ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΜΕΙΣ ΑΙΧΜΗΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

# Γενετική ταυτοποίηση ορισμένων γηγενών ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών δεικτών

**Άννα Δ. Περαντωνάκη**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Μπινιάρη Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αθήνα

2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

# Γενετική ταυτοποίηση ορισμένων γηγενών ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών δεικτών

# "Genetic Identification of some indigenous grapevine varieties using molecular markers"

**Άννα Δ. Περαντωνάκη**

Εξεταστική Επιτροπή:

Μπινιάρη Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Σταυρακάκη Μαριτίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Παπαδάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**Μελέτη ορισμένων γηγενών ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών δεικτών**

*Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής*
*Εργαστήριο Αμπελολογίας*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η ταξινόμηση, διάκριση και ταυτοποίηση ορισμένων γηγενών ποικιλιών αμπέλου. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής μελετήθηκαν δεκαπέντε (15) ποικιλίες αμπέλου. Η συλλογή δειγμάτων έγινε από την περιοχή της Κορίνθου. Τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι νεαρές κορυφές των κυρίων βλαστών των πρέμνων. Η γενετική ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μοριακών δεικτών και συγκεκριμένα με τη μέθοδο των μικροδορυφόρων χρησιμοποιώντας 6 εκκινητές. Στη συνέχεια, για την έκφραση των αποτελεσμάτων ακολούθησε στατιστική ανάλυση μέσω υπολογισμού του συντελεστή γενετικής απόστασης DIST, και τελικά τα συμπεράσματα αποτυπώθηκαν με τη μορφή δενδρογράμματος.

Η συγκεκριμένη μέθοδος ταυτοποίησης επιλέχθηκε σε συνέχεια της προπτυχιακής μου μελέτης 'Αμπελογραφική Μελέτη Μερικών Οινοποιήσιμων Ποικιλιών της Κρήτης'. Καθώς το DNA /αποτελεί χαρακτηριστικό αμετάβλητο και αναλλοίωτο του κάθε είδους, στόχος ήταν η εξαγωγή όσο το δυνατών ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Εξάλλου, η διάκριση και ταξινόμηση των ποικιλιών της αμπέλου χρησιμοποιώντας τόσο την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους όσο και με τη χρήση μοριακών μεθόδων φαντάζει ιδανική.

**Επιστημονική Περιοχή:** Διαχωρισμός ποικιλιών αμπέλου

**Λέξεις κλειδιά:** ταξινόμηση, διάκριση, ταυτοποίηση, ποικιλίες αμπέλου, μικροδορυφόροι, εκκινητές, DNA, δενδρόγραμμα, μοριακές μέθοδοι

**Genetic Identification of some indigenous grapevine varieties using molecular markers**

*Department of Crop Science*
*Laboratory of Viticulture*

## ABSTRACT

The aim of the present study was the classification, discrimination and identification of some grapevine varieties cultivated in Greece. Fifteen (15) grapevine varieties were studied, and samples were collected from the area of Corinthia. The parts of the plants needed for the study were the young leaves from the main shoots of the vines. The genetic identification of these varieties was carried out by the method of microsatellite DNA with the use of 6 primers. For the statistical analysis of the results, the coefficient DIST was used and the results were presented in the form of a dendrogram.

The particular method of identification was chosen following my postgraduate study entitled 'Ampelographic study of some indigenous wine grapevine varieties of Crete'. As DNA constitutes an unchanged and unique characteristic among all species, the purpose was to take as more accurate and safe results as possible. Moreover, the classification and identification of grapevine varieties using both ampelographic characters and molecular methods, seems ideal.

**Scientific area:** Separation of grapevine varieties

**Key words:** classification, discrimination, identification, grapevine varieties, microsatellite, primers, DNA, dendrogram, molecular methods

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Τομείς αιχμής και καινοτόμες εφαρμογές στην παραγωγή και συντήρηση οπωροκηπευτικών και ανθοκομικών ειδών» με κατεύθυνση «Αμπελουργία, Δενδροκομία και Ελαιοκομία» στο Εργαστήριο Αμπελολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ολοκληρώνοντας λοιπόν τη συγγραφή της, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Κ. Μπινιάρη, στο Εργαστήριο Αμπελολογίας του Γ.Π.Α για την επίβλεψη και την ορθή καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια της μελέτης αυτής.Η άψογη συνεργασία και αλληλοκατανόηση που απάρτιζε τη σχέση μας καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα στο παρόν αποτέλεσμα.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά όλο το επιστημονικό και ερευνητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Αμπελολογίας, τηνΕπίκουρη Καθηγήτριακα. Μ. Σταυρακάκη οποία με τις γνώσεις της και την αμέριστη βοήθεια της στάθηκε στο πλευρό μου τόσο καιρό, καθώς και την κα. Δ. Μπούζα, Ε.Δ.Ι.Π., και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γ. Δασκαλάκη, για τη γνωσιολογική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κ. Π. Ζαμανίδη, Ερευνητή Α', και στην κα. Θ. Πιτσώλη, υπεύθυνους κατά τη διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης στο Ινστιτούτο Αμπέλου στη Λυκόβρυση, οι οποίοι με μύησαν στην αγάπη για την άμπελο, μέσα από τη δική τους αφοσίωση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε σε όλες τις επιλογές και αποφάσεις μου, και ήταν πάντα δίπλα μου με αγάπη, υπομονή και κατανόηση.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... 3

ABSTRACT ..... 4

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ..... 5

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... 6

1.Εισαγωγή ..... 7

1.1. Συστηματική της αμπέλου ..... 7

1.2. Άμπελος η Οινοφόρος -*Vitisvinifera*L. ..... 8

1.3. Έννοια και Περιεχόμενο της Αμπελογραφίας ..... 9

1.4. Περιορισμοί στα συστήματα ταξινόμησης ..... 10

1.5. Μοριακές Μέθοδοι ..... 11

1.6. Η μέθοδος των μικροδορυφόρων ..... 13

2. Υλικά και Μέθοδοι ..... 14

2.1. Ποικιλίες Αμπέλου ..... 14

2.2. Απομόνωση Γενετικού Υλικού ..... 15

2.3. Υπολογισμός Συγκέντρωσης DNA ..... 16

2.4. Εκκινητές ..... 17

2.5. Συνθήκες Ενίσχυσης της PCR ..... 17

2.6. Ηλεκτροφόρηση ..... 19

2.6. Στατιστική Ανάλυση ..... 21

3. Αποτελέσματα-Σχόλια ..... 22

# 1.Εισαγωγή

## 1.1. Συστηματική της αμπέλου

Όλα τα είδη και οι ποικιλίες της αμπέλου ανήκουν στο γένος *Vitis*, το οποίο εντάσσεται στην Οικογένεια των Αμπελιδών (*Ampelidae, Ampelidaceae, Vitaceae*), η οποία εν συνεχεία κατατάσσεται στο Φύλο των Terebinthales- Rubiales και στην Τάξη των Rhamnales.Σε ό,τι αφορά τον αριθμό των γενών που κατατάσσονται μέσω της συστηματικής στην Οικογένεια των Αμπελιδών, τα πράγματα δεν είναι ξεκάθαρα. Κατά τον Planchon (1887) τα γένη είναι 10,σύμφωνα με τον Suessenguth(1953) είναι 12,ενώ ο Galet (1967,1988) αναγνωρίζει 18.

Ιδιαίτερη σημασία από την οικογένεια των *Vitaceae*έχει το γένος *Vitis* (το οποίο αναφέρθηκε προηγουμένως), που χωρίζεται σε δύο υπο-γένη, το *Euvitis* (με 2n=38 χρωμοσώματα) και το *Muscadinia* (με 2n=40 χρωμοσώματα). Λόγω της διαφοράς του αριθμού των χρωμοσωμάτων καθώς και της αδυναμίας φυσικής διασταύρωσης των ειδών μεταξύ των δύο υπο-γενών, προτάθηκε το υπο-γένος *Muscadinia*να αποτελέσει ξεχωριστό γένος (Small 1903), κάτι που τελικώς δεν έγινε αποδεκτό (Mullinsetal. 1992).Οι απόψεις για τον αριθμό των ειδών του υπο-γένους *Euvitis*διίστανται. Σύμφωνα με τους Alleweldtκαι Possingham(1988) περιλαμβάνει πάνω από 70 είδη τα οποία χωρίζει σε γεωγραφικές ομάδες με πολυπληθέστερη αυτή της Βόρειας Αμερικής, ενώ ο Galet (1967) κάνει λόγο για 62 είδη, τα οποία κατατάσσονται σε 11 σειρές (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Σειρές και είδη (Galet 1988)

| ΣΕΙΡΕΣ | ΕΙΔΗ |
|---|---|
| Candicancae | *V. candicans, V. doaniana, V. longii, V. coriacea, V. Simpsonii, V.Champinii* |
| Labruscae | *V. Labrusca, V. Coignetiae* |
| Caribaeae | *V. caribaea, V.Blancoii, V. lanata* |
| Arizonae | *V. arizonica, V. californica, V. girdiana, V. Treleasei* |
| Cinereae | *V. cinerea, V. Berlandieri, V. Baileyana, V. Bourgeana* |
| Aestivalae | *V. aestivalis, V. bicolor, V. Lincecumii, V. Bourquina, V.gigas, V. rufotomentosa* |
| Cordifoliae | *V. cordifolia, V. ilex, V. Helleri, V. monticola, V. rubra* |
| Flexuosae | *V. flexuosa, V.Thunbergii, V. betulifolia, V.reticulata, V. amurensis, V. Piasekzii, V. Embergeri, V. pentagona, V. chunganensis, V. Chungii, V. piloso-nerva, V.balansaeana, V.Hancockii, V. hexamera, V. pedicellata, V. Retordii, V. Seguinii, V. silvestrii, V. Tsoii, V.bryoniifolia* |
| Spinosae | *V. armata, V. Davidii, V.Romanetii* |

| | |
|---|---|
| Ripariae | *V.riparia, V. Rupestris* |
| Viniferae | *V. vinifera, V. Sylvestris* |

Στο υπο-γένος *Euvitis*, τα άτομα των ειδών αποτελούνται από n=19 ή 2n=38(αριθμός χρωμοσωμάτων). Τα είδη του προορίζονται είτε για την παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων (*V. vinifera, V. labrusca*), είτε για τη συμμετοχή σε προγράμματα βελτίωσης, καθώς οι διασταυρώσεις και οι εμβολιασμοί μεταξύ των ειδών του υπο-γένους είναι απολύτως επιτυχείς. Για το υπο-γένος *Muscadinia*ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι n=20 ή 2n=40. Περιλαμβάνει τρία είδη , *V. rotundifolia, V. munsoniana, και V.Popenoi*, μεταξύ των οποίων οι διασταυρώσεις είναι επιτυχείς. Τα είδη αυτά εμφανίζουν ενδιαφέροντες χαρακτήρες αντοχής στα διάφορα παθογόνα και αν και οι διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών των δύο υπο-γενών είναι ιδιαίτερα δυσχερείς και επιτυγχάνονται μόνο όταν χρησιμοποιείται το υπο-γένος *Muscadinia*ως άρρην γονέας, δίνουν ιδιαίτερα καλούς απογόνους. Για παράδειγμα, διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών V. *Rotundifolia*και *V.vinifera*έδωσαν ενδιαφέροντες απογόνους για την αντιμετώπιση των νηματωδών και της φυλλοξήρας.

Πίνακας 2. Διαχωριστικοί χαρακτήρες μεταξύ των υπογενών*Euvitis*και *Muscadinia (Galet 2000, Aradhyaetal. 2013)*

| **Διαχωριστικοί χαρακτήρες μεταξύ των υπο-γενών *Euvitis* και *Muscadinia*** | |
|---|---|
| ***Euvitis*** | ***Muscadinia*** |
| Αριθμός χρωμοσωμάτων n= 19 | Αριθμός χρωμοσωμάτων n=20 |
| Η κληματίδα φέρει διάφραγμα στους κόμβους | Η κληματίδα στους κόμβους δεν έχει διάφραγμα |
| Η εντεριώνη είναι ασυνεχής και άφθονη | Η εντεριώνη είναι συνεχής και μικρής ποσότητας |
| Ο φλοιός αποκολλάται υπό τη μορφή μακρών λωρίδων | Ο φλοιός αποκολλάται με τη μορφή πλακών |
| Οι βλαστοί φέρουν κατά κανόνα χνοασμό | Οι βλαστοί είναι πάντα λείοι ή σχεδόν λείοι |
| Οι έλικες είναι δισχιδείς ή πολυσχιδείς | Οι έλικες είναι απλές , μη διακλαδιζόμενες |
| Ο χυμός των ραγών χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγκέντρωση σακχάρων, οξέων και άλλων οργανικών ουσιών | Ο χυμός είναι λίγος, με μικρή περιεκτικότητα σακχάρων που τον καθιστά ακατάλληλο για οινοποίηση |
| Τα γίγαρτα είναι απιοειδή με μαλακή, εμφανώς σχηματισμένη χάλαζα | Τα γίγαρτα είναι σκαφοειδή με ωοειδή χάλαζα με πτυχώσεις και αυλακώσεις |

## 1.2. Άμπελος η Οινοφόρος -*Vitisvinifera*L.

Στην παραγωγική αμπελουργία το σημαντικότερο είδος από την οικογένεια των Αμπελιδών αποτελεί η άμπελος η οινοφόρος (ευρωπαϊκή άμπελος, *Vitisvinifera*L.) η οποία περιλαμβάνει πάνω από 9000 καλλιεργήσιμες ποικιλίες. Σε ό,τι αφορά την προέλευση και την εμφάνιση της καλλιεργούμενης αμπέλου, πολλές απόψεις έχουν διατυπωθεί με παλαιότερη αυτή που αποδίδει την προέλευση της στις περιοχές του Καυκάσου και ανατολικότερα ( 6000-5000 π.Χ.). Σύμφωνα με τον DeLattin (1939)

υπάρχουν τρία υποείδη αμπέλου : *Vitisviniferasylvestris* (άμπελος άγρια η οινοφόρος), *Vitisviniferacaucasica* (άμπελος Καυκασιανή η οινοφόρος, από την οποία έχει προέλθει η καλλιεργούμενη μορφή) και *Vitisviniferasativa* (Καλλιεργούμενη άμπελος). Κατά μία άλλη άποψη τα είδη του γένους *Vitis* ανήκουν σε τρία γενετικά κέντρα: της Νότιας Ευρώπης και της Μικράς Ασίας, της Ανατολικής Ασίας, και της Βόρειας και Κεντρικής Αμερικής, με το είδος *Vitisvinifera*L.να τοποθετείται στην ευρύτερη περιοχή της Μ.Ασίας(Vavilov1926). Τέλος ο Negrul (1946,m1957) κατατάσσει τις ποικιλίες της οινοφόρου αμπέλου σε οικολογικό-γεωγραφικές ομάδες (φυλές) και υπο-ομάδες εκ των οποίων σημαντικότερες είναι η Πόντια φυλή (*Prolespontica*), η Δυτική (*Prolesoccidentalis*), και η Ανατολική (*Prolesorientalis*). Η πρώτη φυλή χωρίζεται σε δύο υπο-ομάδες την *georgica* και την *balkanica,*στην οποία φαίνεται ότι περιλαμβάνονται και όλες οι ελληνικές ποικιλίες. Η Δυτική φυλή φαίνεται ότι περιέχει τις οινοποιήσιμες ποικιλίες της Ευρώπης (Σταυρακάκης 2010), ενώ η Ανατολική χωρίζεται και αυτή σε δύο υπο-ομάδες: την *caspica* και την *antasiatica*, με τη δεύτερη να περιλαμβάνει τις επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου.

## 1.3. Έννοια και Περιεχόμενο της Αμπελογραφίας

Η Αμπελογραφία είναι ένας ειδικός κλάδος της Αμπελουργίας, η ετυμολογία της οποίας προήλθε από τις λέξεις «άμπελος» και «(περι)γράφω» και αντικείμενο έχει την περιγραφή, τη διάκριση, την ταξινόμηση, και την αξιολόγηση των ποικιλιών της αμπέλου, έργο εξαιρετικά δύσκολο λόγω του ιδιαιτέρως μεγάλου αριθμού ποικιλιών του είδους *V.vinifera*L.Η ανάγκη διάκρισης και ταξινόμησης των πολλαπλών ειδών της αμπέλου οδήγησε το 1777 στην πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης από τον Helbling (Molon, 1906) ενώ μέχρι σήμερα έχουν προταθεί πάνω από 200 συστήματα ή σχέδια αμπελογραφικήςπεριγραφής.Ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα οι Vialaκαι Vemorel (1902-1910) κάνουν λόγο για 24000 ονόματα ποικιλιών και συνωνύμων που από ότι φαίνεται αντιστοιχούν σε πάνω από 9000 ποικιλίες της οινοφόρου αμπέλου (AlleweldtandDettweiler 1994). Για το λόγο αυτό κατέστη ξεκάθαρη η ανάγκη προσδιορισμού και ταξινόμησης των ποικιλιών με τα σχέδια να στηρίζονται σε μορφολογικά, αμπελομετρικά, φαινολογικά και γεωγραφικά στοιχεία (Σταυρακάκης,2010).

Για την επίτευξη των στόχων της Αμπελογραφίας, αναπτύχθηκαν τρεις μεθοδολογίες: Η αμπελογραφική περιγραφή, η συγκριτική αμπελογραφία και η πειραματική αμπελογραφία(Νταβίδης1982).

Η *Αμπελογραφική Περιγραφή*ως στόχο έχει την διάκριση και τον προσδιορισμό της ταυτότητας των ειδών και ποικιλιών της αμπέλου, χρησιμοποιώντας γνώσεις των μορφολογικών χαρακτήρων των υπό μελέτη πρέμνων.

Η *Συγκριτική Αμπελογραφία* ασχολείται με την εύρεση λύσης στο πρόβλημα των συνωνύμων των καλλιεργούμενων ποικιλιών της αμπέλου, από τόπο σε τόπο, καθώς και την μελέτη του φαινομένου της πολυκλωνικής σύνθεσης των ποικιλιών. Για την διεξαγωγή της μεθοδολογίας αυτής, πραγματοποιούνται συγκριτικές έρευνες τόσο σε μορφολογικούς χαρακτήρες, όσο και σε καλλιεργητικές συμπεριφορές των υπό εξέταση ποικιλιών.

Η *Πειραματική Αμπελογραφία* αφορά την διερεύνηση προβλημάτων που είναι σχετικά με την προέλευση των ποικιλιών της αμπέλου και στηρίζεται σε μεθόδους γενετικής και φυτογεωγραφίας, αξιοποιώντας παράλληλα ιστορικά στοιχεία.

Η ύπαρξη των τόσων διαφορετικών ποικιλιών αμπέλου, που κατέστησε την ανάγκη για ανάπτυξη του κλάδου της αμπελογραφίας επιτακτική οφείλεται:

- 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
- Στις φυσικές αλλά και τεχνητές διασταυρώσεις.

## 1.4. Περιορισμοί στα συστήματα ταξινόμησης

Στην Ελλάδα, η πρώτη απόπειρα αμπελογραφικής περιγραφής τοποθετείται το 1878 με την κατάταξη περίπου 500 ποικιλιών με βάση το σχήμα και το χρώμα των ραγών από τον Ορφανίδη, ενώ αρκετοί είναι αυτοί που ακολούθησαν με δικές τους αμπελογραφικές περιγραφές που σχετίζονταν με γνωρίσματα ραγών και φύλλων των υπό εξέταση πρέμνων. Οι Λογοθέτης και Βλάχος (1965, 1967) περιέγραψαν έναν αριθμό ποικιλιών στηριζόμενοι σε μορφολογικά και φαινολογικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με τον κώδικα του O.I.V. Έτσι, το 1984 για πρώτη φορά ο O.I.V. και ο I.P.G. (InternationalBoardforPlantGeneticResources) εξέδωσαν πίνακες βαθμολόγησης και κατάταξης των ποικιλιών της αμπέλου με τους παλαιότερους να κάνουν λόγο για 125 χαρακτηριστικά, ενώ τους νεότερους για 84 κυριότερα χαρακτηριστικά. Για τους χαρακτήρες που μελετώνται υπάρχει βαθμολόγηση με κωδικούς αριθμούς οι οποίοι καταγράφονται στον υπολογιστή και παρέχουν την δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης και τη διεξαγωγή συγκριτικών αποτελεσμάτων.

Ωστόσο, ακολουθώντας τις προαναφερθείσες μεθόδους ταξινόμησης, προέκυψαν κάποιοι περιορισμοί οι οποίοι αποτελούσαν πρόβλημα στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Οι περιορισμοί αυτοί είχαν ως εξής:

1) Για τη διάκριση και μορφολογική ταυτοποίηση των ποικιλιών τα όργανα της αμπέλου πρέπει να βρίσκονται σε συγκεκριμένο στάδιο του βλαστητικού τους κύκλου, δυσχεραίνοντας έτσι τη διεξαγωγή αποτελεσμάτων καθ’ όλη τη διάρκεια του έτους.

2) Κατά την διακίνηση πολλαπλασιαστικού υλικού της αμπέλου, πολλές φορές χρησιμοποιούνται κληματίδες, όργανα δηλαδή που καθιστούν σχεδόν αδύνατη την εξακρίβωση της εκάστοτε

ποικιλίας. Έτσι, υπάρχει ο κίνδυνος να διαπιστωθεί διαφορετική ποικιλία αρκετά χρόνια μετά τη φύτευσή της. Το ίδιο πρόβλημα εμφανίζεται και στην περίπτωση των υποκειμένων, τα οποία δεν αναμένεται να εμφανίσουν τα φύλλα τους μετά την εγκατάστασή τους στον αμπελώνα.

3) Οι φαινότυποι των φυτών επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες της περιοχής, τη θρεπτική κατάσταση των πρέμνων και την υγεία τους. Μέσω αυτών των συνθηκών είναι εύκολη η ανάπτυξη ποικιλομορφίας των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πρέμνων και η οδήγηση σε μη ασφαλή συμπεράσματα.

4) Ο μεγάλος αριθμός των ποικιλιών που υπολογίζεται ότι υπάρχουν, σε συνδυασμό με τον μεγάλο βαθμό ετεροζυγωτίας οδηγούν στο συμπέρασμα ύπαρξης συχνών μεταλλάξεων με τη δημιουργία έτσι ακόμα περισσότερων συνωνύμων, τύπων ή παραλλαγών των ήδη υπαρχόντων ποικιλιών.

Με γνώμονα τα παραπάνω, οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όσο σωστή και ακριβής και αν είναι μία αμπελογραφική περιγραφή, πάντα θα παρουσιάζει αδυναμίες αφού θα στηρίζεται σε μορφολογικά και άρα μεταβλητά χαρακτηριστικά. Έτσι, τα τελευταία χρόνια στον κλάδο της αμπελογραφίαςέχουν αρχίσει να στρέφονται σε βιοχημικές και μοριακές μεθόδους. Στις βιοχημικές μεθόδους ανήκει για παράδειγμα ο διαχωρισμών των φλαβονοειδών και των καροτενοειδών με τη χρωματική μέθοδο και των πρωτεϊνών με την ηλεκτροφορητική μέθοδο. Οι βιοχημικές μέθοδοι αναφέρονται στη χρήση των ενζυμικών πολυμορφισμών, οι οποίοι ανιχνεύονται ηλεκτροφορητικά. Τα ένζυμα είναι άμεσα προϊόντα των γονιδίων και επιτρέπουν τον ασφαλή προσδιορισμό της γενετικής σύστασης του οργανισμού. Στις μοριακές μεθόδους μελετάται απευθείας το γενετικό υλικό και περιλαμβάνουν τη χρήση ενζύμων περιορισμού (RFLP), την ανάλυση της τυχαίας ενίσχυσης του πολυμορφικού DNAμε τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RAPD-PCR), καθώς και τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στις οποίες ανήκουν οι μικροδορυφόροι (ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, SimpleSequencesRepeat – SSR). Ασφαλώς, οι βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην ταξινόμηση και κατάταξη των ποικιλιών αμπέλου, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι πρέπει να καταργηθούν οι κλασσικές μέθοδοι αμπελογραφίας. Για την επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων, ιδανικά χρειάζεται ο συνδυασμός των παραπάνω δύο για τη εξαγωγή ασφαλέστερων και ακριβέστερων συμπερασμάτων.

## 1.5. Μοριακές Μέθοδοι

Σε ένα φυτό το DNAείναι ίδιο σε κάθε κύτταρο, κάθε ιστό και κάθε στάδιο ανάπτυξης ενός οργανισμού. Θεωρώντας λοιπόν ότι το DNAπαραμένει αναλλοίωτο, αμετάβλητο και δεν επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες ( δεν λαμβάνουμε υπόψιν την περίπτωση της μετάλλαξης που αποτελεί

εξαίρεση), αποτελεί το καταλληλότερο εργαλείο στην προσπάθεια διάκρισης και ταξινόμησης των ποικιλιών της αμπέλου. Γενετικό υλικό μπορεί να ληφθεί πλέον από οποιοδήποτε μέρος του πρέμνου, από φύλλα και κληματίδες έως και οποιοδήποτε μέρος του φυτού (Marsaletal. 2011).Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNAτα οποία δεν επηρεάζονται από το μορφολογικό στάδιο των ιστών και το περιβάλλον, αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNAκαι παρουσιάζουν συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των βιοχημικών και άλλων δεικτών (Χατζόπουλος 2001, Agarwaletal. 2008).Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών μεθόδων: η πρώτη περιλαμβάνει τις τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης όπως οι RAPD, AFLP, SSRκ.α., και η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις τεχνικές υβριδισμού.

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

- ✓ Να παρέχουν συνεχή / διαρκή ευκρίνεια γενετικών διαφορών
- ✓ Να είναι πολυμορφικοί ( ή αν είναι δυνατόν η ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τύπο)
- ✓ Να συνδέονται με διακριτούς φαινοτύπους.
- ✓ Να δημιουργούν πολλαπλούς , ανεξάρτητους και αξιόπιστους δείκτες.
- ✓ Να μην απαιτούνται πληροφορίες για το γονιδίωμα ενός οργανισμού.
- ✓ Να είναι διάσπαρτοι σε όλο το γονιδίωμα και στην ιδανική περίπτωση να βρίσκονται σε ισοκατανομή.
- ✓ Να είναι ανεξάρτητοι της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου του φυτού.
- ✓ Απλή κληρονομικότητα που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλόμορφους.
- ✓ Να έχουν υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNAκαι όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
- ✓ 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 που να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA (Χατζόπουλος 2001).

Δυστυχώς καμία τεχνική με μοριακούς δείκτες δεν είναι ιδανική για κάθε περίσταση. Οι τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικά σημεία όπως στην αφθονία στο γονιδίωμα, στο επίπεδο του πολυμορφισμού που ανιχνεύεται, στην εξειδίκευση ως προς τον γενετικό τόπο, στην επαναληψιμότητα, στα τεχνικά μέσα και στο κόστος. Στον πίνακα που ακολουθεί αντικατοπτρίζεται η σύγκριση στα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Σύγκριση διαφόρων συχνά χρησμοποιούμενων τεχνικών μοριακών δεικτών (Πηγή: Agarwal2008)

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

## 1.6. Η μέθοδος των μικροδορυφόρων

Οι μικροδορυφόροι ή SSRαποτελούνται από μία ειδική αλληλουχία μονομερών βάσεων του DNA. Ηεπαναλαμβανόμενη αυτή αλληλουχία στους μικροδορυφόρους (1 έως 10 βάσεις αλλά συνηθέστερα 2 με 3) είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα γονιδιώματα των φυτικών και ζωικών οργανισμών. Αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τους ερευνητές κυρίως καθώς εμφανίζουν τα παρακάτω γνωρίσματα (Σταυρακάκη 2014):

- Κληρονομούνται με μενδελιακό τρόπο

- Οι διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων έχουν σαν αποτέλεσμα πολλαπλά αλληλόμορφα για ένα γονιδιακό τόπο

- Χαρακτηρίζονται από επαναληψιμότητα

Εξαιτίας της υψηλής διακριτικής ικανότητας της μικροδορυφορικής ανάλυσης , η εύρεση δύο ταυτόσημων γονοτύπων δύο διαφορετικών ατόμων αποτελεί απόδειξη ότι τα άτομα αυτά ανήκουν στην ίδια ποικιλία. Με τον ίδιο τρόπο επομένως που μπορεί να ταυτοποιηθεί μία ποικιλία, μπορεί να προσδιοριστεί και μία άγνωστη ποικιλία συγκρίνοντας το γονότυπό της με αναφερόμενους γονοτύπους από γνωστές βάσεις δεδομένων (Σταυρακάκη 2014).Ηπαραπάνω τεχνική βρήκε αρκετούς υποστηρικτές, σύμφωνα με τη γνώμη των οποίωνη μέθοδος αυτή μπορεί επιπρόσθετα να εφαρμοστεί και για την επιβεβαίωση καιτον προσδιορισμό συνωνύμων (Sefc 2001), έως και σε επίπεδο κλώνων ποικιλιών (Shindeetal. 2013).Για τον ίδιο σκοπό με σημαντικά αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε και από Έλληνες ερευνητές στο πλαίσιο διεξαγωγής μελετών (Αναγνωστόπουλος 2003, Αβαγιαννέλη 2005, Σταυρακάκη 2008, Σταυρακάκη 2014). Από την άλλη πλευρά υπήρξαν και ορισμένοι που αμφισβήτησαν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου στο πλαίσιο ανίχνευσης γενετικής ποικιλομορφίας εντός της καλλιεργούμενης ποικιλίας ή διάκριση των κλώνων μιας ποικιλίας (CrespanandMillani 2001, Imazioetal.2002, Vignanietal. 2002, Ibanezetal. 2003, Albaetal. 2011).

# 2. Υλικά και Μέθοδοι

## 2.1. Ποικιλίες Αμπέλου

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4) εμφανίζονται οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης με τον προσδιορισμό χρήσης τους και το χρώμα του φλοιού τους. Η συλλογή των παρακάτω ποικιλιών πραγματοποιήθηκεστην Κόρινθο.

Πίνακας 4. Υπό μελέτη ποικιλίες

| ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ | ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΡΗΣΗΣ | ΧΡΩΜΑ ΦΛΟΙΟΥ |
|---|---|---|
| Αηδάνι Άσπρο | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Αθήρι | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Θραψαθήρι | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Κοκκινοβοστίτσα | Ποικιλία Οινοποιίας | Ερυθρό |
| Κοτσιφάλι | Ποικιλία Οινοποιίας | Ερυθρό |
| Μανδηλαριά | Ποικιλία Οινοποιίας | Ερυθρό |
| ΜαύροΚύπρου | Ποικιλία Οινοποιίας | Ερυθρό |
| Μαυροτράγανο | Ποικιλία Οινοποιίας | Ερυθρό |
| Ντεμπίνα | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Πλυτό | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Ροκανιάρης | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Τρυφεροποδιά | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Φράουλα | Επιτραπέζια Ποικιλία | Ερυθρό |
| Chardonnay | Ποικιλία Οινοποιίας | Λευκό |
| Merlot | Ποικιλία Οινοποιίας | Ερυθρό |

## 2.2. Απομόνωση Γενετικού Υλικού

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν τα νεαρά φύλλα των κύριων βλαστών των πρέμνων. Η εξαγωγή DNA από τους ιστούς πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Kit απομόνωσης NucleoSpinPlantII.

Αρχικά, τα φύλλα της νεαρής κορυφής από κάθε ποικιλίαλειοτριβήθηκαν με τη βοήθεια υγρού αζώτου και από αυτάζυγίστηκε 0,1 gλειοτριβημένου ιστού ανά ποικιλία, το οποίο ομογενοποιήθηκε με 0,3 mL του διαλύματοςPL2 για λύση των κυττάρων.Στο διάλυμα προστέθηκαν 10 μLRNaseA, συγκέντρωσης 0,01 ng/μL και το διάλυμα επωάστηκε για 45 λεπτά στους 65$^{o}$C. Ακολούθησε προσθήκη 75 μL του διαλύματος PL3 και μετά την ομογενοποίηση το διάλυμα τοποθετήθηκε για 5 λεπτά στον πάγο. Το διάλυμα μεταφέρθηκε μετά σε νέο eppendorf, αφού προηγήθηκε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11000 rpm για διαχωρισμό του ιζήματος. Στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστέθηκαν 450 μL διαλύματος PC και ακολούθησε καλή ανάδευση. Με τη βοήθεια μίας πράσινης στήλη πραγματοποιήθηκε μεταφορά σε νέοeppendorf όπου μετά από φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11000 rpm, απορρίφθηκε το υποκείμενο. Ακολούθησε προσθήκη 400 μLPW1 στην πράσινη στήλη, φυγοκέντρηση και ξανά απόρριψη του υποκειμένου. Αντιστοίχως, χρησιμοποιήθηκαν 700 μLPW2 με εκ νέου φυγοκέντρηση και απόρριψη όπως και 200 μLPW2. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για στέγνωμα της μεμβράνης και στη

συνέχεια ακολούθησαν 2 όμοιοι κύκλοι προσθήκης 50 μLPE (το οποίο είχε προθερμανθεί στους 65$^{o}$C), επώασης για 10 λεπτά στους 65$^{o}$C και φυγοκέντρησης σε 11000 rpm για 2 λεπτά.

## 2.3. Υπολογισμός Συγκέντρωσης DNA

Μετά την απομόνωση του DNA, σειρά είχε ο υπολογισμός της συγκέντρωσής του. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο NanoDrop (NanoDrop Technology). Συγκεκριμένα, 1μLδείγματος DNA τοποθετήθηκε στην ειδική υποδοχή του μηχανήματος, το οποίο και υπολόγισε τη συγκέντρωσή του DNAσε μήκος κύματος 260nm και 280nm. Έτσι,πέρα από τον προσδιορισμό της ποσότητας του γενετικού υλικού υπολογίστηκε και η καθαρότητα του DNA αφού αυτή εκφράζεται μέσω του λόγου της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm. Η καθαρότητα των δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 1,4-2,ενώ η συγκέντρωση του DNA ήταν κατά μέσο όρο 33,13 ng/μL.

Πίνακας 5. Καθαρότητα και συγκέντρωση του DNA για τις υπό μελέτη ποικιλίες

| ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ | ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (260/280) | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ DNA (ng/μL) |
|---|---|---|
| Θραψαθήρι | 1,884 | 116 |
| Μανδηλαριά | 1,973 | 21,95 |
| Κοτσιφάλι | 1,938 | 30,3 |
| Μαύρο Κύπρου | 1,967 | 18,95 |
| Αηδάνι άσπρο | 1,967 | 20,35 |
| Πλυτό | 1,922 | 57,5 |
| Μαυροτράγανο | 1,976 | 14,9 |
| Κοκκινοβοστίτσα | 1,608 | 37,4 |
| Chardonnay | 1,672 | 15,4 |
| Merlot | 1,982 | 15,65 |
| Ροκανιάρης | 1,941 | 51,7 |
| Τρυφεροποδιά | 1,741 | 51,45 |
| Ντεμπίνα | 1,882 | 25,95 |
| Αθήρι | 1,904 | 12,15 |
| Φράουλα | 1,745 | 14,8 |

## 2.4. Εκκινητές

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. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 6) εμφανίζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν μαζί με την αλληλουχία των βάσεων τους καθώς και τη θερμοκρασία υβριδισμού του εκάστοτε εκκινητή.

Πίνακας 6. Παρουσίαση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

| **Εκκινητής(Primer)** | **Αλληλουχία 5' →3'** | **Θερμοκρασία υβριδισμού˚C** |
|---|---|---|
| ssrVrZAG62 (F) | GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C | 50 |
| ssrVrZAG62 (R) | CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C | 50 |
| ssrVrZAG79(F) | AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G | 50 |
| ssrVrZAG79 (R) | TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C | 50 |
| VVMD32(F) | TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG | 56 |
| VVMD32 (R) | GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC | 56 |
| VVS2 (F) | CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC | 56 |
| VVS2(R) | AAA TTC AAA ATT CTA ATT CAA CTG G | 56 |
| VVMD26(F) | GAG ACG ACT GGT GAC ATT GAG C | 56 |
| VVMD26(R) | CCA TCA CCA CCA TTT CTA CTG C | 56 |
| VVMD28(F) | AAC AAT TCA ATG AAA AGA GAG AGA GAG A | 56 |
| VVMD28(R) | TCA TCA ATT TCG TAT CTC TAT TTG CTG | 56 |

## 2.5. Συνθήκες Ενίσχυσης της PCR

Η προετοιμασία της αντίδρασης λάμβανε χώρα στους 4$^{o}$C με τελικό όγκο τα 10 μL. Το

βασικό μείγμα προετοιμαζόταν σε σωλήνα eppendorf το οποίο περιείχε δις-απιονισμένο και αποσταγμένο νερό, το ρυθμιστικό διάλυμα Qiagen PCR buffer 1x [50μMKCl, 10μM TRIS-HCl(pH: 8,7 στους 20$^{o}$C), 15μM$MgCl_2$ και $(NH_4)_2SO_4$]. Ακολουθούσε προσθήκη 200μM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 50ngεκκινητή (Forward και Reverse) και 1unitTaq DNA πολυμεράση (Qiagen). Το μείγμα αναμείχθηκε, φυγοκεντρήθηκε (14000rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου) και μοιράστηκε σε μικρότερα eppendorfs για τον θερμικό εναλλάκτη. Στο κάθε eppendorf προστέθηκαν 15ng DNA της ποικιλίας, αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε (14000rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου). Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον θερμικό εναλλάκτη (PCR). Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε κυκλικός εναλλάκτης θερμότητας (PerkinElmer, DNA Thermal Cycler 9600) και οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν:

- ✓ 1 κύκλος για 5 λεπτά στους 94$^{o}$C,
- ✓ 35 κύκλοι με: (α) 1 λεπτό στους 94$^{o}$C, (β) 1 λεπτό στη θερμοκρασία στην οποία υβριδίζει η κάθε φάση ζεύγους του εκκινητή, (γ) 1,5 λεπτά στους 72$^{o}$C
- ✓ 1 κύκλος για 30 λεπτά στους 72$^{o}$C.

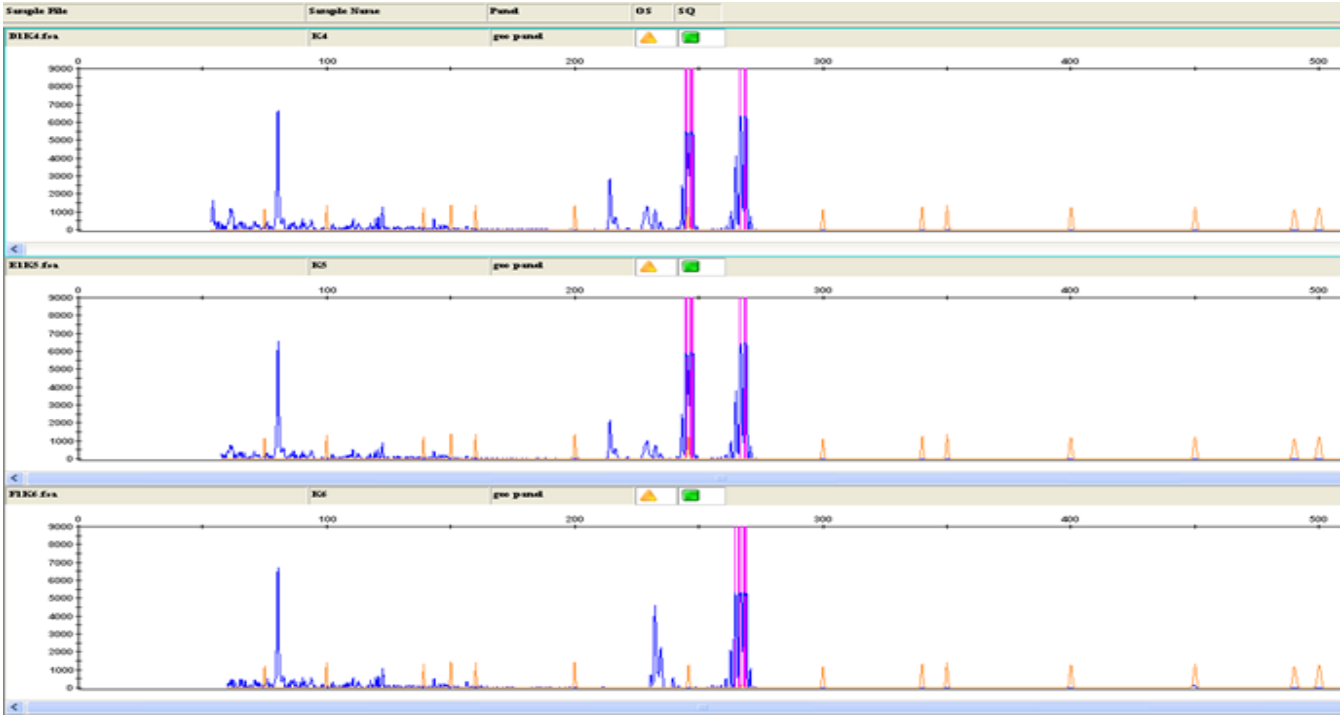
Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται η αποδιάταξη του DNA του δείγματος, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης στους 94$^{o}$C. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA. Στο δεύτερο βήμα, με μείωση της θερμοκρασίας (ανάλογα με τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών) επιτυγχάνεται 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$^{o}$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.

## 2.6. Ηλεκτροφόρηση

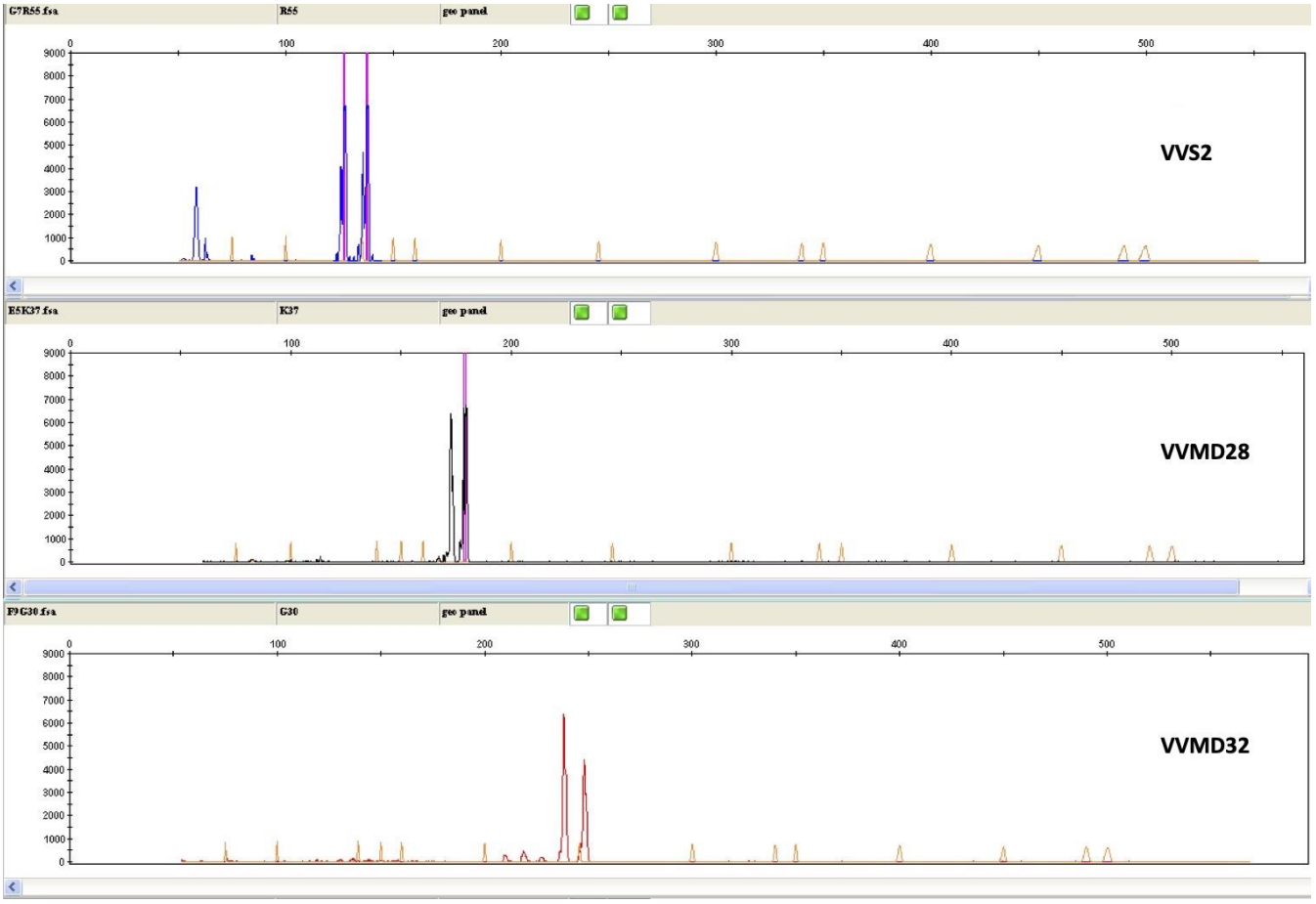
Ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων και ταυτόχρονα ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενισχυμένων τμημάτων έγινε με τη βοήθεια του αυτόματου αναλυτή γονιδιώματος (GeneticAnalyzer ABI PRISM™ 310) με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Capillaryelectrophoresis) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Genemapper v4.0. Πιο συγκεκριμένα,η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε: 0,5 μL των προϊόντων της αλυσιδωτής πολυμεράσης (τα οποία είχαν αραιωθεί με απιονισμένο νερό με αναλογία 1:10), 0,1 μLGene-Scan 500-Liz Size Standard (AppliedBiosystems) και 12,5μLφορμαμιδίου (απαραίτητο για την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA). Έπειτα, ακολουθούσε εισαγωγή των δειγμάτων στον κυκλικό εναλλάκτη θερμότητας (PerkinElmer, DNA Thermal Cycler 9600) για 5 λεπτά στους 94$^{o}$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 τοποθέτηση τους στον αυτόματο αναλυτή.

Η ηλεκτροφόρηση για τη μέθοδο SSR έγινε στον αυτόματο αναλυτή γονιδιώματος (GeneticAnalyzer ABI PRISM™ 310) με τη χρήση πολυμερούς POP-4 (AppliedBiosystems). 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 (AppliedBiosystems) γινόταν η συλλογή των δεδομένων, η ανάλυσή τους, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενισχυμένων προϊόντων και τελικά η δημιουργία εξαγώγιμου αρχείου σε μορφή excel.

Εικόνα 1. Ηλεκτροφορήματα τριών διαφορετικών ποικιλιών με τη χρήση κοινού εκκινητή.



Εικόνα 2. Ηλεκτροφορήματα για την ίδια ποικιλία με τη χρήση τριών διαφορετικών εκκινητών (VVS2, VVMD28, VVMD32)




## 2.6. Στατιστική Ανάλυση

Ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους ποικιλιών βρέθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος NT-SYSTEM-pc v2.02i στηριζόμενηστη μέθοδο UPGMA (μέθοδος μη σταθμισμένων ομάδων ανά δύο, χρησιμοποιώντας αριθμητικό μέσο), όπως αυτή αναπτύχθηκε από τον Rohlf (Exeter Software NewYork, 1993, USA), καθώς και σε μία πιο πρόσφατη έκδοση του προγράμματος (NTSYS-PC v2.11f, Rohlf, 2000).

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

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

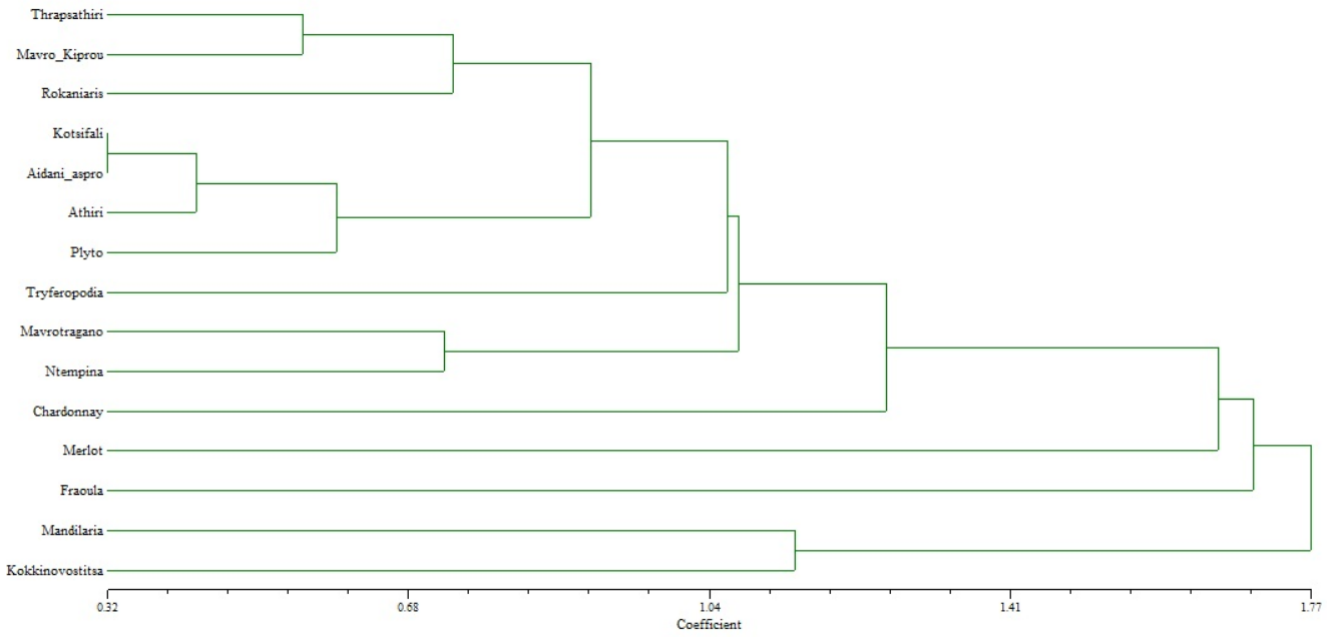
Σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του συντελεστή για τα δύο άτομα, τόσο μεγαλύτερη γενετική απόσταση έχουν.

Βάσει αυτών των δεδομένων δημιουργήθηκαν στη συνέχεια τα δενδρογράμματα, τα οποία και απεικονίζουν την ύπαρξη ή μη συγγένειας των υπό μελέτη ποικιλιών. Για τον υπολογισμό των πινάκων όπου απεικονίζεται ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα λογιστικών φύλλων (Excel).

## 3. Αποτελέσματα-Σχόλια

Για την ανάλυση του βαθμού γενετικής ανομοιότητας των ποικιλιών, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Dist. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τις υπό μελέτη ποικιλίες αποτυπώνονται στο δενδρόγραμμα που ακολουθεί.

Εικόνα 1. Δενδρόγραμμα των ποικιλιών που μελετήθηκαν με βάση τον συντελεστή Dist.



Τα αποτελέσματα από τη χρήση της μοριακής μεθόδου των μικροδορυφόρων έδειξαν ότι υπάρχει γενετική ετερογένεια μεταξύ των ποικιλιών που μελετήθηκαν, αφού το εύρος των τιμών που έλαβε ο συντελεστής γενετικής ανομοιότητας κυμάνθηκε από 0,32 έως 1,77.

Παρατηρώντας το παραπάνω δενδρόγραμμα, γίνεται αντιληπτό ότι χωρίζεται σε δύο κλάδους. Στον πρώτο ανήκουν οι ποικιλίες Μανδηλαριά και Κοκκινοβοστίτσα, ενώ στον δεύτερο υπάγονται όλες οι υπόλοιπες υπό μελέτη ποικιλίες. Οι δύο ποικιλίες του πρώτου κλάδου δεν εμφανίζουν μεγάλη γενετική συγγένεια μεταξύ τους, ενώ συγκρινόμενες με αυτές της άλλης ομάδας, εμφανίζουν τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση του δενδρογράμματος (1,77). Σε ό,τι αφορά τον δεύτερο κλάδο του δενδρογράμματος, αυτός χωρίζεται σε πολλές υποομάδες. Οι δύο ποικιλίες Κοτσιφάλι και Αηδάνι άσπρο είναι οι δύο που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα (0,32). Οι δύο ποικιλίες αυτές καλλιεργούνται για πολλά χρόνια στο γεωγραφικό διαμέρισμα της Κρήτης, διαμορφώνοντας τους ποικιλιακούς τους χαρακτήρες βάσει κοινών εδαφοκλιματικών συνθηκών, γεγονός στο οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί μία μεγάλη γενετική ομοιότητα. Εκτός αυτού, οι συγκεκριμένες ποικιλίες εμφανίζουν και ορισμένα κοινά αμπελογραφικά χαρακτηριστικά, μερικά εκ των οποίων αποτυπώνονται σε κάποιους βασικούς αμελογραφικούς χαρακτήρες που παρουσιάζονται παρακάτω:

- **Κοτσιφάλι**: ανοιχτή λευκοπράσινη νεαρή κορυφή, χνοώδης, με ποώδη βλαστό σχεδόν όρθιο, συνήθως χνοώδη, ανεπτυγμένα φύλλα μεγάλα κυκλικά, με ανώτερους κόλπους μεγάλου βάθους. Το έλασμα χαρακτηρίζεται από επίπεδο έως κυματώδες, βαθυπράσινο και λείο στην άνω επιφάνεια, ενώ η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική έως κυλινδροκωνική με ράγες μικρές έως μέτριες, κόλουρου σχήματος.

- **Αηδάνι Άσπρο**: ανοιχτή λευκοπράσινη νεαρή κορυφή, αραχνοϋφής έως χνοώδής, με ποώδη βλαστό ημιόρθιο, λείος έως αραχνοϋφής και ανεπτυγμένα φύλλα μέτρια έως μεγάλα, κόλουρα με βαθείς ανώτερους κόλπους. Το έλασμα εμφανίζεται ελαφρώς κυματώδες, λείο και βαθυπράσινο στην άνω επιφάνεια, ενώ η σταφυλή είναι μεγάλη, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική με ράγες μικρές έως μέτριες, ωοειδούς σχήματος.

Τις δύο προαναφερθήσες ποικιλίες ακολουθούν με τη σειρά τους οι ποικιλίες Αθήρι και Πλυτό, οι οποίες και αυτές εμφανίζουν μεγάλη γενετική ομοιότητα. Παρόμοιες περιπτώσεις αποτελούν τα ζεύγη Θραψαθήρι με Μαύρο Κύπρου και Μαυροτράγανο με Ντεμπίνα. Από τις ποικιλίες του δεύτερου κλάδου, η ποικιλία Φράουλα, εμφανίζει τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση με όλες τις υπόλοιπες υπό μελέτη ποικιλίες, γεγονός το οποίο πιθανώς αποδίδεται στη διαφορετική χρήση της συγκεκριμένης ποικιλίας, αφού είναι επιτραπέζια, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες που είναι οινοποιίας. Ενώ μετά τη Φράουλα, τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση από τις υπόλοιπες, εμφανίζουν οι ποικιλίες Merlot και Chardonnay, πιθανώς λόγω της ξενικής προέλευσής τους.

Για την αξιοποίηση και αξιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, μελετήθηκαν προγενέστερες μελέτες οι οποίες είχαν σαν αντικείμενο την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση διαφόρων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου. Από την παραπάνω διαδικασία, ξεχώρισαν δύο μελέτες, εκ των οποίων μάλιστα η μία είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Αμπελολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στην πρώτη μελέτη, ΄Genetic study of grape cultivars used for the production of Malvasia wine by

RAPDs (Laboratory of Viticulture, Stavrakakis N. Manolis and Biniari Katerina)', μελετήθηκαν συνολικά 22 ποικιλίες με τη μέθοδο RAPD. Χρησιμοποιήθηκαν 10 εκκινητές και συγκεκριμένα οι 1224, 1225, 1226, 1227, OPF-03, OPF-05, OPM-01, OPM-02, OPM-05, OPM-18 ενώ ο βαθμός γενετικής ανομοιότητας υπολογίστηκε μέσω του NTSYS-pc package 1.8. Με την απεικόνιση των αποτελεσμάτων υπό την μορφή δενδρογράμματος, διαπιστώθηκε ότι ανάμεσα στις υπό εξέταση ποικιλίες, υπήρχαν και οι ποικιλίες Αθήρι και Θραψαθήρι – ποικιλίες που μελετήθηκαν και στην παρούσα μελέτη- οι οποίες εμφάνιζαν υψηλή γενετική ομοιότητα. Το αποτέλεσμα αυτά αποτυπώνονται και στις δύο μελέτες παρά τη διαφοροποίηση των υπό μελέτη ποικιλιών ανά περίπτωση, γεγονός που ενισχύει την άποψη περί γενετικής ομοιότητας. Η επόμενη μελέτη 'A combined approach involving ampelographic description, berry oenological traits and molecular analysis to study native grapevine varieties of Greece ( VITIS-Journal of Grapevine Research 54,99-103,2015, G Merkouropoulos, S Michailidou, A Alifragkis, E Zioziou, S Koundouras, A Argiriou, N Nikolaou)' αφορά τη μελέτη 94 ποικιλιών αμπέλου. Για την ολοκλήρωση της μεθόδου των μικροδορυφόρων, αξιοποιήθηκαν 10 εκκινητές (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD25, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG67, VrZAG79) εκ των οποίων οι VVS2, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 και VrZAG79 ήταν κοινοί με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, όπως κοινό ήταν και το λογισμικό για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, GeneMapper v.4.0. Από τις υπό μελέτη ποικιλίες στην περίπτωση αυτή εξάγεται το συμπέρασμα μεταξύ άλλων, γενετικής ομοιότητας μεταξύ των ποικιλιών Ντεμπίνα και Πλυτό. Οι δύο αυτές ποικιλίες, στην παρούσα μελέτη, βρίσκονται στον δεύτερο κλάδο του δενδρογράμματος, σε διαφορετική όμως υποομάδα, με τον συντελεστή ανομοιότητας να λαμβάνει τιμή 1,04. Η εμφάνιση γενετικής ομοιότητας μεταξύ των δύο αυτών ποικιλιών, παρατηρείται και μέσω ορισμένων κοινών αμπελογραφικών χαρακτήρων που εμφανίζονται μεταξύ τους.

- **Πλυτό:** νεαρή κορυφή ανοιχτή, πράσινη με ρόδινη παρυφή, χνοώδης, με ποώδη βλαστό ημιόρθιο, και ανεπτυγμένα φύλλα μέτρια έως μεγάλα, κυκλικά με ανώτερους κόλπους βαθείς. Το έλασμα είναι κυματώδες, πομφολυγώδες και πρασινότεφρο, αραχνοϋφές έως χνοώδες στην κάτω επιφάνεια. Η σταφυλή χαρακτηρίζεται ως μεγάλη και κυλινδροκωνική με ράγες μέτριες έως μεγάλες σφαιρικές.
- **Ντεμπίνα:** Νεαρή κορυφή μετρίως ανοιχτή έως ανοιχτή, πράσινη με ρόδινη παρυφή, χνοώδης, με ποώδη βλαστό ημιόρθιο και ανεπτυγμένα φύλλα μεγάλα, κυκλικά έως κόλουρα. Το έλασμα χαρακτηρίζεται ως κυματώδες, πομφολυγώδες, ανοιχτοπράσινο, αραχνοϋφές έως χνοώδες στην κάτω επιφάνεια. Η σταφυλή είναι μέτρια, κυλινδροκωνική ή κωνική με ράγες μέτριες έως μεγάλες, σφαιρικές ή εννίοτε ωοειδείς.

Συμπερασματικά, μέσω της χρήσης μοριακών μεθόδων και ιδιαίτερα αυτής των μικροδορυφόρων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μπορούμε να εξάγουμε αρκετά και δεδομένα σε ό,τι αφορά την γενετική συγγένεια διαφόρων ποικιλιών αμπέλου. Η διάκριση και ταυτοποίηση ποικιλιών με βάση τους μορφολογικούς χαρακτήρες των φυτών, ελλοχεύει κινδύνους αφού οι δείκτες αυτοί μεταβάλλονται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και απαιτούν περισσότερο χρόνο λόγω της λήψης μετρήσεων σε συγκεκριμένα φαινολογικά στάδια. Για το λόγο αυτό, όλο και περισσότεροι στρέφονται στη χρήση των μοριακών δεικτών. Ωστόσο, για ένα ασφαλέστερο αποτέλεσμα, ιδανικός είναι ο συνδυασμός και των δύο μεθόδων για τη δημιουργία ολοκληρωμένηςγύρω από τις υπό

μελέτη ποικιλίες. Ο συνδυασμός των μεθόδων αυτών θα αποτελέσει τον παράγοντα της επιτυχίας τόσο στην ερευνητική κοινότητα όσο και στην αμπελοκομική πράξη, με την εγκατάσταση πιο ομοιόμορφων αμπελώνων και την παραγωγή ανώτερων αμπελουργικών προϊόντων.

# Βιβλιογραφία


- 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.

- Alleweldt, G. and Dettweiler, E., 1994. The genetic Resources of *Vitis*: World List of Grapevine Collections (2nd edition), Geilweilerhof.

- Alleweldt, G.andPossingham, J., 1988. Progress in Grapevine Breeding.Ther.Appl. Genet. 75: 669-673

- Aradhya, M.K., Dangl, G.S., Prins, B.H., Boursiquot, J.M., Walker, M.A., Meredith, C.P., and Simon, C.J., 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. Genet. Res. Camb. 81: 179 – 192.

- 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.

- De Lattin G., 1939. Uber den Ursprung und Die Verbeitung der Reben, Zuchter 11: 217-225.

- Galet P., 1967. Recherches sur les methodesd'identification et de classification des Vitacées des zones tempérées.These Doctorates Sciences, Montpellier, 2 tomes.
- Galet P., 1988. Cépages et Vignobles de France, 2nd .Montpellier

- Galet, P., 2000. General Viticulture, English Edition, Oenoplurimedia, Chaintre, France.

- G Merkouropoulos, S Michailidou, A Alifragkis, E Zioziou, S Koundouras, A Argiriou, N Nikolaou, 2015. A combined approach involving ampelographic description, berry oenological traits and molecular analysis to study native

grapevine varieties of Greece ( VITIS-Journal of Grapevine Research 54,99-103.

- Ibanez J., de Andres 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.

- 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.

- Molon, G., 1906. Ampelografia. U. Hoepli. Miano.

- Mullins M., Bouquet A. And Williams L., 1992: Biology of the Grapevine. Cambridge University Press. Cambridge.

- Nergul A., 1946. Origin and Classification of cultured grape, The Ampelography of USSR, t:1159-216, Moscow.

- Planchon J., 1887. Monographie des ampelidees varies, Paris

- Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M.S., Scott, K.D., Steinkellner, H., and Thomas, M.r., 2001. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. In: Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine. Edited by Roubelakis – Angelakis, K.A., Kluwer Academic Publishers. Amsterdam. Pp. 433 – 463.

- 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.

- Small, J.K., 1903. Flora of the Southeastern United States. Pub. By Author, New York.

- Stavrakakis N. Manolis and Biniari Katerina, 2012. Genetic study of grape cultivars used for the production of Malvasia wine by RAPDs, Laboratory of Viticulture, Agricultural University of Athens, Greece.

- Suessenguth K., 1953. *Vitaceae* in Engler-Plantl, Die naturlichenPflanzenfamilien 20d: 174-398, Berlin

- VavilovN., 1926. Studies on the origin of cultivated plants, Bull. Gen. and Pl. Breed. 16:1-248

- 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.

- Αβαγιαννέλη Β., 2005, Μελέτη των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου (*Vitisvinifera*L.) με την εφαρμογή μοριακών δεικτών (SSR).Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθήνα.

- Αναγνωστόπουλος Ι., 2003. Μελέτη των καλλιεργούμενων ποικιλιών (*VitisviniferaL..)* με την εφαρμογή μοριακών δεικτών (SSR). Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθήνα.

- Λογοθέτης, Β.Χ. και Βλάχος, Μ., 1963. Ελληνική Αμπελογραφία. Γ’. Επετηρίς Γεωπονικής και Δασολογικής Σχολής Α.Π.Θ., τ.8: 21 – 70.

- Μπινιάρη Κ., 2000,ΤαυτοποίησηκαίΕλεγχοςΓνησιότηταςτωνΚαλλιεργούμενωνΠοικιλιώνΑμπέλουμετηΧρήση Μοριακών Μεθόδων ( PCR).ΔιδακτορικήΔιατριβή, Αθήνα.

- Νταβίδης Ο., 1982. Στοιχεία Αμπελογραφίας, Αθήνα.

- Σταυρακάκη Μ., 2008, Γενετική μελέτη ποικιλιών οινοποιίας (*Vitisvinifera*L.) με τη χρήση των μοριακών μεθόδων RAPDsκαι SSR.Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθήνα.

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

- Σταυρακάκης Μ.Ν., 2010,Αμπελογραφία. Εκδόσεις Τροπή.

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