

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΓΗΓΕΝΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis Vinifera* L.) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΜΑΡΙΑ Α. ΝΙΚΑΚΟΥ
ΑΘΗΝΑ, 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΑΙΚ. ΜΠΙΝΙΑΡΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΓΗΓΕΝΩΝ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ (*Vitis Vinifera* L.) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

GENETIC STUDY OF NATIVE GRAPEVINE VARIETIES (*Vitis
vinifera* L.) USING MOLECULAR METHODS

ΜΑΡΙΑ Α. ΝΙΚΑΚΟΥ
ΑΘΗΝΑ, 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΙΚ. ΜΠΙΝΙΑΡΗ
ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: Μ. ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
Σ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Αμπελολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Αμπελουργία - Οινολογία”.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής μου μελέτης κα Αικ. Μπινιάρη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Γ. Π. Α. και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Αμπελολογίας. Με τη βοήθειά της κατάφερα να φέρω εις πέρας την εργασία αυτή αφού με καθοδήγησε και μου πρόσφερε τις γνώσεις της απλόχερα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα Μαριτίνα Σταυρακάκη για το χρόνο που αφιέρωσε και τη βοήθειά της στην ολοκλήρωση της εργασίας. Όπως επίσης και την κα Δ. Μπούζα Ε. Δ. Ι. Π. και μέλος του εργαστηρίου Αμπελολογίας για τις συμβουλές και τα μαθήματα ζωής που μου παρέδιδε και τον υποψήφιο Διδάκτορα κ Ι. Δασκαλάκη κυρίως για την καλή του διάθεση, η οποία συνέβαλε στο ευχάριστο πέρας των ημερών.

Ευχαριστώ τον κ. Σ. Παπανικολάου, Αναπληρωτή Καθηγητή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ. Π. Α., και την κα. Μ. Χατζηδημητρίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής του Γ. Π. Α., μέλη της τριμελούς επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν για την εξέταση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την προπτυχιακή φοιτήτρια Μαριλένα Αντύπα, με την οποία μοιραστήκαμε στιγμές εντός και εκτος εργαστηρίου. Νιώθω τυχερή που είχα τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης αλλά κυρίως νιώθω τυχερή που κέρδισα μια φίλη σαν αυτή, έναν υπέροχο άνθρωπο.

Τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην οικογένειά μου. Μου συμπαραστάθηκαν και με στήριξαν κάθε φορά που αντιμετώπιζα εμπόδια. Χωρίς αυτούς δεν θα ήταν καθόλου εύκολα αυτά τα χρόνια. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου έναν-έναν ξεχωριστά, ήταν εκεί για να μοιραστώ τη χαρά αλλά και τους προβληματισμούς μου. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ αξίζει ο άνθρωπος που είναι δίπλα μου - όπου και να βρίσκομαι - τα τελευταία 10 χρόνια και στον οποίο χρωστάω πολλά, η φίλη και αδερφή που δεν είχα, Σοφία Ζάλιου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ - abstract
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
 1. ΓΕΝΙΚΑ
 2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ - SSR
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ
 1. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ
 2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA
 3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA
 4. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ
 5. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ - PCR
 6. ΑΝΑΛΥΤΗΣ
 7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 32 ποικιλίες αμπέλου. Για τη μελέτη των ποικιλιών αυτών, συλλέχθηκαν νεαρά φύλλα κορυφής από την Αμπελογραφική Συλλογή του Εργαστηρίου Αμπελογολίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών αλλά και από την Αμπελογραφική Συλλογή του Ινστιτούτου Αμπέλου στη Λυκόβρυση Αθηνών. Η ταυτοποίηση και η διάκριση των ποικιλιών έγινε με τη μοριακή μέθοδο του μικροδορυφορικού DNA (Single Sequence Repeat), χρησιμοποιώντας 6 εκκινητές.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής ανομοιότητας (συσχέτισης ή απόστασης), Dist και σχηματίστηκαν τα αντίστοιχα δένδρογράμματα με τη μέθοδο UPGMA. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας μεταξύ των ποικιλιών και κυμάνθηκε από 2,22 έως 0,12 (συντελεστής Dist).

Από τα αποτελέσματα της εργασίας προκύπτει ότι η μέθοδος SSR έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ταυτοποίηση αλλά και τον διαχωρισμό των ποικιλιών. Επιπλέον, παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό πολυμορφισμού σε σχέση με άλλες μοριακές μεθόδους. Παρ' όλα αυτά για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, καλό θα ήταν οι μοριακές μέθοδοι να συνδυάζονται με την αμπελογραφική περιγραφή των εκάστοτε υπό μελέτη ποικιλιών.

Λέξεις κλειδιά: μικροδορυφορικό DNA, *Vitis vinifera*, γενετική ταυτοποίηση, Ελλάδα

ABSTRACT

In the present study, 32 native grapevine varieties were studied. Young leaves of these varieties were collected from the ampelographic collection of the Laboratory of Viticulture (Agricultural University of Athens) and from the collection of the Institute of Viticulture in Lykovrysi, Athens. The identification and discrimination of these varieties carried out by the method of microsatellite DNA (Single Sequence Repeat), using 6 primers.

For the statistical analysis of the results, the dissimilarity (distance) coefficient Dist was used in order to determine the degree of genetic similarity generating the corresponding dendrograms with the UPGMA method. After processing the data, the degree of genetic dissimilarity varied from 2,22 to 0,12 (coefficient Dist).

The results of the study showed that the SSR method have satisfactory results in the identification and discrimination of grapevine varieties. Furthermore, it is displaying a greater degree of polymorphism in contrast with other molecular methods. However, for a reliable estimation of the results, the combination of the ampelographic description and molecular methods is more advisable.

Keywords: microsatellite DNA, *Vitis vinifera*, genetic identification, Greece

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ

Το φυτό της αμπέλου ανήκει στη οικογένεια *Vitaceae* (δικοτυλήδονα ανθοφόρα φυτά) και συγκεκριμένα στο γένος *Vitis*, που περιλαμβάνει 79 είδη. Ευρήματα μαρτυρούν την ύπαρξη του φυτού πριν την εποχή των παγετώνων κυρίως στην περιοχή της Ισλανδίας, της Βορείου Ευρώπης αλλά και στην βορειοδυτική Ασία. Κατά την περίοδο των παγετώνων, η βλάστηση της αμπέλου περιορίστηκε στις παραπάνω περιοχές αλλά άκμασε σε θερμότερες ζώνες όπως η κεντρική και ανατολική Ασία, η κεντρική και νότια Ευρώπη, αλλά και η ευρύτερη περιοχή του νότιου Καυκάσου. Μέχρι τότε η άμπελος εμφανιζόταν με την άγρια μορφή της, δηλαδή ως αναρριχώμενος θάμνος, τόσο σε δασικές όσο και σε παραποτάμιες περιοχές.

Οι πρώτοι αμπελοκαλλιεργητές θεωρούνται οι Άριοι (περιοχή Καυκάσου-Κασπίας), οι σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Κατόπιν η τέχνη της αμπελουργίας και της οινοποιίας αναδείχθηκε στους Αιγύπτιους, στους Παλαιστίνιους, στους Φοίνικες και στους Έλληνες. Η άμπελος μεταφέρθηκε στον αρχαίο ελλαδικό χώρο, από την Αίγυπτο στη Μινωική Κρήτη ενώ κατά τη μυθολογία, η καλλιέργεια της αμπέλου και ο οίνος ήταν δώρα του θεού Διονύσου και διαδόθηκαν στον αρχαίο ελλαδικό χώρο από τη Θράκη (Αναγνωστόπουλος, Γ., 2003).

Σήμερα καλλιεργείται το είδος Άμπελος η οινοφόρος (*Vitis vinifera*), το οποίο εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη Μεσοποταμία, την περιοχή της Κασπίας Θάλασσας και του Εύξεινου Πόντου. Το όνομα “Άμπελος η οινοφόρος” οφείλεται στον Διοσκουρίδη και έπειτα στα λατινικά αποδόθηκε ως *Vitis vinifera* L. Ανήκει στο γένος *Vitis*, το οποίο με άλλα δώδεκα γένη, ανήκουν στην οικογένεια *Viticeae* ή *Ampellidaceae* (Gallet P., 1988). Αποτελεί το σπουδαιότερο είδος της αμπέλου στην παραγωγική αμπελουργία αφού - σύμφωνα με την αμπελογραφία των Viala και Vemorel (1909) - υπάρχουν περίπου 24.000 ονόματα ή συνώνυμα που αντιστοιχούν σε περισσότερες από 9.000 ποικιλίες και οι οποίες καλλιεργούνται σε ολόκληρο τον κόσμο. Όσον αφορά τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, φαίνεται να υπερβαίνουν τις 500, χωρίς να υπολογίζονται τα συνώνυμα, οι τύποι και οι

παραλλαγές τους, που αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα (Κριμπάς 1938, 1943).

Η ύπαρξη του μεγάλου αριθμού ποικιλιών του είδους *Vinifera* μπορεί να αποδοθεί

- στον μεγάλο αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n=38$), καθώς και στον υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας που οδηγεί στον έντονο πολυμορφισμό,
- στη μακραίωνη καλλιέργεια της αμπέλου και στη μεγάλη γεωγραφική της εξάπλωση,
- στις συχνές μεταλλάξεις που παρατηρούνται με το πέρασμα των ετών και τέλος,
- στις φυσικές αλλά και τεχνητές διασταυρώσεις.

Σύμφωνα με έρευνες, η πλειονότητα των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου αποτελούν απλά ή πολλαπλά υβρίδια άλλων ποικιλιών (Loukas et al., 1983).

Η ανάγκη διάκρισης και ταξινόμησης των πολλαπλών αυτών ποικιλιών είναι υψίστης σημασίας, παρόλο της επιπρόσθετης δυσκολίας της ύπαρξης συνωνύμων και ομώνυμων. Πάρα πολλοί αμπελογράφοι και συστηματικοί ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό και την ταξινόμηση των ποικιλιών, με την πρώτη απόπειρα να λαμβάνει χώρα το 1777 από τον Helbling (Molon, 1906). Από τότε μέχρι και σήμερα, έχουν προταθεί πάνω από 100 συστήματα αμπελογραφικής περιγραφής και ταξινόμησης των ποικιλιών της αμπέλου.

Σύμφωνα με τον Νταβίδη (1982), η αμπελογραφική μεθοδολογία για την επίτευξη του σκοπού της, χρησιμοποιεί τις τρεις μεθόδους διάκρισης και ταξινόμησης, όπως περιγράφονται παρακάτω:

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

Στην Ελλάδα, η πρώτη προσπάθεια διάκρισης και ταξινόμησης των ποικιλιών της αμπέλου έγινε το 1878 από τον Γ. Ορφανίδη, ο οποίος υπολόγισε περισσότερες από πεντακόσιες ελληνικές ποικιλίες, τις οποίες και κατέταξε σε κλάσεις και τάξεις ανάλογα με το χρώμα και το σχήμα των ραγών. Επόμενος, ο Ε. Πονηρόπουλος (1888) αναγνώρισε περίπου διακόσιες ελληνικές ποικιλίες και τις διέκρινε σε “ποικιλίες οινοποιίας” (περίπου 30) και σε “λοιπές ποικιλίες” (περίπου 170). Το 1983 ο Β. Κριμπάς πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης των ελληνικών ποικιλιών βασιζόμενος στη σχέση «μήκος ράγας προς μήκος γιγάρτου» - χαρακτήρα σχετικά σταθερό σε σχέση με τους άλλους αμπελογραφικούς χαρακτήρες του φύλλου, το σχήμα και το χρώμα των ραγών. Οι επόμενες προσπάθειες έγιναν από τους Λογοθέτη και Βλάχο (1960, 1963, 1965, 1967), οι οποίοι περιέγραψαν έναν αριθμό ποικιλιών βασιζόμενοι σε μορφολογικούς και φαινολογικούς χαρακτήρες σύμφωνα με το σχέδιο του Ο.Ι.Β. (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). Το 1991, ο Βλάχος περιέγραψε με τον ίδιο τρόπο μερικές από τις σπουδαιότερες ελληνικές ποικιλίες καθώς και τα σημαντικότερα είδη και υβρίδια αμερικάνικων αμπελιών που χρησιμοποιούνται ως αντιφυλλοξηρικά υποκείμενα (Δρακόπουλος, 2006).

Από τα παραπάνω και όχι μόνο γεγονότα, προκύπτει η ανάγκη ύπαρξης ενός ενιαίου συστήματος αμπελογραφικής περιγραφής. Το 1984, ο Ο. Ι. Β. σε συνεργασία με τον Ι. Ρ. Γ. R. (International Board for Plant Genetic Resources), εξέδωσαν πίνακες περιγραφής και βαθμολόγησης των χαρακτηριστικών της αμπέλου, οι παλαιότεροι από τους οποίους περιλαμβάνουν 125 βασικά χαρακτηριστικά ποικιλιών αμπέλου ενώ οι νεότεροι τα 84 πιο απαραίτητα χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, κάθε χαρακτηριστικό που μελετάται, βαθμολογείται ανάλογα με έναν κωδικό αριθμό, ο οποίος καταγράφεται και αποκρυπτογραφείται σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Παράλληλα, με τη βοήθεια στατιστικών προγραμμάτων, είναι δυνατή η συγκριτική μελέτη διαφόρων ποικιλιών.

Τα τελευταία χρόνια στον κλάδο της Αμπελογραφίας χρησιμοποιούνται όλο και συχνότερα βιοχημικές (παραδείγματος χάριν, διαχωρισμός των φλαβονοειδών και των καροτενοειδών με τη χρωματογραφική μέθοδο και των πρωτεϊνών με την ηλεκτροφορητική μέθοδο) και μοριακές μέθοδοι (παραδείγματος χάριν, ανίχνευση πολυμορφισμών με τη χρήση μικροδορυφόρων). Οι βιοχημικές μέθοδοι αναφέρονται στη χρήση των ενζυμικών πολυμορφισμών, οι οποίοι ανιχνεύονται ηλεκτροφορητικά. Ως γνωστόν, τα ένζυμα είναι άμεσα προϊόντα των γονιδίων και έτσι επιτρέπουν τον προσδιορισμό της γενετικής σύνθεσης του εκάστοτε οργανισμού. Με τις μοριακές μεθόδους μελετάται απευθείας το γενετικό υλικό

του οργανισμού και περιλαμβάνουν τη χρήση ενζύμων περιορισμού (RFLP), την ανάλυση της τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNA με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RAPD - PCR), καθώς και τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στις οποίες ανήκουν οι μικροδορυφόροι (ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, Simple Sequences Repeat - SSR).

Τέλος, αξίζει να υπογραμμισθεί ότι η αμπελογραφική περιγραφή και γενικά οι μέθοδοι της κλασικής και σύγχρονης Αμπελογραφίας δεν πρέπει να αντικατασταθούν ούτε από τις βιοχημικές ούτε από τις μοριακές μεθόδους. Ο αποτελεσματικότερος τρόπος επίλυσης των προβλημάτων της ταυτοποίησης, διάκρισης και ταξινόμησης ποικιλιών και ιδιαιτέρως συγγενικών ποικιλιών ή ακόμα και κλώνων, είναι φυσικά ο συνδυασμός όλων των μεθόδων (Αμπελογραφική Περιγραφή, Συγκριτική Αμπελογραφία, Πειραματική Αμπελογραφία) (Διαμαντόπουλος, 2006).

2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ - SSR

Ως γνωστόν, το DNA ενός φυτού είναι το ίδιο σε όλα τα κύτταρα, σε κάθε ιστό και σε κάθε στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού. Έτσι, και με την προϋπόθεση ότι δεν θα συμβεί κάποια μετάλλαξη, το DNA παραμένει αναλλοίωτο, αμετάβλητο και δεν επηρεάζεται από εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το γεγονός αυτό, καθιστά το DNA καταλληλότερο για τη μελέτη και τη διάκριση ποικιλιών. Μερικά χρόνια πριν, η απομόνωση του DNA από φυτικά κύτταρα αποτελούσε μία επίπονη διαδικασία. Σήμερα όμως, το γενετικό υλικό μπορεί να απομονωθεί από κάθε διαθέσιμο είδος φυτικού ιστού. Ακόμα και στο φυτό της αμπέλου, πλέον λαμβάνεται γενετικό υλικό με την ίδια ευχέρεια είτε από τα φύλλα είτε τις κληματίδες είτε από άλλα μέρη του οργανισμού (Marsal et al., 2011).

Η ραγδαία εξέλιξη του κλάδου της Μοριακής Βιολογίας έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνικών οι οποίες χρησιμοποιούν μοριακούς και γενετικούς δείκτες για την διάκριση και την ταυτοποίηση των ποικιλιών της αμπέλου. Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA τα οποία δεν επηρεάζονται από το μορφολογικό στάδιο των ιστών και το περιβάλλον, αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και παρουσιάζουν συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των βιοχημικών ή άλλων δεικτών (Χατζόπουλος, 2001 , Agarwal et al., 2008).

Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών μεθόδων. Η πρώτη περιλαμβάνει τις τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR-based technique) όπως οι RAPD, AFLP , SSR κ.α., και η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις τεχνικές υβριδισμού (non-PCR based technique) όπως οι RFLP, SSCP κ.α.. Για να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα, πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα :

- Να είναι πολυμορφικοί (ή αν είναι δυνατόν η ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο).
- Να δημιουργούν πολλαπλούς, ανεξάρτητους και αξιόπιστους δείκτες.
- Να παρέχουν συνεχή/διαρκή ευκρίνεια γενετικών διαφορών.
- Να μην απαιτούνται πληροφορίες για το γονιδίωμα ενός οργανισμού.
- Να συνδέονται με διακριτούς φαινοτύπους.

- Απλή κληρονομικότητα που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τύπο με συγκυρίαρχους αλληλομόρφους.
- Να είναι διάσπαρτοι σε όλο το γονιδίωμα και στην ιδανική περίπτωση να βρίσκονται σε ισοκατανομή.
- Να έχουν υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
- Να είναι ανεξάρτητοι της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου του φυτού.
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στο φυτό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα όταν τα φυτά αναπτυχθούν τόσο , ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA (Χατζόπουλος, 2001).

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

ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΟ DNA (Single Sequence Repeats, SSR)

Τα τελευταία χρόνια η μέθοδος του μικροδορυφορικού DNA άρχισε να εφαρμόζεται με σκοπό τη διάκριση και την ταυτοποίηση ποικιλιών αμπέλου (Vignani et al., 1996, Lin and Walker, 1998, Filippetti et al., 1999, Labra et al., 2001). Για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιήθηκε και στην Ελλάδα - σε ερευνητικές εργασίες που αποσκοπούν στη διάκριση των Ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (Αναγνωστόπουλος, 2003, Αβαγιαννέλη, 2005, Σταυρακάκη, 2008, Σταυρακάκη, 2014).

Οι μικροδορυφόροι ή SSR αποτελούνται από μία ειδική αλληλουχία μονομερών βάσεων του DNA. Η επαναλαμβανόμενη αυτή αλληλουχία στους μικροδορυφόρους είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα γονιδιώματα των φυτικών και ζωικών οργανισμών. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, η χρήση των μικροδορυφόρων για τη γενετική διάκριση και

ταυτοποίηση ποικιλιών αμπέλου, κερδίζει συνεχώς έδαφος σε σχέση με άλλες μοριακές μεθόδους ταυτοποίησης και διάκρισης.

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

Η μέθοδος θεωρείται αρκετά αποτελεσματική, παρόλα αυτά υπάρχουν υποστηρικτές όπως επίσης και επιφυλακτικοί. Αρκετοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι με τη μέθοδο των μικροδορυφόρων, μπορούν να διακριθούν και να ταυτοποιηθούν ακόμη και κλώνοι ποικιλιών (Menegheti et al., 2012, 2013, Shinde et al., 2013). Από την άλλη μεριά, αρκετοί είναι αυτοί που εξέφρασαν ορισμένες επιφυλάξεις για την αποτελεσματικότητα ανίχνευσης γενετικής ποικιλομορφίας εντός της καλλιεργούμενης ποικιλίας ή τη διάκριση κλώνων μιας ποικιλίας (Crespan and Millani, 2001, Imazio et al., 2002, Vignani et al., 2002, Ibanez et al., 2003, Alba, V. et al., 2011).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ

Στον παρακάτω πίνακα (1) φαίνονται οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη καθώς και η περιοχή δειγματοληψίας αυτών.

Πίνακας 1 : Ποικιλίες και περιοχή δειγματοληψίας.

Ποικιλίες	Προορισμός χρήσης	Χρώμα φλοιού	Περιοχή δειγματοληψίας
ΑΗΤΟΝΥΧΙ ΚΟΚΚΙΝΟ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΙΑΛ
ΑΗΤΟΝΥΧΙ ΛΕΥΚΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΑΚΟΥΜΙΝΑΤΟ	Οινοποιίας/ Επιτραπέζια	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΒΑΛΑΪΤΗΣ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΙΑΛ
ΒΙΔΙΑΝΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΒΙΛΑΝΑ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΒΕΡΙΚΟ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΓΕΜΗΡΑ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΔΕΡΜΑΤΑΣ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΕΦΤΑΚΟΙΛΟ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΙΑΛ
ΘΡΑΨΑ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΘΡΑΨΑΘΗΡΙ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΚΑΤΣΑΝΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΚΟΜΗΝΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ

ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΚΡΥΣΤΑΛΙ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΛΑΓΟΡΘΙ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΛΑΟΡΚΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΜΑΥΡΟΘΗΡΙΚΟ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΜΟΣΧΑΡΔΙΝΙΑ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΝΥΧΑΤΟ	Επιτραπέζιας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΠΕΤΡΟΥΛΙΑΝΟΣ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΠΛΑΤΑΝΙ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΠΛΥΤΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΠΕΤΕΙΝΟΣ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΡΟΚΑΝΙΑΡΗΣ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΡΩΜΑΪΚΟ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΕΑ ΓΠΑ
ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ	Οινοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	Επιτραπέζιας/ Σταφιδοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΤΑΧΤΑΣ	Επιτραπέζιας/ Σταφιδοποιίας	Λευκό	ΑΣΙΑΛ
ΤΣΑΡΔΑΝΑ	Οινοποιίας	Ερυθρό	ΑΣΙΑΛ

Όπου:

ΑΣΕΑ ΓΠΑ: Αμπελογραφική Συλλογή Εργαστηρίου Αμπελογογίας,

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΣΙΑΛ: Αμπελογραφική Συλλογή Ινστιτούτου Αμπέλου, Λυκόβρυση

Για πολλές από τις ποικιλίες αυτές έχουν πραγματοποιηθεί αμπελογραφικές περιγραφές αλλά και συγκριτικές γενετικές μελέτες. Παρακάτω παρατίθενται κάποιες βασικές πληροφορίες των ποικιλιών που είτε είναι πιο σημαντικές για καλλιεργητικούς λόγους είτε υπάρχουν στην βιβλιογραφία.

Ακουμινάτο: Ερυθρή ποικιλία για οινοποιητική αλλά και επιτραπέζια χρήση. Καλλιεργείται κυρίως στην δυτική Κρήτη. Αποτελεί μέλος της εθνικής λίστας ποικιλιών αλλά όχι της λίστας των συνιστώμενων ή επιτρεπόμενων ποικιλιών καλλιέργειας.

Βαλαΐτης: Παλαιά κόκκινη ποικιλία αγνώστου προελεύσεως. Καλλιεργούταν στην Κρήτη και από εκεί στην νότια Πελοπόννησο.

Βιδιανό: Παλαιά λευκή γηγενής ποικιλία του κρητικού αμπελώνα. Καλλιεργούνταν σε μεγάλες εκτάσεις όμως σήμερα η καλλιέργειά του έχει μειωθεί σε έκταση λίγο περισσότερο από 500 στρέμματα.

Βιλάνα: Λευκή γηγενής ποικιλία του ανατολικού κρητικού αμπελώνα. Σήμερα είναι η πιο ευρέως καλλιεργούμενη ποικιλία στην Κρήτη καταλαμβάνοντας έκταση 650 εκταρίων.

Γεμήρα: Ανατολικής προελεύσεως ερυθρή ποικιλία. Στην Κρήτη χρησιμοποιείται ως ποικιλία οινοποιίας σε αντίθεση με συνώνυμες ποικιλίες της Ανατολής και της Μικράς Ασίας, οι οποίες καλλιεργούνται ως επιτραπέζιες (Şelli et al. 2007). Δεν περιλαμβάνεται στη λίστα των συνιστώμενων ή επιτρεπόμενων ποικιλιών καλλιέργειας στην Ελλάδα.

Δερματάς: Λευκή ποικιλία οινοποιίας, αγνώστου προελεύσεως καλλιεργείται στην Κρήτη αποκλειστικά.

Εφτάκοιλο: Ανατολικής προελεύσεως ερυθρή ποικιλία οινοποιίας. Καλλιεργείται στην Κρήτη και σε άλλες ελληνικές αμπελουργικές περιοχές από τον 15ο ή 16ο αιώνα (Katramis 1880). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ως η γονεϊκή ποικιλία ενός μεγάλου αριθμού ποικιλιών όπως το Μοσχάτο Αλεξανδρείας (Lacombe et al. 2013).

Θράψα: Ερυθρή ποικιλία που καλλιεργείται από πολύ παλιά στις περιοχές της Κρήτης, της νοτίου Πελοποννήσου και των Κυθήρων. Η αμπελογραφική περιγραφή και έπειτα από DNA profiling, η Θράψα συγγενεύει γενετικά με την Μανδηλαριά, της οποίας είναι ο πιο παραγωγικός κλώνος. Σήμερα η καλλιέργειά της επιτρέπεται στην Κρήτη, τις Κυκλάδες και την Πελοπόννησο.

Θραψαθήρι: Πολύ παλαιά λευκή ποικιλία του κρητικού αμπελώνα, η οποία χρησιμοποιείται για οινοποιητικούς σκοπούς. Γενετικές αναλύσεις δείχνουν ότι συγγενεύει

περισσότερο με το Βιδιανό παρά με το Αθήρι (Biniari and Stavrakakis 2007). Η καλλιέργειά του συνίσταται για την Κρήτη και επιτρέπεται για τις Κυκλάδες και για το νομό Λακωνίας.

Κατσανό: Λευκή κρητική ποικιλία οиноποιίας. Γενετικά συγγενεύει με το Πλυτό και το Πλατάνι και επίσης θεωρείται κλώνος της ποικιλίας Πλατάνι (Biniari and Stavrakakis 2007). Σήμερα καλλιεργείται στις Κυκλάδες και πιο συγκεκριμένα στην Πάρο.

Κοτσιφάλι: Ερυθρή ποικιλία οиноποιίας, ίσως η σημαντικότερη γηγενής του κρητικού αμπελώνα. Καλλιεργούνταν κυρίως στην κεντρο-ανατολική Κρήτη και πλέον καταλαμβάνει περίπου 15000 στρέμματα του νησιού. Είναι επιτρεπόμενη ποικιλία καλλιέργειας για την Κρήτη καθώς και για τις Κυκλάδες και Ικαρία.

Λαγόρθι: Σπάνια γηγενής λευκή ποικιλία της Κρήτης. Τα κύρια αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας αυτής είναι παρόμοια με αυτά του Βιδιανού και της Βιλάνας. Καλλιεργείται στην Κρήτη, την Πελοπόννησο και τα νησιά του Ιονίου όπου και συνίσταται η καλλιέργειά του.

Μπεγλέρι: Λευκή ποικιλία οиноποιίας. Καταγωγή από Συρία ή Περσία. Μετά καλλιεργείται στην Κρήτη και έπειτα Ικαρία, Σάμος και Κυκλάδες. Αμπελογραφικά μοιάζει με Θραψαθήρι, κάτι το οποίο έχει επιβεβαιωθεί και με SSR μέθοδο (Vouillamoz et al. 2006). Ανήκει στις επιτρεπόμενες ποικιλίες καλλιέργειας στην Σάμο, Ικαρία, Χίο και Λέσβο.

Πλατάνι: Γηγενής λευκή ποικιλία της Κρήτης, στενά συνδεδεμένη με τις ποικιλίες Πλυτό και Κατσανό (Biniari and Stavrakakis 2007). Καλλιεργείται κυρίως στην Κρήτη, την Σαντορίνη και έπειτα στην Πάρο. Πρόσφατες γενετικές μελέτες υποθέτουν μια σχέση με το Ασύρτικο (Myles et al. 2011).

Πλυτό: Λευκή ποικιλία του κρητικού αμπελώνα που καλλιεργείται από πολύ παλιά. Σήμερα η καλλιέργειά του συνίσταται για τις αμπελοκομικές περιοχές της Κρήτης και επιτρέπεται για τις Κυκλάδες.

Ρωμαίικο: Ερυθρή ποικιλία αγνώστου προελεύσεως. Καταλαμβάνει περίπου 15000 στρέμματα του αμπελώνα του νομού Ρεθύμνου. Κάποια αμπελογραφικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας αλλά και κάποιες γενετικές μελέτες δείχνουν ότι το ρωμαίικο είναι γενετικά συγγενικό με την ποικιλία Τσαρδάνα (Anagnostopoulos et al. 2005). Σήμερα η καλλιέργειά της επιτρέπεται αποκλειστικά στην περιοχή της Κρήτης.

Σαββατιανό: Λευκή ελληνική ποικιλία οиноποιίας. Καλλιεργείται κυρίως στην Αττική αλλά και στην υπόλοιπη Ελλάδα καταλαμβάνοντας περίπου 160.000 στρέμματα. Η καλλιέργειά της συνίσταται για το αμπελουργικό διαμέρισμα της Στερεάς Ελλάδας και των

νομών Αργολίδας, Κορινθίας και Μαγνησίας και επιτρέπεται στις περισσότερες αμπελουργικές περιοχές της χώρας.

Σουλτανίνα: Πολύ παλαιά λευκή ποικιλία με προέλευση από την Ανατολή. Στην Ελλάδα πρωτοκαλλιεργήθηκε στην περιοχή του Ναυπλίου το 1838. Η κύρια χρήση της είναι η παραγωγή σταφίδων. Σήμερα καλλιεργείται κυρίως στην Κρήτη και στη βορειοανατολική Πελοπόννησο (170.000 στρέμματα). Συνίσταται ως επιτραπέζια ποικιλία για τα αμπελουργικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου, της Στερεάς Ελλάδας, του Βορείου Αιγαίου, των Κυκλάδων, των Δωδεκανήσων, της Κρήτης και των Ιόνιων νήσων. Τέλος, συνίσταται ως ποικιλία σταφιδοποιίας για τους νομούς Αργολίδας, Δωδεκανήσου, Ηλείας, Ηρακλείου, Κορινθίας, Λασιθίου, Ρεθύμνης και Χανίων.

Ταχτάς: Λευκή γηγενής κρητικής ποικιλία. Χρησιμοποιείται ως επιτραπέζια ή ποικιλία σταφιδοποιίας.

Τσαρδάνια: Πολύ παλαιά ερυθρή ποικιλία με προέλευση από τη δύση (Σαρδηνία, Ιταλία). Σήμερα καλλιεργείται αποκλειστικά στη δυτική Κρήτη μαζί με το Ρωμαίικο, με το οποίο και συγγενεύουν γενετικά (Anagnostopoulos et al. 2005). Σήμερα η καλλιέργειά της επιτρέπεται αποκλειστικά στην περιοχή της Κρήτης.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για την απομόνωση του DNA, λήφθηκε υπόψη το πρωτόκολλο του Thomas et al. (1993), ύστερα από κάποιες τροποποιήσεις (Μπινιάρη, 2000).

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε 1g φύλλων νεαρής κορυφής από κάθε πρέμνο, το οποίο μετά από λειοτρίβηση με υγρό άζωτο, ομογενοποιήθηκε σε 12,5mL ρυθμιστικού διαλύματος (A) [0,25M NaCl, 50mM EDTA, 0,2M TRIS-Cl (pH : 8), 0,1% v/v 2-mercaptoethanol, 2,5% w/v polyvinyl-pyrrolidone (MW 40000)] (Thomas et al. 1993). Μετά τη φυγοκέντρωση στις 8000rpm για 10' στους 4°C, δημιουργήθηκε ένα νουκλεϊνικό ίζημα το οποίο επαναδιαλύθηκε σε 2,5mL ρυθμιστικού διαλύματος (B) [0,5M NaCl, 0,2M TRIS-Cl (pH : 8), 50mM EDTA, 1% v/v 2-mercaptoethanol, 2,5% w/v polyvinyl-pyrrolidone (MW 40000), 3% sarcosyl, 20% ethanol].

Το μείγμα επώαστηκε στους 37°C για 45' με συνεχή ανάδευση. Έπειτα, προστέθηκε ίσος όγκος (2,5mL) διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και αναμείχθηκε με ανάδευση. Οι φάσεις διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και παραλήφθηκε η υπερκείμενη υδάτινη φάση, η οποία αναμείχθηκε με 2mL isopropanol (-20°C) για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA σε αυτές τις συνθήκες δημιουργεί σύμπλοκα που καθιζάνουν και έτσι απομονώνεται με γυάλινη ράβδο.

Ακολούθως, διαλύθηκε σε 300μL ddH₂O και προστέθηκε 1,5μL RNase A (ελεύθερη από DNase I) συγκέντρωσης 10mg/mL και επώαστηκε στους 37°C για 20'. Έπειτα, προστέθηκαν 150μL οξικού αμμωνίου (7,5M), έγινε διαχωρισμός με φυγοκέντρωση στις 14000rpm για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και η υπερκείμενη υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα όπου και προστέθηκαν 250μL isopropanol (-20°C). Τέλος, το μείγμα αναδεύτηκε με αργό ρυθμό και το DNA που εμφανίστηκε απομακρύνθηκε με γυάλινη ράβδο για να επαναδιαλυθεί σε 200μL ddH₂O.

3. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο NanoDrop (NanoDrop Technology), μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA που απομονώθηκε. Συγκεκριμένα, 1μl δείγματος DNA τοποθετήθηκε στην ειδική υποδοχή του μηχανήματος, το οποίο σε μήκος κύματος 260nm και 280nm υπολόγισε την συγκέντρωση και ταυτόχρονα την καθαρότητα του δείγματος. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm εκφράζει την καθαρότητα του DNA. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, η καθαρότητα του DNA των δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 1,2 και 1,9, ενώ η συγκέντρωση του κατά μέσο όρο στα 150 ng/μl.

Στόχος ήταν, οι τελικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων να κυμαίνονται στα 30ng/μl DNA. Έτσι, ακολουθήθηκαν αραιώσεις με dH₂O βασιζόμενες στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 : Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA.

Ποικιλίες	C ng/μl	260nm/280nm
ΑΗΤΟΝΥΧΙ ΚΟΚΚΙΝΟ	100,9	1,898
ΑΗΤΟΝΥΧΙ ΛΕΥΚΟ	525,35	1,828
ΑΚΟΥΜΙΝΑΤΟ	57,9	1,816
ΒΑΛΑΪΤΗΣ	136,5	1,719
ΒΙΔΙΑΝΟ	261,15	1,74
ΒΙΛΑΝΑ	137,3	1,784
ΒΕΡΙΚΟ	150,35	1,859
ΓΕΜΗΡΑ	149,95	1,841
ΔΕΡΜΑΤΑΣ	316,4	1,828
ΕΦΤΑΚΟΙΛΟ	44,35	1,745
ΘΡΑΨΑ	125,5	1,843

Ποικιλίες	C ng/μl	260nm/280nm
ΘΡΑΨΑΘΗΡΙ	147,05	1,894
ΚΑΤΣΑΝΟ	228	1,635
ΚΟΜΗΝΟ	192,2	1,822
ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	429,75	1,851
ΚΡΥΣΤΑΛΙ	554,9	1,9
ΛΑΓΟΡΘΙ	169,4	1,78
ΛΑΟΡΚΟ	256,25	1,467
ΜΑΥΡΟΘΗΡΙΚΟ	182,05	1,742
ΜΟΣΧΑΡΔΙΝΙΑ	75,1	1,802
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	395,55	1,547
ΝΥΧΑΤΟ	71,5	1,945
ΠΕΤΡΟΥΛΙΑΝΟΣ	165,2	1,862
ΠΛΑΤΑΝΙ	218	1,731
ΠΛΥΤΟ	74,65	1,9
ΠΕΤΕΙΝΟΣ	62,15	1,882
ΡΟΚΑΝΙΑΡΗΣ	83,2	1,778
ΡΩΜΑΪΚΟ	79,15	1,832
ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ	95,75	1,8
ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	423,55	1,816
ΤΑΧΤΑΣ	403,55	1,868
ΤΣΑΡΔΑΝΑ	167,6	1,468

4. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA σε όλες τις ποικιλίες ήταν ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία προήλθαν από την Operon Technologies Inc. Europe, MGW - Biotech AG. Οι εκκινητές καθώς και η αλληλουχία του καθένα, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 3.

Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, η αλληλουχία των βάσεων και η θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε εκκινητή.

Εκκινητής (primer)	Αλληλουχία (5'→ 3')	Θερμοκρασία υβριδισμού
VVS2 - GEO1 (F)	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	54
VVS2 - GEO1 (R)	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	54
VVS4 - GEO2 (F)	CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC	56
VVS4 - GEO2 (R)	CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	56
ssrVrZAG62 - GEO4 (F)	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	50
ssrVrZAG62 - GEO4 (R)	CCATGTCTCTCCTCAGCTCAGC	50
VVMD7 - GEO6 (F)	AGAGTTGCGGAGAACAGGT	52
VVMD7 - GEO6 (R)	CGAACCTTCACACGCTTGAT	52
VVMD36 - GEO8 (F)	TAAAATAATAATAGGGGGACACGGG	56
VVMD36 - GEO8 (R)	GCAACTGTAAAGGTAAGACACAGTCC	56
VVMD25 - GEO12 (F)	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG	56
VVMD25 - GEO12 (R)	TTGGATTTGAAATTTGAGGG	56

5. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ (PCR)

Η προετοιμασία της αντίδρασης λάμβανε χώρα στους 4°C και τελικός όγκος ήταν τα 25μl. Σε σωλήνα eppendorf προετοιμαζόταν το βασικό μείγμα το οποίο περιείχε δις-απιονισμένο και αποσταγμένο νερό, το ρυθμιστικό διάλυμα Qiagen PCR buffer 1x [50μM KCl, 10μM TRIS-HCl (pH: 8,7 στους 20°C), 15μM MgCl₂ και (NH₄)₂SO₄], 200μM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 50ng εκκινητή (Forward και Reverse) και 1unit Taq DNA πολυμεράση (Qiagen).

Το μείγμα αναμειχθηκε, φυγοκεντρήθηκε (14000rpm για 1' σε θερμοκρασία δωματίου) και μοιράστηκε σε μικρότερα eppendorfs για τον θερμικό εναλλάκτη. Στο κάθε eppendorf προστέθηκαν 60ng DNA της ποικιλίας, αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε (14000rpm για 1' σε θερμοκρασία δωματίου). Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον θερμικό εναλλάκτη (PCR).

Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε κυκλικός εναλλάκτης θερμότητας (Perkin Elmer, DNA Thermal Cycler 9600) και οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν:

- 1 κύκλος για 5 λεπτά στους 94°C,
- 30 κύκλοι από 1 λεπτό στους 94°C, 1 λεπτό στη θερμοκρασία στην οποία υβριδίζει η κάθε φάση ζεύγους του εκκινητή και 1,5 λεπτά στους 72°C,
- 1 κύκλος για 30 λεπτά στους 72°C.

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

Όταν η ενίσχυση λάμβανε τέλος, τα δείγματα αποθηκευόταν στο ψυγείο.

6. ΑΝΑΛΥΤΗΣ

Ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων και ταυτόχρονα ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενισχυμένων τμημάτων έγινε με τη βοήθεια του αυτόματου αναλυτή γονιδιώματος (Genetic Analyzer ABI PRISMTM 310) με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Capillari electrophoresis) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Genemapper v4.0. Συγκεκριμένα, η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε : 1μL των προϊόντων της αλυσιδωτής πολυμεράσης (τα οποία είχαν αραιωθεί με dH₂O με αναλογία 1:10), 0,2μL Gene-Scan 500-Liz Size Standard (Applied Biosystems) και 12,5μL φορμαμίδιου (απαραίτητο για την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA). Έπειτα, ακολουθούσε εισαγωγή των δειγμάτων στον κυκλικό εναλλάκτη θερμότητας (Perkin Elmer, DNA Thermal Cycler 9600) για 5 λεπτά στους 94°C, έτσι ώστε το φορμαμίδιο να διατηρήσει την αποδιάταξη στη διπλή έλικα του DNA. Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετούνταν στον πάγο (ώστε να διατηρηθεί η αποδιάταξη της διπλής έλικας) και διατηρούνταν εκεί μέχρι την τοποθέτησή τους στον αυτόματο αναλυτή.

Η ηλεκτροφόρηση για τη μέθοδο SSR έγινε στον αυτόματο αναλυτή γονιδιώματος (Genetic Analyzer ABI PRISMTM 310) με τη χρήση πολυμερούς POP-4 (Applied Biosystems). Τα προϊόντα από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης περιείχαν μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία αρχικά διαχωριζόταν στο πολυμερές και στη συνέχεια περνούσε από μια δέσμη λέιζερ. Στη συνέχεια, ένα σύστημα πρισμάτων ανέλυε την ακτινοβολία - η οποία ανιχνευόταν από μία CCD κάμερα - τόσο ως προς την ένταση (ποσότητα) όσο και ως προς τον χρωματισμό (ποιότητα). Έπειτα το σήμα απεικονιζόταν σε ηλεκτροφόρημα (διάγραμμα). Τέλος, με τη βοήθεια του λογισμικού GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) γινόταν η συλλογή των δεδομένων, η ανάλυσή τους, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενισχυμένων προϊόντων και τελικά η δημιουργία εξαγωγίμου αρχείου σε μορφή excel.

7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους ποικιλιών βρέθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος NT-SYSTEM-pc v2.02i και με βάση τη μέθοδο UPGMA (μέθοδος μη σταθμισμένων ομάδων ανά δύο, χρησιμοποιώντας αριθμητικό μέσο), όπως αναπτύχθηκε από τον Rohlf (Exeter Software New York, 1993, USA), αλλά και μία πιο πρόσφατη έκδοση του προγράμματος (NTSYS-PC v2.11f, Rohlf, 2000). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και μια άλλη μέθοδος, η NJ (Neighbor-Joining, Method) η οποία αναπτύχθηκε από τους Saitou and Nei (1987) και κατατάσσει τα δείγματα σε ομάδες και γειτονιές.

Για τον υπολογισμό του βαθμού γενετικής ανομοιότητας εφαρμόστηκε ο συντελεστής Dist. Ο συντελεστής Dist (Average Taxonomic Distance) κάθε δυνατού ζεύγους ποικιλιών που μελετήθηκαν υπολογίστηκε με τον τύπο :

$$E_{ij} = \sqrt{\sum_k \frac{1}{n} (x_{ki} - x_{kj})^2}$$

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του συντελεστή για τα δύο άτομα, τόσο μεγαλύτερη γενετική απόσταση έχουν.

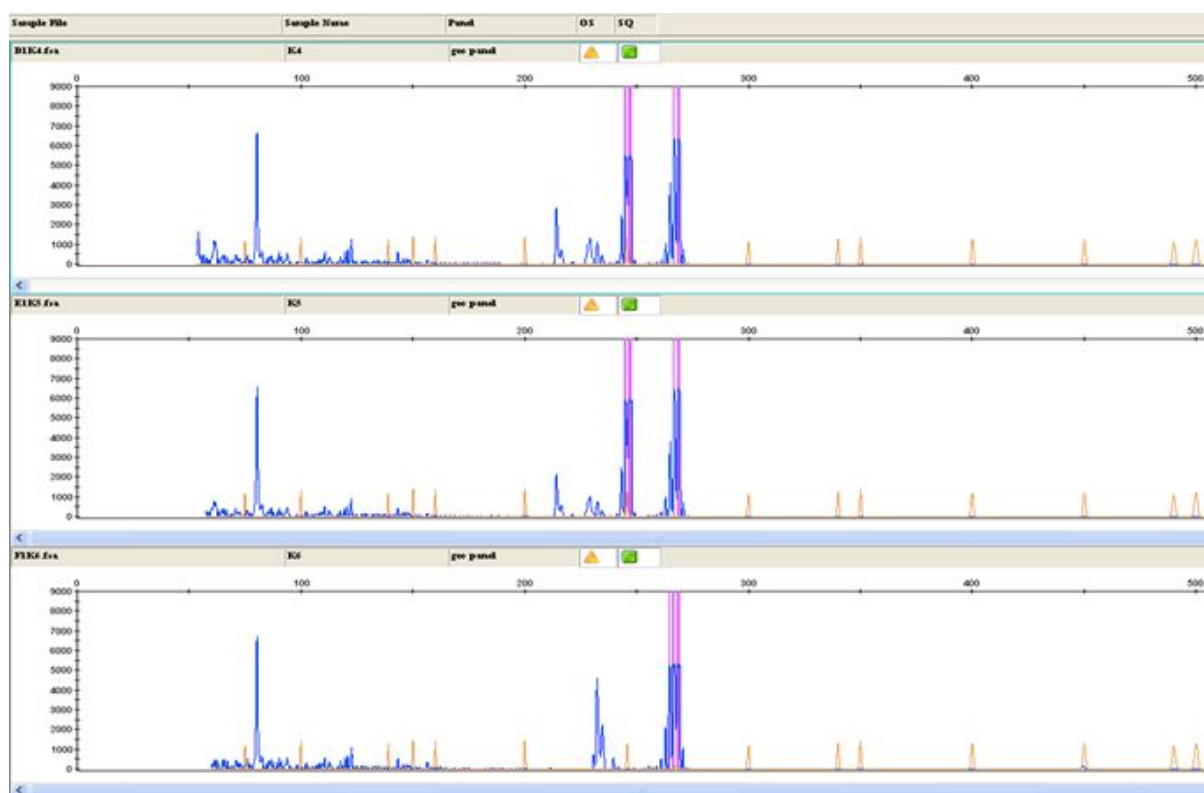
Βάσει αυτών των δεδομένων σχηματίστηκαν στη συνέχεια τα δένδρογράμματα, τα οποία και απεικονίζουν τη συγγένεια των υπό μελέτη ποικιλιών. Για τον υπολογισμό των πινάκων όπου απεικονίζεται ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα λογιστικών φύλλων (Excel).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και μέγεθος αλληλομόρφων.

DNA από τις 32 ποικιλίες μελετήθηκε σε 6 μικροδορυφορικούς τόπους.

Από την επεξεργασία και ανάλυση των ηλεκτροφορημάτων (που έλαβαν χώρα στον αυτόματο αναλυτή του γονιδιώματος) με το λογισμικό GeneMapper v4.0 προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα ενισχυμένα προϊόντα (Εικόνα 1), δηλαδή το μέγεθος των αλληλομόρφων (μήκος) που σχημάτισε ο κάθε εκκινητής (Πίνακας 4).



Εικόνα 1. Ηλεκτροφορήματα των ενισχυμένων προϊόντων του εκκινητή VVS2 στον γενετικό αναλυτή.

Πίνακας 4: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και μέγεθος (μήκος) αλληλομόρφων (bp).

	VVS2		VVS4		ssrVrZAG62		VVMD7		VVMD36		VVMD25	
ΠΛΥΤΟ	141	147	167	167	186	186	242	256	265	269	255	263
ΘΡΑΨΑ	141	141	167	175	194	200	242	252	263	265	241	255
ΠΕΤΕΙΝΟΣ	129	147	169	175	186	202	246	252	245	269	245	255
ΠΕΤΡΟΥΛΙΑΝΟΣ	131	141	175	175	184	186	242	250	257	285	241	255
ΑΚΟΥΜΙΝΑΤΟ	135	147	167	175	186	192	242	242	255	263	239	249
ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ	137	141	175	175	194	200	248	252	251	275	241	249
ΡΩΜΑΙΙΚΟ	129	141	167	175	186	194	241	241	255	269	239	239
ΑΗΤΟΝΥΧΙ_ΚΟΚΚ	147	147	175	175	188	188	246	252	269	269	245	249
ΝΥΧΑΤΟ	141	141	175	175	188	188	242	256	251	267	239	249
ΓΕΜΗΡΑ	139	141	175	175	186	198	242	252	265	285	241	249
ΜΑΥΡΟΘΗΡΙΚΟ	129	139	175	175	184	198	242	254	253	285	239	241
ΚΟΜΗΝΟ	139	145	167	175	186	186	242	242	269	276	245	245
ΒΑΛΑΪΤΗΣ	131	131	167	175	186	192	252	252	251	255	239	255
ΤΣΑΡΔΑΝΑ	129	141	167	175	186	194	242	242	255	269	239	239
ΚΡΥΣΤΑΛΛΙ	131	139	169	175	186	186	246	252	265	269	245	255
ΒΙΔΙΑΝΟ	141	141	167	175	186	198	242	252	263	263	241	241
ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	141	147	175	175	186	186	242	256	251	267	239	249
ΤΑΧΤΑΣ	127	139	175	175	188	188	250	250	277	285	255	255
ΑΗΤΟΝΥΧΙ_ΛΕΥΚ	129	139	175	175	186	202	252	256	259	265	239	255
ΔΕΡΜΑΤΑΣ	129	139	167	167	198	200	252	254	245	269	249	253
ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	139	141	169	175	186	192	242	250	265	275	241	255
ΒΕΡΙΚΟ	141	147	167	167	190	202	242	254	263	275	239	249
ΒΙΛΑΝΑ	139	141	167	167	186	186	242	242	263	285	241	255
ΜΟΣΧΑΡΔΙΝΙΑ	129	129	175	175	184	184	250	252	245	267	241	245
ΡΟΚΑΝΙΑΡΗΣ	139	139	175	175	184	198	242	246	251	277	239	255
ΘΡΑΨΑΘΗΡΙ	141	141	167	175	186	198	242	252	265	265	241	241
ΚΑΤΣΑΝΟ	131	141	167	175	186	186	246	246	255	263	241	241
ΛΑΓΟΡΘΙ	138	141	167	175	186	194	242	250	269	269	239	245
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	129	139	167	167	186	198	241	250	269	289	239	241
ΕΦΤΑΚΟΙΛΟ	145	151	175	175	186	202	242	254	255	265	245	249
ΛΑΟΡΚΟ	139	141	167	167	186	190	242	256	255	255	241	255
ΠΛΑΤΑΝΙ	131	141	167	175	186	186	246	252	255	265	239	241

Δείκτες (συντελεστές) γενετικής ανομοιότητας των ποικιλιών

Για την επεξεργασία και την ανάλυση των ηλεκτροφορημάτων αλλά και του βαθμού γενετικής ανομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Dist.

Ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας (απόστασης) κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν με βάση το συντελεστή Dist, παρουσιάζεται στον Πίνακα 5, ενώ το παραγόμενο δενδρογράμμα φαίνεται στην Εικόνα 2.

Από τον Πίνακα 5 προκύπτει ότι ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας (I) των ποικιλιών που μελετήθηκαν κυμάνθηκε από 2,22 έως 0,12.

Τα αποτελέσματα από τη χρήση της μοριακής μεθόδου SSR με το συντελεστή Dist, έδειξαν ότι υπάρχει γενετική ετερογένεια μεταξύ των ποικιλιών που μελετήθηκαν. Αναλυτικά:

α) Υψηλός βαθμός γενετικής ομοιότητας (χαμηλός βαθμός γενετικής ανομοιότητας/απόστασης) έως και ταυτότητα διαπιστώθηκε μεταξύ των βιοτύπων των ποικιλιών Τσαρδάνα και Ρωμαίικο καθώς και των ζευγών των ποικιλιών Βιδιανό και Θραψαθήρι, τουλάχιστον για τους εκκινητές που μελετήθηκαν. Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ Τσαρδάνα και Ρωμαίικο, επιβεβαιώνει την συγγένεια των ποικιλιών αυτών που καλλιεργούνται αποκλειστικά στην Κρήτη. Όσον αφορά τις ποικιλίες Βιδιανό και Θραψαθήρι, ο υψηλός δείκτης δείχνει ότι οι ποικιλίες αυτές είναι συγγενείς αλλά χρειάζεται λεπτομερής αμπελογραφική περιγραφή των βιοτύπων εξαιτίας και της σύγχυσης που επικρατεί ως προς την ταυτότητα των ποικιλιών αυτών (Stavrakaki and Stavrakakis, 2017). Τέλος, ο επίσης υψηλός βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ των ποικιλιών Πλατάني και Κατσανό επιβεβαιώνει την συγγένεια των ποικιλιών αυτών όπως προσδιορίζεται με την χρήση της αμπελογραφικής περιγραφής (Stavrakaki and Stavrakakis, 2017).

β) Στον ίδιο κλάδο του δενδρογράμματος κατατάσσονται οι ανατολικής προέλευσης ποικιλίες επιτραπέζιας χρήσης (Σουλτανίνα, Νυχάτο, Εφτάκοιλο, Αητονύχι κόκκινο). Σχετικά υψηλότερος ο βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ των ποικιλιών Σουλτανίνα και Νυχάτο που υπαινίσσεται την πιθανή τους προέλευση από τα Χρυσοστάφυλα που αναφέρονται τον 11ο αιώνα (Stavrakaki and Stavrakakis, 2017).

γ) Ο σχετικά χαμηλός βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ των βιοτύπων της ποικιλίας Πλυτό και των ποικιλιών Κατσινό και Πλατάνι, επιβάλλει την περαιτέρω διερεύνηση τους με την χρήση της αμπελογραφικής περιγραφής και των μοριακών μεθόδων.

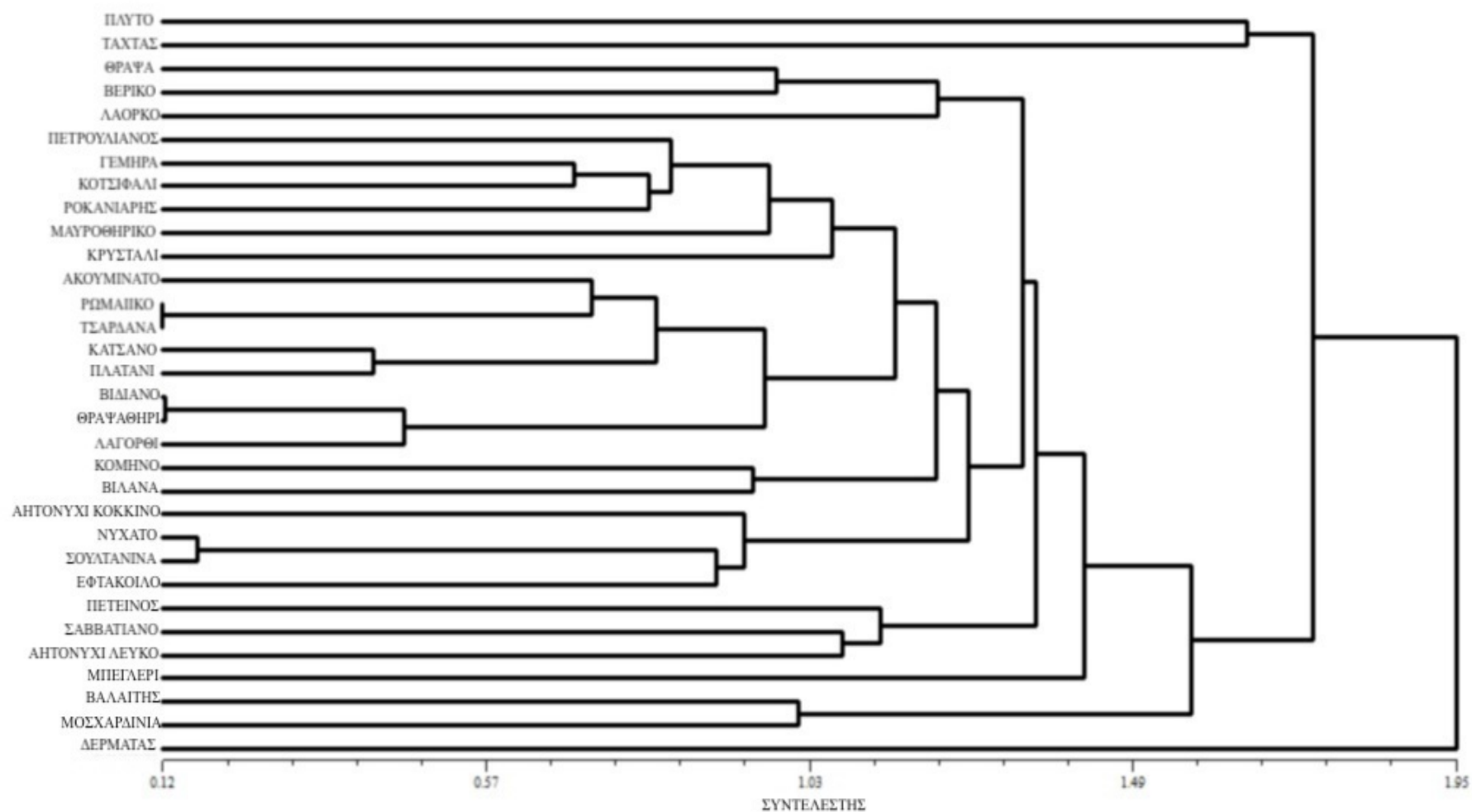
δ) Οι ποικιλίες Ταχτάς και Δερματάς, γηγενείς του κρητικού αμπελώνα όπου καλλιεργούνται από πολύ παλιά, κατατάσσονται σε ξεχωριστό κλάδο του δένδρογράμματος, γεγονός που επίσης επιβάλλει την περαιτέρω διερεύνηση τους με την χρήση της αμπελογραφικής περιγραφής και των μοριακών μεθόδων.

ε) Ο σχετικά χαμηλός βαθμός γενετικής ομοιότητας μεταξύ των ποικιλιών Λαγόρθη και Λάορκο, που κατά πολλούς θεωρούνται συνώνυμα, φαίνεται να μην επιβεβαιώνει τη θεωρία αυτή και ότι μάλλον πρόκειται για διαφορετικές ποικιλίες.

Πίνακας 5: Βαθμός γενετικής ανομοιότητας των ποικιλιών που μελετήθηκαν με τη μέθοδο SSR με βάση τον συντελεστή.

	ΠΛΥΤΟ	ΘΡΑΨΑ	ΠΕΤΕΙΝΟΣ	ΠΕΤΡΟΥΛΙΑΝΟΣ	ΑΚΟΥΜΙΝΑΤΟ	ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ	ΡΩΜΑΙΙΚΟ	ΑΗΤΟΝΥΧΙ_ΚΟΚΚ	ΝΥΧΑΤΟ	ΓΕΜΗΡΑ	ΜΑΥΡΟΘΗΡΙΚΟ	ΚΟΜΗΝΟ	ΒΑΛΑΪΤΗΣ	ΤΣΑΡΔΑΝΑ	ΚΡΥΣΤΑΛΛΙ	ΒΙΔΙΑΝΟ	ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	ΤΑΧΤΑΣ	ΑΗΤΟΝΥΧΙ_ΛΕΥΚ	ΔΕΡΜΑΤΑΣ	ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	ΒΕΡΙΚΟ	ΒΙΛΑΝΑ	ΜΟΣΧΑΡΔΙΝΙΑ	ΡΟΚΑΝΙΑΡΗΣ	ΘΡΑΨΑΘΗΡΙ	ΚΑΤΣΑΝΟ	ΛΑΓΟΡΘΙ	ΜΠΕΓΛΕΡΙ	ΕΦΤΑΚΟΙΛΟ	ΛΑΟΡΚΟ	ΠΛΑΤΑΝΙ
ΠΛΥΤΟ	0,00																															
ΘΡΑΨΑ	1,24	0,00																														
ΠΕΤΕΙΝΟΣ	1,29	1,30	0,00																													
ΠΕΤΡΟΥΛΙΑΝΟΣ	1,36	1,57	1,35	0,00																												
ΑΚΟΥΜΙΝΑΤΟ	1,31	1,25	1,13	1,28	0,00																											
ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ	1,53	1,05	1,15	1,36	1,41	0,00																										
ΡΩΜΑΙΙΚΟ	1,11	0,97	1,39	1,18	0,96	1,31	0,00																									
ΑΗΤΟΝΥΧΙ_ΚΟΚΚ	1,66	1,34	1,54	1,35	1,37	1,34	1,08	0,00																								
ΝΥΧΑΤΟ	1,53	1,30	1,25	1,09	1,13	1,16	1,09	0,95	0,00																							
ΓΕΜΗΡΑ	1,30	1,22	1,35	0,85	1,35	1,08	0,88	1,10	1,10	0,00																						
ΜΑΥΡΟΘΗΡΙΚΟ	1,43	1,64	1,35	0,93	1,46	1,26	1,20	1,66	1,26	0,84	0,00																					
ΚΟΜΗΝΟ	1,41	1,40	1,54	1,23	0,95	1,63	0,93	1,12	1,41	1,21	1,58	0,00																				
ΒΑΛΑΪΤΗΣ	1,54	1,56	1,50	1,71	1,62	1,50	1,50	1,89	1,72	1,82	1,77	1,94	0,00																			
ΤΣΑΡΔΑΝΑ	1,29	1,42	1,34	1,34	0,75	1,45	0,95	1,69	1,45	1,36	1,19	1,09	1,53	0,00																		
ΚΡΥΣΤΑΛΛΙ	1,11	1,21	1,23	0,97	1,20	1,34	0,93	1,18	1,26	1,16	1,38	1,06	1,17	1,25	0,00																	
ΒΙΔΙΑΝΟ	1,22	0,95	1,26	1,44	1,03	1,26	0,50	1,14	1,09	1,05	1,25	1,16	1,48	1,01	1,13	0,00																
ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ	1,54	1,40	1,29	1,06	1,13	1,28	1,11	0,98	0,16	1,14	1,27	1,40	1,73	1,45	1,25	1,12	0,00															
ΤΑΧΤΑΣ	1,84	1,96	1,86	1,48	2,06	1,79	1,80	1,60	2,03	1,55	1,87	1,54	2,06	2,03	1,21	1,98	2,05	0,00														
ΑΗΤΟΝΥΧΙ_ΛΕΥΚ	1,40	1,45	1,16	1,46	1,60	1,07	1,40	1,58	1,46	1,34	1,37	1,90	1,06	1,61	1,20	1,39	1,51	1,74	0,00													
ΔΕΡΜΑΤΑΣ	1,68	1,66	1,57	2,17	2,09	1,41	2,10	2,17	2,10	2,10	2,15	2,20	1,73	2,03	1,78	2,00	2,19	2,05	1,72	0,00												
ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	1,05	0,88	1,19	0,86	0,94	1,19	0,54	1,03	0,99	0,72	1,17	0,91	1,47	1,12	0,76	0,83	1,00	1,62	1,34	1,99	0,00											
ΒΕΡΙΚΟ	0,96	1,01	1,35	1,58	1,35	1,27	1,09	1,38	1,30	1,14	1,50	1,44	1,95	1,48	1,50	1,08	1,36	2,12	1,61	1,74	1,09	0,00										
ΒΙΛΑΝΑ	1,15	1,53	1,71	1,17	1,28	1,67	1,23	1,52	1,59	1,27	1,61	0,98	1,91	1,35	1,28	1,52	1,57	1,78	1,94	2,06	1,02	1,31	0,00									
ΜΟΣΧΑΡΔΙΝΙΑ	1,84	1,99	1,72	1,40	1,79	1,55	1,66	1,89	1,63	1,70	1,40	1,95	1,04	1,56	1,31	1,68	1,61	1,91	1,35	2,02	1,62	2,21	1,93	0,00								
ΡΟΚΑΝΙΑΡΗΣ	1,36	1,32	1,19	0,87	1,08	1,14	1,10	1,38	1,12	0,81	1,00	1,35	1,58	1,23	1,26	1,18	1,13	1,88	1,31	2,12	0,83	1,40	1,26	1,50	0,00							
ΘΡΑΨΑΘΗΡΙ	1,19	0,93	1,28	1,40	1,03	1,25	0,45	1,15	1,11	0,98	1,21	1,11	1,54	0,99	1,13	0,12	1,14	1,95	1,42	2,01	0,78	1,04	1,46	1,71	1,15	0,00						
ΚΑΤΣΑΝΟ	1,33	1,42	1,28	1,32	0,83	1,41	0,96	1,46	1,27	1,47	1,36	1,08	1,21	0,62	0,96	1,00	1,26	1,87	1,47	1,86	1,10	1,57	1,40	1,26	1,36	1,02	0,00					
ΛΑΓΟΡΘΙ	1,37	1,46	1,41	1,37	0,75	1,51	1,01	1,74	1,49	1,40	1,23	1,11	1,64	0,17	1,34	1,08	1,49	2,10	1,71	2,13	1,16	1,55	1,39	1,63	1,23	1,05	0,74	0,00				
ΜΠΕΓΛΕΡΙ	0,91	1,58	1,72	1,43	1,55	1,67	1,16	1,85	1,77	1,22	1,21	1,40	1,96	1,20	1,46	1,34	1,78	1,93	1,79	2,01	1,26	1,13	1,14	1,96	1,51	1,26	1,45	1,27	0,00			
ΕΦΤΑΚΟΙΛΟ	1,56	1,25	1,10	1,49	1,27	1,24	1,24	1,01	0,92	1,11	1,46	1,47	1,99	1,62	1,52	1,02	0,97	2,05	1,52	2,10	1,16	1,16	1,78	2,07	1,17	1,04	1,61	1,64	1,84	0,00		
ΛΑΟΡΚΟ	0,92	1,28	1,43	1,61	1,36	1,64	1,27	1,55	1,29	1,63	1,77	1,61	1,42	1,54	1,26	1,20	1,28	2,22	1,60	1,76	1,22	1,19	1,44	1,78	1,52	1,24	1,32	1,62	1,56	1,47	0,00	
ΠΛΑΤΑΝΙ	1,30	1,35	1,26	1,26	1,00	1,33	0,87	1,40	1,10	1,37	1,23	1,25	1,15	0,82	0,91	0,91	1,10	1,90	1,33	1,87	1,04	1,48	1,52	1,20	1,38	0,94	0,41	0,94	1,43	1,55	1,26	0,00

Εικόνα 2: Δενδρόγραμμα των ποικιλιών που μελετήθηκαν με βάση τον συντελεστή Dist.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την παρούσα εργασία, μπορούμε να καταλήξουμε πως η χρήση της μοριακής μεθόδου SSR είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών της αμπέλου, λόγω της ακρίβειας της μεθόδου, αλλά και του πολύ μεγάλου πολυμορφισμού που έδωσαν οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Ταυτόχρονα, πέρα από τις δυσχέρειες που παρουσιάζει το φυτικό υλικό της αμπέλου (νεαρά φύλλα κορυφής) ως προς τον τρόπο απομόνωσης του DNA αλλά και της καθαρότητάς του, η χρήση ενός μεγάλου αριθμού εκκινητών καθώς και η βελτιστοποίηση των συνθηκών ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA και της ηλεκτροφόρησης των ενισχυμένων προϊόντων, έδωσε ευκρινείς και σταθερούς ηλεκτροφορητικούς φαινοτύπους με αποτέλεσμα να είναι ευχερής η διάκριση μεταξύ των ποικιλιών.

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση με τις συμβατικές μεθόδους είναι αρκετές φορές δύσκολη, αφού οι μορφολογικοί δείκτες είναι χρονοβόροι και ευάλωτοι στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι παρατηρείται αύξηση στη χρήση μοριακών μεθόδων για τη διάκριση των ποικιλιών. Ωστόσο, η αμπελογραφική μέθοδος δεν θα έπρεπε να παραγκωνισθεί από τις μοριακές μεθόδους, αλλά αντιθέτως θα πρέπει να συνδυαστεί με αυτές, ώστε οι ερευνητές να οδηγηθούν σε ασφαλή συμπεράσματα, καθώς καμία μέθοδος δεν έχει μόνο πλεονεκτήματα υπερέχοντας των άλλων. Τα συμπεράσματα αυτά και η ταυτοποίηση των ποικιλιών της αμπέλου ανά τον κόσμο αλλά και η διάκρισή τους, εκτός από ερευνητικό ενδιαφέρον μπορούν να έχουν εφαρμογή σε προγράμματα κλωνικής επιλογής για την ανάδειξη των πολυτιμότερων κλώνων, αλλά και άμεση εφαρμογή στην αμπελοκομική πράξη, αφού αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα επιτυχίας της αμπελοκαλλιέργειας με την έννοια της εγκατάστασης παραγωγικών αμπελώνων με ομοιογενές πολλαπλασιαστικό υλικό. Έτσι, οδηγούμαστε στην παραγωγή αμπελοουργικών, και ιδιαίτερα οινικών, προϊόντων υψηλής σταθερότητας και ποιότητας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Agarwal M., Shrivastava N. and Padh H., 2008, Advances in molecular techniques and their applications in plant sciences, Plant Cell Rep, 27: 617 – 631.

Alba, V., Anaclerio A., Gasparro M., Caputo A.R., Montemurro C., Blanco A. and Antonacci D., 2011, Ampelographic and molecular characterization of Aglianico Accessions (*Vitis vinifera* L.) collected in Southern Italy, S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 32, No.2, 164 – 173.

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

Biniari K., Stavrakakis M.N., 2007, Genetic study of 46 Greek grape cultivars by random amplified polymorphic DNA markers (RAPD-PCR), XXXth OIV World Congress of Vine and Wine (Budapest 2007), DOI: 10.1.1.626.3024.

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

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

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

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

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

Ibáñez J., de Andrès M.T., Molino A. and Borrego J., 2003, Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellite analysis, *Am. J. Enol. Vitic.*, 54: 22-30.

Imazio S., Labra M., Grassi F., Winfield M., Bardini M. and Scienza A., 2002, Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar ‘Traminer’, *Plant Breeding*, 121: 531 – 535.

Katramis N., 1880, *Filologika Analekta Zakynthou* [Literary Analects of Zakynthos], Zakynthos: “I Avgi” N. Kondogiorgas.

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

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

Labra M., Winfield M., Ghiani A., Grassi F., Sala F., Scienza A., and Failla O., 2001, Genetic studies on Trebbiano and morphologically related varieties by SSR and AFLP markers, *Vitis*, 40 (4):187-190.

Lacombe T., Boursiquot J.M., Laucou V., Di Vecchi-Staraz M., Péros J.P., This P. 2013, Large scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.), *Theor Appl Genet* 126(2): 401 – 414, DOI: 10.1007/s00122-012-1988-2.

Lin H., and Walker M. A., 1998, Identifying grape rootstocks with Simple Sequence Repeat (SSR) DNA markers, *Am. J. Enol. Vitic.*, 49 (4): 403-407.

Loukas M., Stavrakakis M. N. And Krimbas C. B., 1983, Inheritance of polymorphic isoenzymes in grape cultivars, *The Journal of Heredity*, 74:181-183.

Marsal G., Baiges I., Canals J.M., Zamora F. and Fort F., 2011, A fast, efficient method for extracting DNA from leaves, stems and seeds from *Vitis vinifera* L., Am. J. Enol. Vitic., 62:3: 376 – 381.

Meneghetti S., Calò A. and Bavaresco L., 2012, A strategy to investigate the intravarietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. for clones and biotypes identification and to correlate molecular profiles with morphological traits or geographic origins, Mol. Biotechnol., 52: 68 – 81.

Meneghetti S., Bavaresco L., Calò A. and Costacurta A., 2013, Inter- and intra- varietal genetic variability in *Vitis vinifera* L. The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive, Chapter 4, pp.73 – 96. <http://dx.doi.org/10.5772/52847>

Molon G., 1906, Ampelografia, U. Hoepli. Milano.

Myles S., Boyko A.R., Owens C.L., Brown P.J., Grass I.F., Aradhya M.K., Buckler E.S., 2011, Genetic structure and domestication history of the grape, Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(9): 3530 – 3535, DOI: 10.1073/pnas.1009363108.

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

Νταβίδης Ο.Ξ., 1982, Ελληνική Αμπελολογία (Δοκίμιον), Στοιχεία Αμπελογραφίας, τ Γ', Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα.

Şelli F., Bakir M., İnan G., Aygün H., Boz Y., Yasasin S., Özer C., Akman B., Söylemezoglu G., Kazan K., Erguül A. 2007, Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in 'Dimrit' and 'Gemre' grapevine accessions from Turkey, Vitis 46(4): 182–187.

Shinde M.P., Upadhyay A., Aher L.B. and Karibasappa G.S., 2013, Molecular marker analysis to differentiate a clonal selection of Centennial Seedless grapevine, *Afr. J. Biotechnol.*, 12(14): 1594 – 1597.

Stavrakaki M. and Stavrakakis M.N., 2017, *The Cretan Grapes*, Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα.

Σταυρακάκη Μ., 2008, Γενετική μελέτη ποικιλιών οινοποιίας (*Vitis vinifera* L.) με τη χρήση των μοριακών μεθόδων RAPDs και SSR, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθήνα.

Σταυρακάκη Μ., 2014, Μελέτη της κλωνικής σύνθεσης της ποικιλίας Κορινθιακή Σταφίδα και διάκριση ορισμένων ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) με τη χρήση αμπελογραφικών και μοριακών μεθόδων, Διδακτορική διατριβή, Αθήνα.

Thomas M.R. and Scott N.S., 1993, Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs), *Theor. Appl. Genet.*, 86(8): 985 – 990.

Viala P. and Vermorel V., 1909, *Traité Général d’Ampélographie*, Maison éd. Paris, 7 volumes.

Vignani R., Bowers J. E. And Meredith C. P., 1996, Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* “Sangiovese”, *Scientia Horticulturae*, 65: 163-169.

Vignani R., Scali M. and Masi E., 2002, Genomic variability in *Vitis vinifera* L. “Sangiovese” assessed by microsatellite and non-radioactive AFLP test [Online], *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1), 1 – 11. Available at :<http://www.ejborg/content/vol5/issue1/full/2>.

Vouillamoz J.F., McGovern P.E., Ergul A., Söylemezoglu G., Tevzadze G., Meredith C.P., Grando M.S. 2006, Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Transcaucasia and Anatolia, *Plant Genet-C* 4(2): 144 –158, DOI: 10.1079/PGR2006114.

Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία Φυτών, Εκδόσεις Έμβρυο.