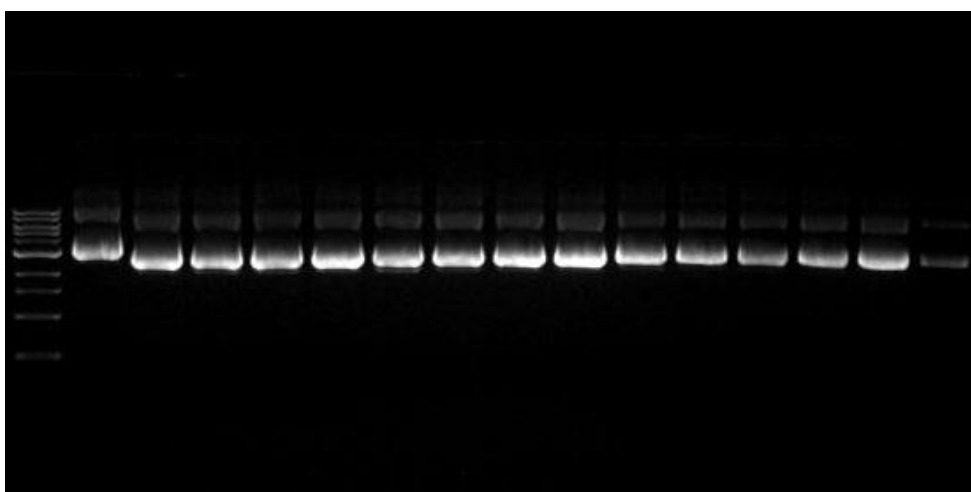


**Εικόνα 15: : Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% του γενομικού DNA ύστερα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI***

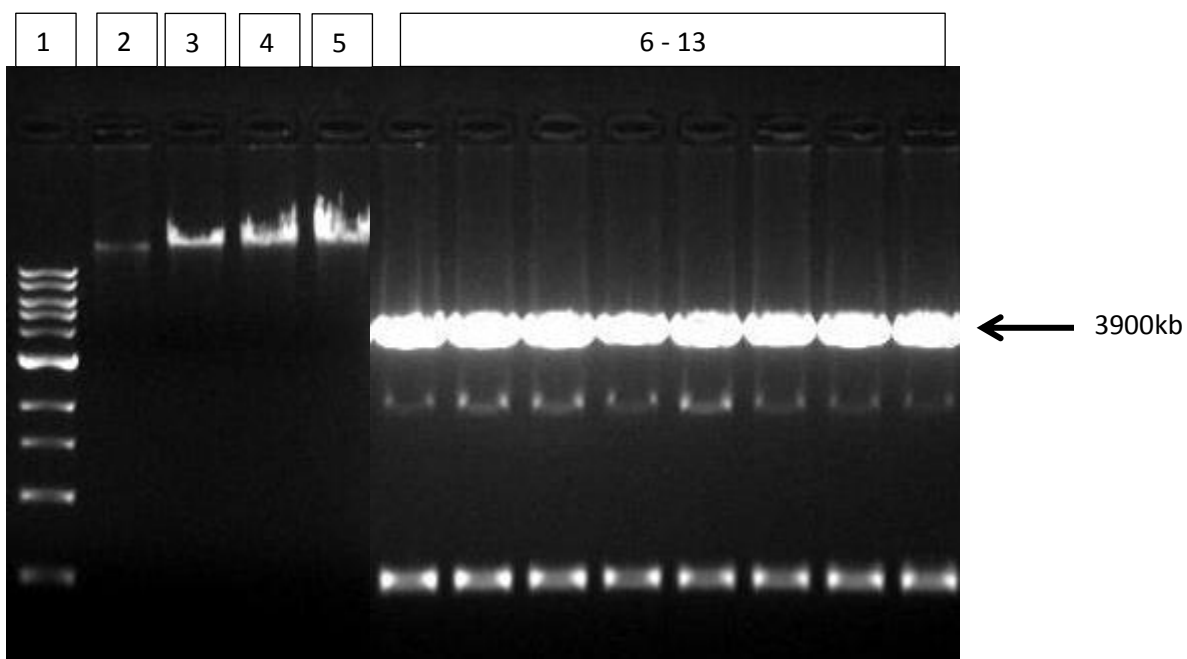
Στη συνέχεια έλαβε χώρα αντίδραση ενοποίησης των άκρων του πλασμιδιακού φορέα και του ένθετου. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την ενοποίηση ήταν η T4 DNA ligase. Ακολούθησε μεταφορά του πλασμιδίου σε ηλεκτροδεκτικά κύτταρα *E.coli* και επίστρωσή τους σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία αντιβιοτικού επιλογής (αμπικιλίνη).

Πραγματοποιήθηκαν αρκετά miniprep για τη διάσωση του πλασμιδίου και από τα τέσσερα στελέχη (εικόνα 16) και διπλές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *BamHI*. Τα προϊόντα των πέψεων αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα 17 το επιθυμητό πλασμίδιο ελήφθη με την μια μπάντα να βρίσκεται στα 3,9kb. Εν συνεχεία εστάλησαν για sequencing. Σύμφωνα με την *Saccharomyces* Genome database η ένθεση και στα 4 προς εξέταση μεταλλαγμένα στελέχη βρέθηκε ότι είχε γίνει στο γονίδιο SSN2 του χρωμοσώματος IV.



**Εικόνα 16: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 1% οι απομονώσεις πλασμιδιακών DNA από τα δεκτικά κύτταρα *E.colie* DH5A**



Εικόνα 17: Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης πλασμιδιακών κλώνων μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *BamHI*. (Σειρά φόρτωσης: 1 *Ladder 1kb*, 2- 5 *φάγοι λ*, 6 -13 *πλασμίδια*)

# Συζήτηση

## **1. Μοριακή σχέση μεταξύ των άγριων στελεχών *Saccharomyces cerevisiae***

Δύο μοριακές τεχνικές εφαρμόστηκαν για να αξιολογηθούν οι μοριακές σχέσεις μεταξύ άγριων πληθυσμών *Saccharomyces cerevisiae* από γλεύκη Αγιωργίτικου της ζώνης Π.Ο.Π Νεμέας.

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA και η ενίσχυση με PCR των interdelta περιοχών. Η ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) είναι μια ευρέως χρησιμοποιημένη τεχνική για τον χαρακτηρισμό στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* (Valero et al., 2005). Η ενίσχυση των interdelta περιοχών με τους εκκινητές delta1 και delta2, παρουσιάζονται ως μια μέτρια μοριακή μέθοδος διαφοροποίησης στελεχών όπως φαίνεται και σε παλαιότερες μελέτες, όμως η διάκριση των στελεχών αυξήθηκε με τη χρήση των εκκινητών delta12 και delta21 (Legras et al., 2003).

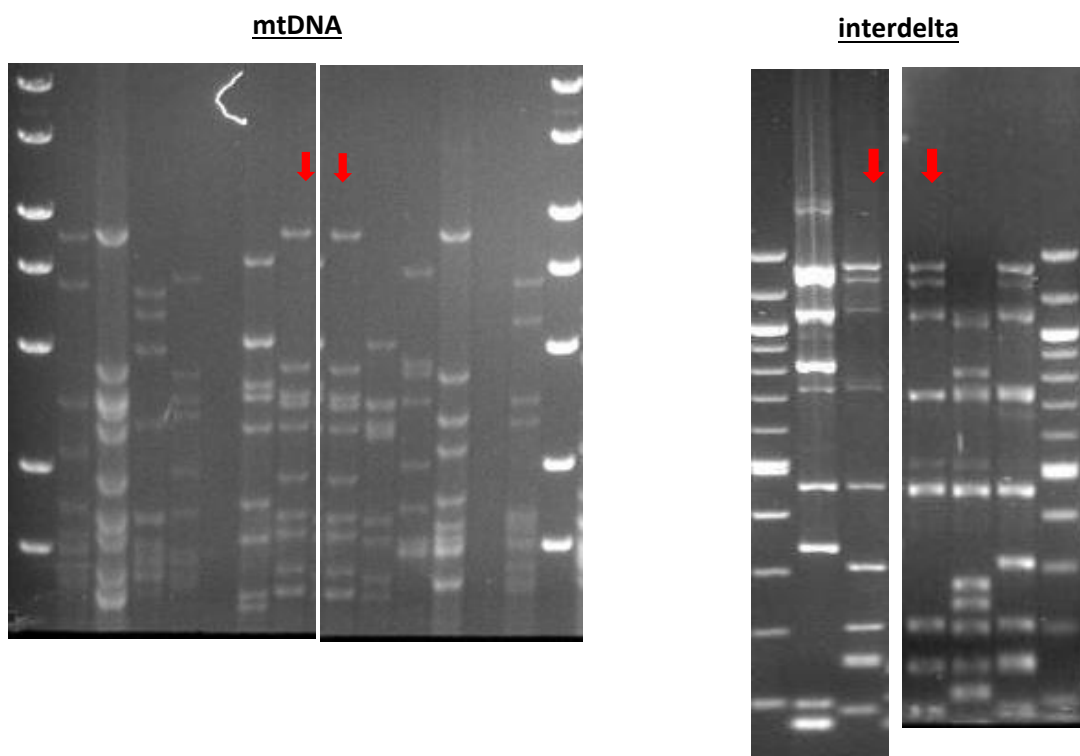
Τα δένδρογράμματα κατασκευάστηκαν με βάση την ομοιότητα των διαφορετικών προτύπων που ελήφθησαν από τις μοριακές τεχνικές με DICE συντελεστή και UPGMA ομαδοποίηση και έδειξαν διαφορετικό βαθμό σχέσης μεταξύ των στελεχών, σύμφωνα με την μοριακή μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 9 η ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA με το ένζυμο περιορισμού *HinfI*, αποκάλυψε την παρουσία 70 διαφορετικών προτύπων, ενώ η ενίσχυση των interdelta περιοχών εμφάνισε 89 διαφορετικά πρότυπα. Διαφορά παρουσίασαν οι δυο τεχνικές στα μοναδικά πρότυπα καθώς και στα κοινά πρότυπα μεταξύ των αμπελώνων με την πρώτη να εμφανίζει 56 μοναδικά πρότυπα και 14 ομάδες με κοινά πρότυπα μεταξύ των αμπελώνων σε αντίθεση με τη δεύτερη που εμφάνισε 71 μοναδικά πρότυπα και 18 ομάδες (πίνακας 9). Μπορούμε λοιπόν να πούμε ότι η μέθοδος ενίσχυσης των interdelta περιοχών παρουσιάζει καλύτερη διακριτική ικανότητα και αυτό μπορούμε να το διακρίνουμε και από την εικόνα 18.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ	ΑΜΠΕΛΩΝΕΣ ΝΕΜΕΑΣ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΝΑΔΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΟΙΝΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ
mtDNA	18	301	70	56	14
interdelta	18	301	89	71	18

**Πίνακας 9: Διαφορές μεταξύ των μοριακών τεχνικών mtDNA και interdelta που παρουσιάζουν στους πληθυσμούς *Saccharomyces cerevisiae* από γλεύκος Αγιωργίτικου της ζώνης Π.Ο.Π. Νεμέας.**

Φαίνεται λοιπόν η μέθοδος ενίσχυσης των interdelta περιοχών του DNA να αποτελεί την πιο χρήσιμη μέθοδο για τη διάκριση απομονωθέντων στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*. Όπως αναφέρουν και άλλοι συγγραφείς αυτή η μέθοδος είναι πραγματικά γρήγορη, αναπαραγωγική και πολύ ευαίσθητη για την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας ανάμεσα σε πληθυσμούς *Saccharomyces cerevisiae*, κρίνοντας ότι η ενίσχυση των interdelta περιοχών γίνεται απευθείας σε αποικία, χωρίς να προηγείται απομόνωση γενομικού DNA.



**Εικόνα 18: Ηλεκτροφορητικά πρότυπα 2 στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*. Όπως παρατηρούμε με τη μέθοδο του μιτοχondριακού DNA τα πρότυπα των δύο στελεχών είναι ίδια, ενώ με τη μέθοδο interdelta τα πρότυπα διαφοροποιούνται.**



Από τα αποτελέσματα τις παρούσας εργασίας φαίνονται οι πολύπλοκες σχέσεις που βρέθηκαν σε μοριακό επίπεδο μεταξύ των απομονωμένων στελεχών που μοιράζονται στο ίδιο περιβάλλον. Επιπλέον, η μελέτη έδειξε ότι πέρα από την πλούσια ποικιλομορφία, τα στελέχη παρατηρούνται ότι έχουν πολλά κοινά γενετικά χαρακτηριστικά.

## **2. Βιοποικιλότητα των απομονωθέντων στελεχών**

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη της βιοποικιλότητας των πληθυσμών *Saccharomyces cerevisiae* καθώς και το οινολογικό δυναμικό αυτών, σε μια από τις πιο σημαντικές οινοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, την Νεμέα και σε μια από τις πιο εκλεκτικές έγχρωμες ελληνικές οινοποιήσιμες ποικιλίες αμπέλου, το αγιωργίτικο. Δυο μοριακοί δείκτες εφαρμόστηκαν η ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA και η ενίσχυση των interdelta περιοχών του DNA για να διαχωριστούν τα διαφορετικά στελέχη *S.cerevisiae*. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φαίνεται η ποικιλομορφία του *S.cerevisiae* να είναι αρκετά μεγάλη σε αυτήν την περιοχή με σχεδόν 90 διαφορετικά πρότυπα από τις 301 συνολικές απομονώσεις, δηλαδή παρουσιάζει ένα ποσοστό 29,6%. Η ποικιλομορφία που βρέθηκε, είναι σχεδόν το ίδιο σημαντική με εκείνη που παρατηρήθηκε από τον Mercado et al. (2011), ο οποίος μελέτησε την βιοποικιλότητα του *Saccharomyces cerevisiae* της ποικιλίας Malbec στην περιοχή ZARM της Αργεντινής με περισσότερα από 190 διαφορετικά στελέχη από τα 590 που αξιολογήθηκαν (32,20%). Ομοίως ο Lorandic et al. (2008) αξιολόγησε την βιοποικιλότητα του *S.cerevisiae* στο 22% σε οινοπαραγωγικές περιοχές της Αυστρίας.

Φαίνεται λοιπόν ότι η ποικιλομορφία του *S.cerevisiae* στην ζώνη της Νεμέας είναι αρκετά σημαντική και αγγίζει την βιοποικιλότητα που έχει παρατηρηθεί σε πολύ σημαντικές οινοπαραγωγικές περιοχές όλου του κόσμου.

Σε πολλές μελέτες, οι συγγραφείς αναφέρουν την παρουσία μοναδικών στελεχών ζύμης σε μία μόνο περιοχή, που οδηγεί στην έννοια του τοπικού χαρακτήρα το λεγόμενο 'terroir' (Raspor et al., 2006). Στην παρούσα εργασία, αυτή η έννοια βλέπουμε ότι υποστηρίζεται με πρότυπα στελεχών που απαντώνται σε γειτονικούς αμπελώνες της ίδιας περιοχής (Λεόντειο και Κουτσομόδι) (διάγραμμα 1).

Επίσης παρουσιάζονται και στελέχη τα οποία είναι κοσμοπολίτικα, δηλαδή στελέχη τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στην ζώνη της Νεμέας. Το πιο διαδεδομένο στέλεχος απαντήθηκε σε 11 από τους συνολικά 18 αμπελώνες ενώ το αμέσως επόμενο διαδεδομένο στέλεχος βρέθηκε σε 7 αμπελώνες.

Σε αυτή την εργασία συμπεριλάβαμε και την μοριακή ανάλυση 7 εμπορικών στελεχών *S.cerevisiae*, τα οποία χρησιμοποιούνται εκτενώς σε εκείνη την περιοχή, για να προσδιορίσουμε την επίδραση της μαζικής χρήσης ξένων στελεχών στην τοπική βιοποικιλότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία 2 εμπορικών ζυμών στους αμπελώνες της Νεμέας. Το ένα απαντάται στον αμπελώνα της Νεμέας (SE4A), ενώ το άλλο απαντάται σε 6 γειτονικούς αμπελώνες της περιοχής του Λεοντείου (διάγραμμα 1, πρότυπο με καφέ χρώμα). Και τα δυο εμπορικά στελέχη φαίνεται να μην έχουν επηρεάσει μέχρι στιγμής την βιοποικιλότητα του πληθυσμού του *S.cerevisiae* στους αμπελώνες αυτούς, αφού όλοι οι αμπελώνες χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, εκτός από τον αμπελώνα MP5A, που η πλειοψηφία των απομονωθέντων στελεχών έδειξαν ότι είναι το εμπορικό στέλεχος (διάγραμμα 1). Χαρακτηριστικά οι Schuller et al., το 2007 ανέφερε ότι η συνεχής χρήση εμπορικών ζυμών έχει περιορισμένη επίδραση στον αυτόχθονο ζυμωτικό πληθυσμό που συλλέγεται από τα σταφύλια και μπορεί να αλλάξει μόνο ελαφρώς τις πληθυσμιακές δομές των στελεχών που συλλέγονται. Η μόνιμη εγκατάσταση εμπορικών στελεχών σε αμπελώνες δεν έχει επιβεβαιωθεί (Clavijo et al., 2010), καθώς επίσης δεν έχουν διευκρινιστεί οι βιολογικοί παράγοντες που καθορίζουν αν ένα συγκεκριμένο στέλεχος γίνεται μόνιμα εγκατεστημένο (Barrajón et al., 2010).

Σε όλες τις περιπτώσεις επιμόλυνσης, η μεταφορά εμπορικών στελεχών στους αμπελώνες οφείλεται στον ανθρώπινο παράγοντα και τη χρήση εξοπλισμού σε οινοποιεία και αμπελώνες (Valero et al., 2005 Combina et al., 2005). Ο αμπελώνας MP5A με τον χαμηλό πολυμορφισμό και το μεγάλο ποσοστό της εμπορικής ζύμης ίσως βρίσκεται πολύ κοντά ή γύρω από το οινοποιείο, όπως στην περίπτωση του αμπελώνα με τον πολύ χαμηλό πολυμορφισμό που περιγράφει ο Mercado et al. (2011).

### **3. Οινολογικά χαρακτηριστικά των γηγενών *Saccharomyces cerevisiae***

Με τον χαρακτηρισμό των διαφορετικών στελεχών ως προς τα οινολογικά τους χαρακτηριστικά διαπιστώθηκε ότι κάποια από αυτά τα στελέχη διαθέτουν πολύ θετικά οινολογικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Σχεδόν όλα τα στελέχη παρουσίασαν υψηλή ανθεκτικότητα σε συγκέντρωση 18% αιθανόλης και ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους 250-300mg/l, δύο στοιχεία που χαρακτηρίζουν γενικά τα στελέχη *S.cerevisiae* (A.Capece et al., 2012).

Η παραγωγή υδρόθειου που καταγράψαμε στα περισσότερα στελέχη ήταν χαμηλή έως και μεσαία, ενώ το 17% δεν παρουσίασαν καμία παραγωγή. Παρόμοια αποτελέσματα για στελέχη *S.cerevisiae* έχουν καταγράψει και άλλοι συγγραφείς (Sabina Di Maio et al. 2012). Ως προς την παραγωγή β- γλυκοσιδάσης επιβεβαιώνονται οι μελέτες που τεκμηριώνουν ότι η δραστηριότητα αυτή είναι μεγάλη σε στελέχη μη *Saccharomyces* απ' ότι σε *Saccharomyces* (Manzanares, et al., 2000), αφού το 56% δεν παρήγαγε καθόλου β- γλυκοσιδάση και μόνο το 11% είχε υψηλή παραγωγή.

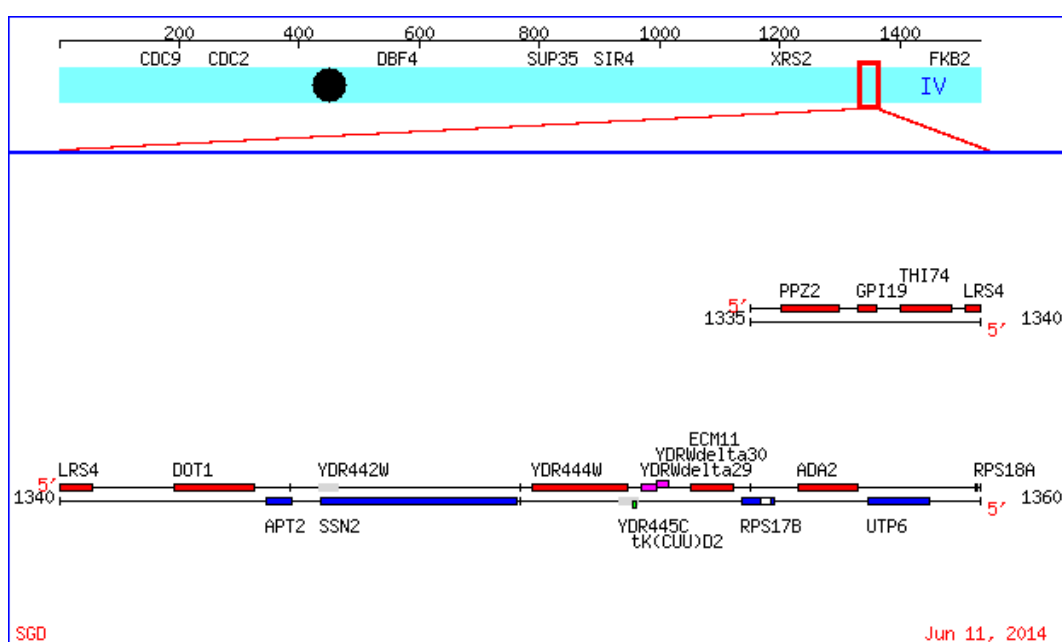
Οι Torrea & Ancín (2002) διαπίστωσαν ότι αυτόχθονες ζύμες που πραγματοποιούν αυθόρμητες ζυμώσεις δεν παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις βιογενών αμινών, γεγονός που φαίνεται να ισχύει και για τα δικά μας προς εξέταση στελέχη.

Τέλος το test για τη δραστηριότητα killer έδειξε ότι το 20% των στελεχών παρουσιάζουν το φαινόμενο killer, το 58% είναι ανθεκτικά σε τοξίνη killer και το 22% είναι ευαίσθητα, ποσοστά παρόμοια είχαν διαπιστωθεί το 1996 από τον Silva (G.A. da Silva., 1996).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχουν στελέχη τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν εναρκτήριες καλλιέργειες για τη δημιουργία οίνων με διαφορετικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά των τοπικών περιοχών.

#### 4. Μεταλλαγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και το φαινόμενο της κροκίδωσης

Στην μελέτη μας για τα μεταλλαγμένα, μας ενδιέφερε να εντοπίσουμε τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με το φαινόμενο της κυτταρικής συσσωμάτωσης και το σχηματισμό κροκιδωμάτων καθώς και να κατανοήσουμε την λειτουργικότητα αυτών των γονιδίων. Τα στελέχη που εξετάσαμε έδειξαν ότι η μετάλλαξη επιτεύχθηκε και το σημείο ένθεσης προσδιορίστηκε στο SSN2 γονίδιο του χρωμοσώματος IV (εικόνα 19).



**Εικόνα 19: Χάρτης εντοπισμού του γονιδίου SSN2 στο γονιδίωμα.**

Το γονίδιο SSN2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα IV και αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Srb9p, η οποία στελεχώνει το σύμπλοκο Srb. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί ένα μέρος του ολοένζυμου RNA πολυμεράση II, καθώς συνδέεται με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (Boube M.et al., 2002).

Στον *Saccharomyces cerevisiae* όπως και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το σύμπλοκο Srb, όπως πολλά άλλα συστατικά της RNA πολυμεράσης II, είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση έκφρασης ενός σχετικά μεγάλου αριθμού γονιδίων.

Συγγραφείς αναφέρουν ότι μονοπάτια μεταγωγής σήματος μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων, στοχεύοντας συστατικά της RNA πολυμεράσης II. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος χρησιμοποιούνται από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι η απόκρισή τους

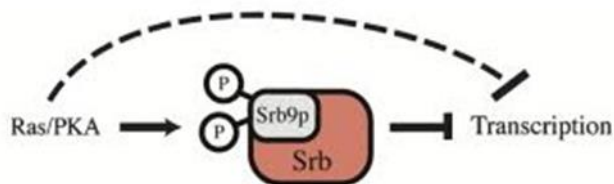
στις αλλαγές του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Έχουν την ιδιότητα να μετατρέπουν το εξωκυτταρικό ερέθισμα σε ενδοκυτταρικό σήμα (Chang Ya-Wen et al., 2004).

Ένα τέτοιο μονοπάτι είναι και το PKA/Ras το οποίο στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει δύο πιθανούς στόχους. Πρώτος στόχος είναι οι πρωτεΐνες trans- ενεργοποιητές, παρόντες στα βελτιωτικά και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συνδέονται με την RNA πολυμεράση II. (Chang Ya-Wen et al., 2004).

Έρευνες, γενετικές και βιοχημικές έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Srb9p είναι υπόστρωμα για την PKA (πρωτεϊνική κινάση A) και η φωσφορυλίωση της ρυθμίζει τη δραστηριότητα του Srb συμπλόκου. Η φωσφορυλίωση της Srb9p από την PKA βελτιώνει την δραστηριότητα του συμπλόκου Srb και κατά συνέπεια αναστέλλεται η έκφραση ειδικών γονιδίων που φυσιολογικά συνδέονται με την στατική φάση ανάπτυξης (εικόνα 20) (Chang Ya-Wen et al., 2004).

Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα, όπου στελέχη *S.cerevisiae* ύστερα από μετάλλαξη στο γονίδιο SSN2 (πρωτεΐνη Srb9p), παρουσίασαν το φαινόμενο της κροκίδωσης.

Με τον εντοπισμό του σημείου ένθεσης και σε άλλα μεταλλάγματα, θα επιτραπεί ο εντοπισμός γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό κροκιδωμάτων (flocculation).



**Εικόνα 20: Μοντέλο απεικόνισης λειτουργίας Ras/PKA με το σύμπλοκο Srb της RNA πολυμεράσης II. Η Ras/PKA φωσφορυλιώνει την Srb9p με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η έκφραση γονιδίων που συνδέονται με την στατική φάση του κυττάρου.**

# Μελλοντικοί στόχοι

Τα τελευταία χρόνια η διατήρηση της βιοποικιλότητας έχει γίνει πρωταρχικό ζήτημα. Η παρούσα εργασία ανέδειξε την σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών του *Saccharomyces cerevisiae* που φυσικά παρουσιάζεται στη Νεμέα, η οποία αποτελεί την μεγαλύτερη και πιο σημαντική αμπελουργική ζώνη της Ελλάδας. Από τα συνολικά 301 απομονωθέντα στελέχη *S.cerevisiae*, ένας σημαντικός αριθμός φάνηκε να είναι ανώτερος από τα βιομηχανικά στελέχη ζύμης που χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινοποίηση.

Στόχος μας είναι με αυτά τα στελέχη να πραγματοποιήσουμε πειραματικές ζυμώσεις και να αξιολογήσουμε την κινητική ζύμωση, τη σύσταση καθώς και να εκτιμήσουμε τα χαρακτηριστικά που δίνουν στο παραγόμενο κρασί, σε τεχνολογικό, ποιοτικό και αισθητικό επίπεδο.

Επίσης τα μοναδικά πρότυπα πρέπει να συγκριθούν με στελέχη της ίδιας περιοχής αλλά διαφορετικής χρονιάς, ώστε να εξεταστεί κατά πόσο οι πληθυσμοί παραμένουν σταθεροί ή μεταβάλλονται επηρεαζόμενοι από παράγοντες όπως οι καιρικές συνθήκες.

Όσον αφορά το φαινόμενο της κροκίδωσης, πρέπει να εξεταστούν και άλλα εργαστηριακά μεταλλαγμένα στελέχη *S.cerevisiae*, που παρουσιάζουν αυτόν τον φαινότυπο, ώστε να εντοπιστούν τα γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό κροκιδωμάτων καθώς και την καλύτερη κατανόηση αυτού του φαινοτύπου.

# Βιβλιογραφία



- A. Capece, et al. 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian "heroic vine-growing area
- A. Clavijo, I. Calderón, P. Paneque (2010). Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143 (2010), pp. 241–245
- Ana Mendes-Ferreira, Catarina Barbosa, Patrícia Lage and Arlete Mendes-Faia. (2011). The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality
- Augustin, H. W., G. Kopperschlager, H. Steffen, and E. Hofmann. 1965. Hexokinase as limiting factor of anaerobic glucose consumption of *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC74. *Biochim. Biophys. Acta* 110:437–439
- Bauer FF, Pretorius IS. 2000. Pseudohyphal and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol* (in press)
- Bevan, E. A., and M. Makower. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast". *Proc. XIth Int. Congr. Genet.* 1:202–203
- Borneman, A. R., Desany, B. A., Riches, D., Affourtit, J. P., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., et al. (2012). The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotetraploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Res.* 12, 88–96
- Borneman, A. R., Pretorius, I. S., and Chambers, P. J. (2013). Comparative genomics: a revolutionary tool for wine yeast strain development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 192–199
- Boube M., Joulia L., Cribbs D. L., Bourbon H. M. 2002. Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. pp. 143–151
- Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., and Dequin, S. (2011). Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits.
- Carreto, L., Eiriz, M. F., Gomes, A. C., Pereira, P. M., Schuller, D., and Santos M. A. S. (2008). Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity.

- Caruso, M., Fiore, C., Conturse, M., Salzano, C., Paparella, A. & Romano, P., 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J. Microb. Biot.* 18, 159-163
- Cavalieri, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R., and Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S.cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* 57, S226–S232
- Chang Ya-Wen, Howard Susie C., Herman Paul K. (2004). The Ras/PKA Signaling Pathway Directly Targets the Srb9 Protein, a Component of the General RNA Polymerase II Transcription Apparatus
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A. and Todd, B.E.N. 1997, Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape Wine Research* 3, 2-8
- Chi, Z., and N. Arneborg. 1999. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 86:1047–1052
- Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches (2010) Aishath Naila, Steve Flint, Graham Fletcher, Phil Bremer, and Gerrit Meerdink
- De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M., Grieco, F., 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 189-200
- Delcroix, A., GuÈnata, Z., Sapis, J., Salmon, J. and Bayonove, C. (1994) Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: Effect on the terpenol content of Muscat wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 291-296
- De Ullivarri MF, Mendoza LM, Raya RR, et al. 2011. Killer phenotype of indigenous yeasts isolated from Argentina wine cellars and their potential starter cultures of winemaking
- Fay, J. C., and Benavides, J. A. (2005). Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22
- G.A. da Silva. 1996. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour

- Garde-Cerdan, T., Ancin-Azpilicueta, C., 2007. Effect of SO<sub>2</sub> on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control* 18, 1501–1506
- G. Fia et al., (2005) Study of b-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity
- Gherbawy Youssuf, Voigt Kerstin, 2010. Molecular identification of fungi. p.183
- Goñi, D.T. & Ancin Azpilicueta, C., 2001. Influence of yeast strain on biogenic amine content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 185-190
- GueÂrin B. 1991. Mitochondria. In *The Yeasts*, 2nd edn, vol 4, Yeast Organelles, Rose AH, Harrison JS (eds). Academic Press: London; 541-600
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., and Fink, G. (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell- cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12158–12163
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>
- Ibeas, J. I., and J. Jimenez. 1997. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:7–12
- Kojic, E.M., and Darouiche, R.O. (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17: 255–267
- Komprda T, Neznalova J, Standara S, Bover-Cid S. 2001. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage polian. *Meat Sci* 59(3):267–76
- Legras, J. L., and Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol.*
- Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., et al. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts.
- Maijala R, Eerola S, Lievonon S, Hill P, Hirvi T. 1995a. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J Food Sci* 60(6):1187–90
- Maijala R, Nurmi E, Fischer A. 1995b. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Sci* 39(1):9–22
- Manzanares, P., Rojas, V., Genoves, S. and Valles, S. (2000) A preliminary search for anthocyanin-b-D-glucosidase activity in non- *Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Technol* 35, 95–103

- Martini, A., and Vaughan-Martini, A. (1990). “Grape must fermentation: past and present,” in *Yeast Technology*, eds J. F. T. Spencer and D. M. Spencer (Berlin: Springer-Verlag), 105–123
- Mauriello et al., 2009, SPME–GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts
- Mauriello, G., Capece, A., D'Auria, M., Garde-Cerdán, T., Romano, P., 2009. SPME-GC. Method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiology* 26, 246–252
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17593–17598
- Mercado, L., Sturm, M., Rojo, M., Ciklic, I., Martinez, C., Combina, M (2011). Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* populations in Malbec vineyards from the “Zona Alta del Río Mendoza” region in Argentina. *Int J Food Microbiol* 151: 319-326
- Mortimer, R., Romano, P., Suzzi, G., and Polsinelli, M. (1994). Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543–1552
- Nagodawithana, T. W., and K. H. Steinkraus, 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:158–162
- Naumov, G. I., Serpova, E. V., and Naumova, E. S. (2006). A genetically isolated population of *Saccharomyces cerevisiae* in Malaysia. *Mikrobiologiya* 75, 245–249
- N. Barrajón, M. Arévalo-Villena, J. Úbeda, A. Briones (2010). Competition between spontaneous and commercial yeasts in winemaking: study of possible factors involved. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2 Formatex, Badajoz (2010), pp. 1035–1041
- Nisiotou, A. A., and Nychas, G. J. E. (2007). Yeast populations residing on healthy or botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2765–2768

- Petering JE, Henschke PA, Langridge P. 1991. The Escherichia coli b-glucuronidase gene as a marker for Saccharomyces yeast strain identification. *Am J Enol Vitic* 42: 6-12
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675–729
- Pretorius IS, Van der Westhuizen TJ. 1991. The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry-a review. *S Afr J Enol Vitic* 12: 3-31
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50, 15e31
- Ramette, A., and Tiedje, J. M. (2007). Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microb. Ecol.* 53, 197–207
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Nadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* 109, 97-102.
- Rauhut D., 1993. Yeasts - production of sulfur compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. 183-223. Fleet G.H. (ed.), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland)
- Rivas B, Gonzalez R, Landete JM, Munoz R. 2008. Characterization of a second ornithine decarboxylase isolated from *Morganella morganii*. *J Food Prot* 71(3):657–61
- Rosi I. et al., (1994) Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin
- R. Pando Bedriñanaa, A. Querol Simónb, B. Suárez Valles 2009. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias
- Sabina Di Maio et al. 2012. Biodiversity of Indigenous *Saccharomyces* Populations from Old Wineries of South-Eastern Sicily (Italy): Preservation and Economic Potential
- Santos MHS. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* 29(2–3):213–31

- Sampermans, S., Mortier, J., and Soares, E.V. (2005) Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J Appl Microbiol* 98: 525–531
- Sato, M., Maeba, H., Watari, J., and Takashio, M. (2002) Analysis of an inactivated Lg-FLO1 gene present in bottom-fermenting yeast. *J Biosci Bioeng* 93: 395–398
- Schacherer, J., Shapiro, J. A., Ruderfer, D. M., and Kruglyak, L. (2009). Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., and Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal.
- Schuller, D., Casal, M., (2007). The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. 137- 150
- Schuller, D., Cardoso, F., Sousa, S., Gomes, P., Gomes, A. C., Santos, M. A. S., et al. (2012). Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions.
- Stratford, M. (1992) Yeast flocculation – a new perspective. *Adv Microb Physiol* 33: 1–71
- Swiegers J.H., I.S. Pretorius. 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 954-960
- Teunissen, A.W.R.H., and Steensma, H.Y. (1995) Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 11: 1001–1013
- The microorganisms of winemaking—isolation, enumeration and identification. In: Fleet GH (ed) *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp 1–25).
- Torrea, D. & Ancín, C., 2002. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4895-4899
- Varelo, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., Dequin, S., 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale three-year study. *FEMS Yeast Res.* 5, 959-969
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Delvaux, F.R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 197–205

- Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2004a) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nature Rev Microbiol* 2: 533–540
- Walker GM. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley: New York
- Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., and Bai, F. Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol. Ecol.* 21, 5404–5417
- Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., & Edwards, C. G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 349–359
- Warringer, J., Zorgo, E., Cubillos, F. A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J. D., et al. (2011). Trait variation in yeast is defined by population history.
- Wickner RB. 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60: 250-265