

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***‘ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΤΑΛΙΚΩΝ ΜΑΛΒΑΖΙΩΝ ΚΑΙ
ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ ΚΑΙ
ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ’***

ΕΥΜΟΡΦΙΑΣ Α. ΜΑΣΤΡΟΓΙΑΝΝΗ



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Μοριακή Βιολογία & Βιοτεχνολογία Φυτών
Ηράκλειο 2011**

MASTER THESIS

EVMORFIA A. MASTROJIANNI

***'A COMPARISON OF ITALIAN 'MALVASIA' GRAPEVINE
CULTIVARS TO GREEK VINE GERMAPLASM THROUGH
MICROSATELLITE & REMAP PROFILING'***

SUPERVISOR : KALLIOPI A. ROUBELAKIS-AGGELAKIS

Selection Committee

Professor Kalliopi Roubelakis-Aggelakis

Professor Nikolaos Panopoulos

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
HERAKLION 2011**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΥΜΟΡΦΙΑΣ Α. ΜΑΣΤΡΟΓΙΑΝΝΗ

*‘ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΙΤΑΛΙΚΩΝ ΜΑΛΒΑΖΙΩΝ ΚΑΙ
ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ ΚΑΙ
ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ’*

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΚΑΛΛΙΟΠΗ Α.
ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΤΕΛΑΚΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καθηγ. ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΤΕΛΑΚΗ &

Καθηγ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

*Σε ένα μοναδικό άνθρωπο που είχα την τύχη να είναι γιαγιά μου, τη γιαγιά
Μορφία και στις δυο μου κόρες Αθηνά και Νικόλια.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που μου στάθηκαν και πίστεψαν σε ‘μενα όλο αυτό το διάστημα.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω το κύριο Francois Lefort για την ευκαιρία που μου προσέφερε να συνεργαστώ με το εργαστήριο Γενετικής του Πανεπιστημίου Εφαρμοσμένων Επιστημών Lullier στη Γενεύη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να συνεργαστώ με το αξιόλογο προσωπικό του εργαστηρίου.

Στην καθηγήτρια κυρία Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στις δυνατότητές μου και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Εξίσου πολύτιμη ήταν και η συμβολή του κυρίου Lassaad Belbahri τον οποίο ευχαριστώ πολύ.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κύριο Νικόλαο Πανόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές του, την ηθική του συμπαράσταση, την κατανόηση και την ψυχολογική στήριξη κατά τη διάρκεια του προγράμματος.

Ευχαριστώ πολύ τη διδάκτορα κυρία Αναστασία Παπαδάκη για τις παραινέσεις και την συμπαράσταση σε αυτή την προσπάθεια.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους συνεργάτες μου στο εργαστήριο ξεκινώντας από τον κ. Δαμιανό Σκοπελίτη, τον κ. Ευθύμιο Ανδρώνη και τον κ. Ιωάννη Ντελή για την ουσιαστική τους βοήθεια και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Πολλοί είναι εκείνοι στους οποίους οφείλω ευχαριστίες. Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και στο σύζυγό μου, οι οποίοι όλο αυτό το διάστημα πάντα με υποστήριζαν και με ενθάρρυναν. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα την ευκαιρία να φτάσω στο επίπεδο αυτό.

Τέλος ευχαριστώ το τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και το τμήμα Γενετικής του Πανεπιστημίου Εφαρμοσμένων Επιστημών Lullier στη Γενεύη για το επίπεδο των σπουδών που μου προσέφεραν, τη διάθεση των ερευνητικών χώρων και την παραχώρηση των οργάνων για την εκτέλεση των πειραματικού μέρους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Ελληνικές γενετικές πηγές αμπέλου μετρούν περίπου 670 ποικιλίες, μεταξύ των οποίων 300 πιθανόν ακόμη καλλιεργούνται και πολύ λίγα είναι γνωστά για την γενετική τους συγγένεια. Από την άλλη πλευρά, αφήνεται να εννοηθεί από την αρχαία βιβλιογραφία και ιστορία ότι μέρος των σύγχρονων δυτικών Ευρωπαϊκών ποικιλιών ενδεχομένως να έχει προέλευση την Ελλάδα. Όμως είναι επίσης γνωστό ότι δυτικής προέλευσης ποικιλίες εισηχθησαν στην Ελλάδα σε διαφορετικές περιόδους.

Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκαν 47 ποικιλίες *Vitis vinifera* L. ως προς την εξελικτική τους προέλευση. Μεγάλο ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στην προέλευση 17 ποικιλιών Malvasia που φαίνεται να έχουν προέλευση Ιταλική σε σχέση με Ελληνικές *Vitis vinifera* ποικιλίες αμπέλου, συμπεριλαμβανομένων 4 Μαλβαζιών από την Ελληνική συλλογή. Για την αποσαφήνιση της σχέσης αυτών των ποικιλιών χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες 9 μικροδορυφορικοί τόποι. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με 553 ποικιλίες *Vitis vinifera* από διαφορετικές χώρες. Από την στατιστική επεξεργασία των 47 ποικιλιών *Vitis vinifera* τα συνώνυμα που προέκυψαν ήταν τα ίδια με αυτά από τη γενικότερη σύγκριση των 600 συνολικά ποικιλιών.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς η χρήση ρετρομεταθετών στοιχείων (Kalendar *et al.*, 1999), που έδωσε ίδια συνώνυμα με αυτά από τη χρήση μικροδορυφορικών τόπων για την ταυτοποίηση ποικιλιών *Vitis vinifera* με το πλεονέκτημα της αξιοσημείωτης οικονομίας σε χρόνο και κόστος.

Λέξεις Κλειδιά: Μικροδορυφόροι στο αμπέλι, Ρετρομεταθετόνια στη μοριακή ταυτοποίηση ποικιλιών αμπέλου, Μαλβαζίες, Προέλευση ποικιλιών αμπέλου.

ABSTRACT

The Greek genetic resources of grapevine account for about 670 cultivars, among which 300 are probably still cultivated, and very little is known about their genetic relationship. On the other hand it is implied, from the ancient literature and history, that part of the modern Western European cultivars could have originated from Greek cultivars. But it is also true that Western cultivars have been imported in Greece at different periods.

In the present study the origin of 47 *Vitis vinifera* L. cultivars was studied with emphasis on the origin of 17 Malvasia genotypes from Italy in comparison to Greek *Vitis vinifera* cultivars, including 4 Malvasias from Greek collection. In order to clarify the evolutionary relationship of these cultivars, 9 microsatellite loci were used as molecular markers. The results were compared to a list of 553 *Vitis vinifera* cultivars from different countries in order to give a general perspective of the genetic relationship among them. The synonyms obtained from the statistic treatment of the 47 *Vitis vinifera* cultivars were also obtained from the comparison of totally 600 genotypes.

Furthermore, the use of retrotransposable elements was also successfully introduced as a technique (Kalendar *et al.*, 1999), which resulted to similar synonyms when compared to microsatellite profile, for the *Vitis vinifera* cultivar identification, having the advantage of being less cost and time consuming.

Key words: Grapevine Microsatellites, REMAP profiling in grapevine, Malvasia, *Vitis vinifera* L. microsatellites.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ταυτοποίηση ποικιλιών Αμπέλου (<i>Vitis vinifera</i> L.)	9
1.2 Παραδοσιακές μέθοδοι ταυτοποίησης γονοτύπων αμπέλου	12
1.3 Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης γονοτύπων αμπέλου	13
1.4 Μεταθετά στοιχεία	25
1.5 Προηγούμενες μελέτες και σκοπός της παρούσας διατριβής	38
2 Υλικά και Μέθοδοι	41
2.1 Φυτικό Υλικό	41
2.2 Απομόνωση DNA	42
2.3 Ποσοτικός Προσδιορισμός DNA	44
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	46
2.5 Ενίσχυση των ρετρομεταθετονίων πολλαπλών γενετικών τόπων με τη μέθοδο REMAP	53
2.6 Προετοιμασία των προϊόντων PCR για φόρτωση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	55
2.7 Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης	56
2.7.1 Συλλογή και ανάλυση αποτελεσμάτων	60
2.8 Φαινογράμματα	61
3 Αποτελέσματα και Συζήτηση	63
3.1 Γενετική παρουσία μικροδορυφόρων	63
3.2 Γενετική ταυτοποίηση με τη μέθοδο REMAP	89
4 Προοπτικές	97
5 Βιβλιογραφία	101
6 Παράρτημα	117

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ

Η πολυποικιλιακή σύνθεση των παραδοσιακών, κυρίως, αμπελώνων και η πολυκλωνική σύνθεση κάθε μιας από τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου συνθέτουν τη θαυμαστή ποικιλότητα, που χαρακτηρίζει τον ελληνικό αμπελώνα. Από τα μέσα του περασμένου αιώνα, αναπτύχθηκε ο κλάδος της Αμπελογραφίας, και επαναπροσδιορίστηκαν όροι, όπως η ποικιλία, ο κλώνος, ο αμπελότοπος, τα οινοπέδια κ.α. (Κριμπάς, 1943,1944).

Στο είδος *Vitis vinifera* L., την Ευρωπαϊκή Άμπελο, ανήκει ένας μεγάλος αριθμός ποικιλιών. Εννιά χιλιάδες ποικιλίες χωρίς να περιλαμβάνονται οι τύποι, τα συνώνυμα και οι παραλλαγές. Οι Vaila και Vermorel, στην επτάτομη Αμπελογραφία τους που δημοσιεύτηκε το 1910, προσπάθησαν να καταγράψουν το σύνολο όλων των παραπάνω (ποικιλιών, συνωνύμων, παραλλαγών κ.ά.). Σταμάτησαν στον αριθμό είκοσι τέσσερις χιλιάδες και μάλλον δεν εξάντλησαν το θέμα. Στην Ελλάδα, με βάση τις αμπελογραφικές περιγραφές που έχουν γίνει (Κριμπάς, 1943, 1944; Λογοθέτης, 1958) έχουν καταγραφεί περισσότερες από 350 ελληνικές ή ελληνογενούς προέλευσης ποικιλίες αμπέλου, χωρίς να υπολογίζονται οι διάφοροι τύποι, οι παραλλαγές (κυρίως χρωματικές) και προπάντων τα συνώνυμα. Αν συνυπολογιστούν, τότε ο αριθμός πλησιάζει τη χιλιάδα. Πολύ μεγάλος αριθμός για το μικρό μέγεθος του ελληνικού αμπελώνα, που δεν ξεπερνά πλέον (σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του 2002) τα 1.300.000 στρ., σε σύγκριση με τα 80 εκατ. περίπου στρ. του παγκόσμιου αμπελώνα.

Υπάρχουν ελληνικές ποικιλίες, που έχουν 12 ή και περισσότερα συνώνυμα. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν και πολλές ποικιλίες, που αποδίδονται με ένα κοινό όνομα συνοδευόμενο από κάποιο τοπωνύμιο ή κάποιον επιθετικό προσδιορισμό, που σχετίζεται κατά κανόνα με τους χαρακτήρες της σταφυλής. Όταν δύο ή περισσότερα πρέμνα εμφανίζονται διαφορετικά (φαινοτυπική παραλλακτικότητα) τότε ανήκουν σε διαφορετικές ποικιλίες. Οι διαφορές μπορεί να εντοπίζονται στη νεαρή βλάστηση (σχήμα, ύπαρξη χνοασμού κ.α.), στο φύλλο (σχήμα, μέγεθος, αριθμός και σχήμα κόλπων, παρουσία και είδος χνοασμού κ.α.), στο σταφύλι και στη ράγα (σχήμα, μέγεθος, χρώμα κ.α.), ή σε άλλες μορφολογικές διαφορές.

Κάθε νέα ποικιλία δημιουργείται από τη διασταύρωση δύο ποικιλιών. Εξαιτίας όμως του μεγάλου βαθμού γενετικής ετερογένειας, που παρουσιάζουν οι ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου, τα προϊόντα της διασταύρωσης διαφέρουν τόσο μεταξύ τους

όσο και με τα γονεϊκά πρέμνα. Οι απόγονοι ενός και μόνο σποροφύτου, που προήλθε από τη διασταύρωση (τεχνητή ή φυσική) δύο ποικιλιών και που αναπαράγονται με αγενή πολλαπλασιασμό, συνιστούν μία *ποικιλία*. Οι χαρακτήρες όμως όλων αυτών των απογόνων (φυτών) είναι δυνατόν να παραλλάσσουν. Φυτά που έχουν τον ίδιο γενότυπο αποτελούν μια ποικιλία, η οποία μπορεί να αλλοιωθεί μόνο από τη συνεχή συσσώρευση μεταλλάξεων. Με άλλα λόγια, τα φυτά που προέρχονται από ένα και μόνο σπορόφυτο με αγενή πολλαπλασιασμό διακρίνονται από γενετική σταθερότητα. Αυτή ακριβώς η γενετική σταθερότητα αποτελεί τη βάση της *κλωνικής επιλογής*.

Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα, που διακρίνει τις ποικιλίες αμπέλου, δυσχεραίνει την ταυτοποίησή τους. Μπορεί τα φυτά μιας ποικιλίας να προέρχονται από ένα σπορόφυτο και να παραλλάσσουν σε διαφορετικό βαθμό. Ο συνεχής όμως, για εκατοντάδες-χιλιάδες χρόνια, αγενής πολλαπλασιασμός, η συσσώρευση μεταλλάξεων, οι διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και η απουσία ελέγχου της υγιεινής κατάστασης των μητρικών φυτών, επιτείνουν την παραλλακτικότητα, με αποτέλεσμα, εντός μιας και μόνο ποικιλίας να είναι δυνατόν να υπάρχουν ομάδες φυτών με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, που αποκλίνουν από το τυπικό δείγμα. Αυτή η ομάδα αποτελεί τον *κλώνο* και είναι ακριβώς αυτό που αποκαλούμε πολυκλωνική σύνθεση μιας ποικιλίας.

Η πολυκλωνικότητα των ποικιλιών αμπέλου οδήγησε τον Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου (Office Internationale de la Vigne et du Vin, O.I.V.) στην αλλαγή των στόχων και του αντικειμένου της αμπελογραφικής περιγραφής από την Αμπελογραφία των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου στην Αμπελογραφία των ποικιλιών-κλώνων. Οι διαφορές πλέον ποικιλίας και κλώνου είναι εμφανείς. Τα άτομα ενός κλώνου προέρχονται με αγενή πολλαπλασιασμό από ένα και μόνο μητρικό φυτό.

Η διάσωση, η διατήρηση, η αμπελογραφική και γενετική μελέτη, η οινική αξιολόγηση όλων των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου είναι απολύτως αναγκαία προϋπόθεση για την παραγωγή νέων τύπων οίνων αλλά και τη βελτίωση της ποιότητας των ήδη παραγόμενων. Σήμερα, με τις νέες τάσεις και εξελίξεις στον αμπελο-οινικό τομέα, δεν επιτρέπεται η απώλεια (και άλλου) γενετικού υλικού. Αντίθετα, επιβάλλεται ανάληψη πρωτοβουλιών σε εθνικό επίπεδο για τον εντοπισμό, μελέτη και αξιολόγηση των 'ξεχασμένων' ελληνικών ποικιλιών με σκοπό τον εμπλουτισμό του ποικιλιακού δυναμικού της χώρας.

Η κρισιμότητα της οριοθέτησης της καλλιεργούμενης ποικιλίας αμπέλου και η ανάδειξη και χρησιμοποίηση των επιθυμητών κλώνων δικαιολογεί τέλος και το τεράστιο ενδιαφέρον που παρατηρείται την τελευταία εικοσιπενταετία στην παγκόσμια Αμπελουργία, όσον αφορά την ταυτοποίηση, διάκριση, ταξινόμηση και αξιοποίηση των ποικιλιών αμπέλου τόσο με τις νέες κλείδες της Αμπελογραφικής Περιγραφής του O.I.V. και των άλλων συναφών οργανισμών όσο και με τη χρήση των βιοχημικών αλλά κυρίως των μοριακών μεθόδων.

Η καλλιέργεια αμπέλου έχει μακρά παράδοση στην νότια και κεντρική Ευρώπη (This *et al.*, 2006). Γενετική ανάλυση αρχαιολογικών σπόρων θα μπορούσε να δια φωτίσει την ιστορία της Ευρωπαϊκής αμπελοκαλλιέργειας και ποικιλιών αμπέλου (Manen *et al.*, 2003). Η ιστορία εξημέρωσης υφιστάμενων ποικιλιών αμπέλου, κάποιες από τις οποίες ενδεχομένως να χρονολογούνται πίσω στη Ρωμαϊκή εποχή (Vouillamoz *et al.*, 2007b) είναι ακόμη υπό εξακρίβωση. Μια συγκριτική μελέτη ποικιλιών αμπέλου από Ευρωπαϊκές καλλιεργητικές περιοχές από την Ελλάδα έως την Πορτογαλία (Sefc *et al.*, 2000) έδειξε μια ομοιόμορφη γενετική παραλλακτικότητα σε όλες τις μελετούμενες γονιδιακές δεξαμενές αμπέλου (Aradhya *et al.*, 2006). Ο υψηλός αριθμός ετερόζυγων ατόμων μέσα στις γονιδιακές δεξαμενές ξεπέρασε τον αναμενόμενο βαθμό ετεροζυγωτίας, με βάση τυχαίο αριθμό αλληλομόρφων.

Στην Ελλάδα, εκτιμάται ότι σήμερα καλλιεργούνται περίπου 300 ποικιλίες, ενώ άλλες 500 ποικιλίες δευτερεύουσας σημασίας, βρίσκονται σε αμπελογραφικές συλλογές στην Κρήτη, στην Αθήνα και στη Θεσσαλονίκη, δίνοντας ένα σύνολο περίπου 800 ποικιλιών (Kotinis, 1985, Lefort and Roubelakis-Angelakis, 2001, Greek Vitis Database, www.biology.uoc.gr/gvd). Το γεγονός ότι η άμπελος εμφανίζεται στην Ελλάδα από την αρχαιότητα καθώς και η χρησιμοποίηση πολλαπλών συνωνύμων και τοπωνυμίων για την ίδια ποικιλία, καθιστά δύσκολη τη γενετική ταυτοποίησή τους. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η αποσαφήνιση, τόσο της προέλευσης των ποικιλιών αμπέλου όσο και της ταυτοποίησής τους με σκοπό την εξάλειψη των συνωνύμων και την ενιαία ονομασία τους για τη διασφάλιση της γνησιότητάς τους.

1.2 Παραδοσιακές Μέθοδοι Ταυτοποίησης Γονοτύπων Αμπέλου (*Vitis vinifera* L.)

Μέχρι τη δεκαετία του '70 η ταυτοποίηση των γονοτύπων *Vitis* γινόταν κυρίως με χρήση αμπελογραφικών χαρακτήρων. Όμως, η αμπελογραφική ταυτοποίηση έχει σοβαρά μειονεκτήματα, όπως η υποκειμενικότητα και η δυσχέρεια σύγκρισης αποτελεσμάτων μεταξύ των ερευνητών, που μειώνουν την αποτελεσματικότητά της. Επίσης απαιτείται η χρήση νωπών δειγμάτων, που δυσχεραίνει το έργο των αμπελογράφων. Πιο συγκεκριμένα, οι παραδοσιακές αμπελογραφικές και αμπελομετρικές μέθοδοι, που χρησιμοποιούνταν για τη μελέτη της ταυτοποίησης και διαφοροποίησης των ποικιλιών, στηρίζονται σε μορφολογικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών. Οι μέθοδοι αυτές όμως υπόκεινται στους παρακάτω περιοριστικούς παράγοντες:

- ✚ Μπορούν να εφαρμοστούν μόνο σε νωπά δείγματα.
- ✚ Οι φαινότυποι των φυτών επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Διαφορετικά περιβάλλοντα μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στις θεωρούμενες, βάσει της Αμπελομετρίας, δομές.
- ✚ Ο συνολικός αριθμός των ποικιλιών αμπέλου σε αμπελογραφικές συλλογές σε όλο τον κόσμο υπολογίζεται ότι είναι πάνω από 15000 και ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων ποικιλιών είναι πολύ μεγάλος. Ακόμα κι αν τα φυτά βρίσκονται σε άριστες συνθήκες, είναι πάρα πολύ δύσκολο να διαχωριστούν οι ποικιλίες μόνο βάσει μορφολογικών διαφορών.
- ✚ Η υποκειμενικότητα και η δυσχέρεια σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ των ερευνητών δυσχεραίνει την αποτελεσματικότητα της αμπελογραφικής ταυτοποίησης.

Για τους παραπάνω λόγους, προέκυψε η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων για την ταυτοποίηση ποικιλιών.

Η χρήση διαφόρων ενζυματικών συστημάτων για ισοενζυματική ανάλυση των ποικιλιών αμπελιού, μελετήθηκε από αρκετούς ερευνητές (Schaefer, 1971; Stavrakakis and Loukas, 1983; Calo *et al.*, 1989; Eiras-Dias *et al.*, 1989; Benin *et al.*, 1998). Όμως η έκφραση των γονιδίων/ενζύμων εξαρτάται από το μελετούμενο όργανο/ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Μόνο τα ενζυματικά συστήματα που δεν εμφανίζουν μεταβολές σε διαφορετικές συνθήκες, μπορούν να θεωρηθούν ισοενζυματικοί δείκτες. Αυτό περιορίζει τον αριθμό των διαθέσιμων δεικτών και επακόλουθα μειώνει τον βαθμό πολυμορφισμού και διαφοροποίησης, που αναδεικνύει η ισοενζυματική ανάλυση (Parfit and Arulsekar, 1989, Walter *et al.*,

1989). Ως πρακτικής φύσης μειονέκτημα, αναφέρεται και η απαίτηση χρήσης φρέσκου φυτικού υλικού σε ταυτόσημα αναπτυξιακά στάδια. Τα τελευταία είκοσι χρόνια αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές για τον μοριακό χαρακτηρισμό των γονοτύπων (Karp *et al.*, 1998), οι περισσότερες εκ των οποίων έχουν εφαρμοστεί στη μελέτη της διαφοροποίησης ποικιλιών αμπέλου.

1.3 Μοριακές Μέθοδοι Ταυτοποίησης Γονοτύπων Αμπέλου (*Vitis vinifera* L.)

Το DNA κάθε οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, είναι ταυτόσημο σε όλα τα κύτταρα κάθε ιστού και σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Το DNA μπορεί να απομονωθεί από κάθε διαθέσιμο ιστό και να αναλυθεί οποιαδήποτε στιγμή. Τα χαρακτηριστικά του DNA δεν επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης των φυτών, επομένως, η ανάλυσή του είναι απαλλαγμένη από διαφόρων ειδών εξωτερικούς περιορισμούς.

Ως γνωστόν, όλες οι γενετικά καθοριζόμενες διαφορές μεταξύ των ατόμων αποτελούν αντανάκλαση των αλλαγών που έχουν υποστεί οι αλληλουχίες του DNA. Οι αλλαγές αυτές σε γονιδιακό επίπεδο μπορούν να προσδιορισθούν είτε απευθείας μέσω της ανάλυσης του DNA είτε έμμεσα μέσω των γονιδιακών προϊόντων ή μεταβολιτών (αλλαγές σε δομικές πρωτεΐνες, ένζυμα, ή μεταβολίτες). Όλα τα παραπάνω μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για την ταυτοποίηση φυτών και ποικιλιών.

Μοριακοί σημαντές

Ως μοριακός σημαντής καλείται μία αλληλουχία του DNA ή μιας πρωτεΐνης, που μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί και να παρακολουθηθεί η μεταβίβασή της στις επόμενες γενεές. Αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, που παρατηρούνται αρκετά συχνά, καλούνται DNA *πολυμορφισμοί αλληλουχίας* και αποτελούν την μοριακή βάση για τον γενετικό καθορισμό διαφορών μεταξύ των ατόμων. Αυτοί μπορούν να διαιρεθούν στις εξής ομάδες:

Πολυμορφισμοί στο DNA

Οι πολυμορφισμοί στο DNA μπορεί να προκύψουν με διάφορους μηχανισμούς και είναι:

✚ Πολυμορφισμοί ζεύγους βάσεων: αλλαγές, προσθήκη ή διαγραφή μιας βάσης.

✚ Αναδιάταξη μιας αλληλουχίας DNA: εξάλλειψη, ένθεση, αναστροφή ή διπλασιασμός ενός τμήματος DNA.

✚ Πολυμορφισμοί επέκτασης: επαναλήψεις ενός συγκεκριμένου μοτίβου αλληλουχίας (μία έως λίγες βάσεις για κάθε μονάδα). Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλότητα στον αριθμό των επαναλήψεων. Οι αλληλουχίες αυτές καλούνται VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) ή μινιδουροφωρικές αλληλουχίες. Οι δείκτες VNTR χαρακτηρίζονται από μια κεντρική αλληλουχία που αποτελείται από έναν αριθμό ταυτόσημων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες βάσει του μήκους της επαναληπτικής μονάδας, τους μινιδουροφόρους (15-70 ζεύγη βάσεων - base pairs - bp) και τους μικροδορυφόρους (2-6 bp).

Το μεγάλο πλεονέκτημα των πολυμορφισμών του DNA, εκτός από την υψηλή συχνότητά τους, είναι ότι δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ανάλυσή τους μπορεί να γίνει με DNA από οποιοδήποτε φυτικό όργανο/ιστό και κατά την διάρκεια οποιοδήποτε αναπτυξιακού σταδίου του φυτού.

Οι τεχνικές που ανιχνεύουν πολυμορφισμούς του DNA αυξάνονται συνεχώς και στηρίζονται σε διαφορετικούς τύπους ηλεκτροφορετικών ζωνών. Αυτές είναι αποτέλεσμα διαφορών στο μήκος των παρατηρούμενων τμημάτων του DNA, που προκύπτουν:

✚ Από πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLPs, CAPS, Microsatellites)

✚ Με ενίσχυση μέσω εκκινητή (PCR, White *et al.*, 1989) των DNA αλληλουχιών (RAPD, Microsatellites).

✚ Με συνδυασμό των δύο παραπάνω μεθόδων (AFLPs).

Τα παραπάνω τμήματα μπορούν να γίνουν ορατά μέσω χρώσης αργύρου, με φθορισμό βρωμιούχου αιθιδίου, με αυτοραδιογραφία ή μη ραδιενεργή ανίχνευση (Sambrook *et al.*, 1989). Ανάλογα με τους εκκινητές ή τους σημαντές, που χρησιμοποιούνται, λαμβάνονται απλά (μία ή λίγες ζώνες) ή περισσότερο σύνθετα πρότυπα.

Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLP)

Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχουν αναπτυχθεί μοριακοί σημαντές DNA, όπως είναι οι RFLPs (Random Fragment Length Polymorphism) και RAPDS (Random Amplified Polymorphic DNA; This *et al.*, 1997, Ye *et al.*, 1998, κ.α.), για τη γενετική

ταυτοποίηση των ποικιλιών *Vitis*. Όμως, ακόμα και οι μέθοδοι αυτές δεν κατάφεραν να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς δεν επιτρέπουν την διάκριση όλων των ποικιλιών, για τις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί. Επιπρόσθετα, οι παραπάνω μέθοδοι είναι αρκετά χρονοβόρες και έχουν υψηλό κόστος.

Σε μία κλασική RFLP ανάλυση το γενωμικό DNA πέπτεται σε τμήματα διαφόρων μηκών από μία συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος, και να μεταφερθούν σε κατάλληλο για υβριδοποίηση φίλτρο. Μετά την υβριδοποίηση, με τη χρήση ειδικού σημαντή, τα τμήματα του DNA μπορούν να γίνουν ορατά. Στα RFLPs ο πολυμορφισμός οφείλεται σε αλλαγή στην αλληλουχία αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας θέσης περιορισμού ή την απώλεια μιας υπάρχουσας, έτσι ώστε να αλλάζουν τα μεγέθη των ζωνών που προκύπτουν από την πέψη με το ένζυμο περιορισμού. Οι γενετικοί δείκτες αυτού του είδους έχουν δύο αλληλόμορφα (απουσία ή παρουσία της θέσης περιορισμού) και επομένως, δεν είναι αρκετά πολυμορφικοί για τη γενετική χαρτογράφηση.

Τυχαίο Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPD)

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό μέσω PCR συγκεκριμένων γενωμικών τμημάτων χρησιμοποιώντας μόνο έναν εκκινητή μικρού μήκους και χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης. Ο εκκινητής μπορεί να προσδεθεί σε διαφορετικές θέσεις, διασκορπισμένες στο γονιδίωμα. Οι πολυμορφισμοί RAPD οφείλονται σε αλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών ή στην απόσταση μεταξύ τους. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της παραπάνω μεθόδου αποτελεί η χαμηλή επαναληψιμότητα, καθώς και το γεγονός ότι οι ζώνες RAPD κληρονομούνται με επικρατή τρόπο. Έτσι σε κάθε περίπτωση μόνο ένα από τα δύο αλληλόμορφα ανιχνεύεται.

Η μετατροπή των πολυμορφικών RAPDs δεικτών σε δείκτες SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), με τη χρήση ειδικών PCR δεικτών, επιτρέπει την ανάδειξη των RAPD πολυμορφισμών, με αρκετά καλό βαθμό επαναληψιμότητας (Bauer and Zyprian, 1997). Η ευρύτερη ανάπτυξη των SCARs από RAPDs δείκτες για γενετική ταυτοποίηση, περιορίστηκε σημαντικά από την εμφάνιση των μικροδορυφορικών δεικτών. Οι RAPDs δείκτες μετατρέπόμενοι σε SCARs εξακολουθούν να παραμένουν χρήσιμοι για την χαρτογράφηση του γονιδιώματος, όταν

συνδυάζονται με ένα συγκεκριμένο φαινότυπο (Lahogue *et al.*, 1998; This *et al.*, 2000).

Επειδή καμιά από τις παραπάνω μεθοδολογίες δεν πληρούσε τις προϋποθέσεις ενός ιδανικού συστήματος ταυτοποίησης, η έρευνα καταλληλότερων μοριακών δεικτών οδήγησε στους μικροδορυφορικούς σημαντές, οι οποίοι έχοντας ήδη μελετηθεί σε ζωντανούς οργανισμούς (και τον άνθρωπο), αναπτύχθηκαν επίσης και στο αμπέλι.

Μικροδορυφορικοί Σημαντές

Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων απλών αλληλουχιών (π.χ. CACACA...) στο φυτικό πυρηνικό DNA δείχτηκε από τον Delseny *et al.* (1983). Απλές αλληλουχικές επαναλήψεις (μικροδορυφόροι) ήταν συχνές στους περισσότερους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών και οργανιδικών γενωμάτων (Lagercrantz *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994), οι οποίες αναπαριστούν μία σημαντική πηγή γενετικής ποικιλότητας (Tautz *et al.*, 1986), χρήσιμη για την μελέτη της γενετικής των φυτών (Morgante and Olivieri, 1993).

Μεταξύ των τριών υποομάδων του επαναληπτικού DNA (satellite DNA, minisatellites and microsatellites; Tautz, 1993), οι μικροδορυφορικοί (microsatellites) σημαντές δείχνουν τον μικρότερο βαθμό επαναληψιμότητας. Οι μικροδορυφόροι απαντώνται στη βιβλιογραφία ως single sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR), simple sequence length polymorphisms (SSLP) ή variable numbers of tandem repeats (VNTRs) και αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις, που χαρακτηρίζονται από βραχεία μοτίβα (1 έως 6 bp), μικρό βαθμό επαναληψιμότητας (5 έως 100 επαναλήψεις) και τυχαία κατανομή στο γονιδίωμα (10^4 με 10^5 ανά γονιδίωμα).

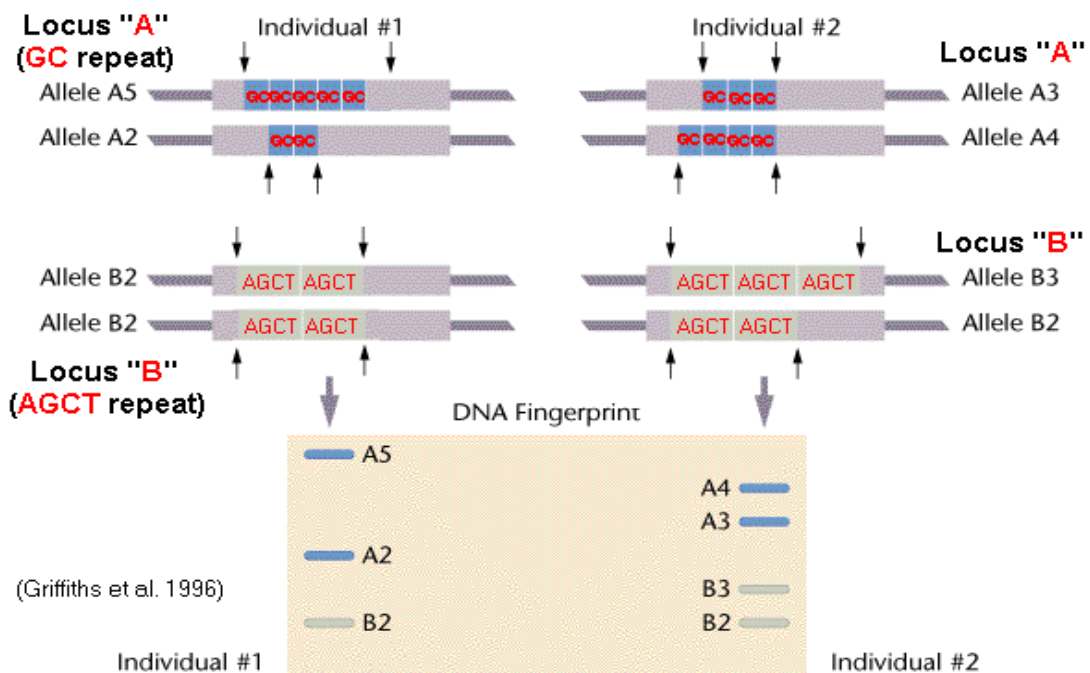
Παρ' ότι ορισμένοι απαντώνται συχνά σε μεταγραφικές μονάδες, καμία συγκεκριμένη λειτουργία δεν έχει αποδοθεί στους μικροδορυφόρους και ίσως διατηρούνται αποκλειστικά χάρη στην ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και να εξαπλώνονται στο γονιδίωμα εντός των ορίων, που καθορίζονται από την αρνητική πίεση επιλογής στην απώλεια προσαρμοστικότητας, που ενδέχεται να προκαλέσουν.

Τα τελευταία χρόνια η δημιουργία και η διάθεση ενισχυμένων αποτυπωμάτων DNA, που απεικονίζονται ως ξεχωριστά μητρικά θραύσματα διαφορετικών ατόμων, έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά πολύτιμα σε εφαρμογές στην εγκληματολογία, στη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων και στην βιοποικιλότητα των οργανισμών. Σημαντικά υψηλός πολυμορφισμός επιτρέπει στις συστατικές ζώνες του αποτυπώματος να

λειτουργούν ως γενετικοί σημαντές, με τον ανασυνδυασμό και τη διάσχιση των σημαντών να χρησιμοποιούνται στην κατασκευή γενετικών χαρτών. Αυτοί οι μοριακοί σημαντές έχουν αποδειχθεί ανώτεροι τόσο από τους βιοχημικούς (πρωτεΐνες) όσο και από φαινοτυπικούς δείκτες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό πολυμορφισμού, έλλειψη επαρκών τόπων ώστε να παράγουν πυκνούς χάρτες και έλλειψη περιβαλλοντικής ποικιλότητας έκφρασης.

Οι τεχνικές που στηρίζονται στο DNA βασίζονται είτε στην ανίχνευση γενωμικών ακολουθιών, πολυμορφικών για τις εσωτερικές περιοριστικές θέσεις με υβριδισμό κλωνοποιημένων ιχνηλατών (probes), όπως στην περίπτωση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP) (Bolstein *et al.*, 1980), είτε στον πολλαπλασιασμό μεταξύ τυχαίων εκκινητών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), όπως στην περίπτωση τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990), ή στον πολλαπλασιασμό μεταξύ απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ή μικροδορυφόρων (ISSR) (Zeitkiewicz *et al.*, 1989). Η μέθοδος πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) είναι ουσιαστικά ένα υβρίδιο, που βασίζεται στον πολυμορφισμό όσον αφορά στις θέσεις πρόσδεσης περιοριστικών ενζύμων αλλά χρησιμοποιώντας προσαρμοστές και εκκινητές προσαρμοστών ώστε να αποτρέψουν την ανάγκη για γνώση των αλληλουχιών για την ανίχνευση πολυμορφισμού (Kalendar *et al.*, 1999). Στην άμπελο επίσης, αυτοί οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται εκτενώς (Fanizza *et al.*, 2003), ενώ πιο συγκεκριμένα οι μικροδορυφορικοί δείκτες εμφανίζονται αξιοσημείωτα πιο ισχυροί (Sefc *et al.*, 2001).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροδορυφόροι είναι χρωματοσωμικές περιοχές στις οποίες ένα μοτίβο αλληλουχίας του DNA (όπως το GC ή AGCT) επαναλαμβάνεται ποικίλες φορές σε μια συγκεκριμένη θέση (τυχαίες επαναλήψεις). Στην παρακάτω εικόνα (Εικ.1), ο τύπος A είναι μια τυχαία επανάληψη του μοτίβου GC: υπάρχουν τέσσερα αλληλόμορφα, με δυο, τρεις, τέσσερις ή πέντε επαναλήψεις (A2, A3, A4 και A5, αντίστοιχα). Ο τύπος B είναι μια τυχαία επανάληψη του μοτίβου AGCT: υπάρχουν δυο αλληλόμορφα, με δυο ή τρεις επαναλήψεις (B2 και B3, αντίστοιχα). Ένα αποτύπωμα DNA που εξετάζει και τους δυο τύπους ταυτόχρονα προετοιμάζεται. Το άτομο #1 είναι ετερόζυγο στον τύπο A (A2/A5) και ομόζυγο στον τύπο B (B2/B2: ως σημειωθεί ότι αυτός ο γονότυπος δίνει μία μόνο ζώνη φαινοτύπου στο αποτύπωμα). Το άτομο #2 είναι ετερόζυγο και στους δυο τύπους: (A4/A3 και B3/B2) αντίστοιχα). Τα δυο άτομα είναι διακριτά σε κάθε τύπο.



Εικ. 1: Μικροδορυφορικοί αλληλόμορφοι (www.mun.ca/biology/scarr/VNTR_fingerprint_2.gif)

Τα τελευταία χρόνια οι μικροδορυφόροι έχουν επικρατήσει ανάμεσα στους διάφορους τύπους γενετικών δεικτών που χρησιμοποιούνται στη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ στενά σχετιζόμενων ατόμων ή πληθυσμών. Ο πρωταρχικός λόγος που τους κάνει δημοφιλείς, είναι ότι συχνά υπάρχει μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων σε ένα μόνο τόπο, ακόμη και μέσα σε ένα πληθυσμό. Ο χαρακτήρας, ο οποίος υπολογίζεται πειραματικά, είναι ο αριθμός των επαναλήψεων. Τα χαρακτηριστικά υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού πηγάζουν από έναν υπερβολικά υψηλό βαθμό μετάλλαξης. Στον άνθρωπο εκτιμάται ότι είναι 5.6×10^{-4} για μια σειρά 15 μικροδορυφορικών τόπων (Weber and Wong, 1993).

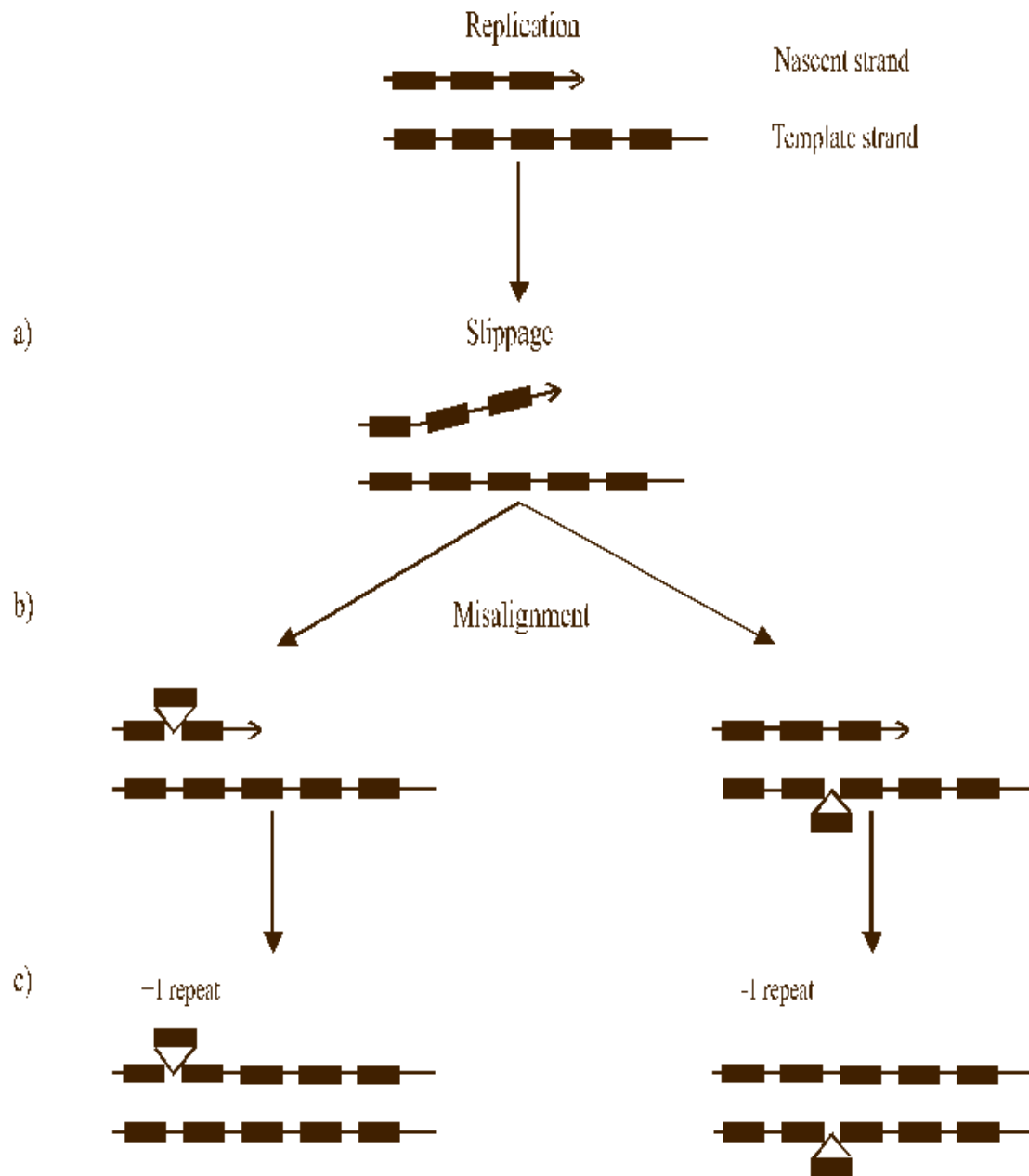
Ενώ ο διαχωρισμός ποικιλιών θα μπορούσε να επιτευχθεί επιτυχώς με μικροδορυφορικούς δείκτες, οι πολυμορφισμοί των μικροδορυφόρων ανάμεσα σε διαφορετικούς κλώνους μιας ποικιλίας σπάνια παρατηρούνται (π.χ. Tschera *et al.*, 2004). Η παρατήρηση αυτή συνηγορεί στη σωματική σταθερότητα των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων μετά από μακρές περιόδους αγενούς αναπαραγωγής αρχαίων ποικιλιών αμπέλου (Zulini *et al.*, 2005). Πράγματι, όταν οι κλώνοι μιας ποικιλίας χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς μικροδορυφορικούς αλληλομόρφους σε διάφορους από τους αναλυθέντες τόπους, η ποικιλία τυπικά θεωρείται πολυκλωνικής προελεύσεως, δηλαδή αποτελείται από διαφορετικές

ποικιλίες, οι οποίες ενδεχομένως να είναι στενά συνδεδεμένες (Vignani *et al.*, 1996; Silverstroni *et al.*, 1997; Cabezas *et al.*, 2003; Zulini *et al.*, 2005). Ωστόσο, σωματικές μεταλλάξεις μικροδορυφόρων συμβαίνουν και παράγουν πολυμορφισμό μέσα σε μία ποικιλία. Περιστασιακά, τέτοιες μεταλλάξεις έχουν ανιχνευθεί στην ανακατασκευή φυλογενετικών δένδρων αμπέλου (Vouillamoz *et al.*, 2003, 2004). Πιο συχνά, οι σωματικές μεταλλάξεις ανιχνεύονται με ανάλυση μεγάλου αριθμού κλώνων και μικροδορυφορικών τόπων. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι διαφορετικοί τύποι εκφράστηκαν ως τρεις αλληλόμορφοι, φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε επίσης σε άλλες μελέτες (Franks *et al.*, 2002; Bertsch *et al.*, 2003; Hocquigny *et al.*, 2004; Zulini *et al.*, 2005; Moncada *et al.*, 2006).

Η διαδικασία της μετάλλαξης στους μικροδορυφόρους δείχνει να εμπεριέχει την ολίσθηση των αλυσίδων DNA κατά την διάρκεια της αντιγραφής (Εικ.2) συνήθως κατά μία επανάληψη (Schlötterer and Tautz, 1992). Κάτι τέτοιο υποδεικνύει ότι η διαδικασία της μετάλλαξης μπορεί να μοντελοποιηθεί μέσω ενός σταδιακού προτύπου, που προτάθηκε αρχικά (Ohta and Kimura, 1973) προκειμένου για ηλεκτροφορετικές παραλλαγές, μολονότι γενικά θεωρείται ακατάλληλο γι' αυτό το σκοπό (Nei, 1987). Η ιδιότητα της σταδιακής μετάλλαξης (stepwise mutation) έχει ως συνέπεια μεγάλο μέρος της βασικής θεωρίας της πληθυσμιακής γενετικής να μην είναι άμεσα εφαρμόσιμο σε δεδομένα μικροδορυφορικών τόπων (Pritchard and Feldman, 1996). Ο πολυμορφισμός μήκους απλών αλληλουχιών, που προκύπτει από την παραλλαγή στον αριθμό των μονάδων επαναλήψεων, μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί με την μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένων από μοναδικές αλληλουχίες, που περιβάλλουν τις περιοχές μέσα στις οποίες βρίσκονται μικροδορυφόροι.

Η κατανόηση της διαδικασίας της μετάλλαξης είναι ουσιαστική πριν αναφερθούν οι σχέσεις μεταξύ παρατηρούμενων παραλλαγών και γενετικής απόστασης ή πληθυσμιακής υποκατασκευής. Οι περισσότερες από τις εκτιμήσεις αυτών των σχέσεων αναπτύχθηκαν βασιζόμενες στην ερμηνεία της παραλλακτικότητας των αλλοζύμων. Στα αλλοένζυμα, θεωρήθηκε ότι οι περισσότερες νέες μεταλλάξεις έδωσαν υπόσταση σε νέους διακριτούς αλληλομόρφους. Επιπροσθέτως, η ηλεκτροφορετική κινητικότητα, με βάση την οποία έχουν προσδιορισθεί οι αλληλόμορφοι, δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της μεταλλακτικής σχέσης μεταξύ των αλληλομόρφων. Αυτή η διαδικασία μοντελοποιήθηκε από ένα Πρότυπο Άπειρων Αλληλομόρφων (Infinite Allele Model,

IAM), στο οποίο κάθε νέα μετάλλαξη θεωρείται ότι δίνει υπόσταση σε ένα νέο ηλεκτροφορητικά διακριτό αλληλόμορφο (ή ηλεκτρομορφή).



Εικ. 2 : Πρότυπο διαδικασίας μετάλλαξης σε μικροδορυφορικό τόπο a) ολίσθηση DNA πολυμεράσης κατά τη διάρκεια αντιγραφής, b) εσφαλμένη στοίχιση της οδηγού αλληλουχίας ή της νέας αντεγραμμένης αλυσίδας και c) συνέχιση της αντιγραφής. Οι αλυσίδες του DNA απεικονίζονται ως γραμμές, οι επαναλαμβανόμενες μονάδες ως μικρά κουτιά και η κατεύθυνση της αντιγραφής από μικρά βέλη.

(Hercules oulu.fi/isbn9514259146/html/c101.html)

Είναι φανερό ότι κάποια ομοπλασία (π.χ. μια ηλεκτρομορφή η οποία συνίσταται από δυο ή περισσότερους αλληλομόρφους) υπάρχει στους αλλοενζυμικούς σημαντές, ωστόσο το IAM έχει αποδειχθεί πολύ επιτυχημένο στην επεξήγηση των παρατηρούμενων αλλοενζυμικών παραλλαγών (Nei, 1987). Η

κατάσταση είναι πολύ διαφορετική στην περίπτωση των μικροδορυφορικών σημαντών. Οι περισσότερες μεταλλάξεις φαίνεται να περιλαμβάνουν την απόκτηση ή την απώλεια μιας μονάδας επανάληψης (Weber and Wong, 1993), ενώ είναι σαφές πως υπάρχει υψηλό ποσοστό ομοπλασίας. Αυτό είναι σημαντικό καθώς η ομοπλασία οδηγεί στην υποτίμηση του συνολικού ποσού παραλλαγής και της γενετικής απόστασης και στην υπερτίμηση των ομοιοτήτων μεταξύ πληθυσμών.

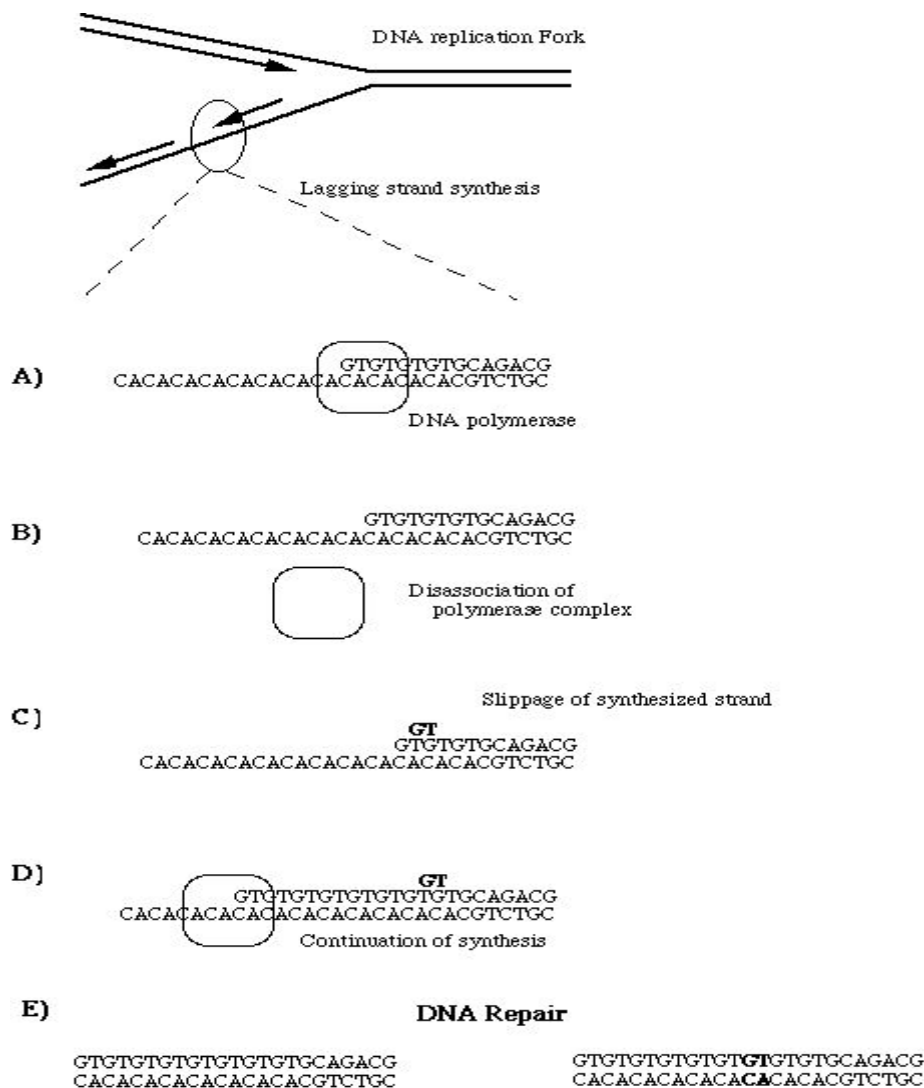
Το μοντέλο βηματικής μετάλλαξης χρησιμοποιείται για την προσομοίωση της κατάστασης. Στο μοντέλο αυτό οι αλληλόμορφοι μπορούν να μεταλλάσσονται μόνο με την προσθήκη ή απώλεια μίας μονάδας επανάληψης. Τα δύο αυτά μοντέλα, IAM και SMM, αντιπροσωπεύουν τα άκρα των περιπτώσεων. Στο IAM δεν υφίσταται καμία ομοπλασία, ενώ στο SMM, υπάρχει μεγάλο ποσοστό ομοπλασίας.

Οι μικροδορυφόροι εκτιμάται ότι μεταλλάσσονται σε τέτοιο ρυθμό ώστε να συμβαίνουν 10^3 και 10^5 μεταλλάξεις ανά γαμέτη (Edwards *et al.*, 1992; Bowcock *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995). Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροδορυφόροι μεταλλάσσονται δεν είναι αρκετά κατανοητοί. Δυο κύριοι μηχανισμοί έχουν προταθεί, οι οποίοι μπορεί να δρουν παράλληλα: 1) η άνιση διάσχιση κατά τη μείωση και 2) η ολίσθηση αλυσίδας κατά την αντιγραφή (Levinson and Gutman, 1987a). Από αυτούς, ο δεύτερος φαίνεται να είναι ο κυρίαρχος (Wolf *et al.*, 1989).

Η ολίσθηση της αλυσίδας πιστεύεται ότι συμβαίνει αρχικά κατά την σύνθεση της καθυστερημένης αλυσίδας (Schlötterer and Tautz, 1992). Για παράδειγμα, μπορεί να εμπεριέχει την ολίσθηση της νέας συντιθέμενης DNA αλυσίδας πάνω στον διαχωρισμό ενός συμπλόκου πολυμεράσης. Αυτή η ολίσθηση δημιουργεί ένα παροδικό εξόγκωμα, το οποίο κατά την επιδιόρθωση του DNA μπορεί είτε να απομακρυνθεί ή να οδηγήσει στην επιμήκυνση της επανάληψης (Schlötterer and Tautz, 1992). Εναλλακτικά, η διαμόρφωση ενός παροδικού εξογκώματος πάνω στη πρότυπη αλυσίδα μπορεί να οδηγήσει στην περικοπή της επανάληψης (Εικ.3).

Οι μικροδορυφόροι χρησιμοποιούνται ευρέως ως γενετικοί σημαντές είναι άφθονοι και διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών και επιπλέον εκφράζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού αλληλομόρφων. Στα φυτά, οι SSR σημαντές έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στην επίλυση ποικίλων ερωτημάτων συμπεριλαμβανομένης της κατασκευής γενετικών χαρτών (Bell and Ecker, 1994; Akagi *et al.*, 1996), την εκτίμηση γενετικής ποικιλομορφίας (Cho *et al.*, 2000), καθώς επίσης την αναγνώριση ποικιλιών και τη μελέτη γενεαλογικών δένδρων ή δενδρογραμμάτων (Gupta *et al.*, 1996).

Προηγούμενες μελέτες πάνω στο ρύζι έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη πολλών εκατοντάδων μικροδορυφορικών σημαντών και ενός γενετικού χάρτη αποτελούμενου από 320 SSRs (Wu and Tanksley, 1993; Akagi *et al.*, 1996; Panaud *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 2000). Οι δείκτες αυτοί έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση ποικιλομορφίας (Yang *et al.*, 1994; Olufowote *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2000; Harrington, 2000) και στον προσδιορισμό θέσης γονιδίων και QTLs στα χρωματοσώματα ρυζιού, χρησιμοποιώντας τόσο ενδοειδικές όσο και διαειδικές διασταυρώσεις (Xiao *et al.*, 1998; Bao *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000; Bres-Party *et al.*, 2001; Moncada *et al.*, 2001).



Εικ.3: Τρόποι μετάλλαξης των μικροδορυφορικών δεικτών (<http://helix.Biology.mcmaster.ca/brent/strand-slip.JPG>).

Οι De Andres *et al.*, (2007) αναφέρουν πολυάριθμες λανθασμένα ταξινομημένες προσβάσεις σε Ευρωπαϊκές συλλογές φυτικού υλικού υποκειμένων, οι

οποίες αποσαφηνίστηκαν με μικροδορυφορική ανάλυση. Πολλές ερευνητικές ομάδες έδειξαν ενδιαφέρον στην γονοτυπική ανάλυση αμπέλου με μικροδορυφορικούς δείκτες, με αποτέλεσμα να έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός δεικτών (π.χ. Bowers *et al.*, 1996, 1999b; Sefc *et al.*, 1999, Arroyo-Garcia *et al.*, 2004; Adam-Blondon *et al.*, 2004; Di Gaspero *et al.*, 2005; Merdinoglu *et al.*, 2005; Goto-Yamamoto *et al.*, 2006). Έτσι, οι μικροδορυφορικοί δείκτες κρίνονται ολοένα και πιο χρήσιμοι για την ολοκλήρωση των γενετικών, φυσικών και βασιζόμενων σε αλληλουχίες χαρτών και ταυτόχρονα παρέχουν σε παραγωγούς και γενετιστές ένα ουσιαστικό εργαλείο σύνδεσης φαινοτυπικών και γονοτυπικών παραλλαγών (Temnykh *et al.*, 2001).

Η γενετική απόσταση, υπολογιζόμενη με βάση την διανομή των αλληλόμορφων γονιδίων και την απόκλιση μεγέθους (Goldstein and Pollock, 1997), ταιριάζει επίσης σε διαειδικές και ενδοειδικές φυλογενετικές αναλύσεις, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Ατομικοί τόποι δύνανται να τοποθετηθούν πάνω σε έναν φυσικό χάρτη με PCR σε πολυδιάστατες δεξαμενές κλώνων τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (BAC-Bacterial Artificial Chromosome) (Whisson *et al.*, 2001) ή πάνω σε έναν γενετικό χάρτη με σήμανση των αλληλομόρφων σε ήδη υπάρχοντες πληθυσμούς χαρτογράφησης (Van der Lee *et al.*, 1997).

Ωστόσο είναι εντυπωσιακή η απουσία επιτυχημένης εφαρμογής στην φυλογενετική ανακατασκευή (Pollock *et al.*, 1998). Με άλλα λόγια, οι SSRs δεν είναι τόσο χρήσιμοι σε φυλογενετικές μελέτες, που περιλαμβάνουν διαφορετικά είδη ή γένη, επειδή η απόκλιση των αλληλουχιών, που συσσωρεύεται με τον εξελικτικό χρόνο, επηρεάζει τις περιοχές επαναδιάταξης των εκκινήτων και ο υψηλός βαθμός εξέλιξης των αλληλουχιών εμποδίζει τη σύγκριση αλληλουχιών και του μεγέθους των αλληλομόρφων πάνω από το επίπεδο του είδους (Powell *et al.*, 1996).

Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για το αποτέλεσμα συνδυασμού δυο πολύπλοκων παραγόντων: (1) της ύπαρξης μιας σειράς περιορισμών, που μειώνει το μέγεθος των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, και (2) του εκφυλισμού των μικροδορυφορικών τόπων με το πέρασμα του χρόνου. Προκαταρκτικές μελέτες υποδεικνύουν ότι καμιά φορά ο δεύτερος καθιστά δύσκολη την εύρεση μικροδορυφόρων, οι οποίοι είναι πολυμορφικοί, σε πολλαπλά είδη (Shriver *et al.*, 1995; Garza *et al.*, 1995; Goldstein and Clark, 1995), μολονότι σε άλλες περιπτώσεις οι πολυμορφικοί μικροδορυφόροι μπορούν να αντέξουν σε σημαντικές φυλογενετικές παρεκκλίσεις (Fitzsimmons *et al.*, 1995; Rico *et al.*, 1996). Προκειμένου να διευκολυνθεί η χρήση των μικροδορυφόρων στην φυλογενετική ανακατασκευή,

πρέπει να μελετηθεί συστηματικά η εξάρτηση του ρυθμού εκφυλισμού των μικροδορυφόρων από τον τύπο του μικροδορυφόρου και τη γενωμική θέση.

Στο παρελθόν τα πλεονεκτήματα των μικροδορυφορικών σημαντών αντισταθμίζονταν μερικώς από την εγγενή δυσκολία στην ανάπτυξη δεικτών, καθώς απαιτούνταν επίμοχθες επαναλήψεις ελέγχου γενωμικών βιβλιοθηκών DNA με SSR ιχνηθέτες για την απομόνωση αλληλουχιών που περιείχαν μικροδορυφόρους (Panaud *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Οι διαθέσιμες τυχαίες EST αλληλουχίες στο ρύζι, παρείχαν μια νέα πηγή SSR σημαντών (Akagi *et al.*, 1996; Temnykh *et al.*, 2000) αλλά η χρωματοσωματική θέση αυτών των σημαντών έπρεπε να καθοριστεί με γενετική χαρτογράφηση.

Πιο πρόσφατα, η αυξανόμενη δεξαμενή DNA αλληλουχιών, η οποία δημιουργήθηκε από τη διεθνές πρόγραμμα γενωμικής αλληλούχισης του ρυζιού (International Rice Genome Sequencing Project-IRGSP) (<http://www.rice-research.org>) και άλλων οργανισμών επιτρέπει την μεγάλου όγκου αναγνώριση SSR τόπων 'in silico', σε αλληλουχημένες περιοχές, συχνά με γνωστή θέση στο χάρτη, παρέχοντας ένα εξαιρετικό σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη και βελτίωση δεικτών.

Αντιθέτως, χαρτογραφημένοι SSR δείκτες, που έχουν συσχετισθεί με φαινότυπους ενδιαφέροντος, παρέχουν μία άμεση σύνδεση με αλληλουχημένες περιοχές, που μπορούν να επισημειωθούν προσεκτικά προκειμένου για την αναγνώριση υπονήφιων γονιδίων, που προσδίδουν έμφαση στο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (Temnykh *et al.*, 2001).

Μικροδορυφόροι σε υποκυτταρικά οργανίδια

Οι μικροδορυφόροι βρίσκονται επίσης στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα των φυτών (cpDNA). Μικροδορυφόροι με επαναλήψεις του τύπου (dA)_n·(dT)_n [(A)_n μικροδορυφόροι εφεξής] χλωροπλαστικού DNA έχουν αναπτυχθεί σε χρήσιμους και σημαντικά πολυμορφικούς γενετικούς δείκτες στο πεύκο και σε πληθυσμούς σόγιας (Powell *et al.*, 1995b). Δεν είναι γνωστό κατά πόσον οι (A)_n μικροδορυφόροι είναι παρόντες σε μιτοχονδριακά γονιδιώματα (mtDNA) κι αν έχουν τις ίδιες δυνατότητες, ως σημαντικά πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες (Dobrowolski *et al.*, 1998). Παραλλαγές στις αλληλουχίες κωδικών και μη κωδικών χλωροπλαστικών τόπων είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την εκτίμηση φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα σε τάξεις φυτών, βασιζόμενοι στο χαμηλό ρυθμό εξέλιξης των

αλληλουχιών και στο σχεδόν ανύπαρκτο ανασυνδυασμό στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα (Golenberg *et al.*, 1990; Rossetto *et al.*, 2002; Provan *et al.*, 2001).

Εξαιτίας αυτής της συντήρησης των αλληλουχιών, πολλές μελέτες έχουν κάνει χρήση χλωροπλαστικών DNA αλληλουχιών για την μελέτη συστηματικής κατάταξης και εξέλιξης πάνω από το επίπεδο των ειδών. Ωστόσο, η εξαγωγή συμπερασμάτων για τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ στενά σχετιζόμενων τάξεων, με χλωροπλαστικές γονιδιακές αλληλουχίες γενικώς παρακωλύεται από την έλλειψη παραλλαγών στις αλληλουχίες (Provan *et al.*, 2001).

Η ανάπτυξη SSR για μη κωδικές περιοχές του χλωροπλαστικού γονιδιώματος και η μεγαλύτερη ποικιλομορφία των αλληλουχιών συγκριτικά με κωδικές περιοχές (Powell *et al.*, 1995a, 1995b; Vendramin *et al.*, 1996; Provan *et al.*, 2001) συνιστούν ένα υψηλότερης ανάλυσης εργαλείο για τη μελέτη πολύ κοντινών τάξεων. Αυτοί οι πολυμορφισμοί στους χλωροπλάστες παρέχουν ένα καθολικό-γενικό σύστημα δεικτών για την ανάλυση του τρόπου, που κληρονομούνται οι χλωροπλάστες και για την εκτίμηση της γενετικής δομής των φυτικών πληθυσμών. Επιπροσθέτως, ο υψηλός βαθμός συντήρησης των αλληλουχιών μεταξύ χλωροπλαστικών γονιδιωμάτων διαφορετικών φυτικών ειδών, έχει επιτρέψει το σχεδιασμό καθολικών PCR εκκινητών, οι οποίοι είναι χρήσιμοι σε πολλά είδη αγγειόσπερμων (Weising and Gardner, 1999).

1.4 Μεταθετά Στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία είναι ευδιάκριτες αλληλουχίες επαναλαμβανόμενου DNA, οι οποίες διακρίνονται από την ικανότητά τους να μετατίθενται ή να αυτοδιπλασιάζονται σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα ενός οργανισμού (Bohne *et al.*, 2008; Kazazian *et al.*, 1998; Ray *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007).

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες μεταθετών στοιχείων που διακρίνονται με βάση τον μηχανισμό μετάθεσής τους: Αυτές είναι τα DNA τρανσποζόνια, τα οποία μετακινούνται κυρίως με έναν μηχανισμό «αποκοπής και ενσωμάτωσης» («cut and paste mechanism») και τα ρετροτρανσποζόνια, τα οποία μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» («copy and paste mechanism»), που περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφή ενός ρετροτρανσποζονιακού-ενδιάμεσου RNA και την περαιτέρω εισαγωγή του συμπληρωματικού αντιγράφου cDNA σε μια νέα θέση στο γονιδίωμα. Έτσι, τα DNA τρανσποζόνια κινητοποιούνται μέσω ενός

ενδιάμεσου DNA, ενώ τα ρετρομεταθετά στοιχεία, απαιτούν για την μετάθεσή τους την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Bohne et al., 2008).

Τόσο τα DNA τραπεζοζόνια, όσο και τα ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται περαιτέρω σε αυτόνομα και μη αυτόνομα τραπεζοζόνια ανάλογα με την ικανότητά τους να κωδικοποιούν ή όχι τις απαραίτητες λειτουργίες για την μετάθεσή τους. Τα μη αυτόνομα τραπεζοζόνια στερούνται των τυπικών αλληλουχιών που υπάρχουν στα αυτόνομα μεταθετά στοιχεία και πιστεύεται ότι υποκλέπτουν τη μηχανή μετάθεσης των αυτόνομων στοιχείων για τη δική τους μετάθεση (Dewannieux et al., 2003; Kajikawa et al., 2002; Ray et al., 2007).

Η πρώτη κατηγορία μεταθετών στοιχείων, τα DNA τραπεζοζόνια είναι κοινά σε πολλούς οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο (Ray et al., 2007). Αποτελούν περίπου το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Lander et al., 2001), απαντώντας σε 294.000 αντίγραφα και το 0.88% του γονιδιώματος του μύου (Waterstone et al., 2002), απαντώντας σε 112.000 αντίγραφα. Το μοριακό τους μέγεθος ποικίλει από 1 έως 3 Kb. Τα περισσότερα DNA τραπεζοζόνια είναι αυτόνομα μεταθετά στοιχεία και δομικά συνίστανται από τρεις περιοχές, την κεντρική περιοχή που κωδικοποιεί για μια τραπεζοζάση, δύο αντίστροφες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 5 έως 500 bp και δυο ευθείες επαναλήψεις που βρίσκονται στα άκρα τους, μεγέθους 2 έως και 8 bp.

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι ενδογενή συστατικά των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων και είναι ικανά να μετατίθενται σε αυτό μέσω ενός ενδιάμεσου ρετροτρανσποζονιακού RNA, χρησιμοποιώντας το μηχανισμό «αντιγραφής και ενσωμάτωσης». Καθώς το αρχικό αντίγραφο δεν αποκόπτεται, η ρετρομετάθεση αυτή αντιστοιχεί σε μηχανισμό διπλασιασμού (Bohne et al., 2008). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την παρουσία ή απουσία μακρών τελικών επαναλήψεων (LTR).

Ταξινόμηση Μεταθετών Στοιχείων

Τα περισσότερα μεταθετά στοιχεία μπορούν να οριστούν σε δυο κύριες τάξεις, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο μετατίθενται (Finnegan, 1989; Cary et al., 1997). Τόσο τα αυτόνομα όσο και τα μη αυτόνομα μέλη βρίσκονται σε πολλές οικογένειες στοιχείων και των δυο τάξεων. Τα αυτόνομα στοιχεία είναι σε θέση να καταλύουν την μετάθεσή τους, ενώ η μετάθεση των μη αυτόνομων στοιχείων

εξαρτάται από μηχανισμούς των αυτόνομων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Τα στοιχεία της Τάξης I (Ρετροτρανσποζόνια) είναι μέλη μιας μεγαλύτερης ομάδας των Ρετροειδών παραγόντων, που επίσης περιλαμβάνουν τους ρετροϊούς (McClure, 1999). Χρησιμοποιούν έναν RNA-ενδιάμεσο μηχανισμό μετάθεσης και κωδικοποιούν την αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcriptase-RT).

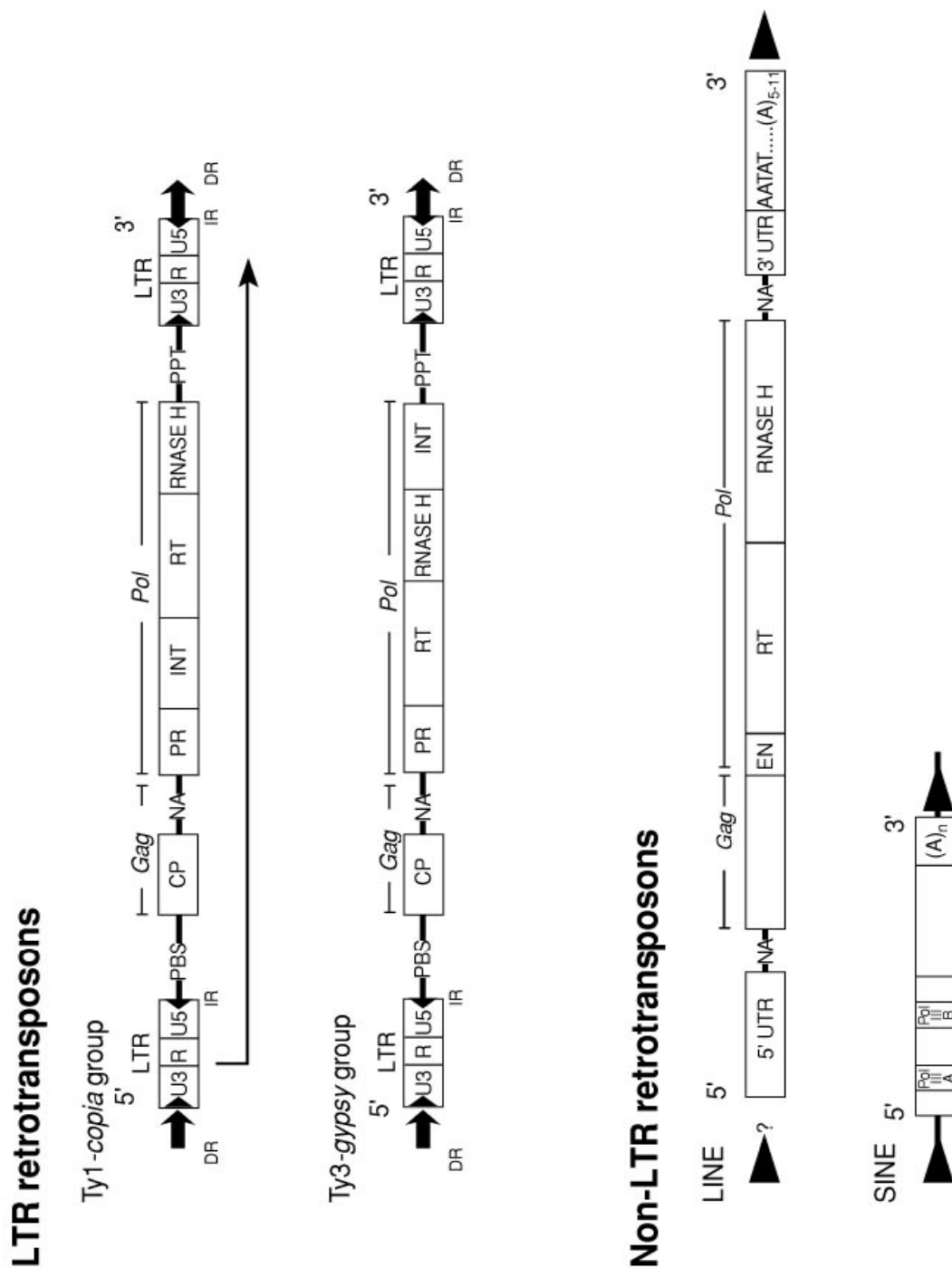
Αυτά τα στοιχεία πολλαπλασιάζονται με τη διαδικασία της μετάθεσης και έχουν υψηλή δυναμική για αύξηση αριθμού αντιγράφων. Χωρίζονται σε δύο υποτάξεις, τα ρετρομεταθετόνια, που χαρακτηρίζονται από ενιαίες, τερματικές επαναλήψεις μήκους (Long Terminal Repeats-LTRs), και τα ρετροθετόνια (Retroposons), που στερούνται τερματικών επαναλήψεων. Εδώ, αυτά τα στοιχεία θα αναφέρονται ως LTR ρετροστοιχεία (ή LTR ρετρομεταθετόνια) και non-LTR ρετροστοιχεία, αντίστοιχα. Τα LTR ρετροστοιχεία περιλαμβάνουν τέσσερις διαφορετικές ομάδες, τα Ty1-copia, τα BEL, DIRS και Ty3 gypsy που διανέμονται ευρέως σε πολλά ζώα και φυτά (Malik *et al.*, 2000). Τα non-LTR ρετροστοιχεία περιλαμβάνουν τα επιμήκη διασπαρμένα πυρηνικά στοιχεία (Long Interspersed Nuclear Elements-LINEs) και τα μη επιμήκη διασπαρμένα πυρηνικά στοιχεία (Short Interspersed Nuclear Elements-SINEs) (Εικ.5).

Τα LTR ρετρομεταθετόνια έχουν επιμήκεις τερματικές επαναλήψεις με ευθή προσανατολισμό σε κάθε άκρο. Μέσα στα LTRs υπάρχουν οι U3, R και U5 περιοχές που περιέχουν σήματα για την έναρξη και τον τερματισμό της μεταγραφής. Το αντίγραφο (λεπτό τόξο) φαίνεται πίσω από κάθε τμήμα. Ξεκινά από το 5' άκρο του R μέσα στο 5' LTR και τερματίζει στο 3' άκρο του R μέσα στο 3' LTR. Τα γονίδια μέσα στα ρετρομεταθετόνια κωδικοποιούν καψιδιακές πρωτεΐνες (CP), ενδονουκλεάση (EN), ιντεγκράση (INT), πρωτεάση (PR), αντίστροφη μεταγραφή (RT), και RNAάση-H.

Άλλες χαρακτηρισμένες αλληλουχίες είναι οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών (Primer Binding Sites-PBS), τμήματα πολυπουρίνης (PolyPurine Tracts-PPT), τα σημεία πρόσδεσης νουκλεϊνικών οξέων (Nucleic Acid binding moiety-NA), οι ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις (Inverted Terminal repeats-IR), οι περιβάλλουσες επαναλήψεις (flanking target direct repeat-DR), η 5' μη μεταφρασμένη περιοχή (5' untranslated region- 5' UTR), η 3' UTR, η Pol III A και B θέσεις αναγνώρισης υποκινητή (promoter) για την RNA πολυμεράση III.

Οι εικόνες 4 και 5 δεν έχουν απεικονιστεί με κλίμακα, καθώς τα LTR ρετρομεταθετόνια ποικίλουν από λίγες kb μέχρι 15kb σε μέγεθος. Τα LINEs συνήθως

κυμαίνονται από λιγότερο από 1kb μέχρι πιθανόν 8kb, ενώ τα SINEs είναι κανονικά 100bp μέχρι 300bp σε μέγεθος. (Kumar and Bennetzen, 1999).



Εικ.5: Γενική κατασκευή των Ty1-copia, Ty3-gypsy, LINE και SINE ρετρομεταθετώνων.

Πολλά στοιχεία της τάξης II (DNA τρανσποζόνια), όπως τα μεταθετόνια *sensu strictu*, χρησιμοποιούν έναν τρόπο μετάθεσης 'αποκοπής και επικόλλησης' στον οποίο μεσολαβεί DNA (DNA-mediated). Ωστόσο, πρόσφατα δείχθηκε ότι ένας

αριθμός στοιχείων της τάξης II για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα αποκαλούμενα *ελητρόνια* (*Helitrons*), έχουν πιθανότητα διαδοθεί μέσω ενός μηχανισμού όμοιου με την μετάθεση κυλιόμενου κύκλου (rolling-circle (RC)) των προκαρυωτικών οργανισμών (Kapitonov and Jurka, 2001). Τα ελητρόνια τείνουν να είναι μεγάλα και, ως έκπληξη, συνιστούν το 2% του γονιδιώματος της *Arabidopsis thaliana* και του *Caenorhabditis elegans* (Kapitonov and Jurka, 2001).

Τα στοιχεία της τάξης II που μετατίθενται με τον μηχανισμό ‘αποκοπής και επικόλλησης’ περιλαμβάνουν την *hAT* (*hobo*, *Activator*, *Tam-3*) υπεροικογένεια στοιχείων, την υπεροικογένεια τύπου *mariner* (*mariner-like*), τα στοιχεία P και τα στοιχεία *MuDR*. Μολονότι τα μεταθετά στοιχεία μικροσκοπικών ανεστραμένων αλληλουχιών (Miniature Inverted Transposable Elements – *MITEs*) και τα στοιχεία *foldback* (FB) είχαν νωρίτερα ταξινομηθεί σε μία Τρίτη κλάση (Capy *et al.*, 1997), περαιτέρω ενδείξεις υποστηρίζουν ισχυρά ότι τα *MITEs* είναι μέλη των στοιχείων της τάξης II (Le *et al.*, 2000; Turcotte *et al.*, 2001). Γενικώς, η δυναμική για αύξηση του αριθμού των αντιγράφων φαίνεται να είναι πιο περιορισμένη στα στοιχεία της τάξης II από ότι της τάξης I.

Διαφορετικές υπεροικογένειες και οικογένειες μεταθετών στοιχείων έχουν πολύ διαφορετικά χαρακτηριστικά μεγέθη. Τα ελητρόνια και τα LTR ρετρομεταθετόνια τείνουν να είναι μεγάλα. Μήκη από 3 μέχρι περισσότερες από 17 kb, ή παραπάνω, έχουν παρατηρηθεί στα στοιχεία πλήρους μεγέθους. Το μέγεθος των non-LTR ρετρομεταθετών στοιχείων ποικίλει από μερικές κιλοβάσεις (χαρακτηριστικό των LINES) μέχρι <500 bp, χαρακτηριστικό των SINES. Τα *MITEs* είναι επίσης σχετικά μικρά (140-500 bp). Ακόμη μικρότερα είναι τα στοιχεία *Maque* στο *Anopheles gambiae* των οποίων το μέγεθος είναι 60bp (Tu, 2001). Τα στοιχεία τύπου *Mutator*, ή *MULEs*, αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια μεταθετών στοιχείων των οποίων τα μήκη είναι ασυνήθιστα ποικίλα. Για παράδειγμα, το εύρος του μεγέθους των ατόμων *MULEs* στην *A. thaliana* είναι 444 με 19.397 bp (Yu *et al.*, 2000).

Η διαφορά στο μέγεθος μεταξύ μεγάλων και μικρών μεταθετών στοιχείων έχει προφανείς επιπτώσεις στην ποικιλότητα του γονιδιωματικού μεγέθους. Καθώς η επίδραση των μεταθετών στοιχείων στο μέγεθος του γονιδιώματος εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων και από το μήκος των στοιχείων, απαιτείται μικρότερος αριθμός μεγάλου μήκους στοιχείων προκειμένου για ισόποση συμβολή με αυτή ενός μεγαλύτερου αριθμού μικρότερου μήκους στοιχείων. Αυτό απεικονίζεται καλά στο

γονιδίωμα της μούχλας, στο οποίο τα non-LTR ρετροστοιχεία και τα DNA στοιχεία αντιπροσωπεύονται από ένα σύνολο 235 μεταθετών στοιχείων που ανήκουν σε επτά οικογένειες (Glockner *et al.*, 2001). Ωστόσο, εξαιτίας του σχετικά μεγαλύτερου μέσου μεγέθους τους, τα non-LTR στοιχεία συμβάλλουν συνολικά κατά 3,7% στο γονιδίωμα σε σύγκριση με το μόλις 1,5% του αντίστοιχου αριθμού των DNA στοιχείων. Ένα χαρακτηριστικό, που είναι κοινό στα στοιχεία τόσο της τάξης I όσο και της τάξης II, και το οποίο χρήζει έμφασης, είναι ότι η συντριπτική πλειοψηφία αντιγράφων είναι συνήθως μη αυτόνομα στοιχεία, (ή ακόμη μικρά τμήματα αντιγράφων πλήρους μεγέθους) σε αντίθεση με τα πλήρως λειτουργικά στοιχεία τα οποία αποτελούν μειοψηφία στα περισσότερα γονιδιώματα.

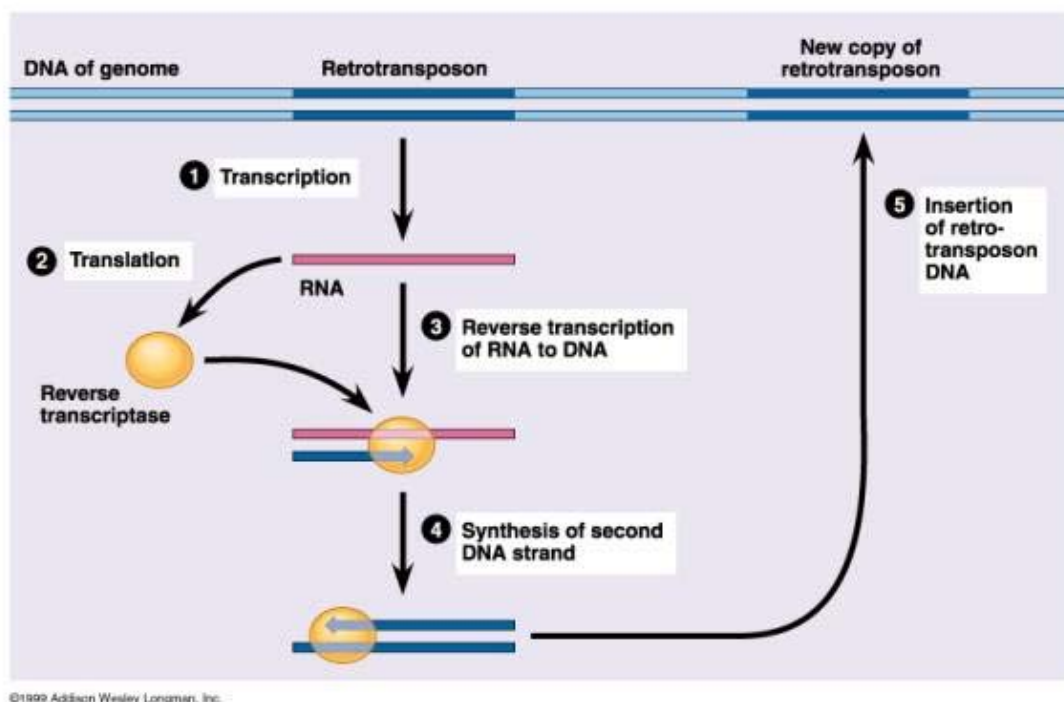
Τα μεταθετά στοιχεία και η εξέλιξη του γονιδιώματος

Τα μεταθετά στοιχεία είναι πιθανοί μεταλλαξιγόνοι παράγοντες με την δυνατότητα να παράγουν μία ευρεία σειρά αλλαγών στο γονιδίωμα των ξενιστών τους (Kidwell and Lisch, 2000; 2001). Ο ρυθμός μετάλλαξης, που προκαλείται από τη δράση των μεταθετών στοιχείων, εκτείνεται από τροποποιήσεις στο μέγεθος και την διάταξη ολόκληρων γονιδιωμάτων μέχρι αντικαταστάσεις, διαγραφές και ενθέσεις ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Συμπληρωματικά, με την ικανότητά τους να αυξάνουν το μέγεθος του γονιδιώματος μέσω της μετάθεσης, τα μεταθετά στοιχεία επάγουν χρωματοσωματικές αναδιατάξεις, όπως διαγραφές, διπλασιασμούς, αντιμεταθέσεις και τυχαίες μετατοπίσεις. Αυτή η δράση παρέχει τη δυναμική για μικρής και μεγάλης κλίμακας γονιδιωματική αναδιοργάνωση, πολλαπλασιασμό και μείωση.

Τα μεταθετά στοιχεία, όπως έχει δειχθεί, σχετίζονται με την προέλευση πολυάριθμων τύπων χρωματοσωματικών αναδιατάξεων σε πολλά είδη (Lim and Simmons, 1994; Caceres *et al.*, 1999). Η αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων των μεταθετών στοιχείων, που προκύπτει από τη μετάθεσή τους, εφαρμόζεται επίσης άμεσα σε σημαντικές επεκτάσεις στο μέγεθος του γονιδιώματος σε μια σχετικά σύντομη περίοδο εξελικτικού χρόνου [π.χ. διπλασιασμός του γονιδιώματος του καλαμποκιού τα τελευταία λίγα εκατομμύρια χρόνια (San Miguel *et al.*, 1998)].

Τα μεταθετά στοιχεία είναι αναμφισβήτητα υπεύθυνα σε σημαντικό βαθμό για την παρατηρούμενη καρυοτυπική παραλλακτικότητα ανάμεσα σε πολλές ομάδες. Αξιόπιστες εκτιμήσεις όλων των αναδιατάξεων, που προκύπτουν από τα μεταθετά στοιχεία, δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμες σε κανένα είδος αλλά είναι απαραίτητες. Τα στοιχεία αυτά μπορεί επίσης να προκαλούν μεταλλάξεις όταν αποκόπτονται με μη

συγκεκριμένο τρόπο (τυχαία), αφήνοντας είτε μη αναγνωρίσιμη ακολουθία, είτε μόνο μικρά ίχνη της προηγούμενης παρουσίας τους. Ένα μεγάλο πρόβλημα αναγνώρισης προκύπτει εξαιτίας της ραγδαίας παρέκκλισης μη αυτόνομων στοιχείων και η προέλευση πολλών αρχαίων αλληλουχιών μπορεί να καθίσταται δύσκολο αν όχι αδύνατο να προσδιοριστεί.



Εικ.4: Μεταθετόνια και Ρετρομεταθετόνια: Μετακινούμενα γενετικά στοιχεία όμοια με τα μεταθετόνια που απαντώνται στα βακτήρια. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά από την Barbara McClintock. Τα Ρετρομεταθετόνια είναι μεταθετόνια που κινούνται μέσω ενός RNA ενδιάμεσου. Η μετακίνησή τους απαιτεί την αντίστροφη μεταγραφάση η οποία συνήθως κωδικοποιείται από μεταθετόνιο. Τα στοιχεία Alu είναι ρετρομεταθετόνια που δεν κωδικοποιούν την αντίστροφη μεταγραφάση. Αντιθέτως, χρησιμοποιούν την αντίστροφη μεταγραφάση κωδικοποιημένη από άλλα ρετρομεταθετόνια (department.oxy.edu/biology/bio130/lectures_2000/11-20-00.htm).

Σταδιακές αλλαγές έναντι κβαντικού άλματος

Ένας χρήσιμος διαχωρισμός έχει γίνει μεταξύ καθολικών και τοπικών δυνάμεων, που δρουν στη διαμόρφωση του γονιδιωματικού μεγέθους (Petoy, 2001). Αναμένεται ότι σχετικά γρήγορα η επέκταση του γονιδιώματος θα μπορεί να διαμορφωθεί από τη δράση καθολικών δυνάμεων. Τόσο οι καθολικές όσο και οι επί μέρους δυνάμεις θα περίμενε κανείς να συμβάλουν σε πιο σταδιακές αλλαγές. Τα μεταθετά στοιχεία, μαζί με την πολυπλοειδία, είναι αντιπροσωπευτικά παραδείγματα καθολικών δυνάμεων για επέκταση, ενώ η επέκταση των μικροδορυφόρων, της

ετεροχρωματινής ή ποικίλων τύπων τυχαίως επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών αντιπροσωπεύουν επί μέρους επιδράσεις.

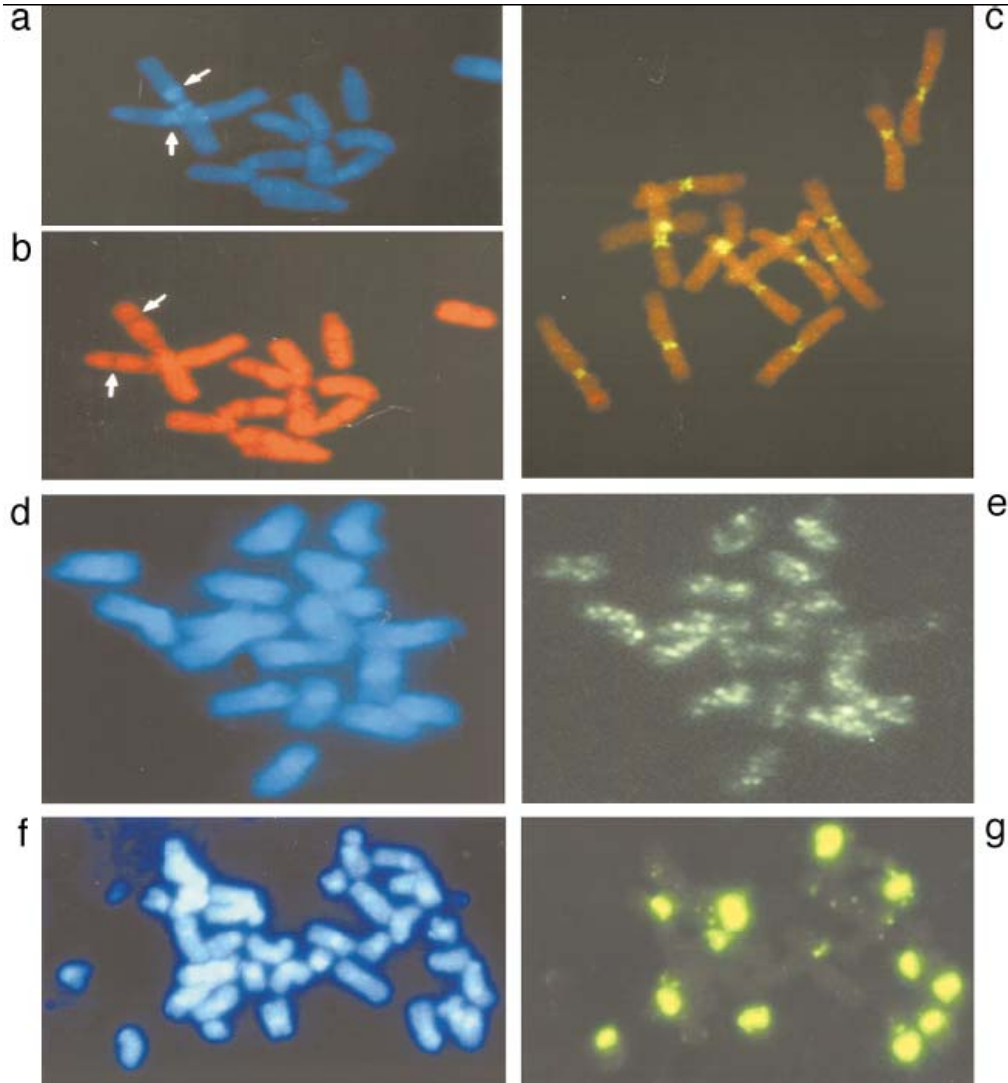
Έχουν βρεθεί διάφορα ενδιαφέροντα πρότυπα παραλλακτικότητας του γονιδιωματικού μεγέθους. Επί παραδείγματι, στα πουλιά, στα θηλαστικά και σε ένα είδος ψαριού (teleost fish), η παραλλακτικότητα του γονιδιωματικού μεγέθους είναι μικρή, υποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές συμβαίνουν με σταδιακή συσσώρευση μικρών τμημάτων DNA (Gregory and Hebert, 1999). Ωστόσο, η μεγάλη παραλλακτικότητα στο γονιδιωματικό μέγεθος που παρατηρείται μεταξύ των ασπόνδυλων και των φυτών δείχνει ότι τα κβαντικά άλματα (quantum jumps) συμβάλλουν σημαντικά, κάτι το οποίο έχει καταγραφεί για ορισμένα φυτά (π.χ. καλαμπόκι San Miguel *et al.*, 1996, 1998). Θα ήταν ενδιαφέρον να προσδιοριστεί ο βαθμός στον οποίο η μετάθεση σχετίζεται με ένα ή και με τα δύο αυτά πρότυπα αύξησης γονιδιωματικού μεγέθους.

Προτίμηση σημείων στόχων και αριθμός αντιγράφων μεταθετών στοιχείων

Πρότυπα κατανομής μη τυχαίων μεταθετών στοιχείων έχουν καταγραφεί σε πολλούς οργανισμούς, συχνά σχετιζόμενα με τον τύπο του στοιχείου, που αφορά (Kidwell and Lisch, 2001). Κάποια μεταθετά στοιχεία δείχνουν προτίμηση για ένθεση σε περιοχές μακριά από γονιδιακές αλληλουχίες του ξενιστή, όπως οι περιοχές ανάμεσα στα γονίδια, η ετεροχρωματινή ή συχνά μέσα σε άλλα μεταθετά στοιχεία. Για παράδειγμα, στα φυτά, τα πιο άφθονα LTR ρετρομεταθετόνια, μερικές φορές περιγράφονται ως ‘διαγονιδιακά LTR ρετρομεταθετόνια’, βρίσκονται πιο συχνά σε μεθυλιωμένες, πιθανώς τοπικές ετεροχρωματικές περιοχές, συχνά σε τοποθετημένες συστάδες (San Miguel *et al.*, 1996). Στο καλαμπόκι, αυτά τα στοιχεία προτιμούν ιδιαίτερα να εισέρχονται μέσα σε LTRs ή παρόμοια στοιχεία (Bennetzen, 2000). Τέτοια στοιχεία φαίνεται να έχουν σχετικά χαμηλούς περιορισμούς στην αύξηση του αριθμού των αντιγράφων.

Άλλα μεταθετά στοιχεία προτιμούν να εισέρχονται κοντά ή μέσα σε αλληλουχίες απλού αντιγράφου. Για παράδειγμα, στα φυτά κάποια DNA μεταθετά στοιχεία φανερώνουν προτίμηση για ένθεση και διατήρηση μέσα σε περιοχές ευχρωματινής του γονιδιώματος, που είναι γενετικά ενεργές και μη μεθυλιωμένες (Cresse *et al.*, 1995; Bennetzen, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Τα Μεταλλακτικά στοιχεία (mutator elements-Mu) στο καλαμπόκι στοχεύουν σε γονιδιακές αλληλουχίες και σε DNA μικρού αριθμού αντιγράφων (Cresse *et al.*, 1995). Κάποια LTR

ρετρομεταθετόνια στα φυτά επίσης ακολουθούν αυτό το πρότυπο (Garber *et al.*, 1999). Ίσως ο χαμηλός αριθμός αντιγράφων αυτού του τύπου στοιχείων άπτεται στην μεγαλύτερη επιλογή έναντι απεριόριστης μετάθεσης σε γονιδιακά πλούσιες περιοχές (Kidwell and Lisch, 2001).



Εικ.6: Φυσικές περιοχές των Ty1-copia (a,b), Ty3-gypsy (c), LINE (d,e), και SINE (f,g) ρετροστοιχεία κατά μήκος φυτικών χρωμοσωμάτων στη μετάφαση που έχουν φανεί με χρήση in situ υβριδισμού (Kumar and Bennetzen, 1999).

Μη μεταβιβαζόμενες γονιδιακές αλληλουχίες

Πολλά μεταθετά στοιχεία έχουν βρεθεί να είναι αρχαία στοιχεία ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων. Λόγω του ότι πολλά από αυτά υπέστησαν μία εκφυλιστική διαδικασία κατά την εξέλιξη και το πέρασμα των χρόνων, τα υπολείμματά τους απομακρύνθηκαν σταδιακά, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η αναγνώρισή τους ως μεταθετά στοιχεία. Διασπαρμένες επαναλήψεις διασπάστηκαν σε βαθμό που να μην είναι πλέον αναγνωρίσιμες, μπορεί ωστόσο να συνιστούν ένα

σημαντικό τμήμα μη μεταβιβαζόμενων γονιδιωματικών αλληλουχιών (Henikoff *et al.*, 1997). Σε πολλά είδη της *Drosophila*, η κεντρική ετεροχρωματίνη συχνά θεωρείται ως 'κοιμητήριο' για νεκρά μεταθετά στοιχεία ένεκα της χαμηλής συχνότητας ανασυνδυασμού στην περιοχή αυτή.

Πολυμορφισμός ενισχυμένων Ρετρομεταθετόνιων και Μικροδορυφόρων

Η διασπορά (Katsiotis *et al.*, 1996; Suoniemi *et al.*, 1996a), η πανταχού παρουσία (Flavell *et al.*, 1992; Voytas *et al.*, 1992) και η επικράτηση/διάδοση (Pearce *et al.*, 1996, 1997; Suoniemi *et al.*, 1996) των ρετρομεταθετόνιων στο φυτικό γονιδίωμα παρέχουν μια εξαιρετική βάση για την ανάπτυξη συστημάτων δεικτών. Τα ρετρομεταθετόνια αναδιπλασιάζονται με επιτυχή αντιγραφή, αντίστροφη μεταγραφή, και ένθεση των νέων αντιγράφων cDNA πίσω πάλι στο γονιδίωμα όπως συμβαίνει και με τους ρετροϊούς (Grandbastien, 1992).

Η δομή και η στρατηγική της αντιγραφής των ρετρομεταθετόνιων τους προσδίδει πολλά πλεονεκτήματα ως δείκτες. Πρώτον, περιέχουν επιμήκεις, προσδιορισμένες, συντηρημένες αλληλουχίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλωνοποίηση τόσο συγκεκριμένων δεικτών όσο και των αλληλουχιών που τους περιβάλλουν. Δεύτερον, τα μεταγραφικά ενεργά μέλη της οικογένειας των ρετρομεταθετόνιων θα παράγουν νέες ενθέσεις στο γονιδίωμα, οδηγώντας σε πολυμορφισμό. Οι νέες ενθέσεις μπορούν έπειτα να ανιχνευθούν και να χρησιμοποιηθούν και προσωρινά να ταξινομήσουν περιπτώσεις ένθεσης σε μια σειρά προέλευσης, για την δημιουργία δενδρογραμμάτων (Shimammura *et al.*, 1997).

Στο κριθάρι, τα ενδογενή αντίγραφα της BARE-1 οικογένειας ρετρομεταθετόνιων είναι υψηλά συντηρημένα (Manninen and Schulman, 1993; Suoniemi *et al.*, 1997,1998), διασπαρμένα και μεταγραφικά ενεργά (Suoniemi *et al.*, 1996). Επιπλέον, το BARE-1 είναι παρόν σε όλο το *Hordeum* (κριθάρι) και τα συγγενή γένη και φαίνεται να έχει διαδραματίσει πολύ σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή εξέλιξη του γένους. Η οικογένεια BARE-1 παρουσιάζεται κατάλληλη για την ανάπτυξη δεικτών.

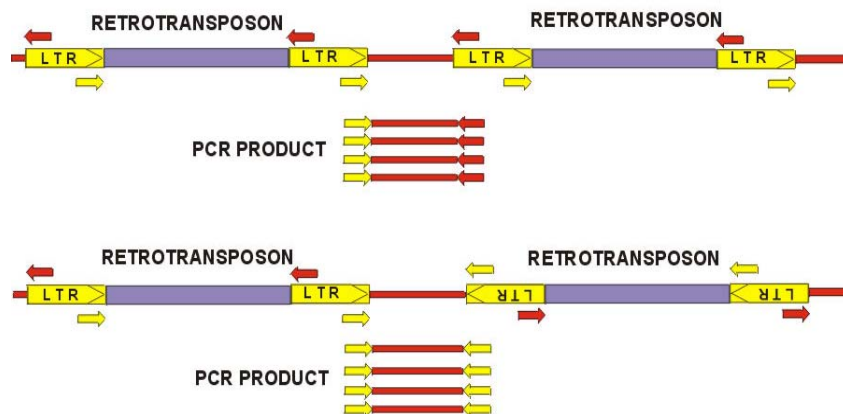
Το 1997 αναπτύχθηκε μια τροποποιημένη AFLP μέθοδος βασισμένη στο BARE-1, στον πολυμορφισμό ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών (S-SAP), στην οποία ένας PCR εκκινήτης με προσανατολισμό αντίθετο από αυτόν της BARE-1 επιμήκους τερματικής επαναλήψεως (LTR) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν

AFLP προσαρμογέα εκκινητή (Waugh *et al.*, 1997). Η μέθοδος έχει διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με την AFLP: μεγαλύτερος πολυμορφισμός, μια πιο ίση κατανομή χρωματοσωμάτων και μεγαλύτερη συγκυριαρχία. Ωστόσο, η μέθοδος S-SAP βασίζεται σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα για τη δημιουργία θέσεων για τη σύνδεση των προσαρμογέων.

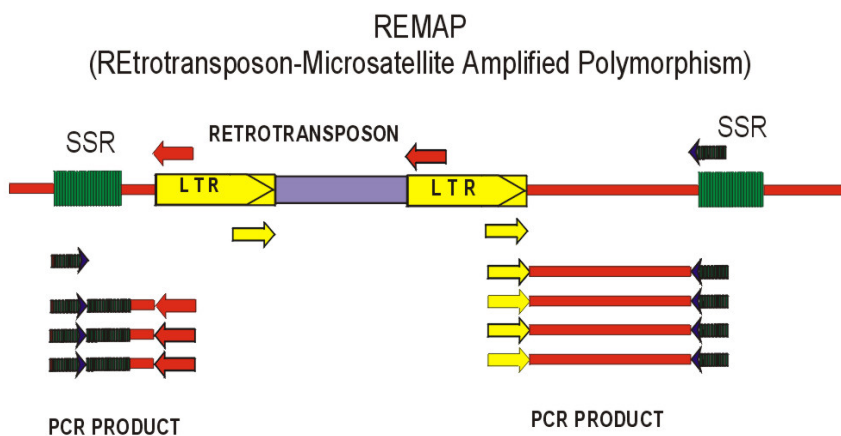
Η ευαισθησία των κοινώς χρησιμοποιούμενων ενζύμων, όπως τα PstI και EcoRI στη μεθυλίωση του DNA, σε συνδυασμό με τον υψηλό και πιθανά ποικίλο βαθμό CG και CxG μεθυλίωση στο φυτικό DNA, σημαίνει ότι κάποιος προφανής πολυμορφισμός δεν μπορεί να είναι ούτε βασιζόμενος στην αλληλουχία ούτε κληρονομήσιμος. Υπάρχουν ωστόσο, δυο μέθοδοι που στηρίζονται στα ρετρομεταθετά στοιχεία, που δεν απαιτούν πέψη του DNA: ο πολυμορφισμός ενίσχυσης μεταξύ ρετρομεταθετών στοιχείων (Inter-retrotransposon-based Amplified Polymorphism-IRAP) (Εικ. 7) και ο πολυμορφισμός ενίσχυσης ρετρομεταθετόνιων και μικροδορυφόρων (REtrotrasposon-Microsatellite Amplified Polymorphism-REMAP) (Εικ. 8).

Και οι δυο μέθοδοι, IRAP και REMAP, εξετάζουν τον πολυμορφισμό στα σημεία ένθεσης των ρετρομεταθετόνιων, η μέθοδος IRAP μεταξύ των ρετρομεταθετόνιων και η μέθοδος REMAP μεταξύ ρετρομεταθετόνιων και μικροδορυφόρων (SSR) (Εικ. 8 & 9). Τα ρετρομεταθετόνια, αντίθετα με τα DNA μεταθετόνια, μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού ‘αντιγραφής’ και ‘ενσωμάτωσης’ διασκορπίζοντας θυγατρικά αντίγραφα αντί να αποκόπτονται και να μετακινούνται απευθείας. Έτσι, σταθερές ενθέσεις συμπεριφέρονται ως Μενδελιανοί τόποι κατά τις διασταυρώσεις και διασχίζονται ανάλογα. Οι δείκτες που βασίζονται σε ρετρομεταθετόνια θα περίμενε κανείς να είναι συγκυρίαρχοι. Τόσο για την IRAP όσο και για την REMAP, έχουν σχεδιαστεί εκκινητές με αντίστροφο προσανατολισμό από αυτόν των LTR αλληλουχιών των ρετρομεταθετόνιων.

Τα LTR των ρετρομεταθετόνιων περιέχουν αλληλουχίες, που είναι ουσιαστικές για την έκφραση (παρακινητή και σημάτων διαδικασίας) και για την ενσωμάτωση. Αυτά τα σημεία τείνουν να είναι υψηλά συντηρημένα. Από αυτές τις συντηρημένες LTR περιοχές μπορούν να δημιουργηθούν οι εκκινητές της PCR ενίσχυσης οι οποίοι συνδέονται στα διασπαρμένα μέλη μιας οικογένειας ρετρομεταθετόνιων. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες περιοχές ενός ρετρομεταθετόνιου, όπως τα εξαιρετικά συντηρημένα (-) και (+) σημεία εκκινητών των αλυσίδων της αντίστροφης μεταγραφάσης.



Εικ. 7: Πολυμορφισμός ενίσχυσης μεταξύ ρετρομεταθετών στοιχείων (IRAP) (www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/markers.htm)

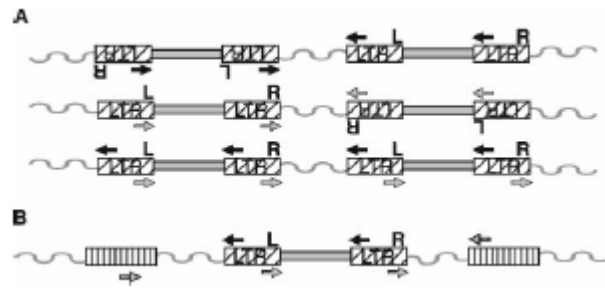


Εικ. 8: Πολυμορφισμός ενισχυμένων Ρετρομεταθετονίων και Μικροδορυφόρων (www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/markers.htm) (Kalendar *et al.*, 1999)

Τα ρετρομεταθετόνια μπορεί να ενσωματώνονται αρχικά με οποιονδήποτε προσανατολισμό μέσα στο γονιδίωμα, κι έτσι, οποιαδήποτε δυο μέλη της οικογένειας των ρετρομεταθετονίων μπορούν να βρεθούν κορυφή με κορυφή, βάση με βάση ή κορυφή με βάση. Για τους δυο πρώτους προσανατολισμούς, ένας και μόνο εκκινητής αρκεί για να δώσει προϊόντα PCR από στοιχεία επαρκώς κοντινά μεταξύ τους (Εικ. 9Α). Για την ενίσχυση παρεμβατικού γενωμικού DNA για στοιχεία με προέλευση κορυφή με βάση, και οι 3' και οι 5' LTR εκκινητές πρέπει να χρησιμοποιηθούν, δίνοντας επίσης ζώνες και από τον άλλον προσανατολισμό.

Η μέθοδος REMAP στηρίζεται σε έναν αντίθετης κατεύθυνσης LTR εκκινητή και σε έναν δεύτερο εκκινητή από έναν μικροδορυφόρο. Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι για μικροδορυφόρους και είναι δεσμευμένοι στο 3' τερματικό άκρο τους με την προσθήκη μιας απλής επιλεκτικής βάσης στο 3' άκρο. Αυτό γίνεται για την αποφυγή πολυμορφισμού από παραλλαγές στο μήκος των μικροδορυφορικών

επαναλήψεων, αλλά ταυτόχρονα και για να επιτραπεί η ενίσχυση από πολυάριθμους μικροδορυφορικούς τύπους.



Εικ. 9: A, B Στρατηγική ενίσχυσης για IRAP (A) και REMAP (B). A. BARE-1 ρετρομεταθετόνια απεικονίζονται ως L-LTRs και R-LTRs (επιμήκεις τερματικές αλληλουχίες, σημειωμένες, για αριστερά και δεξιά αντίστοιχα) περιβάλλοντας τις εσωτερικές κωδικές περιοχές (σκιασμένο κουτί) έχοντας εισαχθεί σε σημείο που εκατέρωθεν έχει DNA (flanking DNA) (κυματιστή γραμμή). Οι PCR εκκινητές που αντικρύζουν με φορά αντίθετη από το 5' (σκουρόχρωμα βέλη) και το 3' άκρο (ανοιχτόχρωμα βέλη) των LTRs θα ενισχύσουν το παρεμβατικό DNA από τα BARE-1 στοιχεία σε οποιονδήποτε από τους τρεις πιθανούς προσανατολισμούς. B. Στην μέθοδο REMAP ένας εκκινητής από τη μέθοδο IRAP χρησιμοποιείται μαζί με έναν εκκινητή ο οποίος αποτελείται από επαναλήψεις απλών αλληλουχιών (διάστικτο βέλος). Ο αντίστοιχος μικροδορυφόρος απεικονίζεται ως επιμερισμένο με κάθετες γραμμές κουτί (Kalendar *et al.*, 1999).

1.5 Προηγούμενες Μελέτες και Σκοπός Της Παρούσας Διατριβής

Οι Ελληνικές γενετικές πηγές αμπέλου περιλαμβάνουν περίπου 670 ποικιλίες, εκ των οποίων 300 ενδεχομένως να καλλιεργούνται ακόμη, χωρίς να είναι γνωστή η προέλευσή τους και η γενετική τους σχέση. Από την άλλη πλευρά, υποτίθεται, ότι μέρος των σύγχρονων δυτικών Ευρωπαϊκών ποικιλιών θα μπορούσε να κατάγεται από Ελληνικές ποικιλίες. Αλλά είναι επίσης γνωστό ότι δυτικές ποικιλίες έχουν κατά καιρούς εισαχθεί στην Ελλάδα (Lefort and Roubelakis-Angelakis, 2001, Greek Vitis Database www.biology.uoc.gr/gvd).

Οι Μαλβαζίες αντιπροσωπεύουν μία από τις πιο πολύπλοκες ομάδες ποικιλιών, εξ αιτίας του ότι μεγάλος αριθμός των ποικιλιών, αρωματικές και μη αρωματικές, έχουν το ίδιο όνομα (Malvasia). Διάφορες ιστορικές αναφορές, (Dalmasso *et al.*, 1964), συνδέουν το όνομα της Μαλβαζίας με τη Μονεμβασιά, την πόλη της Πελοποννήσου από το λιμάνι της οποίας μεταφέρονταν κρασιά. Αυτά τα κρασιά εισάγονταν στην Ιταλία τον 13^ο αιώνα, όταν το όνομα της Μαλβαζίας χρησιμοποιείτο στην Βενετία για να υποδηλώσει τα μέρη, όπου οι άνθρωποι συνήθιζαν να πίνουν αυτά τα Ελληνικά κρασιά. Συνεπώς, οι άμπελοι που έδιναν αυτά τα κρασιά ενδεχομένως να είχαν επίσης εισαχθεί στην Ιταλία. Είναι πιθανόν, εκμεταλλευόμενοι την φήμη αυτών των οίνων, να μετονόμασαν διαφορετικές ποικιλίες σε Μαλβαζίες.

Αποτελέσματα προηγούμενων μελετών δείχνουν ότι οι ποικιλίες «Μοσχάτο», με ένα ξεχωριστό μοσχάτο άρωμα, διαχωρίστηκαν από τις ποικιλίες Malvasia, οι οποίες περιλαμβάνουν τόσο αρωματικές όσο και μη αρωματικές ποικιλίες αμπέλου. Επίσης, υποδεικνύουν ότι καμία ομαδοποίηση των ποικιλιών του *V. vinifera* σε αρωματικές και μη αρωματικές δεν μπορεί να γίνει, όπως προτάθηκε στο παρελθόν (Fanizza *et al.*, 2003). Σε προηγούμενες μελέτες (Fanizza *et al.*, 2003) ομαδοποιούνται οι ποικιλίες *Malvasia bastarda*, *Malvasia forzati*, *Malvasia coda di pecora*, *Malvasia mancinelli* και *Malvasia jocco*, καθώς είναι αρκετά παραπλήσιες σε μοριακό επίπεδο (με συντελεστή ανομοιότητας 0,01-0,03). Ακόμη κι αν αυτές οι ποικιλίες αμπέλου καλλιεργούνται σε διαφορετικές περιοχές στη Νότια Ιταλία, ενδέχεται να είναι μία μόνο ποικιλία ή διαφορετικοί κλώνοι της ίδιας ποικιλίας. Είναι συχνό στην περίπτωση του *Vitis* και άλλων καρποφόρων ειδών κληματίδες από την ίδια ποικιλία να εισάγονται σε γειτονικές περιοχές, για λόγους διάδοσης, και να μετονομάζονται. Αυτή η λάθος ταυτοποίηση μπορεί να πηγάζει από τους

καλλιεργητές οι οποίοι προσθέτουν το όνομα της τοποθεσίας ή του αγρού στην ποικιλία (Μαλβαζία) (Fanizza *et al.*, 2003).

Στην ίδια μελέτη ομαδοποιούνται επίσης οι *Malvasia di Sardegna S1*, *Malvasia di Sardegna S2*, *Malvasia di Sardegna S3*, *Malvasia di Sardegna S4* και *Malvasia di Lipari*, οι οποίες καλλιεργούνται στη Σικελία και Σαρδηνία (Fanizza *et al.*, 2003). Η έλλειψη διαφορών μεταξύ αυτών των γονοτύπων (πιθανοί κλώνοι) σε μοριακό επίπεδο μπορεί να οφείλεται στο μικρό τμήμα του γονιδιώματος που έχει μελετηθεί, μολονότι έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός AFLP δεικτών σε αυτήν την ανάλυση. Είναι πιθανό ότι μια μετάλλαξη θα μπορούσε να περιοριστεί σε μια πολύ μικρή περιοχή του γονιδιώματος ή θα μπορούσε να εμπεριέχει μια σημειακή μετάλλαξη σε μια ρυθμιστική αλληλουχία DNA, η οποία θα ήταν δύσκολο να ανιχνευθεί με AFLP ή άλλες παρόμοιες τεχνικές.

Σύμφωνα με έγγραφα (Cettolini, 1893) η ποικιλία αμπέλου Μαλβαζία εισήχθει στη νήσο Σαρδηνία από την Ελλάδα κατά την Βυζαντινή περίοδο. Η Μαλβαζία της Σικελίας (*Malvasia di Lipari*) αποδείχθηκε διαφορετική από αυτήν της Σαρδηνίας (*Malvasia di Sardegna*) επειδή συγκεντρώνεται στο ίδιο κλαδί με μεγαλύτερη τιμή γενετικής απόστασης (0,15 συντελεστής ανομοιότητας). Δεν έχουν αναφερθεί συνώνυμα για την Μαλβαζία της Σικελίας (*Malvasia di Lipari*), η οποία είναι μία αρχαία άμπελος με μοσχάτο άρωμα που εισήχθη από την Ελλάδα σε μια μικρή νήσο κοντά στην Σικελία (Nicosia and Barbara, 1959).

Άλλες ποικιλίες που έχουν μελετηθεί ως προς τη γενετική τους συγγένεια είναι οι *Malvasia Bianca furlò*, *Malvasia di Candia*, *Malvasia bianca anglari* και *Malvasia nera di brindisi*. Αν και όλες είναι υπό την ονομασία «Μαλβαζία» υπάρχει μια γενετική ποικιλομορφία μεταξύ αυτών των γονοτύπων. Μέσα σε αυτήν την ομάδα υπάρχει μια αρωματική ποικιλία αμπέλου *Coda di Volpe*, η οποία έχει αναπτυχθεί στην Καμπανία (περιοχή της Νότιας Ιταλίας) από την Ρωμαϊκή εποχή, και έχει περιγραφεί σε ένα αρχαίο βιβλίο γραμμένο στα Λατινικά από τον Pliny (Roy-Chevrier, 1900) για την ασυνήθιστη μορφολογία του κλάδου.

Η παρούσα μελέτη αναφέρει αποτελέσματα από την παρουσία μικροδορυφόρων, που αποκτήθηκαν από 47 Ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, συμπεριλαμβανομένων ποικιλιών οινοποιίας και επιτραπέζιων, σε εννέα μικροδορυφορικούς (SSR: Simple Sequence Repeats) τύπους. Η επιλογή εννέα ήδη χαρακτηρισμένων μικροδορυφορικών δεικτών, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε άλλες μελέτες στην Ευρώπη, καθιστά τα αποτελέσματά μας συγκρίσιμα στους τύπους

αυτούς με εκείνα άλλων εργαστηρίων και θα συμβάλλουν στη διεθνή προσπάθεια ταυτοποίησης γονοτύπων (Lefort *et al.*, 2001).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό Υλικό

Συλλέχθηκαν φύλλα ποικιλιών *Vitis vinifera* από το Ινστιτούτο Agrario di San Michele all' Adige, Centro Sperimentale (ως ευγενική προσφορά του Dr.Marco Stefanini) και από την αμπελογραφική συλλογή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Τα φύλλα διατηρήθηκαν στους -80° C μέχρι την εκχύλιση.

Οι ποικιλίες αμπέλου που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Οι 47 Γονότυποι που μελετήθηκαν

A/A	Γονότυποι	Προέλευση	Κωδικός Αναφοράς
01.	Malvasia moscatel Fonte grande	Ιταλία	1
02.	Malvasia Fine	Ιταλία	2
03.	Malvasia del Chianti	Ιταλία	3
04.	Malvasia nera di Lecce	Ιταλία	4
05.	Malvasia di Schierano	Ιταλία	5
06.	Malvasia di Casorzo	Ιταλία	6
07.	Malvasia Grigiorosa	Ιταλία	7
08.	Malvasia del Lazio	Ιταλία	8
09.	Malvasia nera	Ιταλία	9
10.	Malvasia di Candia aromatica	Ιταλία	10
11.	Malvasia nera di Brindisi	Ιταλία	11
12.	Malvasia Istriana	Ιταλία	12
13.	Malvasia Istria	Ιταλία	13
14.	Malvasia Rei	Ιταλία	14
15.	Malvasia bela	Ιταλία	15
16.	Malvasia Fruehrot	Ιταλία	16
17.	Malvasia di Candia	Ιταλία	17
18.	Malvasia aromatica	Κρήτη	18
19.	Malvasia di Candia	Κρήτη	19
20.	Malvasia del Chianti	Κρήτη	20
21.	Malvasia Istriana	Κρήτη	21
22.	Αθήρι (24)	Κρήτη	22
23.	Δαφνάτο (370)	Κρήτη	23
24.	Δαφνιά (243)	Κρήτη	24
25.	Δερματάς (142)	Κρήτη	25
26.	Κοτσιφάλι (49)	Κρήτη	26
27.	Κρητικό (464)	Κρήτη	27
28.	Κρητικό Μαύρο (80)	Κρήτη	28
29.	Λιάτικο (41)	Κρήτη	29
30.	Μαντηλάρια (30)	Κρήτη	30
31.	Μαντηλάρια (61)	Κρήτη	31
32.	Μαυροδάφνη (293)	Κρήτη	32
33.	Μαυροδάφνη (51)	Κρήτη	33
34.	Μαύρο τραγανό (325)	Κρήτη	34
35.	Μαύρο τραγανό (525)	Κρήτη	35

36.	Μονεμβασία (216)	Κρήτη	36
37.	Gamay (3-39)	Γαλλία	37
38.	Pinot noir (9-18)	Γαλλία	38
39.	Cabernet Sauvignon	Γαλλία	39
40.	Άγνωστος Γονότυπος	Κρήτη	40
41.	White Ghirghentina (1)	Μάλτα	41
42.	White Ghirghentina (2)	Μάλτα	42
43.	White Ghirghentins (3)	Μάλτα	43
44.	White Ghirghentina (4)	Μάλτα	44
45.	Red Gellewza	Μάλτα	45
46.	Malvasia del Bierzo	Ισπανία	46
47.	Malvasia de la Ricia	Ισπανία	47

Οι αριθμοί σε παρένθεση δηλώνουν τον κωδικό DNA κάθε δείγματος (Greek Vitis Database).

2.2 Απομόνωση ολικού DNA από φυτικούς ιστούς

Για την απομόνωση DNA από φύλλα αμπελιού, λήφθηκαν υπόψη διάφοροι παράγοντες όπως η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης, ο τρόπος εκχύλισης, ο ιστός που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί, η αναλογία ιστού: διαλύματος κ.α. Ένα διάλυμα εκχύλισης DNA από φυτικούς ιστούς, συνήθως περιέχει:

- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) μεγάλης ρυθμιστικής ικανότητας (buffering capacity), ικανό να διατηρήσει το pH του εκχυλίσματος, μετά την λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση του όξινου περιεχομένου των χυμοτοπίων. Το pH του διαλύματος θα πρέπει να επιλεγεί προκειμένου να αποφευχθεί η περιοχή τιμών που θα ευνοήσει την δράση των αποδιατακτικών ενζύμων. Για παράδειγμα, τα περισσότερα λιπολυτικά ένζυμα και οι λιποξυγενάσες ευνοούνται σε τιμές pH μεταξύ 5.0 και 6.0, ενώ οι πυρηνικές DNAσες έχουν pH optima περίπου 7.0. Επακόλουθα, τα περισσότερα διαλύματα εκχύλισης DNA έχουν pH περίπου 8.0-9.0.
- ✚ Χηλική ένωση, όπως το EDTA (ethylenediaminetetraacetate), το οποίο περιλαμβάνεται συνήθως για την παρεμπόδιση των υδρολυτικών ενζύμων από μεταλλικά ιόντα.
- ✚ Αντιοξειδωτικούς παράγοντες, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοτρεϊτόλη, για τη διατήρηση των ομάδων -SH σε αναγμένη κατάσταση, αποτρέποντας την απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας.
- ✚ Ενώσεις, που αποτρέπουν τη δέσμευση των ενζύμων από φαινολικές ενώσεις και ταννίνες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφορα πολυμερή, όπως το polyethylene

glycol (PEG), και το polyvinylpyrrolidone (PVP), που δεσμεύουν τις φαινολικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της εκχύλισης καθώς και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όπως θειώλες (θειογλυκολικό οξύ, β-μερκαπτοαιθανόλη και κυστεΐνη) που εμποδίζουν την οξειδωση των φαινολών.

- ✚ Για τη διαλυτοποίηση των προσδεσμεμένων σε μεμβράνες ενζύμων, χρησιμοποιούνται διαφοροί παράγοντες, όπως άλατα σε χαμηλή ιοντική ισχύ, μη ιοντικά απορρυπαντικά κ.α.
- ✚ Το CTAB είναι ένα ισχυρά κατιονικό απορρυπαντικό, το οποίο χρησιμοποιείται για την διαλυτοποίηση των φυτικών μεμβρανών, σχηματίζοντας σύμπλοκο με το DNA.

Στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε η παρακάτω μέθοδος για την εκχύλιση DNA από φύλλα αμπελιού *Vitis vinifera* L. (Lefort and Roubelakis-Angelakis, 2001), η οποία αποτελεί τροποποίηση πρηγούμενης μικρομεθόδου (Lefort and Douglas, 1999).

Εκχύλιση DNA

Εκατόν πενήντα mg φύλλα αμπέλου *Vitis vinifera* L. (φρέσκα ή διατηρημένα στους -20° C), ελήφθησαν από πρέμνα όπως προαναφέρθηκε. Τα φύλλα λειοτριβήθηκαν με την προσθήκη υγρού αζώτου σε γουδί και ακολούθως προστέθηκε 1ml από το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης DNA (DNA extraction buffer) το οποίο αποτελείτο από:

- ✚ 50 mM TRIS pH 8.0
- ✚ 50 mM EDTA pH 8.0
- ✚ 0.4 M LiCl
- ✚ 1.1 M NaCl
- ✚ 1% CTAB
- ✚ 2% PVP (MW = 25,000)
- ✚ 0.5% TWEEN 20 για τη διάρρηξη των πλασματικών μεμβρανών καθώς και
- ✚ 10 μ l 2-mercaptoethanol ως αναγωγικό παράγοντα

Το διάλυμα που προέκυψε επώαστηκε για 15 min στους 65° C σε υδατόλουτρο (LAUDA RM6) στο εσωτερικό ενός Eppendorf tube. Ακολούθως, 0.5ml διαλύματος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (chloroform/isoamyl alcohol (24:1)) προστέθηκε στο παραπάνω διάλυμα και ακολούθησε έντονη ανάδευση. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 14000 rpm . Περίπου 0.8 ml από το υπερκείμενο

μεταφέρθηκαν σε καινούριο αποστειρωμένο eppendorf tube και ίσος όγκος ισοπροπανόλης προστέθηκε σε αυτό. Ακολούθως, το μίγμα αναδεύτηκε, επώαστηκε για 15 min στον πάγο για να κατακρημνιστεί το DNA και φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 14000 rpm.

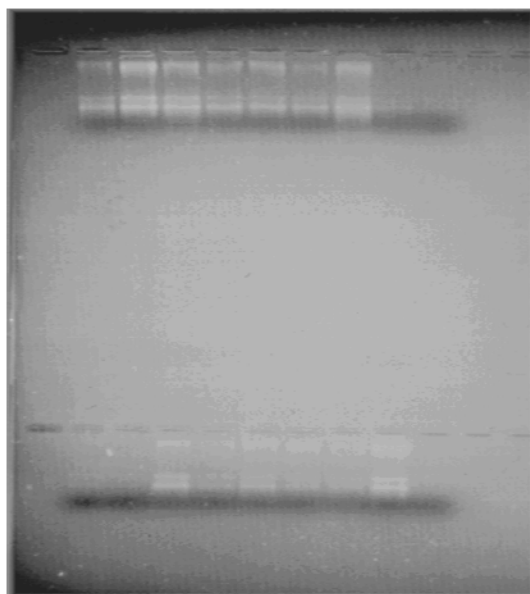
Μετά την φυγοκέντρηση, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και 1 ml αιθανόλης 70% προστέθηκε στο ίζημα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min στις 14000 rpm και στη συνέχεια η αιθανόλη απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει. Τελικά 100 μl διαλύματος TE pH 8.0 (10 mM TRIS • Cl (pH 8.0) και 1 mM EDTA (pH 8.0)), προστέθηκαν στο ίζημα και ακολούθησε επαναδιάλυση αυτής.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς και σε ξύλο, ράγες, ρίζες ή ξηρά φύλλα. Το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την απομόνωση DNA των δειγμάτων της παρούσας εργασίας.

2.3 Ποσοτικός Προσδιορισμός DNA

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή ηλεκτροφόρησης OWL (OWL, Etats-Unis). Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης διαχωρίζει τα τμήματα DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ηλεκτροφορετική συσκευή (Biofinex, Suisse), η οποία συμπληρώνεται με διάλυμα TBE 1x μέχρι την κάλυψη του πηκτώματος. Στο πήκτωμα φορτώνονται 8μl από κάθε δείγμα (2μl DNA αραιωμένα σε 6μl απιονισμένο ύδωρ) αναμεμιγμένα με 2μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (loading dye-blue bromophenol). Χρησιμοποιήθηκε marker HindIII/EcoRI λ (Biofinex, Suisse).

Στο πήκτωμα εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα ισχύος 100 V για περίπου 180 min. Όταν η ‘μεταφορά’ των δειγμάτων DNA ολοκληρώθηκε το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε σκοτεινό δωμάτιο Chemigenious (Syngene, Angleterre) με κάμερα υψηλής ανάλυσης προσαρτημένη σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV table) και συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το πήκτωμα εκτέθηκε στην ακτινοβολία (Transluminescence UV) και οι φωτογραφίες που ελήφθησαν επεξεργάστηκαν με το λογισμικό GeneSnap (Syngene).



Εικ. 10. Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

Το συνολικό ποσό του DNA σ'ένα δείγμα προσδιορίσθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (PERKIN-ELMER, Lamda 20) στα 260 nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης απορροφούν στα 260 nm αλλά και στα 280 nm, όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά. Για να είναι καθαρό το δείγμα, πρέπει η απορρόφηση στα 260 nm να είναι σχεδόν διπλάσια της απορρόφησης στα 280 nm. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις και υπολογίσθηκε ο λόγος OD_{260}/OD_{280} . Ο λόγος αυτός επρεπε να είναι 1,6-2. Η ποσοτικοποίηση έγινε από τη τιμή της απορρόφησης μιας αραιώσης του αρχικού δείγματος όγκου 1 ml (π.χ. αραιώση 5:1000) στα 260 nm. Για μεγαλομοριακό DNA ισχύει ότι $OD_{260}=1$, που σημαίνει ότι στο 1 ml που μετρήθηκε περιέχονται 50 μg DNA. Γενικά εφαρμόστηκε η παρακάτω σχέση:

$$\text{DNA concentration} = (A_{260}) \times \text{OD of 1.0} \times 200 / 1000 \mu\text{l}$$

$(\mu\text{g} / \mu\text{l}) \qquad \qquad \qquad (\mu\text{g} / \mu\text{l}) \text{ (Dilution factor)}$

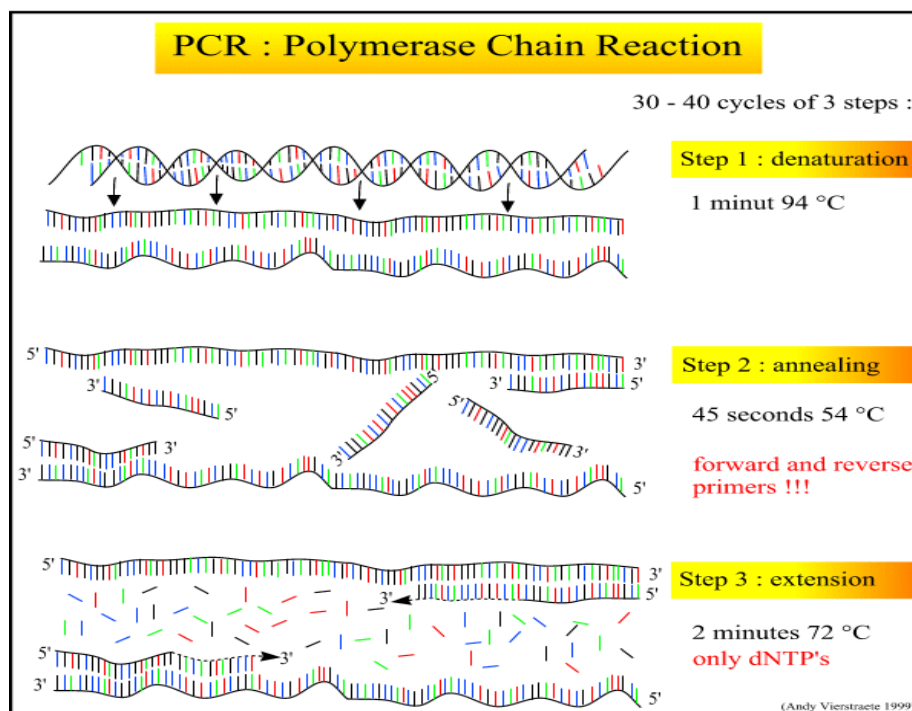
2.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία πολύ σημαντική εργαστηριακή τεχνική (*in vitro*) που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ταυτόσημων αντιγράφων μιας συγκεκριμένης γενετικής περιοχής από μία μικρή ποσότητα αρχικού DNA (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985, 1988; Sharf *et al.*, 1986). Οι αρχές της PCR συνοψίζονται παρακάτω (Navidi and Arnheim, 1994; Watson *et al.*, 1992).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) εφαρμόζεται για να ενισχύσει ένα τμήμα DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Το τμήμα αυτό του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί καλείται DNA στόχος. Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας DNA σε κάθε μια από τις δυο πλευρές του τμήματος έτσι ώστε να σχεδιαστεί το κατάλληλο ζεύγος των ειδικών εκκινητών (*primers*) συνήθως με μήκος 20-25 βάσεις. Δύο ολιγονουκλεοτίδια, λοιπόν, χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για μια σειρά συνθετικών αντιδράσεων που καταλύονται από τη DNA πολυμεράση (Saiki *et al.*, 1988).

Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια τυπικά έχουν διαφορετικές αλληλουχίες και είναι συμπληρωματικές των αλληλουχιών οι οποίες βρίσκονται στις απέναντι αλυσίδες δίκλωνου μορίου DNA. Κατά το πρώτο στάδιο της μεθόδου, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία (η οποία φτάνει τους 95° C) υπό την παρουσία μοριακής περίσσειας από κάθε ένα από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια και τεσσάρων τριφωσφονουκλεοτιδίων (Deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs, 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) και δίνει δυο μονόκλωνες αλυσίδες οι οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για τα επόμενα δυο στάδια.

Κατά το δεύτερο στάδιο (αναδιάταξη) το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία που επιτρέπει την αναδιάταξη/υβριδισμό των ολιγονουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες-στόχους. Κατά το τρίτο στάδιο (προέκταση με πολυμεράση) η θερμοκρασία αυξάνεται ξανά, στους 72° C αυτή τη φορά (ιδανική θερμοκρασία δράσης της *Taq* πολυμεράσης), με αποτέλεσμα οι εκκινητές να προσδένονται στις μονόκλωνες αλυσίδες DNA προκειμένου να επιμηκυνθεί η αλυσίδα του DNA στόχου. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές (Εικ.11).



Εικ.11: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου χρησιμεύουν ως μητρικά μόρια για τα επόμενα, κάθε κύκλος διπλασιάζει το ποσό του επιθυμητού προϊόντος DNA. Το μεγαλύτερο προϊόν αυτής της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα τμήμα διπλής έλικας DNA του οποίου το τελευταίο άκρο ορίζεται από το 5'-τελικό άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων και το μήκος του είναι η απόσταση ανάμεσα στους εκκινητές. Το μεγαλύτερο μήκος που πολλαπλασιάζεται δεν μπορεί να υπερβεί τις 1000-1300 βάσεις (Saiki *et al.*, 1988).

Στην πραγματικότητα μετά από n -κύκλους της αντίδρασης PCR δεν προκύπτουν 2^n αντίγραφα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ποικιλοτρόπως. Ένα μόριο διπλής αλυσίδας μπορεί να μην καταφέρει να αποδιαταχθεί σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες-υποστρώματα. Επίσης οι εκκινητές μπορεί να μην καταφέρουν να αναδιαταχθούν σε κάποια από τα υποστρώματα και τέλος η DNA πολυμεράση μπορεί να μην καταφέρει να προεκτείνει τους ανδιατεταγμένους εκκινητές έτσι ώστε αυτοί με τη σειρά τους να καλύψουν ολοκληρωτικά την περιοχή στόχο.

Χρησιμοποιήθηκε η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που απομονώνεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polymerase). Το ένζυμο είναι ανθεκτικό στην παρατεταμένη επώαση στους 95°C, δεν καταστρέφεται στο στάδιο της αποδιάταξης και δε χρειάζεται να αντικατασταθεί σε κάθε κύκλο της

αντίδρασης. Κάτω από τις συνηθισμένες συνθήκες, το ποσό της *Taq* πολυμεράσης περιορίζεται μετά από τους 25-30 κύκλους (Saiki *et al.*, 1988).

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται για την πριμοδότηση της PCR, συνήθως έχουν μήκος 16-24 βάσεις. Οι εκκινητές που ξεπερνούν τα 10 νουκλεοτίδια σε μήκος είναι μικρής δύναμης διαλογής, αλλά και πάλι εξαρτώνται από τη θερμοκρασία αναδιάταξης στην αντίδραση. Συνήθως χρησιμοποιούνται στην PCR σε συγκέντρωση 0,3-9 μΜ. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ολιγονουκλεοτιδίων μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση έκτοπων θέσεων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μη-θεμιτών αλληλουχιών.

Η PCR είναι μη αποδοτική όταν η συγκέντρωση των εκκινητών είναι περιορισμένη (Oste, 1988). Επίσης, τα προϊόντα της αντίδρασης εξαρτώνται από την ποιότητα και την καθαρότητα των εκκινητών. Τα dNTPs χρησιμοποιούνται σε κορεσμένη συγκέντρωση (200 μΜ για κάθε dNTP) (Oste, 1988).

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τις αλληλουχίες εκατέρωθεν της επανάληψης του μικροδορυφόρου, είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 20-30 bp και πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

- ✚ Να μην έχουν συμπληρωματικά 3' άκρα, για να μην σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους.
- ✚ Να μην περιέχουν σειρές (>3) πουρινών ή πυριμιδινών, γιατί αυτό μπορεί να προκαλέσει λανθασμένη εκκίνηση από περισσότερα σημεία και παραγωγή περισσότερων προϊόντων.
- ✚ Να μην περιέχουν παλίνδρομες αλληλουχίες για να μην σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές.
- ✚ Να απέχουν μεταξύ τους απόσταση τέτοια ώστε να μπορεί να πολλαπλασιαστεί με PCR (< 1Kb).
- ✚ Να έχουν τυχαία κατανομή βάσεων και παρόμοιο ποσοστό %GC. Αυτό είναι σημαντικό για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας τήξης T_m , στην οποία το 50% των μορίων των ολιγονουκλεοτιδίων έχουν αποδιαταχθεί από την αλληλουχία-στόχο. Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο είναι μικρότερη από το (T_m). Για να μπορούν δύο εκκινητές να υβριδοποιούνται με την αλληλουχία-στόχο στις ίδιες συνθήκες, πρέπει να έχουν παρόμοιο T_m . Το T_m ενός ολιγονουκλεοτιδίου υπολογίζεται εμπειρικά από τον τύπο:

$$(T_m) = (A \text{ ή } T) * 2^{\circ} C + (G \text{ ή } C) * 4^{\circ} C$$

όπου A,T,G,C, είναι ο αριθμός των αντίστοιχων τριφωσφορνοουκλεοτιδίων στην αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου.

Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο χαρακτηρίζει κάθε ζεύγος εκκινητών και γενικά είναι 3-10° C μικρότερη από το Tm των εκκινητών. Εκκινητές με υψηλό GC% (υψηλό Tm) υβριδοποιούνται σε θερμοκρασίες >55° C. Χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης (<50° C) ευνοούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, λόγω εκτοπικής πρόσδεσης των PCR-εκκινητών. Η υβριδοποίηση γίνεται σε μικρό χρόνο γιατί οι PCR εκκινητές βρίσκονται σε περίσσεια και ο χρόνος της επέκτασης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου. Για παράδειγμα επέκταση 30 sec αρκεί για PCR προϊόντα μεγέθους 400-500 bp.

Όπως συμβαίνει σε όλες τις βιοχημικές διαδικασίες, έτσι και κατά τη διάρκεια της PCR ενδέχεται να λάβουν χώρα μεταλλάξεις. Κατά την ενίσχυση μορίων DNA με μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορεί να πραγματοποιηθούν σημειακές μεταλλάξεις, που μπορούν να εκτιμηθούν (Sun, 1995; Wang *et al.*, 2000; Weiss and Haeseler, 1995, 1997).

Κατά τη διαδικασία PCR ενίσχυσης σύντομων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (μικροδορυφόρων), παράλληλα με την κύρια ζώνη, εμφανίζονται διάφορες δευτερεύουσες ζώνες, που συνήθως αναφέρονται ως ακαθόριστες ζώνες (*stutter bands*, (Weber and May, 1989)). Η παρουσία αυτών των ακαθόριστων ζωνών στο προϊόν της PCR ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα στην εκτίμηση διαφορετικών αλληλομόρφων στην γενετική ταυτοποίηση.

Για την μείωση της επίδρασης των ακαθόριστων ζωνών στην γενετική ταυτοποίηση με μικροδορυφόρους, πολλοί ερευνητές ανέπτυξαν υπολογιστικούς αλγόριθμους για να βοηθήσουν στην αυτόματη γενετική ταυτοποίηση (Lancia and Perlin, 1998; Perlin *et al.*, 1994, 1995; Stoughton *et al.*, 1997) χωρίς να προσδιορίσουν πώς συμβαίνουν οι μεταλλάξεις.

Σε μια προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού μετάλλαξης των μικροδορυφόρων κατά την PCR, οι Miller και Yuan (1997) ανέπτυξαν ένα μαθηματικό μοντέλο και υπέθεσαν πως σε κάθε κύκλο PCR η πιθανότητα μιας επανάληψης να προστίθεται ή να αφαιρείται δεν εξαρτάται από τον αριθμό των επαναληπτικών μονάδων που έχει το υπόστρωμα. Η θεώρηση αυτή έρχεται σε σαφή αντίθεση με το γεγονός ότι οι ακαθόριστες ζώνες είναι διαφορετικές για αλληλουχίες με διαφορετικό αριθμό επαναληπτικών μονάδων.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι τα εξής:

- ✚ **dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP).** Χρησιμοποιούνται συνήθως 250 μM από κάθε νουκλεοτίδιο στην αντίδραση.
- ✚ **BSA (Bovine Serum Albumin):** Η BSA διευκολύνει και σταθεροποιεί την Ταq πολυμεράση, αλλά δεν είναι πάντα απαραίτητο συστατικό της αντίδρασης. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$.
- ✚ **10X Taq buffer:** Στην αντίδραση γίνεται 1X. Η σύσταση του 10X Taq buffer είναι: 75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- ✚ **MgCl₂:** Η συγκέντρωση του MgCl₂ μπορεί να μεταβάλλεται από 5 ως 25 mM, ανάλογα με το είδος των εκκινητών και τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης. Γι'αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να προσδιορίζεται η καλύτερη συγκέντρωση MgCl₂. Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου μπορεί να επηρεάσει την υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο και να προκαλέσει παραγωγή μη-ειδικών προϊόντων. Το KCl διευκολύνει την υβριδοποίηση του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο.
- ✚ **Taq πολυμεράση:** 0.3-0.5 μονάδες ενζύμου αρκούν για κάθε αντίδραση PCR.
- ✚ **H₂O:** απιονισμένο και αποστειρωμένο.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (πολυσακχαρίτης), εναλασσόμενων μορίων D-galactose (στην φωτογραφία αναπαριστάνεται από τις μπλε σφαίρες) και 3,6-anhydro-L-galactose (στην φωτογραφία του παραρτήματος αναπαριστάνεται από τις κόκκινες σφαίρες). Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, εκτός από την ποσοτικοποίηση, δίνει και χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του DNA και την περιεκτικότητα του σε RNA.

A. Υλικά

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιούνται τα παρακάτω υλικά:

- ✚ **1X διάλυμα TBE:** 90mM Tris-Cl, 90mM βορικό οξύ, 2mM EDTA. Είναι το διάλυμα ηλεκτροφόρησης που προσδίδει αγωγιμότητα στο πήκτωμα με τα ιόντα βορικού οξέος.
- ✚ **2X διάλυμα χρωστικής:** bromophenol blue, γλυκερόλη 20%. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται για την καθήλωση του DNA όταν αυτό φορτώνεται στο πήκτωμα

και η βρωμοφαινόλη χρωματίζει το δείγμα για την παρατήρησή του καθώς τρέχει στο πήκτωμα.

- ✚ Βρωμιούχο αιθίδιο. Προστίθεται στο πήκτωμα, σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Προσδένεται μεταξύ των δύο αλυσίδων της DNA έλικας, ώστε το σύμπλοκο βρωμιούχου αιθιδίου-DNA να φθορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.
- ✚ Πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η αγαρόζη διαλύεται σε 2X TBE με βρασμό. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (100 µg/ml), και στη συνέχεια αφήνεται να στερεοποιηθεί σε ειδική μήτρα στην οποία τοποθετείται κατάλληλο χτένι για το σχηματισμό των θέσεων όπου φορτώνονται τα δείγματα.

B. Διαδικασία

- ✚ Μία ποσότητα δείγματος DNA (300-500ng), αναμειγνύεται με 1X διάλυμα χρωστικής.
- ✚ Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα. Μαζί φορτώνεται κι ένας ποσοτικός μάρτυρας (DNA λ βακτηριοφάγου γνωστής συγκέντρωσης).
- ✚ Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100-120 Volts για δύο ώρες περίπου.
- ✚ Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.
- ✚ Η ποσοτικοποίηση γίνεται συγκρίνοντας την ένταση της ζώνης του άγνωστου DNA με την ένταση της ζώνης του μάρτυρα. Αν υπάρχει RNA αυτό φαίνεται με τη μορφή του νέφους.

PCR πυρηνικών μικροδορυφόρων

Προκειμένου για τον πολλαπλασιασμό των μικροδορυφορικών τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ενίσχυσης από πυρηνικούς μικροδορυφορικούς τόπους του είδους *Vitis riparia* (Steinkellner *et al.*, 1999), οι *ssrVrZAG 21*, *ssrVrZAG 47*, *ssrVrZAG 62*, *ssrVrZAG 64*, *ssrVrZAG 79* και *ssrVrZAG 83* καθώς και από μικροδορυφορικούς τόπους του είδους *Vitis vinifera* (Thomas and Scot, 1993; Lefort *et al.*, 2002), οι *VVS2*, *UCH11* και *UCH29*. Για τη διαδικασία ενίσχυσης της PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Thermocycle Master Gradient (Eppendorf, Allemagne) σε βάσεις πολυπροπυλενίου με 96 υποδοχές (πηγάδια) ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20µl.

Για την αντίδραση PCR τα δείγματα ετοιμάστηκαν ως εξής:

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν τα ακόλουθα:

- ✚ 1μM από κάθε εκκινητή
- ✚ 100μM από κάθε διάλυμα dNTP (Biofinex, Praroman, Switzerland)
- ✚ 1.5 mM MgCl₂ (Biotools)
- ✚ 1x PCR ρυθμιστικό διάλυμα (το οποίο αποτελείται από 75mM Tris HCl – pH 9.0-, 50mM KCl, 20mM (NH₄)₂SO₄) (Biotools, Madrid, Spain)
- ✚ Απιονισμένο νερό
- ✚ 0.5 μονάδες *Taq* πολυμεράσης (Biotools, Madrid, Spain) και
- ✚ 50ng DNA δείγματος

Ο πρόσθιος εκκινητής (forward) σε κάθε περίπτωση σημαίνεται με Cys Fluor.

Εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρωτόκολο θερμικής κυκλοποίησης:

- ✚ 95°C για 5 min,
- ✚ 10 κύκλοι των 15 s στους 51 °C,
- ✚ 15 s στους 94 °C, που ακολουθούνται από
- ✚ 23 κύκλους των 15 s στους 51 °C,
- ✚ 15 s στους 89 °C και
- ✚ Άμεσος τερματισμός της διαδικασίας με τοποθέτηση των δειγμάτων στους 4 °C.

Η επιτυχία της ενίσχυσης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE (Tris, boric acid, EDTA, pH 8.0) με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Η ανάλυση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αλληλούχισης πολυακρυλαμίδης σε συσκευή ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences) και το μέγεθος των αλληλομόρφων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Allele Locator.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Μήκος σε βάσεις	T _m (°C)	Allele size range (bp)
UCH11-R	CTGCCGTTTGGGTAAGATGCT	21	65	(GA) ₁₅
UCH11-F	ATGCCCGAGAAGAGTCGAGAA	21	65	(GA) ₁₅
UCH29-R	CAACCTGTTGATGAAAGGGAAA	22	63	(CT) ₁₈
UCH29-F	AAACATGATCTGATGCAGGTGA	22	62	(CT) ₁₈
ZAG79-R	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	25	50	
ZAG79-F	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	25	50	
VVS2-R	AAATTCAAAAGTCTAATTCAACTGG	25	52.1	129-155
VVS2-F	CAGCCCGTAAAGGTATCCATC	21	53.4	129-155
ZAG47-R	ACGGTGTGCTCTCATTGTCATTGAC	25	50	
ZAG47-F	GGTCTGAATACATCCGTAAGTATAT	25	50	
ZAG21-R	GGGGCTACTCCAAAGTCAGTTCTTG	25	50	190-214
ZAG21-F	TCATTCACCTCACTGCATTCATCGGC	25	50	190-214
ZAG62-R	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	25	50	185-203
ZAG62-F	GGTGAATGGGCACCGAACACACGC	25	50	185-203
ZAG83-R	ACGCAACGCCTAGTAAATACAACGG	25	50	
ZAG83-F	GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG	25	50	
ZAG64-R	TGCAATGTGGTCAGCCTTTGATGGG	25	58	
ZAG64-F	TATGAAAGAAACCCAACGCGGCACG	25	58	

2.5 Ενίσχυση των ρετρομεταθετονίων πολλαπλών γενετικών τόπων με την μέθοδο PCR – REMAP (REtrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism)

Το πειραματικό πρωτόκολο είναι προσαρμοσμένο σε εκείνο που περιγράφεται από τους Kalendar *et al.* (1999). Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των ρετρομεταθετονίων σχεδιάστηκε από αλληλουχίες ρετρομεταθετονίων του *Vitis vinifera* L. που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί (Pelsy and Merdinoglu, 2002). Ως εκκινητής για το ρετρομεταθετόνιο επιλέχθηκε μία μικρή αλληλουχία που βρίσκεται στην περιοχή PPT πριν από το LTR του ρετρομεταθετονίου (VnPPT1, 5'-TTG AGG GGG AGT GTT AGC TG- 3') (Lefort F., unpublished data).

Το μίγμα του αποδιατεταγμένου εκκινητή που προσδένεται στην μικροδορυφορική αλληλουχία (CA)₇ έχει προσδιοριστεί από τους Zietkiewicz *et al.*, 1994. Για τον σκοπό αυτό, για τον ISSR, ένας εκφυλισμένος εκκινητής επιλέχθηκε με την αλληλουχία BDB(CA)₇, όπου το B μπορεί να είναι C, G, ή T και το D μπορεί να είναι A, G ή T. Η επιλογή αυτή εξηγείται από την μικρότερη συχνότητα των διουκλεοτιδικών μικροδορυφόρων του μοτίβου CA που εμφανίζεται στα φυτά.

Για τον καλύτερο χαρακτηρισμό αυτών των πολλαπλών γενετικών τόπων, είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης, στις οποίες οι δυο εκκινητές υβριδίζουν καλύτερα στη μήτρα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα το είδος *Malvasia moscatel Fonte grande*. Για τις δοκιμές των αντιδράσεων

της PCR πραγματοποιήθηκε ο ίδιος εξοπλισμός όπως παραπάνω. Μετά τις δοκιμές, οι βέλτιστες συνθήκες PCR για τους εκκινητές VvPP1 και BDB(CA)₇ είναι:

- 95 °C για 5 λεπτά για 34 κύκλους, αναλυτικά:
 - 95 °C για 30s,
 - 61 °C για 30s,
 - 72 °C για 2 λεπτά και άμεση λήξη στους
- 4 °C.

Με την ακόλουθη σύσταση μίγματος αντίδρασης

- 1xPCR buffer (Biotools),
- MgCl₂ (Biotools) 1.5 mM,
- dNTPs (Biofinex) 100 μM,
- VvPP1 (Microsynth) 1 μM,
- BDB(CA)₇ (Microsynth) 1 μM,
- ultra-pure water,
- *Taq* polymerase (Biotools) 2.5 u/20 μl and
- DNA sample (100ng).

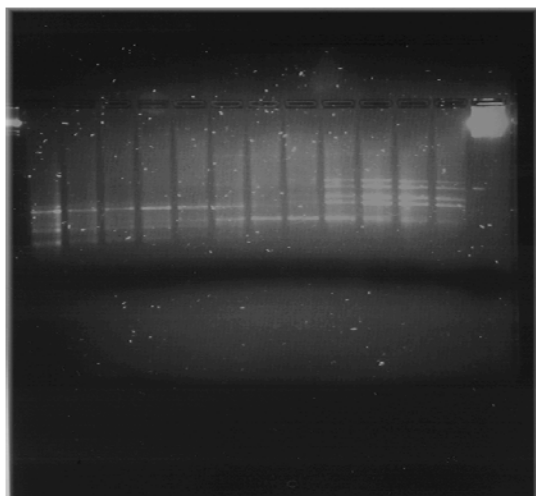
Πιο συγκεκριμένα για συνολικό όγκο 20 μl προστίθενται:

- 2 μl 10x PCR Buffer,
- 0.6 μl MgCl₂ (50 mM),
- 2 μl dNTPs (4mM),
- 0.2 μl εκκινητή VvPP1,
- 0.2 μl εκκινητή BDB(CA)₇ (100 μM),
- 12.5 μl ultra pure water,
- 0.5 μl *Taq* πολυμεράσης (5 u/μl) και
- 2 μl δείγματος DNA (50ng/ μl).

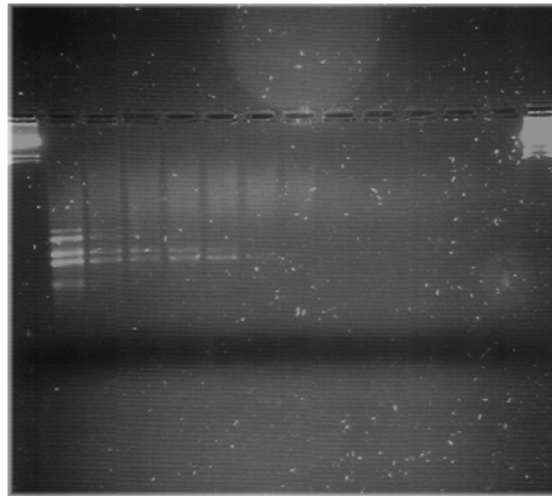
Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Η μετανάστευση διήρκεσε 120min σε μία δεξαμενή ηλεκτροφόρησης με Sub-Cell®. Τα προϊόντα της PCR προκειμένου να ελεγχθούν τοποθετήθηκαν αρχικά πάνω σε Parafilm® ως εξής:

Σε 8 μl του προϊόντος προς ανάλυση προστέθηκαν 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης καθώς επίσης και 1 μl Gelstar® Nucleic Acid Stain. Οι μάρτυρες για τον προσδιορισμό του μεγέθους προετοιμάστηκαν επίσης ως εξής: 2μl μάρτυρα, 2μl loading buffer και 2μl Gelstar®. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε

είναι ο BMA 100 (BioWhittaker Molecular Applications, Etat-Unis). Στο πήκτωμα εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα τάσεως 100V και εντάσεως 400mA για 180 λεπτά.



40⁰C to 60⁰C



60⁰C to 72⁰C

Εικ. 12 Έλεγχος βέλτιστης θερμοκρασίας για τα καλύτερα αποτελέσματα ενίσχυσης με εκκινητές BDB(CA)₇ και VvPPT1. (Είδος στο οποίο πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος *Malvasia moscatel fonte grande*).

2.6 Προετοιμασία των προϊόντων PCR (τόσο για τους μικροδορυφόρους όσο και για το REMAP) για φόρτωση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Τα προϊόντα της PCR επί των μικροδορυφορικών τόπων αναμίχθηκαν με αποδιατακτικό μίγμα φόρτωσης το οποίο αποτελείτο από φορμαμίδη (Loading Dye, Amersham Biosciences, Etat-Unis), έναν δείκτη μεγέθους ALFexpress™ sizer™ 100 (Amersham Biosciences) και έναν δείκτη μεγέθους ALFexpress™ sizer™ 300 (Amersham Biosciences) σε βάση PCR, με 96 υποδοχές, για τον θερμικό κυκλοποιητή. Το μίγμα φορμαμίδης με τον δείκτη μεγέθους προετοιμάστηκε νωρίτερα και κατόπιν διανεμήθηκε στη βάση με τη χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας HandyStep® (Brand, Allemagne). Στη συνέχεια, κάθε δείγμα τοποθετήθηκε ξεχωριστά σε κάθε υποδοχή της βάσης.

Η χωρητικότητα του αναλυτή τμημάτων προβλέπει 40 πηγάδια φόρτωσης, για το λόγο αυτό προετοιμάστηκε ένα ενιαίο μίγμα (master mix) για τα 40 δείγματα (6 μl μίγματος φόρτωσης και 3 μl του PCR προϊόντος). Η βάση PCR σφραγίστηκε ερμητικά στην κορυφή με κολλητική PCR ταινία (ABgene, UK). Τα δείγματα υπέστησαν αποδιάταξη στους 92°C για 3 min και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε πάγο.

Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείτο από 42 πηγάδια εκ των οποίων τα 40 μόνο μπορούσαν να αναλυθούν. Τα δύο πλεονάζοντα πηγάδια βρίσκονταν στα δυο άκρα του πηκτώματος λειτουργώντας ουσιαστικά προστατευτικά ώστε να περιοριστεί η παραμόρφωση στα πηγάδια 1 και 40. Αυτά, συμπληρώθηκαν με 9μl χρωστικής φορτώσεως, σε ίσο όγκο με αυτόν των δειγμάτων. Τα δείγματα φυλάσσονταν μόνιμα σε πάγο. Τοποθετήθηκαν μέσα στα πηγάδια στην ίδια ακριβώς σειρά όπως είχαν φορτωθεί και στην PCR προκειμένου για την εύκολη αναγνώρισή τους.

Τα προϊόντα της REMAP PCR υπέστησαν μία διαδικασία post-PCR μόνο με την παρουσία χρωστικής φορτώσεως (χωρίς την προσθήκη δείκτη μεγέθους στο δείγμα) σε PCR plate στον θερμικό κυκλοποιητή. Σε κάθε υποδοχή τοποθετήθηκαν 4 μl προϊόντος PCR και 5 μl χρωστικής φορτώσεως. Εδώ χρησιμοποιήθηκε ένας εξωτερικός δείκτης μεγέθους ο ALFexpress™ sizer™ 50-500 (Amersham biosciences). Ο δείκτης αυτός ήταν ένα μίγμα αποτελούμενο από 2 μl του ALFexpress™ sizer™ 50-500, 3 μl TE pH 7.5 και 4 μl φορμαμίδης.

Έτσι 24 ήταν τα δείγματα που προετοιμάστηκαν καθώς και 3 εξωτερικοί δείκτες μεγέθους. Όλα τα δείγματα υπέστησαν μία φάση αποδιάταξης καθώς επώαστηκαν στους 92°C για 3 λεπτά. Μετά την αποδιάταξη τα δείγματα τοποθετήθηκαν απευθείας σε πάγο. Ο εξωτερικός δείκτης μεγέθους τοποθετήθηκε ανά 3 ή 5 πηγάδια ανάμεσα στα δείγματα, με σκοπό τη διόρθωση της επίδρασης της παραμόρφωσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Τα δυο πηγάδια, στο αριστερό και το δεξί άκρο του πηκτώματος, συμπληρώθηκαν με 9μl μορμαμίδης. Τελικά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα υπόλοιπα πηγάδια στη σειρά με την οποία είχαν τοποθετηθεί και για την PCR.

2.7 Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των μικροδορυφορικών δεικτών, οι οποίες περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση 35S dATP κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR και διαχωρισμό των προϊόντων σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (Thomas and Scott, 1993), σήμανση των εκκινητών με 32P κατά την διάρκεια της PCR αντίδρασης και διαχωρισμό των προϊόντων σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο των μη-αποδιατακτικών πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης (Scott *et al.*, 2000b), υβριδοποίηση των σημασμένων στα άκρα (32P, βιοτίνη) μικροδορυφορικών

ολιγονουκλεοτιδικών σημαντών με τεμάχια που μεταφέρονται σε νάιλον μεμβράνες μετά από διαχωρισμό σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (Kijas *et al.*, 1995) και χρώση αργύρου των αποδιατακτικών πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης (Bowers *et al.*, 1996; 1999b; Bowers and Meredith, 1997).

Ο πλέον αποτελεσματικός τρόπος, όμως, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, είναι η χρήση εκκινητών που έχουν σημανθεί με κάποια φθορίζουσα ουσία. Προκειμένου να αναλυθούν τα τμήματα PCR, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα αλληλόμορφα και να μετρηθεί το μέγεθός τους με ακρίβεια, χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος αναλυτής νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ALFwin™ Fragment Analyser 1.00 με σκοπό το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Η σήμανση των εκκινητών με τη χρήση φθορίζουσας ουσίας κατέστησε τα τμήματα DNA, που προέκυψαν από την PCR, ανιχνεύσιμα με τη βοήθεια ανιχνευτή laser. Αυτά αποθηκεύτηκαν ως εικόνα του πηκτώματος που αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού AlleLocator™ software (Pharmacia Biotech, Sweden), με το οποίο διαφορά μιας βάσης ήταν διακριτή. Ένα τέτοιο πρότυπο αναλύθηκε με τη βοήθεια ενός προγράμματος H/Y και επιτεύχθηκε ο ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους των αλληλομόρφων. Τα μεγέθη αυτά σε bp ήταν τα δεδομένα των αλληλομόρφων, που θα αποθηκεύονταν σε μία γενετική βάση δεδομένων. Μια ποικιλία χαρακτηρισμένη σε 9 περιοχές για παράδειγμα, έδωσε 18 δεδομένα σε bp, που αντιστοιχούσαν σε 18 αλληλόμορφα, άσχετα με το αν το δείγμα είναι ομόζυγο ή ετερόζυγο σε έναν ή περισσότερους τόπους.

Τυπικά, μετά την αντίδραση της PCR με τους μικροδορυφορικούς εκκινητές, προκύπτουν και γίνονται ορατές στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης:

- ✚ Μία μεγαλύτερη ζώνη, η οποία αντιστοιχεί στο ένα αλληλόμορφο που το άτομο έχει κληρονομήσει από τον θηλυκό γονέα και μία μικρότερη ζώνη, η οποία αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο πατρικής προέλευσης, αν το δείγμα είναι ετερόζυγο ως προς τον αναλυόμενο γενετικό τόπο.
- ✚ Μία έντονη ζώνη, αν το δείγμα είναι ομόζυγο για τον μελετούμενο γενετικό τόπο.

Κάποια υποκείμενα ή ποικιλίες *Vitis*, δεν είχαν καθόλου αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο που εξετάστηκε και έδωσαν έναν null – null γενότυπο. Ένα null αλληλόμορφο παρατηρείται όταν το DNA, που αναπαριστά το γενετικό τόπο είναι μεν παρόν, όμως ο πολλαπλασιασμός του μέσω της αντίδρασης PCR παρεμποδίστηκε από DNA μεταλλαγές (σημειακές μεταλλαγές DNA, διαγραφές ή προσθήκες) στις θέσεις

υβριδοποίησης των εκκινητών, διαφορετικά παρατηρείται όταν το DNA που αναπαριστά το γενετικό τόπο δεν είναι παρόν στο γένωμα του δείγματος.

Τα σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική προϊόντα διαχωρίστηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ReproGel™ περιεκτικότητας 6% το οποίο αποτελείτο από 8% (w/v) acrylamide/bis acrylamide monomers, 0.1M Tris, 83mM boric acid, 1mM EDTA, UV εκκινητή και αποδιατακτικό παράγοντα. Το μείγμα διοχετεύθηκε στην κασσέτα, η οποία στη συνέχεια εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV light) (Εικ.13) για διάστημα 10 λεπτών της ώρας μέχρι να πολυμεριστεί πλήρως.



Εικ. 13 Πολλαπλή Λάμπα Υπεριώδους Ακτινοβολίας (UV) Amersham Biosciences

Μετά τον πολυμερισμό της πολυακρυλαμίδης η κασσέτα τοποθετήθηκε στον αυτόματο αναλυτή ALFexpress sequencer (Εικ.14) και ο ελεύθερος χώρος συμπληρώθηκε με 1xTBE. Η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία. Ελέγχθηκε αρχικά το laser τόσο ως προς τη θερμοκρασία, μέχρι τους 40° C, όσο και προς τη μετάδοσή του, μέχρι το 90%. Με την επιτυχή ολοκλήρωση του ελέγχου τα πηγάδια πλύθηκαν καλά και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε αυτά τα δείγματα (προϊόντα της PCR), τα οποία είχαν μόλις υποστεί post-PCR μεταχείριση.

Κατά την διάρκεια αυτής της post-PCR μεταχείρισης κάθε προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εκτέθηκε στους 92° C για 2 λεπτά έτσι ώστε το δίκλωνο DNA να διαχωριστεί σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες και οι δυο αλληλόμορφοι να μπορούν να τρέξουν ανεξάρτητα κατά μήκος του πηκτώματος. Τέλος το πρόγραμμα ρυθμίστηκε για διάστημα 500 min, σε τάση 1500 V, ένταση 60 mA, ισχύ 30W και σε θερμοκρασία 55° C.



Εικ. 14 Αυτόματος Αναλυτής ALFexpress sequencer Της Amersham Biosciences

Παράμετροι του ALFexpress™ run

Μόλις το πήκτωμα ετοιμάστηκε συνδέθηκαν τα δυο ηλεκτρόδια, ένα αρνητικό κι ένα θετικό. Το αρνητικό συνδέθηκε στο δοχείο που βρισκόταν στο πάνω μέρος της κασέτας μπροστά από τα πηγάδια φόρτωσης. Το θετικό τοποθετήθηκε στο αποσπώμενο δοχείο στη βάση του αναλυτή τμημάτων ή σε αυτό το οποίο βυθιζόταν το κάτω τμήμα της κασέτας. Για 700 min διαδικασία ανάγνωσης, στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης εφαρμόστηκε σε τάση 1500 Volts, ένταση 60 milliAmps, ισχύ 25Watts και θερμοκρασία 55° C. Στη συνέχεια καλύφθηκε ο αναλυτής με το πρόσθιο

καπάκι του, δημιουργήθηκε ένα αρχείο με την ημερομηνία και την ονομασία της διαδικασίας και ξεκίνησε η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος.

2.7.1 Συλλογή και ανάλυση Αποτελεσμάτων

Η γονοτυπική ανάλυση με μικροδορυφόρους απαιτεί τον καθορισμό του αριθμού των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε έναν συγκεκριμένο τόπο, σε μια δεδομένη ποικιλία. Αυτό επιτυγχάνεται με ηλεκτροφορητικό καθορισμό μεγέθους του τμήματος που περιλαμβάνει την επαναλαμβανόμενη περιοχή (τον μικροδορυφορικό τόπο), η οποία ενισχύεται με τη μέθοδο PCR με εκκινητές που προσδένονται σε θέσεις άνωθεν και κάτωθεν του μικροδορυφορικού DNA. Μέθοδοι για την αποτύπωση και την μέτρηση αυτών των προϊόντων PCR έχουν βελτιωθεί σημαντικά, ξεκινώντας με τη ραδιοενεργή σήμανση, χρώση με άργυρο ή βρωμιούχο αιθίδιο των προϊόντων PCR (Thomas and Scott, 1993; Scott et al., 2000b; Bowers et al., 1996, 1999b; Bowers and Meredith, 1997), οι οποίες έχουν αντικατασταθεί από την χρήση εκκινητών προσδεδεμένων με χρωμοφόρα και ανάλυση τμημάτων με αυτόματους αναλυτές και λογισμικά εκτίμησης μεγέθους τμημάτων.

Η επεξεργασία του μεγέθους των αλληλομόρφων μεταξύ πηκτωμάτων και διαφορετικών ABI συσκευών ανάλυσης/αλληλούχισης έχει δείξει υψηλή αναπαραγωγικότητα, ενώ παρατηρούνται διαφορές στην επεξεργασία μεγέθους όταν συγκρίνονται τα αποτελέσματα από διαφορετικά ηλεκτροφορητικά συστήματα. Για παράδειγμα, ένας αλληλόμορφος που εκτιμάται ότι έχει μέγεθος 150 bp με χρώση αργύρου μπορεί να τρέξει στις 148 bp στο σύστημα Pharmacia, ενώ μπορεί να δώσει αποτέλεσμα 153 bp στην περίπτωση του αναλυτή ABI. Αυτές οι αποκλίσεις, ωστόσο, είναι σταθερές μέσα σε έναν συγκεκριμένο τόπο και μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν με ανάλυση μιάς μικρής ομάδας γονοτύπων σε κάθε ένα από τα συστήματα /ανάλυσης/αλληλούχισης.

Αργότερα, τα μεγέθη των αλληλομόρφων που υπολογίζονται από διαφορετικά υπολογιστικά συστήματα, μπορούν να διορθωθούν για την παρατηρούμενη απόκλιση με βάση ένα εδραιωμένο πρότυπο σύστημα και δεδομένα από διαφορετικές πηγές μπορούν ξανά να συγκριθούν εύκολα (This *et al.*, 2004). Έτσι, τα δεδομένα που αποκτήθηκαν σε διαφορετικά εργαστήρια και με διαφορετικές μεθόδους μπορούν να συνδυαστούν εύκολα σε ενιαίες αναλύσεις και βάσεις δεδομένων. Στην παρούσα διατριβή, τα δεδομένα που συλλέχθηκαν για τον χαρακτηρισμό των μικροδορυφόρων και των REMAP καταγράφησαν αυτόματα από τον ALFwin™ Fragment Analyser

1.00 αμέσως μόλις τερματίστηκε το πρόγραμμα. Έπειτα, τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού AllelLocator™ software (Pharmacia Biotech, Sweden).

2.8 Φαινογράμματα

Η μελέτη της σχέσης μεταξύ ομάδων οργανισμών ονομάζεται ταξινομική. Ο κλάδος της ταξινομικής που ασχολείται με αριθμητικά δεδομένα, όπως οι αλληλουχίες DNA, ονομάζεται Φυλογενετική. Συστηματικοί βιολόγοι που επιθυμούσαν να ανακατασκευάσουν εξελικτικές γενεαλογίες ειδών βασισμένοι σε μορφολογικές ομοιότητες αρχικά ανέπτυξαν τη φυλογενετική ανάλυση.

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης μπορούν να αντικατοπτριστούν σαν ένα ιεραρχικό, διακλαδιζόμενο διάγραμμα, ένα κλαδόγραμμα ή ένα φυλογενετικό δένδρο. Ένα δένδρο αντιπροσωπεύει τη γενεαλογική εξέλιξη διαφορετικών ειδών, συνδέοντάς τα μέσα από έναν συνδυασμό συγκεκριμένων ομοιοτήτων και διαφορών. Οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ οργανισμών μπορούν να κωδικοποιηθούν ως ένας συνδυασμός χαρακτήρων, καθένας με δυο ή περισσότερες διατυπώσεις εναλλακτικών χαρακτήρων. Σε μια αντιστοίχιση DNA αλληλουχιών, για παράδειγμα, κάθε αντιστοιχισμένη πλευρά είναι ένας ξεχωριστός χαρακτήρας, καθένας με 4 διατυπώσεις χαρακτήρων, που αντιστοιχούν στα 4 νουκλεοτίδια του DNA αδενίνη, θυμίνη, κυτοσίνη και γουανίνη.

Όλα τα δένδρα θεωρούνται δυαδικά, εννοώντας ότι κάθε κόμβος διακλαδίζεται σε δυο θυγατρικές απολήξεις. Οι απολήξεις συναντώνται σε έναν κόμβο, ο οποίος βρίσκεται στην άκρη της απόληξης. Κάθε απόληξη έχει ένα συγκεκριμένο ποσοστό εξελικτικής απόκλισης που συνδέεται με αυτήν, ποσοτικοποιημένο σε κάποια απόσταση μεταξύ των DNA αλληλουχιών. Αυτές οι αποστάσεις αναφέρονται ως μήκη απολήξεων ή μήκη κλάδων. Οι τερματικοί κόμβοι, ή φύλα, αντιστοιχούν στις παρατηρούμενες αλληλουχίες που ενδεχομένως συνδέονται με έναν τελικό πρόγονο ή ρίζα του δένδρου. Μία πραγματική βιολογική φυλογένεια έχει ρίζα, ωστόσο μόνο μερικοί φυλογενετικοί αλγόριθμοι παρέχουν πληροφόρηση σχετικά με την θέση της ρίζας.

Για μια συγκεκριμένη ομάδα n φύλλων, οι κόμβοι και οι απολήξεις ενός δένδρου μπορούν να μετρηθούν ως εξής: Θα υπήρχαν $(n-1)$ κόμβοι συμπληρωματικά

με τα n φύλλα, δίνοντας ένα σύνολο $(2n-1)$ κόμβων και ένας κόμβος λιγότερες απολήξεις δηλαδή $(2n-2)$, παραβλέποντας την απόληξη πάνω από τον βασικό κόμβο. Στην παρούσα διατριβή το πρόγραμμα Identity 1.0 (Sefc and Wagner, 2000) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των μικροδορυφορικών δεδομένων για περαιτέρω εισαγωγή και επεξεργασία από το πρόγραμμα Microsat (Minch *et al.*, 1997). Η απόσταση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η $[-\text{Log}(\text{αναλογία κοινών αλληλομόρφων})]$. Ένα φαινόγραμμα εξάγεται τότε με χρήση της επιλογής Kitsch του πακέτου Phylip (Feselstein, 1989) και Treeview (Page, 1996).

Τα δεδομένα από την εφαρμογή της μεθόδου REMAP μεταφέρονται και παίρνουν τη μορφή ορθογώνιου διαδικού πίνακα για να επιτραπεί έτσι η ανάλυση από το λογισμικό NTSYSpc 2.1 (Exeter Software, Setauker, NY, State-Plain) όπως έγινε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρουσίας μικροδορυφόρων. Η γενετική απόσταση που χρησιμοποιήθηκε είναι η μέση ταξονομική απόσταση. Αυτός ο πίνακας, βασισμένος στη συγκεκριμένη απόσταση, επιτρέπει την κατασκευή ενός φαινογράμματος με τη χρήση του UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

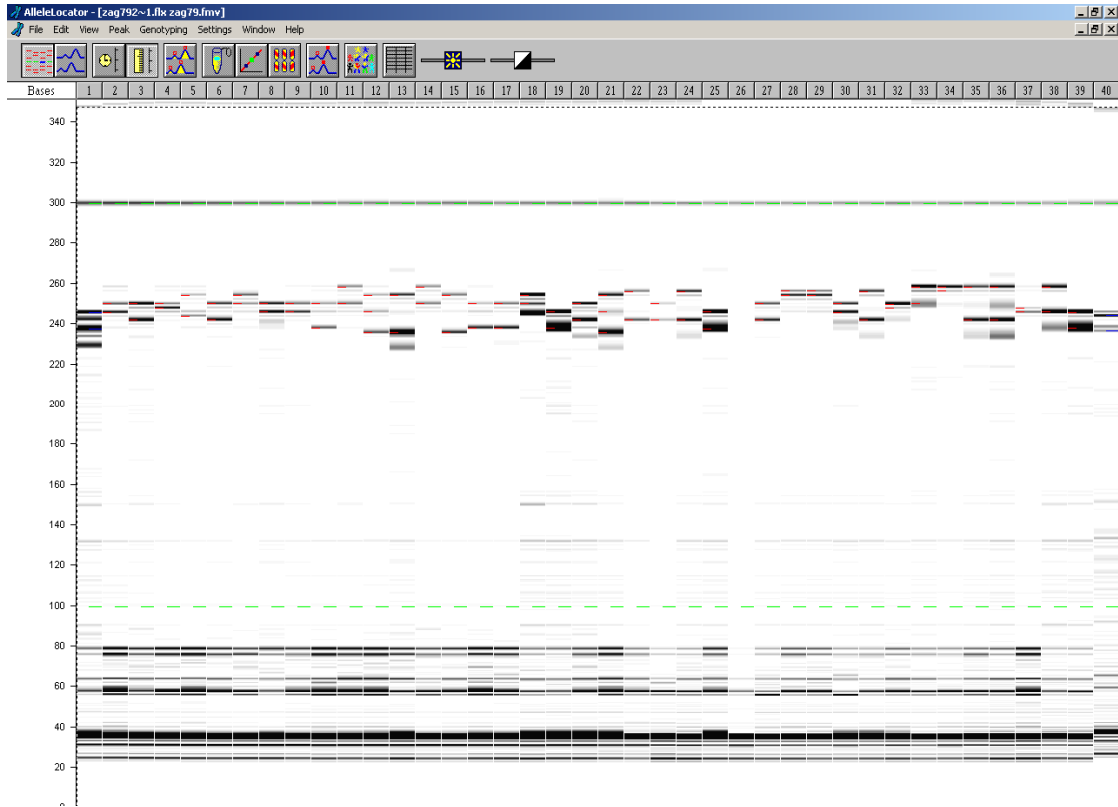
3.1 Γενετική παρουσία μικροδορυφόρων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός της παρούσας διατριβής, ήταν η γενετική ταυτοποίηση 47 ποικιλιών *Vitis vinifera*, χρησιμοποιώντας μικροδορυφόρους ως μοριακούς δείκτες, δίνοντας περισσότερη έμφαση στην προέλευση των Ιταλικών ποικιλιών Malvasia σε σχέση με Ελληνικές ποικιλίες. Οι 9 μικροδορυφορικοί τόποι, που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι UCH11, UCH29, VVS2, ZAG21, ZAG47, ZAG62, ZAG64, ZAG79 and ZAG83. Ο αριθμός των παρατηρηθέντων αλληλομόρφων ήταν 6 για τον γενετικό τόπο ZAG83, 7 για τους γενετικούς τόπους UCH11, ZAG21 και ZAG62, 8 για τους γενετικούς τόπους ZAG47 και ZAG64, 9 για τον γενετικό τόπο ZAG79 και 11 αλληλόμορφοι διαφορετικού μεγέθους για τους γενετικούς τόπους UCH29 και VVS2.

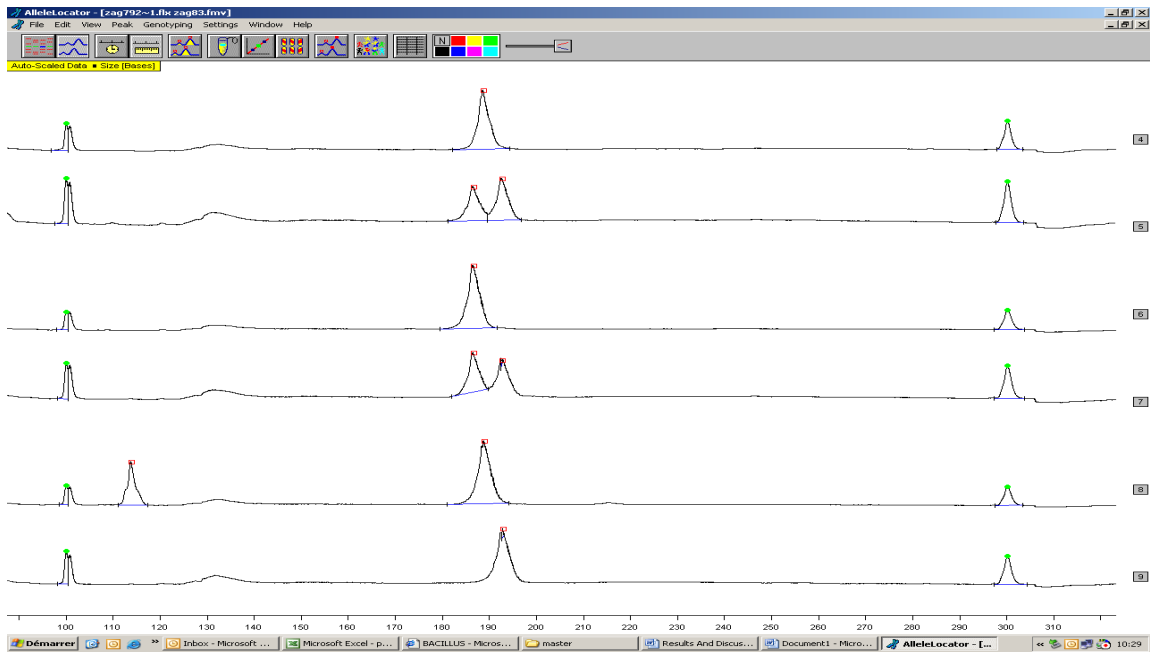
Παράλληλα προτάθηκε και εξετάστηκε ως προς τα αποτελέσματά της μία ακόμη μέθοδος μοριακής ταυτοποίησης των ποικιλιών αμπέλου, η μέθοδος REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism).

Το μικροδορυφορικό προφίλ των ποικιλιών αμπέλου απεικονίζεται παρακάτω. Οι Εικόνες 15 και 17, δείχνουν ένα αντιπροσωπευτικό πήκτωμα από αυτά που αντλήθηκαν για κάθε μικροδορυφορικό τόπο από τον αναλυτή ALFexpress II. Σε αυτά απεικονίζονται σε διακριτές ζώνες οι αλληλόμορφοι του εκάστοτε μικροδορυφορικού τόπου για κάθε μια από τις μελετούμενες ποικιλίες αμπέλου.

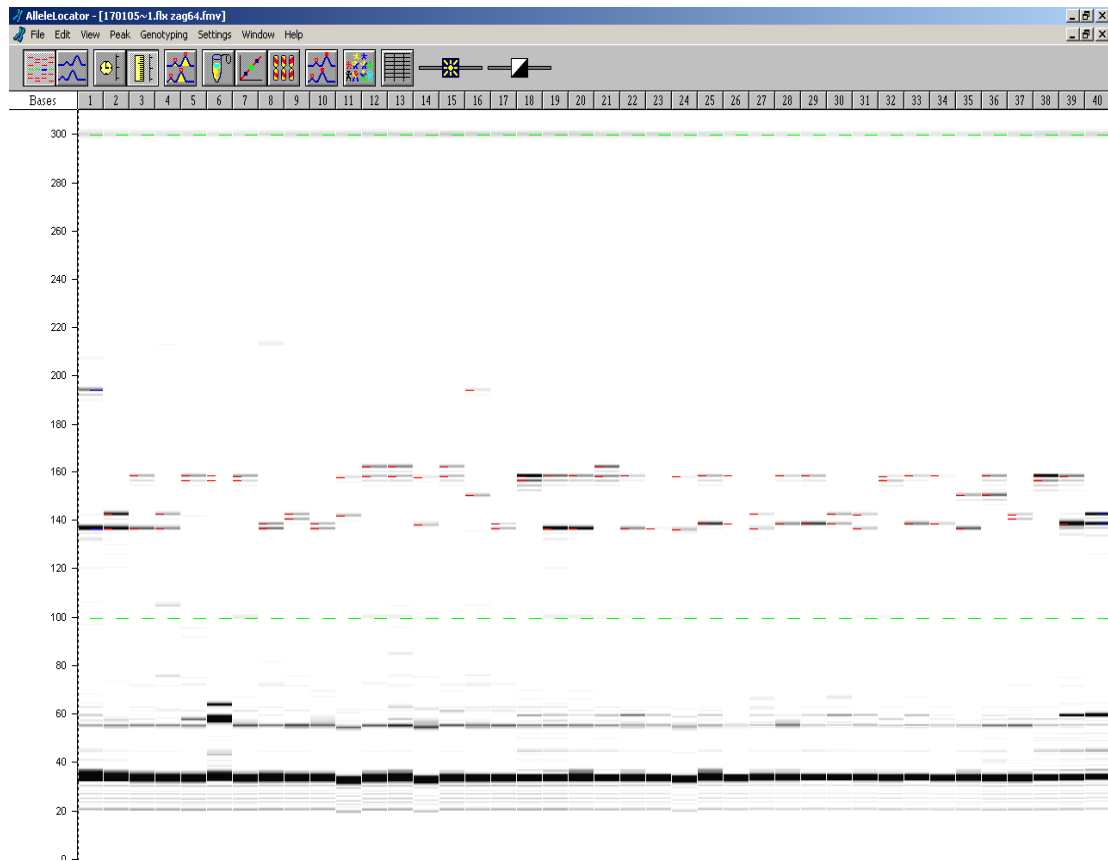
Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με τη βοήθεια του λογισμικού AlleleLocator™ μετά από ανάλυση του γενετικού προφίλ κάθε μικροδορυφορικού τόπου. Τα αντιπροσωπευτικά ηλεκτροφορετικά γραφήματα δίδονται παρακάτω στις Εικόνες 16 και 18 σε αντιστοιχία με τις εικόνες των πηκτωμάτων. Στα ηλεκτροφορετικά γραφήματα διακρίνονται οι κορυφές που έδωσε η παρουσία των επικρατέστερων αλληλομόρφων των μικροδορυφορικών τόπων (με βάση τη συχνότητα εμφάνισής τους).



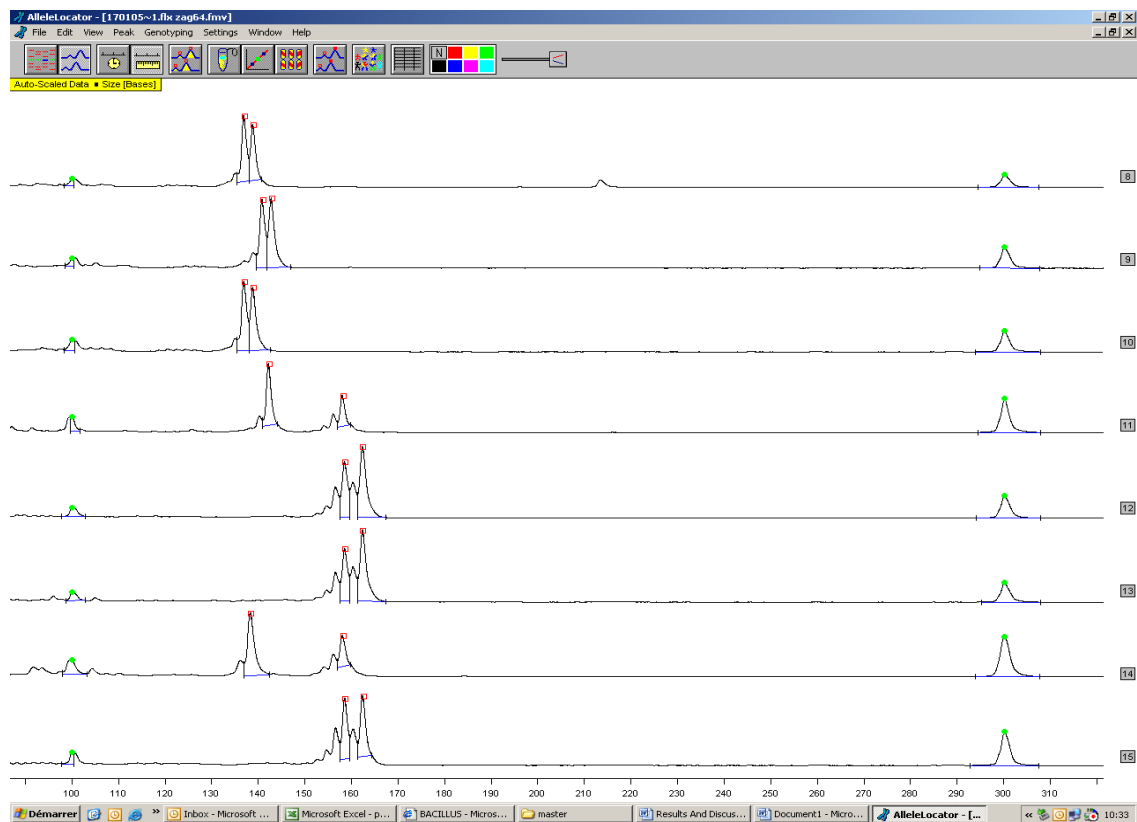
Εικ. 15 Απεικόνιση Πηκτώματος Πολυακρυλαμίδης από τον αναλυτή ALExpress II για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG79.



Εικ. 16 Ηλεκτροφορητικό γράφημα πηκτώματος πολυακρυλαμίδης για τον μικροδορυφορικό τόπο 'ZAG79'.



Εικ. 17 Απεικόνιση Πηκτώματος Πολυακρυλαμίδης από τον αναλύτη ALFexpress II για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG64.



Εικ. 18 Ηλεκτροφορητικό γράφημα πηκτώματος πολυακρυλαμίδης για τον μικροδορυφορικό τόπο 'ZAG64'.

Τα μεγέθη των αλληλομόρφων για τους 9 μικροδορυφορικούς δείκτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 παρακάτω.

Πίνακας 3. Μεγέθη Αλληλομόρφων σε bp ανά γενετικό τόπο και ανά ποικιλία.

Lane	Name	UCH		VVS		ZAG		ZAG		ZAG		ZAG		ZAG		ZAG		ZAG	
		11	11	29	29	2	2	21	21	47	47	62	62	64	64	79	79	83	83
<u>1</u>	<i>Malvasia moscatel fonte grande</i>	244	244	207	207	136	130	190	200	153	163	193	203	137	159	230	246	190	200
<u>2</u>	<i>Malvasia fine</i>	246	262	288	309	132	142	202	202	159	167	187	193	137	143	246	250	194	200
<u>3</u>	<i>Malvasia del Chianti Italy</i>	242	262	205	207	142	144	204	206	157	157	195	199	137	159	242	250	190	194
<u>4</u>	<i>Malvasia nera di Lecce</i>	242	242	203	285	132	142	190	206	167	172	193	195	137	143	248	250	190	190
<u>5</u>	<i>Malvasia di Schierano</i>	246	248	209	296	132	131	206	206	157	167	185	195	157	159	246	251	188	191
<u>6</u>	<i>Malvasia di Casorzo</i>	242	244	207	309	132	150	200	206	157	157	195	199	157	159	242	250	188	188
<u>7</u>	<i>Malvasia grigiorosa</i>	244	246	207	209	134	142	190	206	157	163	195	203	157	159	250	254	188	194
<u>8</u>	<i>Malvasia del Lazio</i>	242	242	207	294	132	134	190	202	161	172	199	199	137	139	246	250	190	190
<u>9</u>	<i>Malvasia nera di Lecce</i>	247	267	207	207	142	144	204	206	161	161	195	199	141	143	246	250	194	194
<u>10</u>	<i>Malvasia di Candia Aromatica Italy</i>	242	244	207	309	132	142	190	190	163	172	199	201	137	139	238	250	190	194
<u>11</u>	<i>Malvasia nera di Brindisi</i>	242	248	205	309	142	144	202	206	157	159	195	201	143	159	250	258	194	194
<u>12</u>	<i>Malvasia Istriana Italy</i>	242	248	211	296	140	142	194	202	157	157	187	187	159	163	236	254	188	194
<u>13</u>	<i>Malvasia Itria Italy</i>	242	248	211	296	140	142	194	202	157	157	187	187	159	163	236	254	188	194
<u>14</u>	<i>Malvasia Eei</i>	244	244	203	207	138	142	202	214	159	163	185	187	139	159	250	258	188	194
<u>15</u>	<i>Malvasia Bela</i>	242	248	211	296	140	142	194	202	157	157	187	187	159	163	236	254	188	194
<u>16</u>	<i>Malvasia Frueshrot</i>	246	246	207	309	134	138	190	206	163	167	193	199	151	159	238	250	188	200
<u>17</u>	<i>Malvasia di Candia Italy</i>	244	244	207	309	132	142	190	190	163	172	199	201	137	139	238	250	190	194
<u>18</u>	<i>Malvasia aromatica Crete</i>	244	246	207	209	134	142	190	206	157	163	195	203	157	159	250	254	188	194
<u>19</u>	<i>Malvasia di Candia Crete</i>	242	244	207	209	132	142	200	206	157	159	187	203	137	159	238	246	194	200
<u>20</u>	<i>Malvasia del Chianti (C)</i>	242	262	205	207	144	144	204	206	157	157	195	199	137	159	242	250	190	194
<u>21</u>	<i>Malvasia Istriana Crete</i>	242	248	211	296	142	142	194	202	157	157	187	187	159	163	236	254	188	194
<u>22</u>	<i>Athiri 24</i>	242	246	203	207	132	142	190	206	157	163	187	199	137	159	242	256	188	194
<u>23</u>	<i>Dafnato 370</i>	242	246	207	211	132	142	190	206	157	163	187	199	137	159	242	256	188	194
<u>24</u>	<i>Dafnia 243</i>	242	244	207	294	134	142	206	206	157	161	187	187	139	159	238	246	188	200
<u>25</u>	<i>Dermatas 142</i>	242	248	207	295	132	142	206	206	159	161	199	201	139	159	246	258	188	194

Lane	Name	UCH 11	UCH 11	UCH 29	UCH 29	VV S2	VV S2	ZAG 21	ZAG 21	ZAG 47	ZAG 47	ZAG 62	ZAG 62	ZAG 64	ZAG 64	ZAG 79	ZAG 79	ZAG 83	ZAG 83
26	Κοταφιάλη (49)	242	244	203	207	142	144	190	214	163	167	187	193	137	143	242	250	190	194
27	Κρητικός (464)	236	236	207	294	132	148	190	202	159	172	187	203	139	159	254	256	188	194
28	Κρητικός (80)	236	236	207	294	132	148	190	202	159	172	187	203	139	159	254	256	188	194
29	Λιάπκο (41)	242	246	203	288	134	142	206	206	163	163	199	203	139	143	246	250	188	194
30	Μαντηλάρα (30)	242	246	203	207	142	144	190	206	157	163	187	187	137	143	242	256	194	194
31	Μαντηλάρα (61)	242	262	207	294	144	144	190	204	157	157	195	201	157	159	250	250	188	200
32	Μαυροδάφνη (263)	242	244	207	288	142	148	206	206	159	172	187	187	139	159	258	258	188	194
33	Μαυροδάφνη (51)	242	244	207	288	142	148	206	206	159	172	187	187	139	159	258	258	188	194
34	Μάιμο-μαγανό (323)	242	242	203	294	134	150	190	204	159	163	187	187	137	151	242	258	194	194
35	Μάιμο-μαγανό (323)	242	248	203	294	142	144	190	206	159	167	187	187	151	159	242	258	188	194
36	Μονεμβασιά (216)	248	262	207	294	132	140	190	206	153	157	187	195	141	143	246	248	188	194
37	Ganay 3-36	244	262	203	288	138	146	190	200	159	167	193	203	157	159	246	258	194	200
38	Pinot Noir 9-18	244	248	288	288	138	150	200	206	153	167	187	193	139	159	238	246	200	200
39	Cabernet Sauvignon	244	262	209	284	132	150	204	206	153	167	187	193	139	143	238	246	190	200
40	Άγνωστος Γονότυπος Malta (White)	244	248	209	307	138	142	190	214	163	172	195	201	139	143	236	250	188	192
41	Ghirghentina 1 Malta (White)	242	248	294	294	132	150	190	206	163	167	187	187	137	137	242	250	192	192
42	Ghirghentina 2 Malta (White)	242	248	294	294	132	150	190	206	163	167	187	187	137	137	242	250	192	192
43	Ghirghentina 3 Malta (White)	236	244	209	294	140	150	190	200	157	170	187	187	137	139	246	256	192	192
44	Ghirghentina 4	242	248	294	294	132	150	190	206	163	167	187	187	137	137	242	250	192	192
45	Malta (Red Gellewaj)	242	248	294	294	132	150	190	206	163	167	187	187	137	137	242	250	192	192
46	Malvasia del Bierzo	236	242	288	307	130	140	200	206	163	167	193	203	137	139	250	258	188	198
47	Malvasia de La Ricia	256	262	209	211	140	142	204	206	163	172	185	187	137	139	250	256	188	192

Στη συνέχεια τα δεδομένα για τα μεγέθη των μικροδορυφόρων εισήχθησαν στο λογισμικό IDENTITY 1.0 (Wagner and Sefc, 1999, Austria) και υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα:

- ✚ Η τιμή PI [Probability of identity, $PI = \sum p_i^4 + \sum \sum p_i p_j^2$] (Paetkau *et al.* 1995).
- ✚ Η τιμή r (probability of null alleles, $r = (H_e - H_o) / (1 + H_e)$). H_e . (Brookfield 1996). H_e και H_o , είναι η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, αντίστοιχα ($H_e = 1 - \sum p_i^2$).
- ✚ Ο αριθμός των αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο.
- ✚ Οι συχνότητες των αλληλομόρφων.
- ✚ Το άθροισμα των ανιχνευόμενων αλληλομόρφων.
- ✚ Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (Nei, 1973).
- ✚ Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία.

$H_e = n (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2) / (n-1)$: Calculation formule for the expected Heterozygosity (**He**) of a sample of size **n**, of frequency **p** for an allele **i** (Edwards *et al.*, 1992).

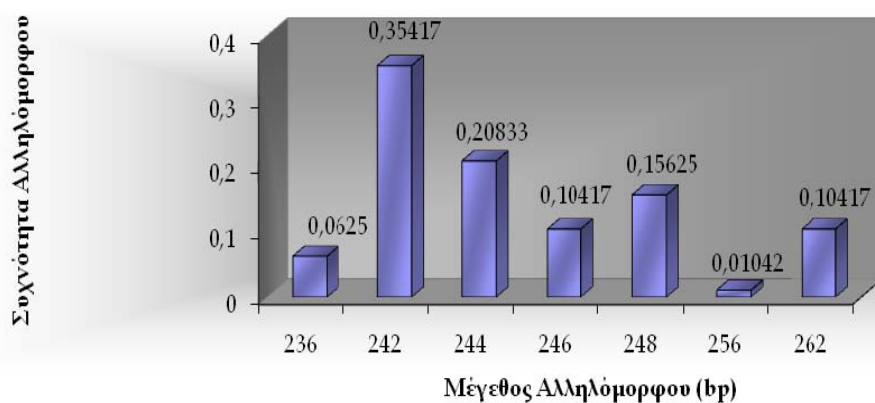
Στους πίνακες 4-12 που ακολουθούν παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση των 47 υπό εξέταση ποικιλιών *Vitis vinifera*.

Πίνακας 4. Στατιστική Ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο UCH11 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 1 : 'UCH11'								
Number of Alleles	:	7						
Allele size	:	236	242	244	246	248	256	262
Allele Frequency	:	0.0625	0.35417	0.20833	0.10417	0.15625	0.01042	0.10417
Standard Deviation	:	0.02471	0.04881	0.04145	0.03118	0.03706	0.01036	0.03118
95% upper conf. Limit	:	0.11633	0.43745	0.28405	0.16675	0.22653	0.04535	0.16675
sum 96	:							

Heterozygosity - expected	:	0.781033						
Heterozygosity - observed	:	0.8125						
Estimated Frequency of Null Alleles	:	-0.017668						
Paternity Exclusion Probability	:	0.583913						
Probability of Identity (PI)	:	0.136393						

Συχνότητες Αλληλομόρφων για το μικροδορυφορικό τόπο UCH11



Πίνακας 5. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο UCH29 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 2 : 'UCH29'												
Number of Alleles	:	11										
Allele size	:	203	205	207	209	211	284	288	294	296	307	309
Allele Frequency	:	0.09375	0.04167	0.29167	0.08333	0.0625	0.02083	0.08333	0.1875	0.05208	0.02083	0.0625
Standard Deviation	:	0.02975	0.02039	0.04639	0.02821	0.02471	0.01458	0.02821	0.03984	0.02268	0.01458	0.02471
95% upper conf. Limit	:	0.15442	0.08962	0.37285	0.14192	0.11633	0.06102	0.14192	0.26126	0.10315	0.06102	0.11633
sum 96	:											

Heterozygosity- expected	:	0.843967										
Heterozygosity- observed	:	0.854167										
Estimated Frequency of Null Alleles	:	-0.005531										
Paternity Exclusion Probability	:	0.699606										
Probability of Identity (PI)	:	0.071322										



Πίνακας 6. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο VVS2 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 3 : 'VVS2'												
Number of Alleles	:	11										
Allele size	:	130	132	134	136	138	140	142	144	146	148	150
Allele Frequency	:	0.01042	0.19792	0.08333	0.01042	0.0625	0.08333	0.27083	0.13542	0.01042	0.04167	0.09375
Standard Deviation	:	0.01036	0.04066	0.02821	0.01036	0.02471	0.02821	0.04536	0.03492	0.01036	0.02039	0.02975
95% upper conf. Limit	:	0.04535	0.27269	0.14192	0.04535	0.11633	0.14192	0.35096	0.20294	0.04535	0.08962	0.15442
sum 96	:											

Heterozygosity - expected	:	0.840495										
Heterozygosity - observed	:	0.916667										
Estimated Frequency of Null Alleles	:	-0.041387										
Paternity Exclusion Probability	:	0.687432										
Probability of Identity (PI)	:	0.079439										

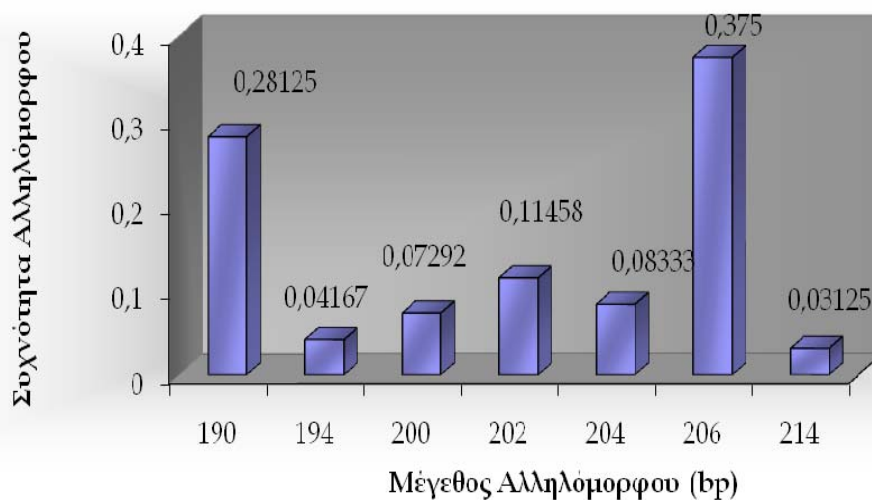


Πίνακας 7. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG21 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 4 : 'ZAG21'								
Number of Alleles	:	7						
Allele size	:	190	194	200	202	204	206	214
Allele Frequency	:	0.28125	0.04167	0.07292	0.11458	0.08333	0.375	0.03125
Standard Deviation	:	0.04589	0.02039	0.02654	0.03251	0.02821	0.04941	0.01776
95% upper conf. Limit	:	0.36193	0.08962	0.12924	0.17894	0.14192	0.45866	0.07565
sum	:	96						

Heterozygosity - expected	:	0.75217						
Heterozygosity - observed	:	0.8125						
Estimated Frequency of Null Alleles	:	-0.034432						
Paternity Exclusion Probability	:	0.541684						
Probability of Identity (PI)	:	0.166823						

Συχνότητες Αλληλομόρφων για το μικροδορυφορικό τόπο ZAG21

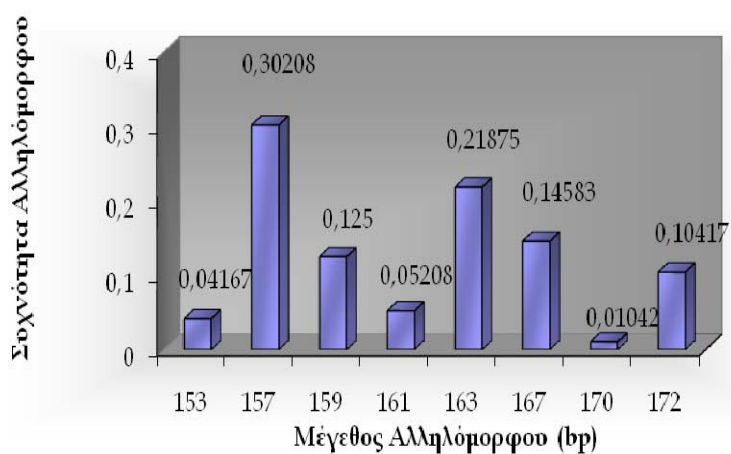


Πίνακας 8. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG47 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 5 : 'ZAG47'									
Number of Alleles	:	8							
Allele size	:	153	157	159	161	163	167	170	172
Allele Frequency	:	0.04167	0.30208	0.125	0.05208	0.21875	0.14583	0.01042	0.10417
Standard Deviation	:	0.02039	0.04686	0.03375	0.02268	0.04219	0.03602	0.01036	0.03118
95% upper conf. Limit	:	0.08962	0.38373	0.191	0.10315	0.29534	0.21478	0.04535	0.16675
sum 96	:								

Heterozygosity - expected	:	0.808594							
Heterozygosity - observed	:	0.770833							
Estimated Frequency of Null Alleles	:	0.020878							
Paternity Exclusion Probability	:	0.627369							
Probability of Identity (PI)	:	0.11222							

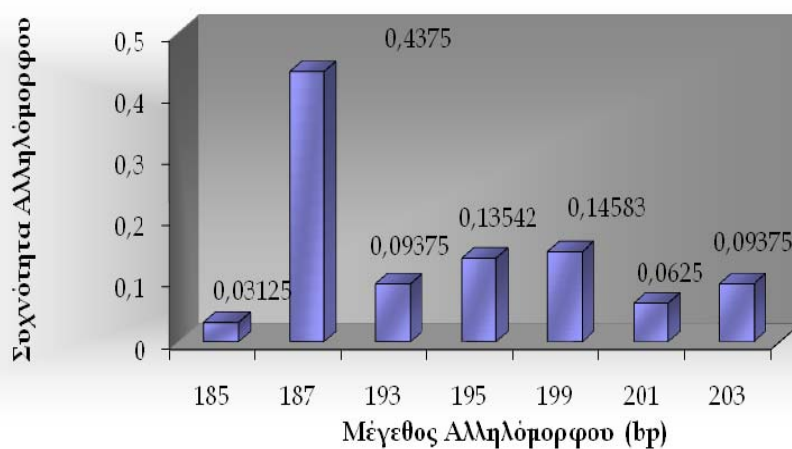
Συχνότητες Αλληλόμορφων για το μικροδορυφορικό τόπο ZAG47



Πίνακας 9. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG62 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 6 : 'ZAG62'							
Number of Alleles	7						
Allele size	185	187	193	195	199	201	203
Allele Frequency	0.03125	0.4375	0.09375	0.13542	0.14583	0.0625	0.09375
Standard Deviation	0.01776	0.05063	0.02975	0.03492	0.03602	0.02471	0.02975
95% upper conf. Limit	0.07565	0.52137	0.15442	0.20294	0.21478	0.11633	0.15442
sum %	-----						
Heterozygosity - expected	0.746528						
Heterozygosity - observed	0.666667						
Estimated Frequency of Null Alleles	0.045726						
Paternity Exclusion Probability	0.551918						
Probability of Identity 'PI'	0.144206						

Συχνότητες Αλληλόμορφων για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG62

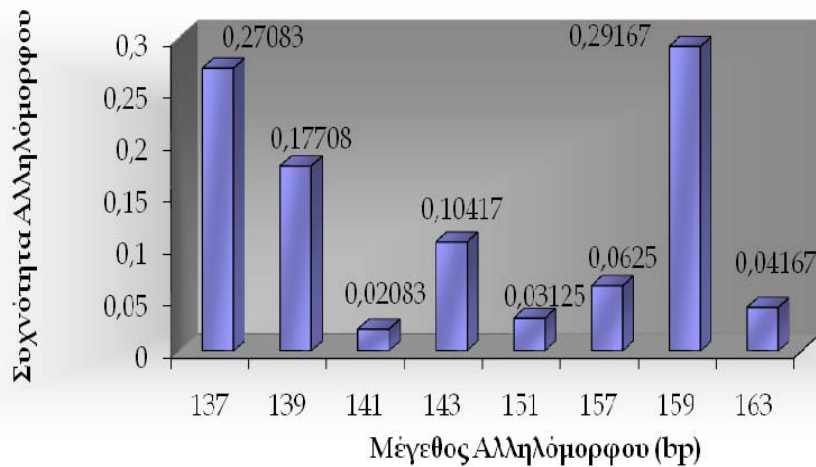


Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG64 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 7 : 'ZAG64'									
Number of Alleles	:	8							
Allele size	:	137	139	141	143	151	157	159	163
Allele Frequency	:	0.27083	0.17708	0.02083	0.10417	0.03125	0.0625	0.29167	0.04167
Standard Deviation	:	0.04536	0.03896	0.01458	0.03118	0.01776	0.02471	0.04639	0.02039
95% upper conf. Limit	:	0.35096	0.24976	0.06102	0.16675	0.07565	0.11633	0.37285	0.08962
sum	:	96							

<i>Heterozygosity - expected</i>	:	0.792318							
<i>Heterozygosity - observed</i>	:	0.916667							
<i>Estimated Frequency of Null Alleles</i>	:	-0.069379							
<i>Paternity Exclusion Probability</i>	:	0.59852							
<i>Probability of Identity (PI)</i>	:	0.131315							

Συχνότητες Αλληλόμορφων για το μικροδορυφορικό τόπο ZAG64

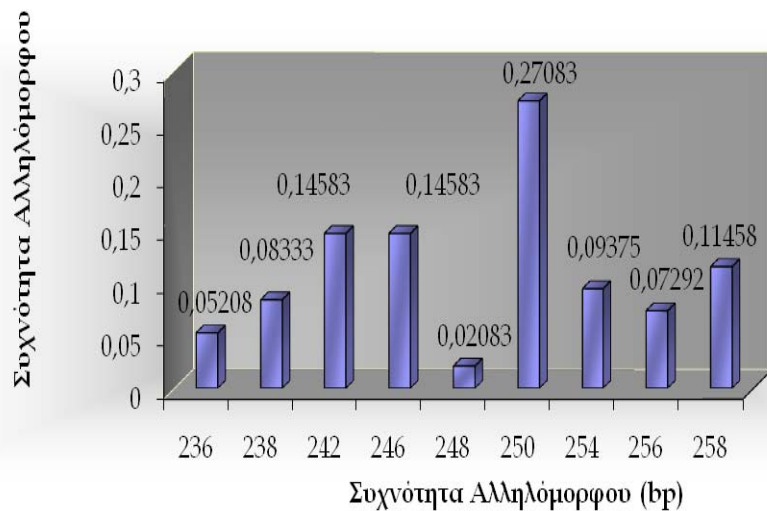


Πίνακας 11. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG79 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 8 : 'ZAG79'										
Number of Alleles	:	9								
Allele size	:	236	238	242	246	248	250	254	256	258
Allele Frequency	:	0.05208	0.08333	0.14583	0.14583	0.02083	0.27083	0.09375	0.07292	0.11458
Standard Deviation	:	0.02268	0.02821	0.03602	0.03602	0.01458	0.04536	0.02975	0.022654	0.03251
95% upper conf. Limit	:	0.10315	0.14192	0.21478	0.21478	0.06102	0.35096	0.15442	0.12924	0.17894
sum 96	:									

Heterozygosity - expected	:	0.846788								
Heterozygosity - observed	:	0.9375								
Estimated Frequency of Null Alleles	:	-0.049119								
Paternity Exclusion Probability	:	0.698078								
Probability of Identity (PI)	:	0.07404								

Συχνότητες Αλληλόμορφων για το μικροδορυφορικό τόπο ZAG79

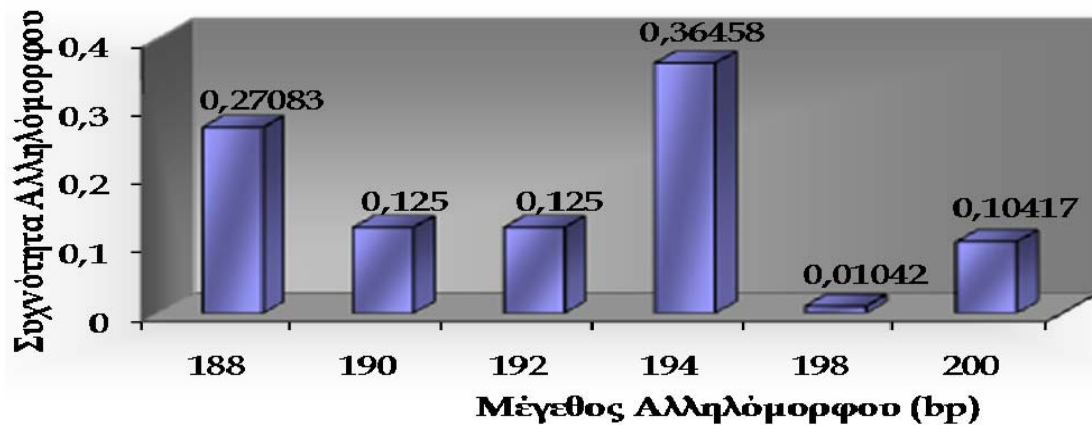


Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση για τον μικροδορυφορικό τόπο ZAG83 στις υπό μελέτη ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera*.

Locus 9 : 'ZAG83'							
Number of Alleles	:	6					
Allele size	:	188	190	192	194	198	200
Allele Frequency	:	0.27083	0.125	0.125	0.36458	0.01042	0.10417
Standard Deviation	:	0.04536	0.03375	0.03375	0.04912	0.01036	0.03118
95% upper conf. Limit	:	0.35096	0.191	0.191	0.44808	0.04535	0.16675
sum 96	:						

Heterozygosity - expected	:	0.751519					
Heterozygosity - observed	:	0.729167					
Estimated Frequency of Null Alleles	:	0.012762					
Paternity Exclusion Probability	:	0.530999					
Probability of Identity (PI)	:	0.176008					

Σοχνότητες Αλληλόμορφων για το μικροδορυφορικό τόπο ZAG83



Total Exclusion Probability	:	0.999830036755
Total Probability of Identity (PI)	:	3.570003E-09

Συγκεντρώνοντας από κάθε έναν από τους πίνακες 4-12 παραπάνω τις στατιστικές τιμές για κάθε μικροδορυφορικό τόπο αυτής της μελέτης προκύπτει ο πίνακας 13.

Πίνακας 13. Συγκριτικός πίνακας στατιστικών τιμών για κάθε μικροδορυφορικό τόπο αυτής της μελέτης.

	<i>Heterozygosity-expected</i>	<i>Heterozygosity-observed</i>	<i>Estimated Frequency of Null Alleles</i>	<i>Probability of Identity (PI)</i>	<i>Number of Alleles</i>
<u>UCH11</u>	0.781033	0.8125	-0.017668	0.136393	7
<u>UCH29</u>	0.843967	0.854167	-0.005531	0.071322	11
<u>VVS2</u>	0.840495	0.916667	-0.041387	0.079439	11
<u>ZAG21</u>	0.75217	0.8125	-0.034432	0.166823	7
<u>ZAG47</u>	0.808594	0.770833	0.020878	0.11222	8
<u>ZAG62</u>	0.746528	0.666667	0.045726	0.144206	7
<u>ZAG64</u>	0.792318	0.916667	-0.069379	0.131315	8
<u>ZAG79</u>	0.846788	0.9375	-0.049119	0.07404	9
<u>ZAG83</u>	0.751519	0.729167	0.012762	0.176008	6

Η υψηλότερη τιμή τόσο της αναμενόμενης όσο και της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας εμφανίζεται στην περίπτωση του γενετικού τόπου ZAG79. Ωστόσο, ο τόπος με το μεγαλύτερο πληροφοριακό περιεχόμενο φαίνεται να είναι ο VVS2 με μία αξιοσημείωτη τιμή παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας πολύ κοντινή με αυτήν της αναμενόμενης. Η στατιστική μελέτη στον τόπο αυτό, επέδειξε την παρουσία 11 αλληλομόρφων, τιμή παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας υψηλότερης από την αναμενόμενη, αρνητική τιμή συχνότητας null αλληλομόρφων και $PI=0,07404$.

Η συχνότητα των null αλληλομόρφων εμφανίζεται να έχει αρνητικές τιμές σε 6 από τους μικροδορυφορικούς τόπους της μελέτης (UCH11, UCH29, VVS2, ZAG21, ZAG64 και ZAG79), ενώ σε 3 από αυτούς (ZAG47, ZAG62 και ZAG83), εμφανίζει θετικές μεν, αλλά αρκετά χαμηλές τιμές. Στον γενετικό τόπο ZAG83, η μη ομοιόμορφη κατανομή των αλληλομόρφων ανέδειξε υψηλή τιμή PI ($PI=0,176008$), σε σύγκριση με τους υπόλοιπους γενετικούς τόπους, γεγονός που τον αναδεικνύει σε τόπο μικρού σχετικά πληροφοριακού περιεχομένου προκειμένου για γενετική μικροδορυφορική ταυτοποίηση.

Η παράμετρος ‘probability of identity’ είναι η πιθανότητα δύο άτομα που επιλέγονται τυχαία να έχουν ταυτόσημους STR (Short Tandem Repeat). Όσο μικρότερη είναι η τιμή της παραμέτρου αυτής τόσο διαφορετικά είναι τα άτομα

μεταξύ τους ως προς τον συγκεκριμένο μικροδορυφορικό τόπο. Μεγαλύτερη τιμή της παραμέτρου ακόμη κι εξατομίκευση μπορεί να επιτευχθεί με ανάλυση συνδυασμού μικροδορυφορικών τόπων (multiplexing). Ένεκα του ότι τα STRs υφίστανται ανεξάρτητα μεταξύ τους, η πιθανότητα βιολογικής ένδειξης με συγκεκριμένο συνδυασμό μικροδορυφορικών τόπων καθορίζεται από τη συχνότητα παρουσίας τους σε έναν πληθυσμό. Έτσι, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των χαρακτηρισμένων μικροδορυφορικών τόπων τόσο πιο εντυπωσιακή είναι η συχνότητα παρουσίας του αναλυθέντος δείγματος στο σύνολο του πληθυσμού.

Η επεξεργασία των μικροδορυφορικών προτύπων των 47 ποικιλιών *Vitis vinifera*, που μελετήθηκαν, για τους 9 μικροδορυφορικούς τόπους, κάνοντας χρήση του IDENTITY 1.0 software, ανέδειξε μεταξύ άλλων, μια λίστα με πιθανά συνώνυμα μεταξύ των μελετούμενων δειγμάτων καθώς και μία λίστα με τους πιθανούς συνδυασμούς πατρικών ατόμων-απογόνων. Η μελέτη των παραπάνω αποτελεσμάτων αποτελεί σημαντική ένδειξη για την επιβεβαίωση ή ακύρωση των ταυτοτήτων που έχουν δοθεί στις μελετούμενες ποικιλίες *Vitis vinifera* (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Ταυτόσημοι Γονότυποι – Συνώνυμα

<i>Malvasia Istria Italy</i>	~	<i>Malvasia Istriana Italy</i>
		<i>Malvasia Istriana Italy</i>
<i>Malvasia Bela</i>	~	<i>Malvasia Istria Italy</i>
<i>Malvasia aromatica Crete</i>	~	<i>Malvasia grigiorosa</i>
<i>Malvasia del Chianti Crete</i>	~	<i>Malvasia del Chianti Italy</i>
		<i>Malvasia Istriana Italy</i>
<i>Malvasia Istriana Crete</i>	~	<i>Malvasia Istria Italy</i>
<i>Malvasia Istriana Crete</i>	~	<i>Malvasia Bela</i>
<i>Κρητικό (80)</i>	~	<i>Κρητικό (464)</i>
<i>Μαυροδάφνη (51)</i>	~	<i>Μαυροδάφνη (293)</i>
<i>Malta (White Ghirghentina 2)</i>	~	<i>Malta (White Ghirghentina 1)</i>
<i>Malta (White Ghirghentina 4)</i>	~	<i>Malta (White Ghirghentina 1)</i>

<i>Malta (White Ghirghentina 4)</i>	~	<i>Malta (White Ghirghentina 2)</i>
<i>Malta (Red Gellewza)</i>	~	<i>Malta (White Ghirghentina 1)</i>
<i>Malta (Red Gellewza)</i>	~	<i>Malta (White Ghirghentina 2)</i>
<i>Malta (Red Gellewza)</i>	~	<i>Malta (White Ghirghentina 4)</i>

Στον παραπάνω πίνακα η ποικιλία Κρητικό Μαύρο (80) εμφανίζεται να είναι συνώνυμο του Κρητικό (464), η Μαυροδάφνη (51) εμφανίζεται να είναι συνώνυμο με την Μαυροδάφνη (293), το Δαφνάτο (370) συνώνυμο με το Αθήρι (24), η Malvasia Grigiorosa εμφανίζεται ως συνώνυμο με την Malvasia aromatica Crete και η Malvasia Istria Italy φαίνεται να είναι συνώνυμο με τις Malvasia Istriana Italy, Malvasia Istriana Crete και Malvasia Bela.

Μία άλλη ομάδα συνωνύμων είναι η Malvasia del Chianti Crete με την Malvasia del Chianti Italy, αποδεικνύοντας ότι τα δυο άτομα Malvasia del Chianti από την Κρήτη και την Ιταλία είναι ταυτόσημα, δηλαδή πρόκειται για την ίδια ποικιλία. Τέλος, η τρίτη ομάδα συνωνύμων που προέκυψε είναι μια ομάδα ατόμων με προέλευση τη Μάλτα. Έτσι, η White Ghirghentina (1), (2) και (4) βρέθηκαν πανομοιότυπες με την Red Gellewza. Η παρατήρηση αυτή, δεδομένης της ύπαρξης της White Ghirghentina (3) επίσης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως από λάθος, είτε κατά την δειγματοληψία, είτε κατά τη διάρκεια του πειράματος να θεωρήθηκε η μία ποικιλία ότι είναι η άλλη, κι έτσι όλα τα άτομα White Ghirghentina, ουσιαστικά να αποτελούν μία και μόνη ποικιλία.

Οι πιθανοί πατρικοί συνδυασμοί ατόμου-απογόνου υπολογίστηκαν με το ίδιο λογισμικό σύμφωνα με την Μενδελιανή αρχή συγκυρίαρχης κληρονομικότητας των μικροδορυφορικών τόπων απεικονιζόμενη με τη σχέση ‘απόγονος = γονέας 1 x γονέας 2’ (Πίνακας 15). Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, που αναφέρονται στους πιθανούς συνδυασμούς πατρότητας ‘ατόμου-απογόνου’ η ποικιλία Αθήρι (24) είναι πιθανός απόγονος της διασταύρωσης μεταξύ των Malvasia di Casorzo και της Ελληνικής ποικιλίας Mantilaria (30). Με μεγαλύτερη πιθανότητα, η ίδια ποικιλία προέρχεται από τη διασταύρωση μεταξύ των ελληνικών ποικιλιών Dafnato (370) και Mantilaria (30).

Η ποικιλία *Malvasia di Candia aromatica* (Italy) φαίνεται να είναι απόγονος της διασταύρωσης των ποικιλιών *Malvasia del Lazio* και *Malvasia di Candia*.

Η ποικιλία *Mantilaria 30*, ελληνικών καταβολών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, είναι απόγονος της διασταύρωσης είτε μεταξύ των ποικιλιών *Athiri* (24) και *Kotsifali* (49) είτε μεταξύ των ποικιλιών *Dafnato* (370) και *Kotsifali* (49). Όπως είναι φανερό, το *Athiri* (24) (σε έναν από τους πιθανούς συνδυασμούς) και η *Mantilaria 30* εμφανίζονται να έχουν κοινό συνδυασμό πιθανής πατρότητας, μια παρατήρηση που αποτελεί ισχυρή ένδειξη της στενής γενετικής σχέσης μεταξύ τους και της κοινής τους εξελικτικής προέλευσης (σε ποσοστό 0.25%). Δύσκολο να προταθεί ότι η Μαντηλαριά, που είναι ποικιλία *teinturier*, (βάφτρα, δηλαδή με πολύ σκούρο σχεδόν κυανούν χυμό) προέρχεται από το Δαφνάτο και μια κόκκινη, το Κοτσιφάλι.

Πίνακας 15. Πιθανοί πατρικοί συνδυασμοί ατόμου-απογόνου, βασιζόμενοι στην συγκυρίαρχη Μενδελιανή κληρονομικότητα των μικροδορυφορικών τόπων, απεικονιζόμενοι με το σχήμα 'απόγονος = γονέας 1 x γονέας 2'.

<i>Athiri 24</i>	=	<i>Malvasia di Casorzo</i>	x	<i>Mantilaria 30</i>	(22 = 6 x 31)
<i>Malvasia di Candia Aromatica Italy</i>	=	<i>Malvasia del Lacio</i>	x	<i>Malvasia di Candia Italy</i>	(10 = 8 x 17)
<i>Athiri 24</i>	=	<i>Dafnato 370</i>	x	<i>Mantilaria 30</i>	(22 = 24 x 31)
<i>Mantilaria 30</i>	=	<i>Athiri 24</i>	x	<i>Kotsifali 49</i>	(31 = 22 x 27)
<i>Athiri 24</i>	=	<i>Dafnato 370</i>	x	<i>Kotsifali 49</i>	(22 = 24 x 27)
<i>Mantilaria 30</i>	=	<i>Dafnato 370</i>	x	<i>Kotsifali 49</i>	(31 = 24 x 27)

Ακολούθως, κάνοντας χρήση του IDENTITY 1.0, υπολογίστηκαν οι στατιστικές πιθανότητες για όλους τους ανιχνευόμενους πιθανούς συνδυασμούς πατρικής γενιάς-απογόνου (όπως περιγράφεται από τους Bowers and Meredith, 1997). Για κάθε γενετικό τόπο που εξετάστηκε, και συνολικά για όλους τους γενετικούς τόπους που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν οι ακόλουθες αναλογίες πιθανοτήτων:

✚ Η αναλογία της πιθανότητας, ότι οι προτεινόμενοι γονείς απέδωσαν το γονότυπο του απογόνου έναντι της πιθανότητας ότι δύο τυχαία άτομα απέδωσαν το γονότυπο του απογόνου: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (δύο τυχαίες ποικιλίες) = X x Y.

- ✚ Η αναλογία της πιθανότητας: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (τυχαίο άτομο X προτεινόμενος γονέας 1) = $X \times (1)$.
- ✚ Η αναλογία της πιθανότητας: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (συγγενικό άτομο του προτεινόμενου γονέα 2 x προτεινόμενος γονέας 1) = $rel(2) \times (1)$.
- ✚ Η αναλογία πιθανότητας: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (προτεινόμενος γονέας 2 x τυχαία ποικιλία) = $(2) \times X$.
- ✚ Η αναλογία πιθανότητας: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (προτεινόμενος γονέας 2 x συγγενικό άτομο του προτεινόμενου γονέα 1) = $(2) \times rel(1)$.

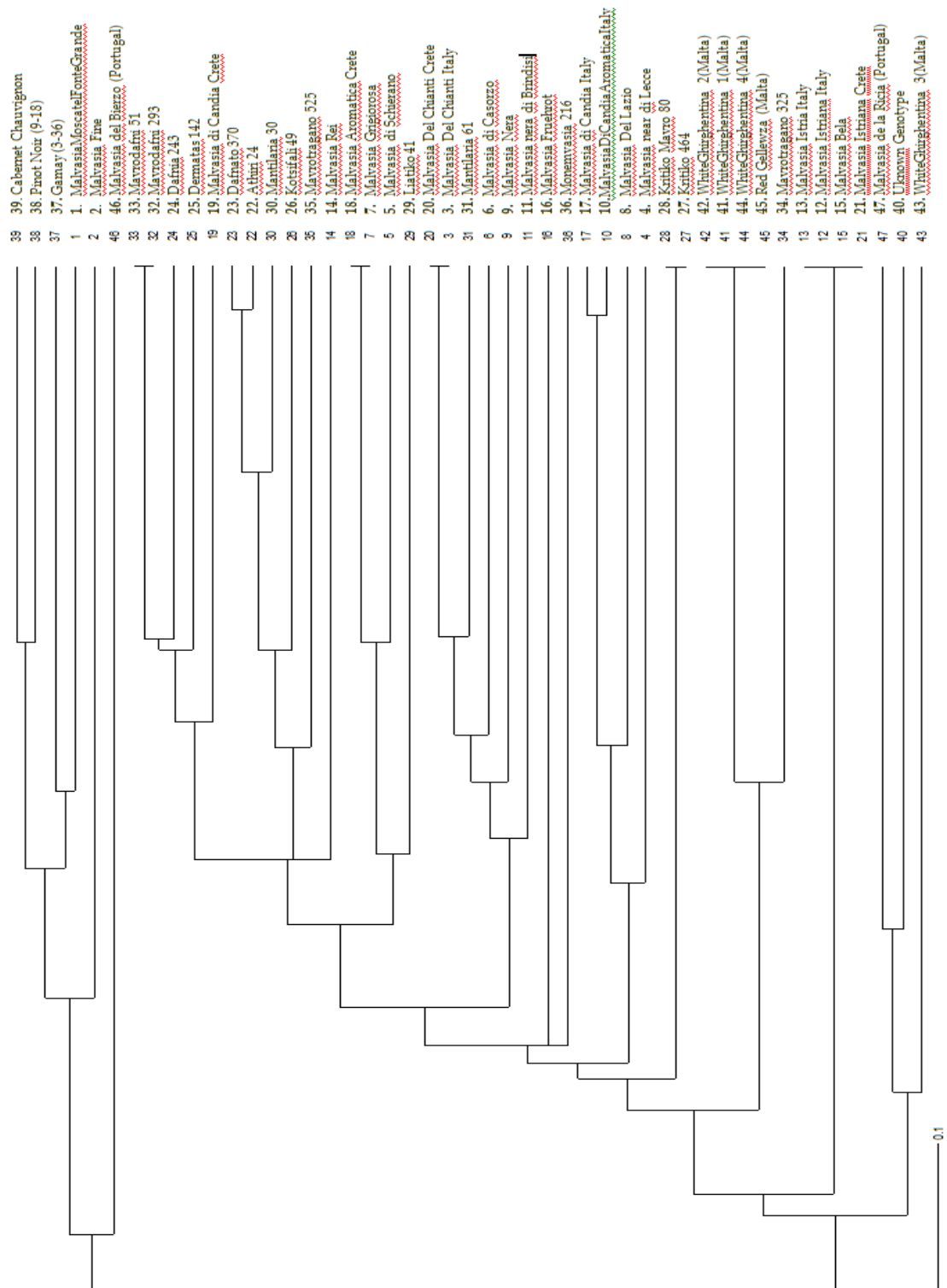
Οι πιθανότητες για τους προτεινόμενους γονείς προέκυψαν από τους νόμους του Mendel, ενώ οι πιθανότητες για τυχαία άτομα υπολογίστηκαν από τις συχνότητες αλληλομόρφων στον πληθυσμό.

Η κληρονομηση σπάνιων αλληλομόρφων στηρίζει σημαντικά συμπεράσματα, που αφορούν την πατρότητα. Όμως, σε μικρού μεγέθους δείγματα οι υπολογιζόμενες συχνότητες των αλληλομόρφων μπορεί να είναι μικρότερες από τις πραγματικές συχνότητες αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Για τον παραπάνω λόγο, οι στατιστικές πιθανότητες υπολογίστηκαν πάνω από το 95% όριο εμπιστοσύνης των παρατηρούμενων συχνοτήτων των αλληλομόρφων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνονται στον Πίνακα 16 παρακάτω.

Ακολουθώντας με τη βοήθεια του TREEVIEW software, σχεδιάστηκε το φαινόγραμμα που ακολουθεί (Εικ.19):

Πίνακας 16. Στατιστικές πιθανότητες συνδυασμού γονέων και απογόνων

	Malvasia del Chianti Crete	Malvasia del Chianti Italy	x	Malvasia nera di Brindisi	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	3.62E+06	4.23E+01	4.52E+00	1.05E+05	4.83E+01
	:	6.73E+03	2.73E+00	1.40E+00	3.68E+03	2.14E+01
Malvasia aromatica Crete	=	Malvasia di Schierano	x	Malvasia grigiorosa	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	1.24E+06	1.35E+03	1.63E+01	5.66E+01	5.58E+00
	:	2.19E+03	9.28E+01	6.72E+00	3.47E+00	1.68E+00
Malvasia grigiorosa	=	Malvasia di Schierano	x	Malvasia aromatica Crete	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	1.24E+06	1.35E+03	1.63E+01	5.66E+01	5.58E+00
	:	2.19E+03	9.28E+01	6.72E+00	3.47E+00	1.68E+00
Athiri 24	=	Malvasia di Casorzo	x	Mandaria 30	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	5.98E+04	1.52E+04	2.97E+01	2.59E+02	8.22E+00
	:	2.46E+02	7.63E+02	1.33E+01	1.67E+01	2.89E+00
Malvasia di Caudia Aromatica Italy	=	Malvasia del Lactio	x	Malvasia di Caudia Italy	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	1.63E+07	8.47E+04	4.04E+01	3.62E+02	9.98E+00
	:	3.07E+04	2.84E+03	1.83E+01	2.23E+01	3.48E+00
Malvasia del Chianti Italy	=	Malvasia del Chianti Crete	x	Athiri 24	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	9.27E+08	1.08E+04	2.89E+01	1.08E+04	2.89E+01
	:	1.72E+06	7.00E+02	1.31E+01	7.00E+02	1.31E+01
Mandalaria 30	=	Athiri 24	x	Konstantali 49	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	3.03E+04	1.31E+02	5.71E+00	4.85E+02	9.25E+00
	:	1.19E+02	8.09E+00	1.99E+00	2.92E+01	3.55E+00
Athiri 24	=	Dafniate 370	x	Konstantali 49	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	3.74E+03	6.22E+00	1.64E+00	2.58E+03	1.69E+01
	:	1.54E+01	4.11E-01	4.77E-01	1.27E+02	6.68E+00
Mandalaria 30	=	Dafniate 370	x	Konstantali 49	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	1.51E+04	2.70E+02	6.66E+00	2.42E+02	7.23E+00
	:	5.97E+01	1.38E+01	2.32E+00	1.46E+01	2.64E+00
Athiri 24	=	Dafniate 370	x	Mandalaria 30	z	
Combined over all loci with observed allele frequencies with 95% upper CI	:	2.39E+05	3.98E+02	9.03E+00	1.04E+03	1.47E+01
	:	9.86E+02	2.43E+01	3.45E+00	6.68E+01	5.76E+00



Εικ. 19 Φαινόγραμμα μικροδορυφορικού προφίλ των 47 ποικιλιών.

Στην παρούσα μελέτη καμία φυλογενετική σχέση μεταξύ των ατόμων των υπό μελέτη ποικιλιών δεν αποκομήθηκε. Έγινε μόνο μια προσπάθεια για την ταυτοποίηση διαφορετικών ποικιλιών και της κοινής τους ή μη εξελικτικής ιστορίας, με τη χρήση ειδικά επιλεγμένων μικροδορυφορικών δεικτών. Κατά την παρατήρηση του φαινογράμματος διαχωρίζονται σαφώς δύο κύριοι κλάδοι. Μία ομάδα περιλαμβάνει και τις τρεις γαλλικές ποικιλίες ως μάρτυρες για την ορθότητα των αποτελεσμάτων και των οποίων η προέλευση είναι αποσαφηνισμένη και επιβεβαιωμένα γαλλική. Έτσι, μαζί με τις 3 γαλλικές ποικιλίες (Cabernet Chauvignon, Pinot noir (9-18) και Gamay (3-36) εμφανίζονται στην ίδια ομάδα επίσης τρεις Μαλβαζίες [(Malvasia Moscatel fonte grande, Malvasia fine (δείγμα από Ιταλία) και Malvasia del Bierzo (δείγμα από Πορτογαλία)]. Οι ποικιλίες αυτές εμφανίζονται να έχουν κοινή εξελικτική προέλευση.

Το δείγμα από την Πορτογαλία (Malvasia del Bierzo) εμφανίζεται να έχει σημαντικά μεγαλύτερη γενετική απόσταση από τις άλλες ποικιλίες. Αμέσως μικρότερη γενετική απόσταση από την Πορτογαλική ποικιλία εμφανίζεται να έχει η Malvasia fine και μένουν δυο κλάδοι με μικρότερες γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους, που όμως και οι δύο περιέχουν γαλλικές ποικιλίες. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η Malvasia Moscatel Fonte Grande είναι γαλλικής προέλευσης. Είναι γεγονός ότι λόγω του ιδιαίτερου αρώματος αυτών των κρασιών, δινόταν το όνομα Μαλβαζία στις αντίστοιχες ποικιλίες αμπέλου αυθαίρετα πολλές φορές, δημιουργώντας μεγάλη σύγχυση για την προέλευση των ποικιλιών και κάνοντας επιτακτική την ανάγκη ανάλογων ερευνών για την αποσαφήνισή τους.

Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι οι ποικιλίες, που φέρουν το όνομα Malvasia Moscatel fonte grande, Malvasia fine (από Ιταλία) και Malvasia del Bierzo (από Πορτογαλία) δεν είναι ουσιαστικά γνήσιες Μαλβαζίες αλλά κάποιες άλλες ποικιλίες αμπέλου, που λόγω του ιδιαίτερου αρώματος των παραγόμενων από αυτές κρασιών ονομάστηκαν αυθαίρετα Μαλβαζίες. Ο δεύτερος κλάδος του φαινογράμματος αποτελείται από δυο ομάδες. Η μία αφορά τρεις μόνο ποικιλίες και εμφανίζει μεγάλη γενετική απόσταση από την άλλη ομάδα. Αυτές οι τρεις ποικιλίες είναι: η Malvasia de la Ricia, η Red Gellewza (σε αντικατάσταση του πιθανού σφάλματος) και ένας άγνωστος γονότυπος (δείγμα από αμπελοκαλλιεργητική περιοχή της Κρήτης) και έχουν κοινή εξελικτική βάση.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα και με δεδομένη την αξιοσημείωτα μεγάλη γενετική απόσταση από τις άλλες ποικιλίες, φαίνεται ότι και στην περίπτωση της

Malvasia de la Ricia δόθηκε αυθαίρετα η ονομασία Μαλβαζία, πιθανόν λόγω του ιδιαίτερου αρώματος του κρασιού. Ο άγνωστος γονότυπος βρίσκεται κοντά (με κριτήριο τη γενετική απόσταση) στην πορτογαλικής προέλευσης ποικιλία, που όμως δεν φαίνεται να ανήκει στις Μαλβαζίες. Πιθανότατα λοιπόν κάποια ποικιλία, που καλλιεργούταν στην Πορτογαλία να μεταφέρθηκε στην Κρήτη.

Στον δεύτερο κλάδο η άλλη υποομάδα περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν. Στην υποομάδα αυτή ξεχωρίζουν δευτερεύουσες υποομάδες. Διαπιστώνεται λοιπόν ότι η ποικιλία που εμφανίζεται να έχει 4 συνώνυμα (Malvasia Istria Italy, Malvasia Istriana Italy, Malvasia Bela και Malvasia Istriana Crete) βρίσκεται σε σημαντική γενετική απόσταση από τις υπόλοιπες ποικιλίες που μελετήθηκαν. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί επίσης ένδειξη ότι ενδεχομένως και στην περίπτωση αυτή αυθαίρετα να δόθηκε η ονομασία Malvasia.

Στις επόμενες δυο υποομάδες εμφανίζεται η ποικιλία Mavrotragano (325) σε πιο κοντινή γενετική απόσταση με την ποικιλία White Ghirghentina σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες, και έχουν κοινή εξελικτική βάση. Μάλιστα, επειδή το τμήμα αυτό του φαινογράμματος δείχνει κοινό πρόγονο με την πλειονότητα των ελληνικών ποικιλιών ενδεχομένως η ποικιλία White Ghirghentina να έχει ρίζες ελληνικές ή το αντίστροφο, δηλαδή το Mavrotragano (325) να έχει καταβολή από την Μάλτα, δεδομένου ότι το Mavrotragano (525) που είναι σε πολύ μικρότερη γενετική απόσταση με άλλες Ελληνικές ποικιλίες, βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη απόσταση από το Mavrotragano (325). Άρα το τελευταίο δεν αποτελεί ποικιλία ελληνικής προέλευσης καθώς οι δυο ποικιλίες έχουν μεν την ίδια ονομασία αλλά όμως έχουν μεγάλη γενετική απόσταση μεταξύ τους.

Στη συνέχεια εμφανίζεται η ποικιλία Kritiko να έχει δυο συνώνυμα (Kritiko Mavro (80) και Kritiko (464)) με αρκετά μεγάλη γενετική απόσταση από τις περισσότερες ποικιλίες που μένουν να σχολιαστούν.

Με βάση ιστορικά δεδομένα και με τις σχετικά μικρότερες, σε αυτό το σημείο πλέον του φαινογράμματος, γενετικές αποστάσεις των ποικιλιών και καθώς τα άκρα ορίζονται μεταξύ άλλων από ποικιλίες ελληνικής προελεύσεως, ως πρόγονοι των επόμενων διακλαδώσεων, πάνω από το 80% από τις υπό μελέτη Μαλβαζίες φαίνεται να έχουν προέλευση Ελληνική.

Οι ποικιλίες που μελετήθηκαν συγκρίθηκαν με 553 άλλες ποικιλίες *Vitis vinifera*, συμπεριλαμβανομένων των Ελληνικών ποικιλιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για καλύτερη ποιότητα και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, με

σκοπό να έχουμε μια πιο γενική και αντικειμενική άποψη της εξελικτικής προέλευσης αυτών των ποικιλιών. Από τα συνώνυμα που προέκυψαν από τη σύγκριση αυτή επιλέχθηκαν εκείνα που αναφέρονται στις υπό μελέτη ποικιλίες αμπέλου. Δημιουργήθηκε έτσι ένα νέο αρχείο που έδωσε την παρακάτω λίστα συνωνύμων (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Συνώνυμα που προέκυψαν από τη σύγκριση 600 ποικιλιών, από διαφορετικές χώρες, του είδους *Vitis vinifera*

Malvasia del Chianti Crete (MLV)	~	Malvazia del Chianti (GR)
Malvasia del Chianti Crete (MLV)	~	Malvasia del Chianti Italy (MLV)
Malvasia del Chianti Crete (MLV)	~	Παύλος
Malvasia del Chianti Italy (MLV)	~	Malvazia del Chianti (GR)
Malvasia del Chianti Italy (MLV)	~	Παύλος
Παύλος	~	Malvasia del Chianti (GR)
Malvasia Istriana Crete (MLV)	~	Malvasia Istriana Italy (MLV)
Malvasia Istriana Crete (MLV)	~	Malvasia Istria Italy (MLV)
Malvasia Istriana Crete (MLV)	~	Malvasia Bela (MLV)
Malvasia Istria Italy (MLV)	~	Malvasia Istriana Italy (MLV)
Malvasia Bela (MLV)	~	Malvasia Istriana Italy (MLV)
Malvasia Bela (MLV)	~	Malvasia Istria Italy (MLV)
Malvasia aromatica Crete (MLV)	~	Malvasia grigiorosa (MLV)
Αθήρι 24	~	Αθήρι
Κοτσιφάλι (49)(MLV)	~	Kotsifali (49) (GR)
Kritiko 464(MLV)	~	Kritiko (GR)
Kritiko 464(MLV)	~	Kritiko mavro (GR)
Kritiko 80(MLV)	~	Kritiko (GR)
Kritiko 80(MLV)	~	Kritiko mavro (GR)
Kritiko 80(MLV)	~	Kritiko 464(MLV)
Liatiko 41(MLV)	~	Liatiko (41) (GR)
Kritiko Mavro(GR)	~	Kritiko (GR)

Mantilaria 30(MLV)	~	Mantilaria (30) (GR)
Mantilaria 61(MLV)	~	Mantilaria (61) (GR)
Mavrodafni 293(MLV)	~	Mavrodafni (293) (GR)
Mavrodafni 293(MLV)	~	Mavrodafni (51) (GR)
Mavrodafni 51(MLV)	~	Mavrodafni (293) (GR)
Mavrodafni 51(MLV)	~	Mavrodafni (293)(MLV)
Mavrodafni (51) (GR)	~	Mavrodafni (293) (GR)
Malta (White Ghirghentina 2) (MLV)	~	Malta (White Ghirghentina 1) (MLV)
Malta (White Ghirghentina 4) (MLV)	~	Malta (White Ghirghentina 1) (MLV)
Malta (White Ghirghentina 4) (MLV)	~	Malta (White Ghirghentina 2) (MLV)
Malta (Red Gellewza) (MLV)	~	Malta (White Ghirghentina 1) (MLV)
Malta (Red Gellewza) (MLV)	~	Malta (White Ghirghentina 2) (MLV)
Malta (Red Gellewza) (MLV)	~	Malta (White Ghirghentina 4) (MLV)

Στη λίστα αυτή οι ποικιλίες από κάθε χώρα φέρουν μπροστά 3 ή 4 αντιπροσωπευτικά γράμματα. Οι ποικιλίες που μελετώνται εδώ διακρίνονται από τη συντομογραφία MLV. Έτσι, η ποικιλία Malvasia del Chianti (δείγμα από την Ιταλία) είναι συνώνυμο της ποικιλίας Malvasia del Chianti (Malvasia del ChiantiGR) που καλλιεργείται στην Ελλάδα καθώς επίσης και της ελληνικής ποικιλίας Παύλος (ΠαύλοςGR), αποτέλεσμα που υποστηρίζει ισχυρά την Ελληνική προέλευση της ποικιλίας αυτής, δηλαδή της Malvasia del Chianti. Η ποικιλία Malvasia Istria που καλλιεργείται στην Ιταλία είναι συνώνυμο της Malvasia Istriana που καλλιεργείται επίσης στην Ιταλία, και η Malvasia Bela (MLV) είναι συνώνυμο της Malvasia Istriana (Italy) (MLV) και της Malvasia Istria (Italy) (MLV) επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, που ελήφθησαν από τη σύγκριση των 47 ποικιλιών.

Άλλα συνώνυμα είναι τα Κρητικό 464 (MLV), Κρητικό Μαύρο 80 (MLV), ΚρητικόGR και Κρητικό ΜαύροGR και όλα ανήκουν στην ίδια ποικιλία 'Κρητικό'. Κανένα άλλο συνώνυμο που να συμπληρώνει ή να ανατρέπει τα αρχικά μας αποτελέσματα δεν βρέθηκε.

Μία άλλη λίστα πιθανού πατρικού συνδυασμού 'ατόμου-απογόνου' αντλήθηκε και παρουσιάζεται στον Πίνακα 18 του παραρτήματος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, οι ποικιλίες DimyatBUL, Dimyat cl.4/24 BUL, DianaBUL, Nasurla (77 cr) CR, Kanelles (5al) AL και ΖουμιάτικοGR μοιράζονται περισσότερο από το μισό των αλληλομόρφων τους με την Malvasia istrianaGR (συνώνυμο των Malvasia Istriana Italy, Malvasia Istria Italy, Malvasia Istriana Crete και Malvasia Bela (που στο εξής θα αναφέρονται ως Malvasia Istriana για οποιοδήποτε από τα συνώνυμα), γεγονός που τις κάνει πιθανούς προγόνους ή απογόνους συγκεκριμένης ποικιλίας (δηλαδή της Malvasia Istriana). Αυτό γίνεται πιο σαφές πιο κάτω, όταν ένας από τους γονείς των DimyatBUL και Dimyat cl.4/24BUL είναι η Malvasia Istriana (με την Amet Adgi Ibram (78 cr) CR ή Νύχι ΒασιλικάGR να είναι ο άλλος πιθανός γονέας), μία ισχυρή ένδειξη για την Ελληνική προέλευση των ποικιλιών αυτών, με βάση και τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Η Malvasia nera di Brindisi είναι πιθανός απόγονος των ποικιλιών ΑθήριGR και ΓουστολίδιGR ή της ΡόμπολαGR και πιθανός απόγονος των Bampa-HasanGR και ΓουστολίδιGR ή ΡόμπολαGR. Στον πίνακα 18 ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι το ΓουστολίδιGR είναι κατά πολύ μεγάλη πιθανότητα πρόγονος της ποικιλίας Malvasia nera di Brindisi με δεύτερο πιθανό γονέα κάποιον από τις ποικιλίες ΚαρβουνιάρηςGR, Καρυδάτο ΜαύροGR, ΚυπρέικοGR, ΛαδικινόGR, ΛαγόρθιGR, Malvasia del ChiantiGR, ΠαύλοςGR, ΨευδοσύρικοGR, ΡωμέικοGR, ΣάτινοGR, ΣκλάββαGR, ΤσαρδάναGR and Malvasia del Chianti και επομένως οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η Malvasia nera di Brindisi είναι Ελληνικής προέλευσης.

Μια ακόμη παρατήρηση που ενισχύει την Ελληνική προέλευση της ποικιλίας Malvasia nera di Brindisi είναι ότι άλλοι πιθανοί πρόγονοί της είναι η ελληνική ποικιλία ΡόμπολαGR με κάποια από τις ποικιλίες ΛαδικινόGR, ΛαγόρθιGR, Malvasia del Chianti, ΠαύλοςGR, ΨευδοσύρικοGR, ΡωμέικοGR, ΣάτινοGR, ΣκλάββαGR and ΤσαρδάναGR, επιβεβαιώνοντας την ελληνική της καταγωγή. Όλοι λοιπόν από τους πιθανούς γονείς της ποικιλίας Malvasia nera di Brindisi είναι Ελληνικές ποικιλίες άρα και η ίδια.

Η ποικιλία Malvasia aromaticaGR δεν προκύπτει να είναι συνώνυμο της Malvasia aromatica CreteMLV, η οποία είναι συνώνυμο της Malvasia grigiorosa, όμως η τελευταία είναι σε ποσοστό (95%), μία από τις γονεϊκές ποικιλίες της πρώτης. Τέλος, η Malvasia aromatica, της Ελληνικής συλλογής, με συνώνυμο την Malvasia Grigiorosa, είναι πιθανός απόγονος της διαστάρωσης μεταξύ των ποικιλιών ΤσουγιανίδεςGR και Malvasia di Schierano, ενώ η Malvasia di Candia Italy είναι πιθανός απόγονος των Malvasia del Lazio και Malvasia di Candia Italy.

Η ποικιλία *Malvasia di Casorzo* αποτελεί μία από τις πιθανές γονεϊκές ποικιλίες πολλών ελληνικών ποικιλιών, όπως επίσης μιας Γαλλικής (*Muscat d' Alsace R*) και μιας Βουλγαρικής (*Tamyanka*) ποικιλίας θέτοντας ένα ερωτηματικό ως προς την κοινή εξελικτική τους προέλευση.

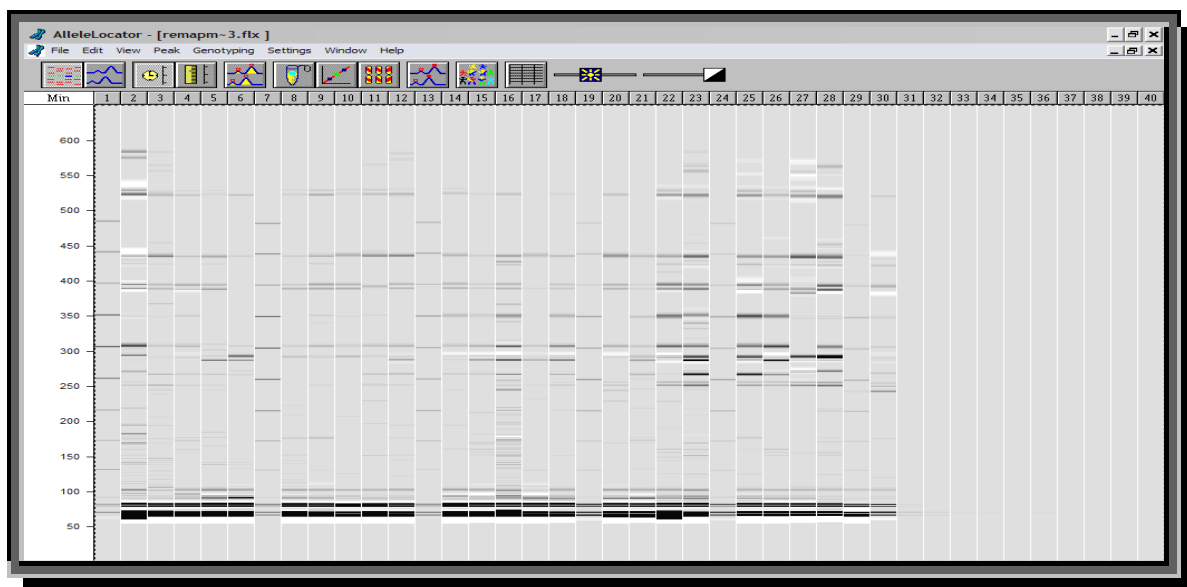
Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι αν και μόνο 9 μικροδορυφορικοί τόποι χρησιμοποιήθηκαν για την γενετική ταυτοποίηση των υπό μελέτη ποικιλιών *Vitis vinifera* με σκοπό τον προσδιορισμό της προέλευσης ποικιλιών με το όνομα *Malvasia*, καταφέραμε να δώσουμε μία πιο σαφή εικόνα σε σχέση με την προέλευσή τους αυτή, για την οποία υπάρχουν πολύ σοβαρές ενδείξεις ότι είναι τελικά Ελληνική. Η χρήση περισσότερων ποικιλιών με το όνομα *Malvasia* και η σύγκρισή τους σε περισσότερους μικροδορυφορικούς τόπους θα επιβεβαιώσει τα παραπάνω.

3.2 Γενετική ταυτοποίηση με τη μέθοδο REMAP

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μία άλλη μέθοδος για την γενετική ταυτοποίηση των ποικιλιών αμπέλου, την REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism). Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί των μικροδορυφορικών δεικτών τόσο ως προς τον χρόνο διεκπεραίωσης, που απαιτεί όσο και ως προς το κόστος της, ενώ τα αποτελέσματα και από τις δυο μεθόδους είναι σχεδόν ταυτόσημα.

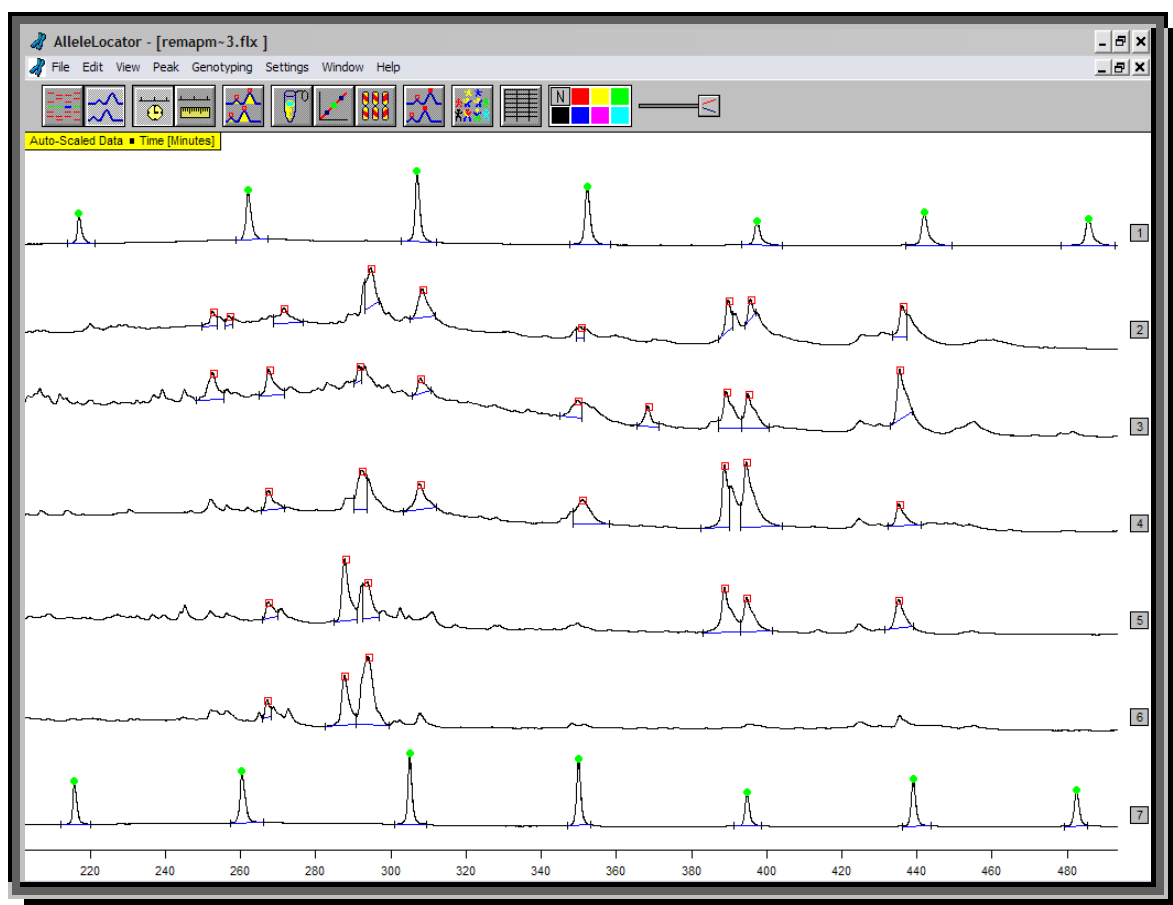
Από τις ποικιλίες που μελετώνται στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκαν 24, για έλεγχο του γενετικού τους προφίλ με τη μέθοδο REMAP. Ο αριθμός των ζωνών που λαμβάνονται είναι πολύ σημαντικός, λόγω του πολυμορφισμού που εμφανίζεται σε μια περιοχή με μεγέθη από 50 έως 500 bp. Για να έχουμε στατιστικά πιο αντικειμενικά συμπεράσματα και για την εξάλειψη όλων των μη ομόλογων ενδείξεων-κορυφών (picks) το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε 4 φορές και καταγράφηκαν οι μέσες τιμές (τα μεγέθη των αλληλομόρφων που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στις επαναλήψεις αυτές).

Στην εικόνα 20 παρουσιάζεται το πήκτωμα (REMAP profile) έτσι όπως αποτυπώθηκε από τον αναλυτή ALFexpress II.



Εικ. 20 Απεικόνιση ηκτώματος με τη μέθοδο ρετρομεταθετονίων (REMAP).

Το ηλεκτρογράφημα παρακάτω απεικονίζει μέρος από την πραγματική εικόνα του ηκτώματος (Εικόνα 21).



Εικ. 21 Ηλεκτροφαινόγραμμα προφίλ ρετρομεταθετών στοιχείων των 24 ποικιλιών του είδους *Vitis vinifera*.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των τριών πειραματικών επαναλήψεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 19 παρακάτω.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα που αντλήθηκαν από τη σύγκριση των τριών επαναλήψεων προφίλ με πετρομετατόνια (μέθοδος REMAP) για τις Ιταλικές και Κρητικές Μαλβαζίες και τις Γαλλικές ποικιλίες *Vitis vinifera*.

Lane	Name	145	147	149	151	153	155	156	158	160	161	163	165	166	167	168	171	173	175	176	177	179	183	185	187	188	190
1	<i>Malvasia moscatel fonte grande</i>						155		160			165			168			175	177								
2	<i>Malvasia fine</i>						155		160						168			175		179		185					
3	<i>Malvasia del Chianti Italy</i>						155		158	160				166	168					176							188
4	<i>Malvasia nera di Lecce</i>									161		165		167						176							
5	<i>Malvasia di Schierano</i>							156	160										175							188	
6	<i>Malvasia di Casorzo</i>									161			166	168							177		183				
7	<i>Malvasia grigiorosa</i>	145		149	151			156	160												177						190
8	<i>Malvasia del Lacio</i>				151			156	160						168					176							
9	<i>Malvasia nera di Lecce</i>		147		151			156	160						168				175								
10	<i>Malvasia di Candia Aromatica Italy</i>											163			168				175								190
11	<i>Malvasia nera di Brindisi</i>								160		163			167						176							
12	<i>Malvasia Istriana Italy</i>						155		160						168												
13	<i>Malvasia Istria Italy</i>						155		160						168												
14	<i>Malvasia Rei</i>	145							160	161											177						190
15	<i>Malvasia Bela</i>						155		160						168												
16	<i>Malvasia Frueshrot</i>				151			156	158	160																	
17	<i>Malvasia di Candia Italy</i>				151		155		160								171	173							187	190	
18	<i>Malvasia aromatica Crete</i>	145	149	151			156		160												177						190
19	<i>Malvasia di Candia Crete</i>	145	149	151	153	155			160				166	168						176					187		
20	<i>Malvasia del Chianti Crete</i>					155	158		160				166	168						176						188	
21	<i>Malvasia Istriana Crete</i>					155			160						168												
37	<i>Gamay 3-36</i>					155	158								168	171				176							
38	<i>Pinot Noir 9-18</i>				151				160							168				175						188	190
39	<i>Cabernet Sauvignon</i>		149	151							163	165				171											

Lane	Name	192	194	200	203	206	208	210	217	218	222	225	230	234	236	240	242	243	249	254	257	259	260	261	264	266	268
1	Malvasia moscatel fonte grande									218	225				236				249	254					264	266	268
2	Malvasia fine									218									249	254					264		
3	Malvasia del Chianti Italy																		249	254					264		
4	Malvasia nera di Lecce		194														242	243	249	254						266	
5	Malvasia di Schierano												230		240				249						264		
6	Malvasia di Casorzo														236				249					261	266		
7	Malvasia grigiorosa																		249	254					266	268	
8	Malvasia del Lazio	192						210											249	254			260				
9	Malvasia nera di Lecce	192				206			217				230	234					249	254					264		
10	Malvasia di Candia Aromatica (f)		194				208								236				249		259				264		
11	Malvasia nera di Brindisi									218							242		249	257					264		
12	Malvasia Istriana Italy					206													249	254					264	268	
13	Malvasia Istra Italy					206													249	254					264	268	
14	Malvasia Rei									218	222								249					261			
15	Malvasia Bela					206													249	254					264	268	
16	Malvasia Fruhhrot				203		208				222				236	242			249	254							
17	Malvasia di Candia Italy																		249				260			266	
18	Malvasia aromatica Crete																		249	254						266	268
19	Malvasia di Candia Crete	192																	249	254						266	
20	Malvasia del Chianti Crete																		249	254					264		
21	Malvasia Istriana Crete					206													249	254					264	268	
37	Gamay 3-36																		249	254							
38	Pinot Noir 9-18																242	243	249	254							268
39	Cabernet Sauvignon			200				210		222	225				236							257			264		

Lane	Name	269	270	271	274	285	289	290	291	296	300	304	307	308	312	322	326	330	338	344	347	348	349	354	363	365	369	
1	Malvasia moscatel fonte grande					285	289	290	291		304									344	347							
2	Malvasia fine		170			285	289	290	291	296	300	304								344	347							
3	Malvasia del Chianti Italy		170			285	289					304									347							
4	Malvasia nera di Lecce					285	289	290	291				307					330					349		363			
5	Malvasia di Schierano		170			285	289		291		304					326			311									
6	Malvasia di Casorzo			271		285	289	290			304	308	312											354				
7	Malvasia grigiorosa							290	291		304								338		347							
8	Malvasia del Lazio	269	170			285	289	290			304																	
9	Malvasia nera di Lecce					285	289	290	291		304									344	347				363	365	369	
10	Malvasia di Candia Aromatica (f)					285	289	290	291		304									344	347				363	365		
11	Malvasia nera di Brindisi					285	289	290	291		304										347							
12	Malvasia Istriana Italy					285	289	290	291		304											348						
13	Malvasia Istra Italy					285	289	290	291		304											348						
14	Malvasia Rei					285	289	290	291	296	304																	
15	Malvasia Bela					285	289	290	291		304											348						
16	Malvasia Fruhhrot		170		274	285	289				304																	
17	Malvasia di Candia Italy		170								304													354				
18	Malvasia aromatica Crete							290	291		304								338		347							
19	Malvasia di Candia Crete					285	289	290			304								338	344	348							
20	Malvasia del Chianti Crete		170			285	289				304										347							
21	Malvasia Istriana Crete					285	289	290	291		304											348						
37	Gamay 3-36		170						291		304									344	348							
38	Pinot Noir 9-18					285	289	290			304											348						
39	Cabernet Sauvignon		170			289	290	291						312	322													

Lane	Name	384	388	390	408	410	411	415	420	425	430	431	432	439	445	449	450	454	516	517	519	520	522	524	549	550	558
1	Malvasia moscatel fonte grande	384		390					420	425	430						450	454	516				522				
2	Malvasia fine	384		390					420	430					445	449				517					549	558	
3	Malvasia del Chianti Italy	384		390					420	430				439	445	449				517				524	550		
4	Malvasia nera di Lecce	384		390					420	430												520		524	550		
5	Malvasia di Schierano			390					420		431	432								517				524	549		
6	Malvasia di Casorzo	384		390					420	430												519		524	550		
7	Malvasia grigiorosa	384		390	410		415		420	425	431						450			517				524	550	558	
8	Malvasia del Lazio	384		390	408		411		420		431									517	519			524	550	558	
9	Malvasia nera di Lecce		388						420		431									517				524	550	558	
10	Malvasia di Candia Aromatica Italy	384		390		410			420		431									517				524			
11	Malvasia nera di Brindisi	384		390					420		431													524	550	558	
12	Malvasia Istriana Italy	384		390					420	430					445	449				517				524	550		
13	Malvasia Istria Italy	384		390					420	430					445	449				517				524	550		
14	Malvasia Rei	384		390								432								517				524	550	558	
15	Malvasia Bela	384		390					420	430					445	449				517				524	550		
16	Malvasia Fruehrot	384		390						430	432									517				524	549		
17	Malvasia di Candia Italy	384		390					420	430												519		524			
18	Malvasia aromatica Crete	384		390	410		415		420	425	431						450			517				524	550	558	
19	Malvasia di Candia Crete	384		390					420	425	430				445	449				517				524	550		
20	Malvasia del Chianti Crete	384		390					420	430				439	445	449				517				524	550		
21	Malvasia Istriana Crete	384		390					420	430					445	449				517				524	550		
37	Gamay 3-36	384		390					420	425	430				445	449			516				522		550		
38	Pinot Noir 9-18	384		390					420	425	430												520	524	550		
39	Cabernet Sauvignon																										

Lane	Name	559	566	568	571	574	577	580	589
1	Malvasia moscatel fonte grande		566				577		
2	Malvasia fine			568			577		
3	Malvasia del Chianti Italy	559							
4	Malvasia nera di Lecce	559		568			577		
5	Malvasia di Schierano	559						580	589
6	Malvasia di Casorzo	559							
7	Malvasia grigiorosa		566			574			
8	Malvasia del Lazio		566			574			
9	Malvasia nera di Lecce								
10	Malvasia di Candia Aromatica Italy		566			574			
11	Malvasia nera di Brindisi								
12	Malvasia Istriana Italy	559	566			574			
13	Malvasia Istria Italy	559	566			574			
14	Malvasia Rei				571			580	
15	Malvasia Bela	559	566			574			
16	Malvasia Fruehrot	559		568					
17	Malvasia di Candia Italy		566			574			
18	Malvasia aromatica Crete		566			574			
19	Malvasia di Candia Crete	559		568				580	
20	Malvasia del Chianti Crete	559							
21	Malvasia Istriana Crete	559	566			574			
37	Gamay 3-36	559							
38	Pinot Noir 9-18	559							
39	Cabernet Sauvignon								

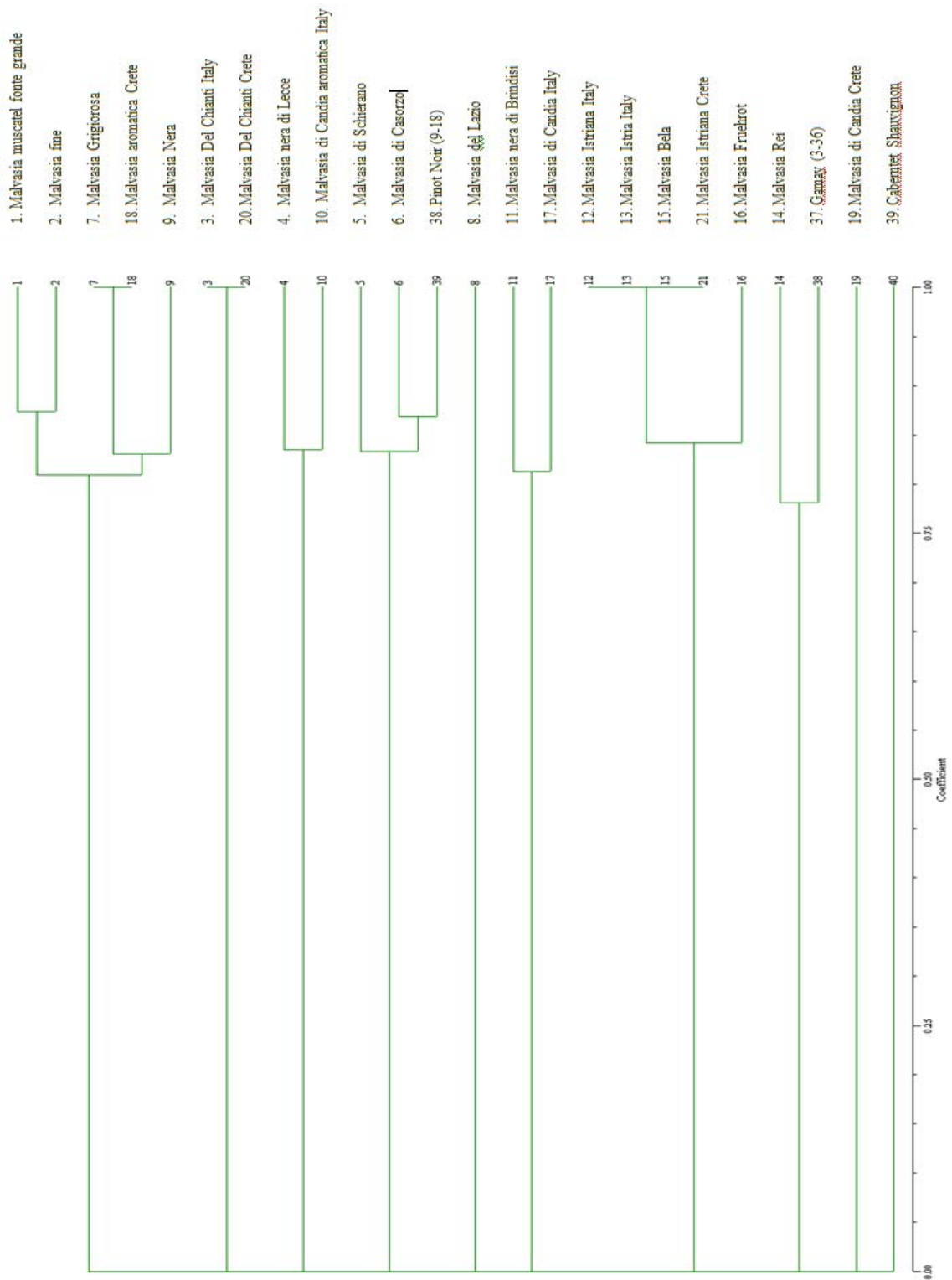
Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει τα προφίλ που εξάγονται αποτελούνται από μεγάλο αριθμό ζωνών, που αντιστοιχούν στους REMAP αλληλομόρφους. Το προφίλ μιας ποικιλίας μπορεί να αποτελείται από 6 έως 11 αλληλομόρφους. Συνολικά καταμετρήθηκαν 112 διαφορετικοί αλληλόμορφοι, όταν αναλύθηκαν τα μεγέθη των αλληλομόρφων που εξήχθησαν από το λογισμικό AlleleLocator® software για ζώνη ανάλυσης 145-589 bp για μέσο αριθμό 35 αλληλομόρφων ανά ποικιλία.

Ο πίνακας αυτών των αποτελεσμάτων μετατράπηκε σε ορθογώνιο δυαδικό πίνακα, ώστε να επιτραπεί η ανάλυσή του από το λογισμικό NTSYSpc 2.1 (Exeter Software, Setauket, NY, State-Plain), όπως επίσης έγινε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου των μικροδορυφορικών δεικτών (Εικόνα 22). Η γενετική απόσταση που χρησιμοποιήθηκε είναι η μέση ταξονομική απόσταση.

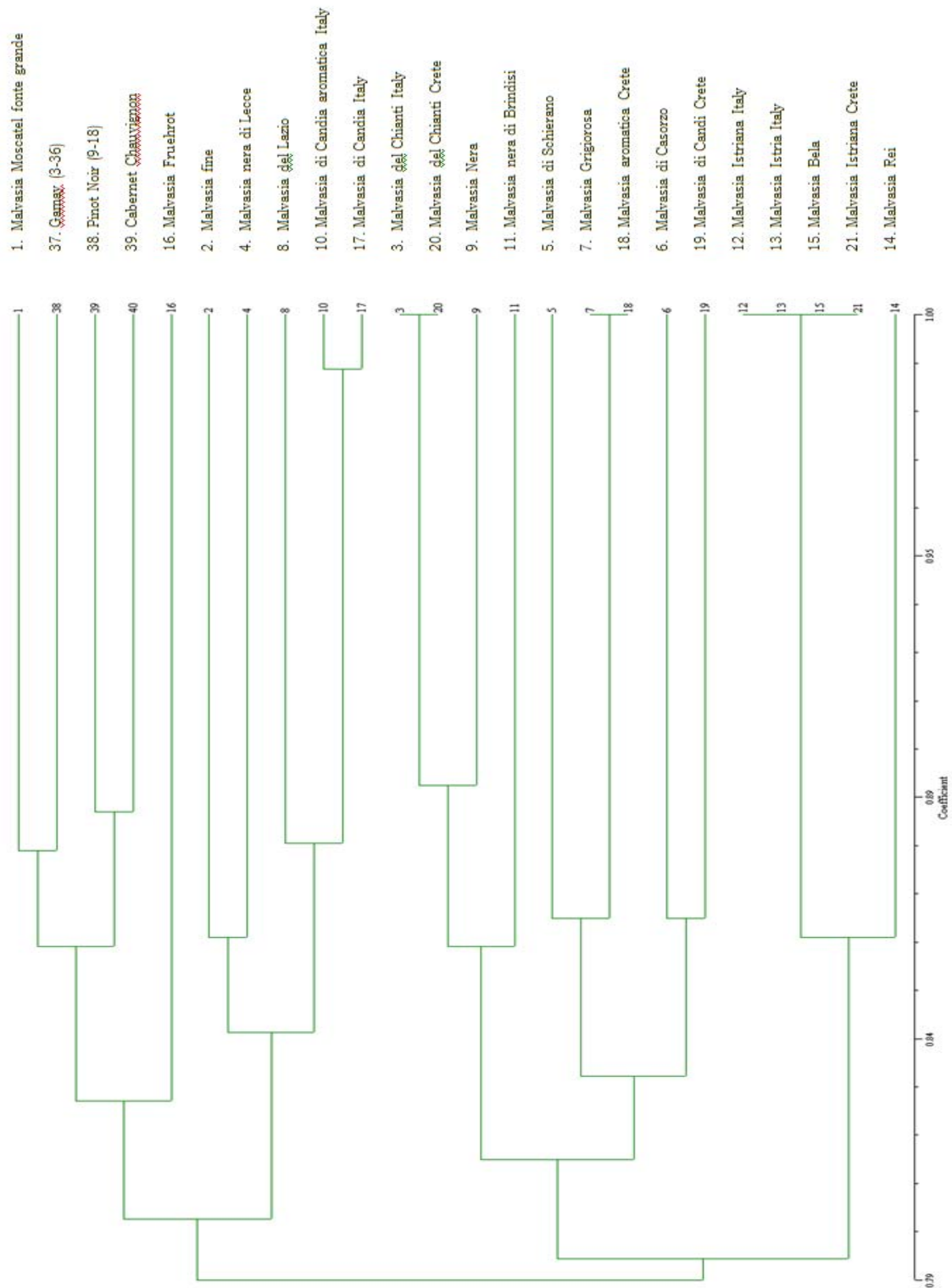
Αυτός ο πίνακας βασισμένος σ' αυτήν την απόσταση, επιτρέπει την κατασκευή ενός φαινογράμματος με τη χρήση Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Το φαινόγραμμα αυτό δίνεται στην Εικόνα 23. Μπορεί να δειχθεί ότι το προφίλ των μικροδορυφόρων έδωσε ένα μοναδικό προφίλ ταυτοποίησης για τις 24 από τις 47 ποικιλίες.

Μέσα από μια σύγκριση μεταξύ των φαινογραμμάτων, που παρουσιάζονται στις Εικόνες 19, 22 και 23 μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι είναι αρκετά όμοια, τουλάχιστον όσον αφορά την περίπτωση των συνωνύμων, που έχουν προκύψει από τις δυο μεθόδους (συγκεκριμένα, είναι ακριβώς τα ίδια). Θα έπρεπε να λάβει κανείς υπόψη ότι τα δεδομένα, που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φαινογράμματος από τα αποτελέσματα της μεθόδου REMAP είναι σχεδόν τα διπλά (112 different alleles) σε σύγκριση με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για το μικροδορυφορικό προφίλ και την κατασκευή του αντίστοιχου φαινογράμματος (55 διαφορετικά αλληλόμορφα κατανεμημένα στους 9 μικροδορυφορικούς τόπους).

Η μέθοδος REMAP είναι πολύ αξιόπιστη, ιδανική για την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους, και δίνει με μία μόνο αντίδραση μία πολύ συγγενή προσέγγιση στην εξελικτική προέλευση των ατόμων, υποδεικνύοντας τα ίδια συνώνυμα που αποκομίστηκαν με τη χρήση των λογισμικών IDENTITY 1.0 και NTSYSpc (και για τις δυο μεθόδους).



Εικ. 22. Φαινόγραμμα της μεθόδου ρετρομεταθετώνων [*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP)*] των γαλλικών ποικιλιών και των Μαλβαζιών αυτής της μελέτης.



Εικ. 23. Φαινόγραμμα μικροδορυφορικού προφίλ των 24 ποικιλιών *Vitis vinifera* με τη χρήση του λογισμικού NTSYSpc.

4. Προοπτικές

Η ακριβής ταυτοποίηση καλλιεργούμενων ποικιλιών και κλώνων *Vitis vinifera* L. είναι μεγάλης σημασίας για την εμπορική καλλιέργεια και γενετική ταυτοποίηση των προϊόντων τους.

Η χρήση εξειδικευμένων μικροδορυφορικών δεικτών θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην επίλυση πολλών εμποδίων, που αντιμετωπίζουν οι γενετιστές. Κανένας άλλος μοριακός δείκτης δεν έχει δώσει τόσο μεγάλο πληροφοριακό όγκο για τους γενετιστές του *Vitis vinifera* L.

Στο αμπέλι, οι πυρηνικοί SSR χρησιμοποιούνται ευρέως για τη γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών (Sefc *et al.*, 2000) όπως επίσης και ως γενετικοί δείκτες για την κατασκευή γενετικών χαρτών (Dalbó *et al.*, 2000), την πιστοποίηση συνωνύμων και την τεκμηρίωση γενετικών συγκρίσεων. Επίσης, οι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί για την έρευνα γενετικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών οινοποιίας και για την καθιέρωση πατρότητας κλασικών γαλλικών ποικιλιών, όπως η ‘Cabernet Sauvignon’ (Bowers and Meredith, 1997) και ‘Chardonnay’ (Bowers *et al.*, 1999) και επίσης Αυστριακών ποικιλιών (Sefc *et al.*, 1998).

Η πιθανότητα χρήσης της ποικιλότητας στους χλωροπλαστικούς μικροδορυφορικούς τόπους για την έρευνα των σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών και για την διευκρίνιση της ιστορίας εξημέρωσης του *Vitis* spp. οδήγησε στην ανάλυση της ύπαρξης πολυμορφισμών στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα του *Vitis* sp. (Argoyo-García *et al.*, 2002).

Χλωροπλαστικοί μικροδορυφορικοί δείκτες (cpSSR) χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την ανάλυση δειγμάτων γλεύκους, εφόσον η αντίστοιχη αναλογία ποικιλιών στο μίγμα μπορεί να εκτιμηθεί με βάση τη σχετική ένταση σήματος των αλληλομόρφων, που έχουν καταγραφεί από τον αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών (Baleiras-Couto and Eiras-Dias, 2006). Η κατανομή των χλωροτύπων στις καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπέλου, και οι γενετικές σχέσεις μεταξύ σύγχρονων γονοτύπων και αγρίου τύπου κλημάτων από διαφορετικές περιοχές, οδήγησε στο συμπέρασμα της ύπαρξης δυο κέντρων προέλευσης της καλλιεργούμενης αμπέλου, ένα κοντά στην Ανατολή και ένα στην δυτική Μεσόγειο.

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και άλλοι συγγραφείς (Aradhya *et al.*, 2003; Grassi *et al.*, 2003; Imazio *et al.*, 2006). Από τη στιγμή που συγκεκριμένοι χλωρότυποι βρέθηκαν να είναι τοπικά περιορισμένοι σε συγκεκριμένες περιοχές,

αμφιλεγόμενες προελεύσεις κάποιων ποικιλιών αμπέλου ίσως μπορούν να αποσαφηνιστούν με ανάλυση του χλωροπλαστικού γονιδιώματός τους.

Επιπροσθέτως, υπάρχουν αρωματικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera* L.) που είναι γνωστές από την Ρωμαϊκή Εποχή. Διαδόθηκαν σε τόσο μεγάλο βαθμό, που οι πρώτοι αμπελογράφοι έκαναν ορισμένες προσπάθειες, κατά τον 19^ο αιώνα, να κατηγοριοποιήσουν τις ποικιλίες *Vitis vinifera* σε αρωματικές και μη αρωματικές ποικιλίες. Κάτι τέτοιο ήταν εξαιρετικά δύσκολο εξαιτίας του γεγονότος ότι κάποιες ποικιλίες, αρωματικές και μη, είχαν παρόμοια ονόματα.

Πολύαριθμες ποικιλίες με το όνομα Malvasia αναφέρονται στις γνωστές 'Ampelografia' (Molon, 1906) και 'Ampelographie' (Viala and Vermorel, 1909). Ακόμη κι αν στο παρελθόν πολλοί συγγραφείς έτειναν να θεωρούν τις Μαλβαζίες αποκλειστικά ως αρωματικές ποικιλίες αμπέλου, σήμερα σε αυτές περιλαμβάνεται ένας μεγάλος αριθμός μη αρωματικών ποικιλιών. Μία λιγότερο πολύπλοκη κατηγορία αρωματικών ποικιλιών αμπέλου είναι τα Μοσχάτα (Muscat), τα οποία ξεχωρίζουν για το ιδιαίτερο άρωμά τους. Άλλες αρωματικές ποικιλίες αμπέλου, όχι τόσο γνωστές όσο τα Μοσχάτα και οι Μαλβαζίες, καλλιεργήθηκαν επίσης σε περιορισμένες περιοχές με διαφορετικά ονόματα.

Η πρώτη αναφορά αρωματικών ποικιλιών αμπέλου έγινε σε αρχαία έγγραφα (Cato, Pliny περίπου το 200-300 π.Χ.) αλλά περισσότερες αναφορές γίνονται στην βιβλιογραφία του 12^{ου} αιώνα. Αυτήν την περίοδο ένας μεγάλος αριθμός κρασιών (κυρίως αρωματικά ή γλυκά) εξάγονταν από την Ελλάδα στην Ιταλία. Συνεπώς, οι ποικιλίες αμπέλου που σχετίζονταν με αυτά τα κρασιά μπορεί επίσης να είχαν μετακινηθεί. Όπως και να έχει, δεν υπήρχαν και δεν υπάρχουν περιοχές στην Ιταλία χωρίς αρωματικές ποικιλίες αμπέλου ή αρωματικά κρασιά με το όνομα Malvasia και/ή Μοσχάτο. Αυτό δημιούργησε σύγχυση, η οποία διαρκεί μέχρι τις μέρες μας, σχετικά με την ταυτοποίηση αρωματικών ποικιλιών αμπέλου ιδιαίτερα Μαλβαζιών και Μοσχάτων.

Έτσι, η μελέτη γενετικών σχέσεων μεταξύ αρωματικών ποικιλιών είναι σημαντική, όχι μόνο για λόγους διάδοσης και αναπαραγωγής, για την αποφυγή σύγχυσης στην διανομή φυτικού υλικού αμπέλου, αλλά επίσης για την διατήρηση γενετικού υλικού, προγράμματα παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού κ.λ.π.

Οι SSR δείκτες, όπως ήδη έχει αναφερθεί, έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμοι για την ακριβή ταυτοποίηση ποικιλιών, τον προσδιορισμό συνωνύμων, τον καθορισμό γενετικής συνάφειας και την γενετική χαρτογράφηση γονιδιωμάτων.

Εκείνο, που δεν είναι σίγουρο, ωστόσο, είναι κατά πόσον οι SSR δείκτες θα παραμείνουν ο προτιμώμενος τύπος δεικτών στο μέλλον, δεδομένου του αλματώδους ρυθμού ανάπτυξης της τεχνολογίας δεικτών DNA. Πρόσφατα, ολοκληρώθηκε η αλληλούχιση γονιδιωμάτων γονοτύπων αμπέλου (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007), επιτρέποντας τη βελτίωση και την ανάπτυξη συμπληρωματικών τεχνικών, αναφορικά με γενετικούς δείκτες, όπως είναι η γονιδιακή ανάλυση των SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Στα γονιδιώματα των ευκαρυωτικών οργανισμών οι SSR συχνά βρίσκονται κοντά σε διασκορπισμένα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, όπως οι αλληλουχίες *Alu* στα πρῶτιστα (Arcot *et al.*, 1996; Jurka and Pethiyagoda, 1995) και οι επιμήκεις τερματικές επαναλήψεις των ρετρομεταθετόνιων στο κριθάρι (Ramsay *et al.*, 1999). Αυτές οι ενώσεις έχουν άμεση πρακτική εφαρμογή για την επιτυχή ανάπτυξη SSR δεικτών. Η αποφυγή αλληλουχιών που περιβάλλουν και ανταποκρίνονται σε γνωστό επαναλαμβανόμενο DNA έχει γίνει διαδικασία ρουτίνας κατά την ανάπτυξη μικροδορυφορικών δεικτών για το γονιδίωμα θηλαστικών (Fondon *et al.*, 1998) διότι η τοποθέτηση PCR εκκινήτων σε επαναλαμβανόμενες περιοχές δίνει ψευδή ή μη συγκεκριμένα προϊόντα.

Σε αντίθεση με τα σχετικά μικρά μεγέθη του γονιδιώματος των προκαρυωτικών οργανισμών, οι ευκαρυωτικοί ποικίλουν περισσότερο από 200.000 φορές στο μέγεθος των γονιδιωμάτων τους (Gregory, 2001). Κανένας παράγοντας, όπως ο αριθμός των κωδικών γονιδίων ή ο βαθμός πολυπλοκότητας του οργανισμού δεν συσχετίζεται στενά με το μέγεθος του γονιδιώματος, εγείροντας το γνωστό 'Παράδοξο της Τιμής C' (C-Value Paradox).

Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό ότι διαφορικές ποσότητες μη κωδικών, επαναλαμβανόμενων τμημάτων DNA, ευθύνονται για ένα μεγάλο μέρος της ποικιλότητας μεγέθους του ευκαρυωτικού γονιδιώματος, παρέχοντας έτσι μια μερική εξήγηση του παραδόξου (Gregory & Hebert, 1999; Petron, 2001). Ωστόσο, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα, για παράδειγμα ποιο είναι το μέγεθος της συμβολής διαφόρων τύπων επαναλαμβανόμενου DNA (μεταθετά στοιχεία, δορυφορικό DNA και απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες) στην ποικιλότητα του γονιδιακού μεγέθους, και πώς τα γονιδιακά μεγέθη παραμένουν σταθερά ή μειώνονται. Αυτά τα ερωτήματα είναι πολυσύνθετα και ενδεχομένως να απαιτούν πολύπλοκες απαντήσεις καθότι οι περιβαλλοντικές επιδράσεις, που διαμορφώνουν το

μέγεθος του γονιδιώματος ποικίλουν ευρέως ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς (Petrov, 2001).

Η ικανότητα προτυποποίησης των μικροδορυφορικών δεικτών είναι σχετικά υψηλή σε σύγκριση με άλλα εργαλεία γενετικής ταυτοποίησης γεγονός που καθιστά αυτή την τεχνολογία περισσότερο αποτελεσματική. Ένα εκτενές τετραετές πρόγραμμα Διαχείρισης και Συντήρησης Γενετικού Υλικού Αμπέλου (GrapeGene06) (http://www.montpellier.inra.fr/grape_gen06/) βρίσκεται σε εξέλιξη, στο οποίο συμμετέχουν 25 μέλη από 17 χώρες, με σκοπό να προτυποποιήσουν πρωτόκολλα και βάσεις δεδομένων που αφορούν τους μικροδορυφορικούς δείκτες για την πλειονότητα των ποικιλιών αμπέλου.

Όπως και στην παρούσα διατριβή, νέες τεχνικές υιοθετούνται συνεχώς και μπορούμε να φανταστούμε ότι είναι μόνο η αρχή μιας σειράς νέων μεθόδων γενετικής ταυτοποίησης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adam-Blondon A.F., Roux, C., Claux, D., Butterlin G., Merdinoglu, D., & This P.** (2004) Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor Appl Genet* **109**:1017-1024
- Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A., & Fujimura T.** (1996) *Microsatellite DNA markers for rice chromosomes*. *Theor Appl Genet* **94**: 61-67
- Ananiev E.V., Phillips R.L. & Rines H.W.** (1998) *Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin*. *Genetics* **149**: 2025-2037
- Aradhya M.K., Dangl G.S., Prins B.H., Boursiquot J.M., Walker M.A., Meredith X.P., & Simon C.J.** (2003) *Genetic structure and differentiation in cultivated grape, Vitis vinifera L.* *Genet Res* **81**:179-192
- Arcot S.S., Adamson A.W., Lamerdin J.E., Kanagy B., Deininger P.L., Carrano A.V., & Batzer M.A.** (1996) *Alu fossil relics--distribution and insertion polymorphism*. *Genome Res* **6**(11): 1084-92.
- Arroyo-Garcia R., & Martinez-Zapater J.M.** (2004) *Development and characterization of new microsatellite markers for grape*. *Vitis* **43**:175-178
- Baleiras-Couto M.M., & Eiras-Dias J.E.** (2006) *Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers*. *Anal Chim Acta* **563**:283-291
- Bao J.S., Zheng X.W., Xia Y.W., He P., Shu Q.Y., Lu X., Chen Y., & Zhu L.H.** (2000) *QTL mapping for the paste viscosity characteristics in rice (Oryza sativa L.)*. *Theor Appl Genet* **100**: 280-284
- Bell C.J., & Ecker J.R.** (1994) *Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis*. *Genomics*. **19**(1): 137-44.
- Bennetzen J.L.** (2000) *Transposable element contributions to plant gene and genome evolution*. *Plant Mol Biol* **42**: 251-269
- Bertsch X., Kieffer F., Triouleyre X., Butterlin G., Merdinoglu D., & Walter B.** (2003) *Molecular profiling of Vitis vinifera Chardonnay obtained by somatic embryogenesis*. *J Intl Sci Vigne Vin* **37**:223-227
- Bohne A., Brunet F., Galiana-Arnoux D., Schultheis C. & Volff J.** (2008) *Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates*. *Chrom Res* **16**: 203-215

- Boltstein D., White R. L., Skolnick M., & Davis R.W.** (1980) Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**: 314-331
- Bourquin J.C., Sonko A., Otten L., & Walter B.** (1993) *Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in Vitis vinifera L.* *Theor Appl Genet* **87**: 431-438
- Bowers J.E., Bandman E.B., & Meredith C.P.** (1993) *DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars.* *Am J Enol Vitic* **44**: 266-274
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., & Meredith C.P.** (1996) *Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (Vitis vinifera).* *Genome* **39**: 628-633
- Bowers J.E., & Meredith C.P.** (1997) *The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon.* *Nature Genetics* **16**(1): 84-87.
- Bowers J., Boursiquot J.M., This P., Chu K., Johansson H., & Meredith C.P.** (1999) *Historical genetics: The parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of North Eastern France.* *Science* **285**: 1562-1565.
- Bres-Patry C., Loreux M., Clement G., Bangratz M., & Ghesquiere A.** (2001) *Heredity and genetic mapping of domestication-related traits in a temperate japonica weedy rice.* *Theor Appl Genet* **102**: 118-126
- Buscher N., Zyprian E., Bachmann O., & Blaiich R.** (1994) *On the origin of the grapevine variety Muller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD).* *Vitis* **33**: 15-17
- Cabezas J.A., Cervera M.T., Arroyo-García R., Ibanez J., Rodriguez-Torres I., Borrego J., Cabello F., & Martinez-Zapater J.M.** (2003) *Garnacha and Garnacha Tintorera: Genetic relationships and the origin of teinturier varieties cultivated in Spain.* *Am J Enol Vitic* **54**:237-245
- Caceres M., Puig M. & Ruiz A.** (2001) *Molecular characterization of two natural hotspots in the Drosophila buzzatii genome induced by transposon insertions.* *Genome Res* **11**: 1353-1364
- Caceres M., Ranz J.M., Barbadilla A., Long M. & Ruiz A.** (1999) *Generation of a widespread Drosophila inversion by a transposable element.* *Science* **285**: 415-418
- Capy P., Bazin C., Higuët D. & Langin T.** (1997) *Dynamics and Evolution of Transposable Elements.* Landes Bioscience, Austin TX

- Cervera M.T., Cabezas J.A., Sancha J.C., Martinez-de-Toda F., & Martinez-Zapater J.M.** (1998) *Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources: a case study with accessions from Rioja (Spain)*. Theor Appl Genet **97**: 51-59
- Cettolini S.** (1893) *Elenco delle principali uve sarde*. Annuario R. Scuola di viticoltura e Enologia, Cagliari, Vol. III
- Chen X., Temnykh S., Xu Y., Cho Y. G., & McCouch S. R.** (1997) *Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.)*. Theor Appl Genet **95**: 553-567
- Cho Y. G., Ishii T., Temnykh S., Chen X., Lipovich L., McCouch S. R., Park W. D., Ayres N., & Cartinhour S.** (2000) *Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.)*. Theoretical and Applied Genetics **100**:713-722
- Copenhaver G. P. & Preuss D.** (1999) *Centromeres in the genomic era: unravelling paradoxes*. Curr Opin Plant Biol **2**: 104-108
- Cresse A.D., Hulbert S. H., Brown W.E., Lucas J. R. & Bennetzen J.L.** (1995) *Mul-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA*. Genetics **140**: 315-324
- Dalbó M.A., Ye G.N., Weeden N.F., Steinkellner H., Sefc K.M., & B.I.** (2000) *Gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map*. Genome **43(2)**: 333-340.
- Dalmaso G., Dell' Olio G., Malfatto P., Cosmo I., Polsinelli M., Sardi F., Prospero V., Pirovano A., Bruni B., Breviglieri N., Casini E., Del Gaudio S., Giusto D., Panzera C., Mazzei A., & Zappalá A.** (1964) *Malvasie*. In: *Principali vitigni ad uva da vino coltivati in Italia*. M.A.F., Roma
- Dangl G.S., Mendum M.L., Prins B.P., Walker M.A., Meredith C.P., & Simon C.J.** (2001) *Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: a tool for managing a grape germplasm collection*. Genome **44**: 432-438
- Deininger P.L., & Batzer M.A.** (1999) *Alu repeats and human disease*. Mol Genet Metab **67**: 183-193
- De Andres M.T., Cabezas J.A., Cervera M-T, Borrego J., Martinez-Zapater J.M., & Jouve N.** (2007) *Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections*. Am J Enol Vitic **58**:75-86

- Dewannieux M., Esnault C., & Heidmann T.** (2003) *LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences*. *Nat Gen* **35**:41-48
- Di Gaspero G., Cipriani G., Marrazzo M.T., Andretta D., Castro M.J.P., Peterlunger E., & Testolin R.** (2005) *Isolation of (AC)_n-microsatellites in Vitis vinifera L and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection*. *Mol Breeding* **15**:11-20
- Dobrowolski M.P., Tommerup I.C., & O'Brien P.A.** (1998) *Microsatellites in the mitochondrial genome of Phytophthora cinnamomi failed to provide highly polymorphic markers for population genetics*. *FEMS Microbiol Lett* **163(2)**: 243-8
- Dorer D.R., & Henikoff S.** (1994) *Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in Drosophila*. *Cell* **77**: 993-1002
- Drabek J., Stavek J., Jaluvkova M., Jurcek T., & Frebort I.** (2008) *Quantification of DNA during winemaking by fluorimetry and Vitis vinifera L-specific quantitative PCR*. *Europ Food Res Techn* **226**:491-497
- Edwards A., Hammond H.A., Jin L., Caskey C.T., & Chakraborty R.** (1992) *Genetic variation at five trimetric and tetrametric tandem repeat loci in four human population groups*. *Genomics* **12**: 241-253
- Evgen' en M.B., Yenikolopov G.N., Peunova N.I., & Ilyin Y.V.** (1982) *Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of Drosophila*. *Chromosoma* **85**: 375-386
- Fanizza G., Chaabane R., Lamaj F., Ricciardi L., & Resta P.** (2003) *AFLP analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (Vitis vinifera)*. *Theor Appl Genet.* **107(6)**: 1043-7
- Fanti L., Dorer D.R., Berloco M., Henikoff S. & Pimpinelli S.** (1998) *Heterochromatin protein 1 binds transgene arrays*. *Chromosoma* **107**: 286-292
- Faria M.A., Magalhaes R., Ferreira M.A., Meredith X.P., & Monteiro F.F.** (2000) *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). *J Agric Food Chem* **48**:1096-1100
- Finnegan D.J.** (1989) *Eukaryotic transposable elements and genome evolution*. *Trends Genet* **5**: 103-107
- Fitzsimmons N.N., Moritz C., & Moore S.S.** (1995) *Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution*. *Mol Biol Evol* **12(3)**: 432-40

- Flavell A.J., Dunbar E., Anderson R., Pearce S. R., Hartley R., & Kumar A.** (1992) *Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogenous in higher plants*. *Nucleic Acids Res* **20**: 3639-3644
- Fondon J.W. 3rd, Mele G.M., Brezinschek R.I., Cummings D., Pande A., Wren J., O'Brien K.M., Kupfer K.C., Wei M.H., Lerman M., Minna J.D., & Garner H.R.** (1998) *Computerized polymorphic marker identification: experimental validation and a predicted human polymorphism catalog*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95(13)**: 7514-9
- Franks T., Botta R., & Thomas M.R.** (2002) *Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement*. *Theor Appl Genet* **104**:192-199
- Garber K., Bilic I., Pusch O., Tohme J., Bachmair A., Schweizer D. & Jantsch V.** (1999) *The Tpv2 family of retrotransposons of Phaseolus vulgaris: structure, intergration characteristics, and use for genotype classification*. *Plant Mol Biol* **39**: 797-807
- Garcia-Beneytez E., Moreno-Arribas M.V., Borrego J., Polo M.C., & Ibanez J.** (2002) *Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of Vitis vinifera L using microsatellite markers*. *J Agric Food Chem* **50**:6090-6096
- Garza J.C., Slatkin M., & Freimer N.B.** (1995) *Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size*. *Mol Biol Evol* **12(4)**: 594-603
- Glockner G., Szafranski K., Winckler T., Dingermann T., Quail M. A., Cox E., Eichinger L., Noegel A.A. & Rosenthal A.** (2001) *The complex repeats of Dictyostelium discoideum*. *Genom Res* **11**: 585-594
- Gogorcena Y., Arulsekhar S., Dandekar A. M., & Parfitt D. E.** (1993) *Molecular markers for grape characterization*. *Vitis* **32**: 183-185
- Goldstein D.B., & Clark A.G.** (1995) *Microsatellite variation in North American populations of Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **23(19)**: 3882-6
- Goldstein D.B., & Pollock D.D.** (1997) *Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference*. *J Hered* **88**: 335-342
- Golenberg E.M., Giannasi D.E., Clegg M. T., Smiley C.J., Durbin M., Henderson D., & Zurawski G.** (1990) *Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species*. *Nature* **344(6267)**: 656-8

- Goto-Yamamoto N., Mouri H., Azumi M., & Edwards K.J.** (2006) *Development of grape microsatellite markers and microsatellite analysis including oriental cultivars.* Am J Enol Vitic **57**:105-108
- Grandbastien M.A.** (1992) Retroelements in higher plants. Trends Genet. **8(3)**:103-108.
- Grassi F., Labra M., Imazio S., Spada A., Sgorbati S., Scienza A., & Sala F.** (2003) *Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis.* Theor Appl Genet **107**:1315-1320
- Gregory T.R.** (2001) *Coincidence, co-evolution, or causation? DNA content, cell size and the C-value enigma.* Biol Rev Camb Philos Soc **76**: 65-101
- Gregory T.R. & Hebert P.D.** (1999) *The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences.* Genome Res **9**: 317-324
- Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma P.C., & Ramesh B.** (1996) *Microsatellites in plants: A new class of molecular markers.* Current Science **70**: 45-54
- Harrington S.** (2000) *"A survey of genetic diversity of eight AA genome species of Oryza using microsatellite markers"*. MS thesis, Cornell University, Ithaca, NY
- Heikkinen E., Launonen V., Muller E. & Bachmann L.** (1995) *The pvB370 BamIII satellite DNA family of the Drosophila virilis group and its evolutionary relation to mobile dispersed genetic pDv elements.* J Mol Evol **41**: 604-614
- Henikoff S., Greene E.A., Pietrokovski S., Bork P., Attwood T.K. & Hood L.** (1997) *Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras.* Science **278**: 609-614
- Imazio S., Labra M., Grassi F., Scienza A., & Failla O.** (2006) *Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine.* Genet Res Crop Evol **53**:1003-1011
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., et al.** (2007) *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla.* Nature **449**:463-465
- John B.** (1988) *The biology of heterochromatin.* pp. 1-128 in Heterochromatin, Molecular and structural Aspects, edited by Verma S. R. Cambridge University Press, Cambridge UK
- Jurka J., & Pethiyagoda C.** (1995) *Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis.* J Mol Evol **40(2)**: 120-6
- Kajikawa M. & Okada N.** (2002) *LINES mobilize SINES in the eel through a shared 3' sequence.* Cell **111**:433-444

- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., & Schulman A.** (1999) *IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques*. *Theor Appl Genet* **98**: 704-711
- Kapitonov V.V., & Jurka J.** (2001) *Rolling-circle transposons in eukaryotes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8714-8719
- Kapitonov V.V., & Jurka J.** (1999) *Molecular paleontology of transposable elements from *Arabidopsis thaliana**. *Genetica* **107**: 27-37
- Kapitonov V.V., Holmquist G.P. & Jurka J.** (1998) *L1 repeat is a basic unit of heterochromatin satellites in Cetaceans*. *Mol Biol Evol* **15**: 611-612
- Katsiotis A., Schmidt T., & Heslop-Harrison J.S.** (1996) *Chromosomal and genomic organization of Ty1-copia-like retrotransposon sequences in the genus *Avena**. *Genome* **39**: 410-417
- Kazazian H.H.Jr.** (1998) *Mobile elements and disease*. *Curr Opin Genet Dev* **8**:343-350
- Kidwell M.G., & Lisch D.R.** (2000) *Transposable elements and host genome evolution*. *Trends Ecol Evol.* **15(3)**:95-99
- Kidwell M.G. & Lisch D.R.** (2001) *Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution*. *Evolution* **55**: 1-24
- Kumar A., & Bennetzen J.L.** (1999) *Plant retrotransposons*. *Annu Rev Genet.* **33**:479-532
- Le Q.H., Wright S., Yu Z. & Bureau T.** (2000) *Transposon diversity in *Arabidopsis thaliana**. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7376-7381
- Lefort F., & Douglas G.C.** (1999) *An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus**. *Ann Forest Sci* **56**:259-263
- Lefort F., Poisse E., Kyvelos C. J., & Roubelakis-Angelakis K.A.** (2001) *Genetic relationships within the Greek cultivars of *Vitis vinifera* assessed by nuclear microsatellite markers*. The Greek Vitis Database www.biology.uoc.gr/gvd
- Lefort F., & Roubelakis-Angelakis K.A.** (2001) *Genetic Comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by Nuclear Microsatellite Profiling*. *Am J Enol Vitic* **52(2)**: 101-108

- Lefort F., Kyvelos C. J., Zervou M., Edwards K. J., & Roubelakis-Angelakis K. A.** (2002) *Characterization of new microsatellite loci from Vitis vinifera and their conservation in some Vitis species and hybrids*. *Molecular Ecology Notes* **2**(1): 20–21
- Levis R.W., Ganesan R., Houtchens K., Tolar L.A. & Sheen F.M.** (1993) *Transposons in place of telomeric repeats at a Drosophila telomere*. *Cell* **75**: 1083-1093
- Lim J.K. & Simmons M.J.** (1994) *Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **16**: 269-275
- Lodhi M.A., Ye G.N., Weeden N.F., & Reisch B.I.** (1994) *A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species*. *Plant Mol Biol Rep* **12**:6-13
- Lodhi M.A., Weeden N.F., & Reich B.I.** (1997) *Characterization of RAPD markers in Vitis*. *Vitis* **36**: 133-140
- Malik H.S., Henikoff S. & Eickbush T.H.** (2000) *Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses*. *Genome Res* **10**: 1307-1318
- Manen J-F, Bouby L., Dalnoki O., Marival P., Turgay M., & Schlumbaum A.** (2003) *Microsatellites from archaeological Vitis vinifera seeds allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars*. *J Archaeol Sci* **30**:721-729
- Manninen I., & Schulman A.H.** (1993) *BARE-1, a copia-like retroelement in barley (Hordeum vulgare L.)*. *Plant Mol Biol* **22**: 829-846
- McClure M. A.** (1999) *The retroid agents: disease, function, and evolution*. Pp. 163-195 in *Origin and Evolution of Viruses*, edited by E. Domingo, R. Webster & J. Holland. Academic Press, London
- Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.F., & Decroocq S.** (2005) *Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (Vitis vinifera L) suitable for multiplex PCR*. *Mol Breeding* **15**:349-366
- Miller W. J., Nagel A., Bachmann J. & Bachmann L.** (2000) *Evolutionary Dynamics of the SGM transposon family in the Drosophila obscura species group*. *Mol Biol Evol* **17**: 1597-1609
- Molon G.** (1906) *Ampelografia*. Hoepli U, Milano, Vol II
- Moncada P., Martinez C. P., Borrero J., Chatel M., Gauch H.Jr., Guimaraes E., Tohme J., & McCouch S.R.** (2001) *Quantitative trait loci for yield and yield*

components in an *Oryza sativa* x *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment. *Theor Appl Genet* **102**: 41-52

Moncada X., Pelsy F., Merdinoglu D., & Hinrichsen P. (2006) *Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers.* *Genome* **49**:1459-1472

Nadir E., Margalit H., Gallily T. & Ben-Sasson S.A. (1996) *Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications.* *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6470-6475

Nakamura S., Haraguchi K., Mitani N., & Ohtsubo K. (2007) *Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L) cultivar.* *J Agric Food Chem* **55**:10388-10395

Nei M. (1987) "*Molecular Evolutionary Genetics*". Columbia Univ Press, New York

Nicosia G., & Barbara G. (1959) *Il Malvasia di Lipari.* In: Luigi Scialpi (ed) *Estr da 'Vini d'Italia'*. Roma

Ohta T., & Kimura M. (1973) *A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population.* *Genet Res* **22**: 201-204

Okazaki S., Ishikawa H. & Fujiwara H. (1995) *Structural analysis of TRASI, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, Bombyx mori.* *Mol Cell Biol* **15**: 4545-4552

Olufowote J.O., Xu Y., Chen X., Park W.D., Beachell H.M., Dilday R.H., Goto M., & McCouch S.R. (1997) *Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RLFP markers.* *Genome* **38**: 1170-1176

Panaud O., Chen X., & McCouch S.R. (1996) *Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.).* *Mol Gen Genet* **252**: 597-607

Pearce S.R., Harrison G., Heslop-Harrison J.S., Flavell A.J., & Kumar A. (1997) *Characterization and genomic organization of Ty1-copia group retrotransposons in rye (*Secale cereale*).* *Genome* **40**: 1-9

Pearce S. R., Pich U., Harrison G., Flavell A.J., Heslop-Harrison J.S., Schubert I., & Kumar A. (1996) *The Ty1-copia group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin.* *Chrom Res* **4**: 357-364

- Pelsy F. & Merdinoglu D.** (2002) *Complete sequence of Tvv1, a family of Ty1 copia-like retrotransposons of Vitis vinifera L., reconstituted by chromosome walking.* Theoretical and Applied Genetics **105**: 614-621.
- Petrov D.A.** (2001) *Evolution of genome size: new approaches to an old problem.* Trends Genet **17**: 23-28
- Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L., Dimitri P., Bonaccorsi S., Marchetti E., Caizzi R., Caggese C. & Gatti M.** (1995) *Transposable elements are stable structural components of Drosophila melanogaster heterochromatin.* Proc Natl Acad Sci USA **92**: 3804- 3808
- Pollock D.D., Bergman A., Feldman M.W., & Goldstein D.B.** (1998) *Microsatellite behavior with range constraints: parameter estimation and improved distances for use in phylogenetic reconstruction.* Theor Popul Biol **53**(3): 256-71
- Powell W., Machray G. C., & Provan J.** (1996) *Polymorphism revealed by simple sequence repeats.* Trends in Plant Science **7**: 215-222
- Powell W., Morgante M., Andre C., McNicol J. W., Machray G. C., Doyle J.J., Tingey S.V., & Rafalski J.A.** (1995) *Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome.* Curr Biol **5**(9): 1023-9
- Powell W., Morgante M., McDevitt R., Vendramin G. G., & Rafalski J.A.** (1995) *Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines.* Proc Natl Acad Sci USA **92**(17): 7759-63
- Pritchard J.K., & Feldman M.W.** (1996) *Genetic data and the African origin of humans.* Science **274**(5292): 1548-9
- Provan J., Powell W., & Hollingsworth P. M.** (2001) *Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution.* Trends Ecol Evol **16**(3): 142-147
- Ramsay L., Macaulay M., Cardle L., Morgante M., degli Ivanissevich S., Maestri E., Powell W., & Waugh R.** (1999) *Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley.* Plant J **17**(4): 415-25
- Ray D., Walker J., & Batzer M.** (2007) *Mobile element-based forensic genomics.* Mut Res **616**:24-33
- Rico C., Rico I., & Hewitt G.** (1996) *470-million years of conservation of microsatellite loci among fish species.* Proc Roy Soc London B **263**: 549-557

- Rosa Arroyo-Garcia, Lefort F., Marva Teresa de Andrés, Ibanez J., Borrego J., Jouve N., Cabello F., & José Miguel Martinez-Zapater** (2002) *Chloroplast microsatellite polymorphisms in Vitis species*. NRC Research Press, Genome **45**: 1142-1149
- Rossetto M., McNally J., & Henry R. J.** (2002) *Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae*. Theor Appl Genet **104**(1): 61-6
- Roy A. M., Carroll M. L., Nguyen S. V., Salem A. H., Oldridge M., Wilkie A. O., Batzer M., A. & Deininger P. L.** (2000) *Potential gene conversion and source genes for recently integrated Alu elements*. Genome Res **10**: 1485-1495
- SanMiguel P., Gaut B. S., Tikhonov A., Nakajima Y. & Bennetzen J. L.** (1998) *The paleontology of intergene retrotransposons of maize*. Natl Genet **20**: 43-45
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y. K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P. S., Edwards K. J., Lee M., Avramova Z. & Bennetzen** (1996) *Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome*. Science **274**: 765-768
- Savazzini F., Martinelli L.** (2006) *DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification*. Anal Chim Acta **563**:274-282
- Sefc K. M., Lopes M. S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K. A., Ibanez J., Pejic I., Wagner H. W., Glossl J., & Steinkellner H.** (2000) *Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars*. Theoretical and Applied Genetics **100**(3/4): 498-505
- Sefc K.M., Regner F., Turetschek E., Glössl J., & Steinkellner H.** (1999) *Identification of microsatellite sequences in Vitis riparia and their applicability for genotyping of different Vitis species*. Genome **42**:367-373
- Sefc K. M., Regner F., Glossl J., & Steinkellner H.** (1998) *Monitoring der genetischen Variabilität und Pedigree Studien bei Weinreben*. Bericht über die 49. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, pp 71-73
- Schlötterer C., & Tautz D.** (1992) *Slippage synthesis of simple sequence DNA*. Nucleic Acids Res **20**: 211-216

- Sensi E., Vignani R., Rohde W., & Biricolti S.** (1996) *Characterization of genetic biodiversity with Vitis vinifera L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology.* *Vitis* **35**: 183-188
- Shimamura M., Yasue H., Ohshima K., Abe H., Kato H., Kishiro T., Goto M., Munechika I., & Okada N.** (1997) *Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates.* *Nature* **388**: 666-670
- Shriver M. D., Jin L., Boerwinkle E., Deka R., Ferrell R. E., & Chakraborty R.** (1995) *A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci.* *Mol Biol Evol* **12**(5):914-20
- Silvestroni O., Di Pietro D., Intrieri X., Vignani R., Filippetti I., Del Casino X., Scali M., & Cresti M.** (1997) *Detection of genetic diversity among clones of cv Fortana (Vitis vinifera L) by microsatellite DNA polymorphism analysis.* *Vitis* **36**:147-150
- Siret R., Boursiquot J.M., Merle M.H., Cabanis J.C., & This P.** (2000) *Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (Vitis vinifera L) residual DNA in must and wine using microsatellite markers.* *J Agric Food Chem* **48**: 5035-5040
- Sneath P.H.A., & Sokal R.R.** (1973) *Numerical taxonomy.* WH Freeman and Company, San Francisco
- Steinmann M. & Steinmann S.** (1998) *Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of Drosophila miranda a model for sex chromosome evolution.* *Genetica* **103**: 409-420
- Suoniemi A., Schmidt D., & Schulman A.H.** (1997) *BARE-1 insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites.* *Genetica* **100**: 219-230
- Suoniemi A., Anamthawat-Jonsson K., Arna T., & Schulman A.H.,** (1996) *Retrotransposon BARE-1 is a major, dispersed component of the barley (Hordeum vulgare L.) genome.* *Plant Mol Biol* **30**: 1321-1329
- Suoniemi A., Tanskanen J., Pentikäinen O., Johnson M. S., & Schulman A.H.** (1998) *The core domain of retrotransposon integrase in Hordeum: Predicted structure and evolution.* *Mol Biol Evol* **15**: 1135-1144
- Tautz D.** (1993) *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences.* In 'DNA Fingerprinting: State of the Science' (S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen, and A. J. Jeffreys, Eds.), pp. 21-28, Birkhäuser, Basel

- Techera A.G., Jubany S., De Leon I.P., Boido E., Dellacassa E., Carrau F.M., Hinrichsen P., & Gaggero C.** (2004) *Molecular diversity within clones of cv Tannat (Vitis vinifera)*. *Vitis* **43**:179-185
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., & McCouch S. R.** (2001) *Computational and Experimental analysis of Microsatellites in Rice (Oryza sativa L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential*. *Genome Research* **11**: 1441-1452
- Temnykh S., Park W.D., Ayers N., Cartinhour S., Hauck N., Lipovich L., Cho Y.G., Ishii T., & McCouch S.R.** (2000) *Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (Oryza sativa L.)*. *Theor Appl Genet* **100**: 697-712
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith X.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., & Maul E.** (2004) *Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars*. *Theor Appl Genet* **109**:1148-1158
- This P., Lacombe T., & Thomas M.R.** (2006) *Historical origins and genetic diversity of wine grapes*. *Trends Genetics* **22**:511-519
- Thomas M. S., Cain P., & Scott N. S.** (1994) *DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness*. *Plant Mol Biol* **25**: 937-949
- Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P., & Scott N.S.** (1993) *Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification*. *Theor Appl Genet* **86**:173-180
- Tschiersch B., Hofmann A., Krauss V., Dorn R., Korge G. & Reuter G.** (1994) *The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes*. *EMBO J* **13**: 3822-3831
- Tu Z.** (2001) *Maque, a family of extremely short interspersed repetitive elements: characterization, possible mechanism of transposition, and evolutionary implications*. *Gene* **263**: 247-253
- Turcotte K., Srinivasan S. & Bureau T.** (2001) *Survey of transposable elements from rice genomic sequences*. *Plant J* **25**: 169-179

- Van der Lee T., De Witte I., Drenth A., Alfonso C., & Govers F.** (1997) *AFLP Linkage Map of the Oomycete Phytophthora infestans*. Fungal Genet Biol **21**(3):278-91
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., & Morgante M.** (1996) *A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae*. Molecular Ecology, **5**: 111-114
- Velasco R., Zharkikh A., Troglio M., et al.** (2007) *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*. PLoS ONE **2**(12):1326
- Viala P., Vermorel V.** (1909) *Ampélographie*. Masson et C, Paris, Tome VII
- Vignani R., Bowers J.E., & Meredith C.P.** (1996) *Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of Vitis vinifera 'Sangiovese'*. Sci Hort **65**:163-169
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Beijans M., van der Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., & Zabeau M.** (1995) *AFLP : A new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Res **21**: 4407-4414
- Vouillamoz J, Maigre D, & CP Meredith** (2003) *Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of Vitis vinifera L 'Cornalin du Valais'*. Theor Appl Genet **107**:448-454
- Vouillamoz J.F., & Grando M.S.** (2006) *Genealogy of wine grape cultivars: Pinot is related to Syrah*. Heredity **97**:102-110
- Vouillamoz J.F., Schneider A., & Grando M.S.** (2007) *Microsatellite analysis of Alpine grape cultivars (Vitis vinifera L): alleged descendants of Pliny the Elder's Raetica are genetically related*. Genet Res Crop Evol **54**:1095-1104
- Vouillamoz J.F., Maigre D., & Meredith C.P.** (2004) *Identity and parentage of two alpine grape cultivars from Switzerland (Vitis vinifera L Lafnetscha and Himbertscha)*. Vitis **43**: 81-87
- Voytas D. F., Cummings M. P., Konieczny A. K., Ausubel F. M., & Rodermel S. R.** (1992) *Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants*. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 7124-7128
- Waugh R., McLean K., Flavell A. J., Pearce S. R., Kumar A., Thomas BBT, & Powell W.** (1997) *Genetic distribution of BARE-1 like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP)*. Mol Gen Genet **253**: 687-694
- Weber J. L., & Wong C.** (1993) *Mutation of human short tandem repeats*. Human Mol Gen **2**: 1123-1128

- Weising K., & Gardner R. C.** (1999) *A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms.* *Genome* **42(1)**: 9-19
- Whisson S. C., van der Lee T., Bryan G. J., Waugh R., Govers F., & Birch P. R.** (2001) *Physical mapping across an avirulence locus of *Phytophthora infestans* using a highly representative, large-insert bacterial artificial chromosome library.* *Mol Genet Genomics.* **266(2)**: 289-95
- Wilder J. & Hollocher H.** (2001) *Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans.* *Mol Biol Evol* **18**: 384-392
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., & Tingey S. V.** (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.* *Nucleic Acids Res.* **18(22)**:6531-5.
- Wolf T.** (1996) *Untersuchungen an Holz zur Sortenidentifikation von Rebunterlagssorten mit Hilfe der RAPD-Methode.* Thesis, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany
- Wu K. S. & Tanksley S. D.** (1993) *Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice.* *Mol Gen Genet* **241**: 225-235
- Xiamping Q., Lu J., & Lamikarna O.** (1996) *Genetic diversity in Muscadine and American bunch grapes based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.* *J Am Soc Hort Sci* **121**: 1020-1023
- Xiao J., Li J., Grandillo S., Ahn S. N., Yuan L., Tanksley S. D., & McCouch S. R.** (1998) *Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*.* *Genetics* **150**: 899-909
- Xing J., Witherspoon D., Ray D., Batzer M., and Jorde L.** (2007) *Mobile DNA Elements in Primate and Human Evolution.* *Yearbook of Physical Anthropology* **50**:2-19
- Yang G. P., Saghai Maroof M. A., Xu C. G., Zhang Q., & Biyashev R. M.** (1994) *Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice.* *Mol Gen Genet* **245**: 187-194
- Yu Z., Wright S. I., & Bureau T. E.** (2000) *Mutator-like elements in *Arabidopsis Thaliana*. Structure, diversity and evolution.* *Genetics* **156**: 2019-2031
- Zelenstova E. S., Vashakidze R. P. Kraev A. S. & Evgen'ev M. B.** (1986) *Dispersed repeats in *Drosophila virilis*: elements mobilized by interspecific hybridization.* *Chromosoma* **93**: 469- 476

- Zhang Q., Arbuckle J. & Wessler S. R.** (2000) *Recent, extensive and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable elements family Heartbreaker into genic regions of maize.* Proc Natl Sci USA **97**: 1160-1165
- Zietkiewicz E., Rafalski A., & Labuda D.** (1989) *Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.* Genomics **20**: 176-183
- Zou J. H., Pan X. B., Chen Z. X., Xu J. Y., Lu J. F., Zhai W. X., & Zhu L. H.** (2000) *Mapping quantitative trait loci controlling sheat blight resistance into rice cultivars (Oryza sativa L.).* Theor Appl Genet **101**: 569-573
- Zulini L., Fabro E., & Peterlunger E.** (2005) *Characterisation of the grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers.* Vitis **44**:35-38

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 18. Πιθανοί γονεϊκοί συνδυασμοί ατόμων-απογόνων από τη σύγκριση 601 ποικιλιών από διαφορετικές χώρες βασιζόμενοι στην συγκυρίαρχη Μενδαλιανή κληρονομικότητα των μικροδορυφορικών τόπων, που παρουσιάζεται ως ‘απόγονος=γονέας 1 x γονέας 2’

GRMalvazia aromatica = BULVeren x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 43 x 560)
GRMalvazia aromatica = BULVeren x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 43 x 571)
GRMalvazia aromatica = BULChernomorski Eleksir x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 72 x 560)
GRMalvazia aromatica = BULChernomorski Eleksir x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 72 x 571)
GRMalvazia aromatica = RUSLesnoi belyi maraginski x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 114 x 560)
GRMalvazia aromatica = RUSLesnoi belyi maraginski x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 114 x 571)
GRMalvazia aromatica = CRNasurla (77 cr) x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 178 x 571)
GRMalvazia aromatica = MOLAlimshak x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 201 x 560)
GRMalvazia aromatica = MOLAlimshak x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 201 x 571)
GRMalvazia aromatica = GRAsprokoritho x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 255 x 560)
GRMalvazia aromatica = GRAsprokoritho x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 255 x 571)
GRMalvazia aromatica = GRKachpetsi x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 303 x 560)
GRMalvazia aromatica = GRKachpetsi x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 303 x 571)
GRMalvazia aromatica = MLVMalvasia di Schierano x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 558 x 560)
GRMalvazia aromatica = MLVMalvasia di Schierano x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 558 x 571)
GRMalvazia aromatica = CRNasurla (77 cr) x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 178 x 560)
GRMalvazia aromatica = GRTsougiannides x MLVMalvasia grigiorosa	(363 = 495 x 560)
GRMalvazia aromatica = GRTsougiannides x MLVMalvasia aromatica Crete	(363 = 495 x 571)
GRMalvazia aromatica = GRTsougiannides x MLVMalvasia di Schierano	(363 = 495 x 558)
MLVMalvasia aromatica Crete = GRTsougiannides x MLVMalvasia di Schierano	(571 = 495 x 558)
MLVMalvasia aromatica Crete = GRMalvazia aromatica x MLVMalvasia di Schierano	(571 = 363 x 558)
MLVMalvasia grigiorosa = GRTsougiannides x MLVMalvasia di Schierano	(560 = 495 x 558)
MLVMalvasia grigiorosa = GRMalvazia aromatica x MLVMalvasia di Schierano	(560 = 363 x 558)
MLVMalvasia nera di Lecce = BULZarchin x GRPsilomavro Kalavryton	(557 = 46 x 446)
MLVMalvasia nera di Lecce = FRChasselas CB60 x GRChanoum memesi	(557 = 79 x 271)
MLVMalvasia del Lacio = GRPetrachladi x MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy	(561 = 432 x 563)

MLVMalvasia Rei = ALKanelles (5al)* x ALTagje e kuqe (7al)	(567 = 232 x 234)
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = RUSVaryoshkin x CHARvine	(563 = 122 x 137)
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = RUSVaryoshkin x GRSeftka	(563 = 122 x 470)
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = RUSVaryoshkin x MLVMalvasia di Candia Italy (563=120 x570)	
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = GRSeftka x MLVMalvasia di Candia Italy	(563 = 470 x 570)
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = GRVilana x MLVMalvasia di Candia Italy	(563 = 502 x 570)
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = CHHumagne Blanc x MLVMalvasia di CandiaItaly (563=144x570)	
MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy = MLVMalvasia del Lacio x MLVMalvasia di Candia Italy (563 = 561 x 570)	
MLVMalvasia di Candia Italy = CHARvine x MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy	(570 = 137 x 563)
MLVMalvasia di Candia Italy = CRAkseit kara (80 cr) x MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy (570 = 180 x 563)	
MLVMalvasia di Candia Italy = GRSeftka x MLVMalvasia di Candia Aromatica Italy	(570 = 470 x 563)
MLVMalvasia di Candia Crete = GRMalvazia di Candia x MLVDafnia 243	(572 = 365 x 578)
GRMalvazia di Candia = BULVita x MLVMalvasia di Candia Crete	(365 = 44 x 572)
GRMalvazia di Candia = CRCornichon crymski (75 cr) x MLVMalvasia di Candia Crete	(365 = 177 x 572)
GRMalvazia di Candia = ALKorith (3 al)* x MLVMalvasia di Candia Crete	(365 = 230 x 572)
GRMalvazia istriana = CRNasurla (77 cr) x MLVMalvasia Istriana Italy	(366 = 178 x 565)
GRMalvazia istriana = CRNasurla (77 cr) x MLVMalvasia Istria Italy	(366 = 178 x 566)
GRMalvazia istriana = CRNasurla (77 cr) x MLVMalvasia Bela	(366 = 178 x 568)
GRMalvazia istriana = CRNasurla (77 cr) x MLVMalvasia Istriana Crete	(366 = 178 x 574)
GRMalvazia istriana = ALKanelles (5al)* x MLVMalvasia Istriana Italy	(366 = 232 x 565)
GRMalvazia istriana = ALKanelles (5al)* x MLVMalvasia Istria Italy	(366 = 232 x 566)
GRMalvazia istriana = ALKanelles (5al)* x MLVMalvasia Bela	(366 = 232 x 568)
GRMalvazia istriana = ALKanelles (5al)* x MLVMalvasia Istriana Crete	(366 = 232 x 574)
GRMalvazia istriana = GRZoumiatiko x MLVMalvasia Istriana Italy	(366 = 509 x 565)
GRMalvazia istriana = GRZoumiatiko x MLVMalvasia Istria Italy	(366 = 509 x 566)
GRMalvazia istriana = GRZoumiatiko x MLVMalvasia Bela	(366 = 509 x 568)

GRMalvazia istriana = GRZoumiatiko x MLVMalvasia Istriana Crete	(366 = 509 x 574)
GRMalvazia istriana = BULDimyat x MLVMalvasia Istriana Italy	(366 = 12 x 565)
GRMalvazia istriana = BULDimyat x MLVMalvasia Istria Italy	(366 = 12 x 566)
GRMalvazia istriana = BULDimyat x MLVMalvasia Bela	(366 = 12 x 568)
GRMalvazia istriana = BULDimyat x MLVMalvasia Istriana Crete	(366 = 12 x 574)
GRMalvazia istriana = BULDimyat cl.4/24 x MLVMalvasia	(366 = 13 x 565)
GRMalvazia istriana = BULDimyat cl.4/24 x MLVMalvasia	(366 = 13 x 566)
GRMalvazia istriana = BULDimyat cl.4/24x MLVMalvasia	(366 = 13 x 568)
GRMalvazia istriana = BULDimyat cl.4/24 x MLVMalvasia	(366 = 13 x 574)
GRMalvazia istriana = BULDiana x MLVMalvasia	(366 = 12 x 565)
GRMalvazia istriana = BULDiana x MLVMalvasia	(366 = 21 x 566)
GRMalvazia istriana = BULDiana x MLVMalvasia	(366 = 21 x 568)
GRMalvazia istriana = BULDiana x MLVMalvasia	(366 = 12 x 574)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRAthiri x GRGoustolidi	(564 = 259 x 300)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRAthiri x GRRompola	(564 = 259 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRAthiri x GRRompola	(564 = 259 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRBampa-Hasan x GRGoustolidi	(564 = 262 x 300)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRBampa-Hasan x GRRompola	(564 = 262 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRBampa-Hasan x GRRompola	(564 = 262 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRKarvouniaris	(564 = 300 x 309)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRKarydato mavro	(564 = 300 x 310)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRKypreiko	(564 = 300 x 347)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRLadikino	(564 = 300 x 349)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRLagorthi	(564 = 300 x 350)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRMalvazia del Chianti	(564 = 300 x 364)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRPavlos	(564 = 300 x 428)

MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRPsevdosyriko	(564 = 300 x 445)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRRomeiko	(564 = 300 x 459)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRSatino	(564 = 300 x 467)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRSklava	(564 = 300 x 475)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x GRTsardana	(564 = 300 x 494)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x MLVMalvasia del Chianti Italy	(564 = 300 x 556)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRGoustolidi x MLVMalvasia del Chianti Crete	(564 = 300 x 573)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRKarvouniaris x GRRompola	(564 = 309 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRKarvouniaris x GRRompola	(564 = 309 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRKarydato mavro x GRRompola	(564 = 310 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRLadikino x GRRompola	(564 = 349 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRLadikino x GRRompola	(564 = 349 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRLagorthi x GRRompola	(564 = 350 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRLagorthi x GRRompola	(564 = 350 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRPavlos x GRRompola	(564 = 428 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRPavlos x GRRompola	(564 = 428 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRomeiko x GRRompola	(564 = 459 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRomeiko x GRRompola	(564 = 459 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x GRSatino	(564 = 461 x 467)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x GRSklava	(564 = 461 x 475)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x GRTsardana	(564 = 461 x 494)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x MLVMalvasia del Chianti Italy	(564 = 461 x 556)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x MLVMalvasia del Chianti Crete	(564 = 461 x 573)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x GRSatino	(564 = 462 x 467)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x GRSklava	(564 = 462 x 475)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x GRTsardana	(564 = 462 x 494)

MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x MLVMalvasia del Chianti Italy	(564 = 462 x 556)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRMalvazia del Chianti x GRRompola	(564 = 364 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRMalvazia del Chianti x GRRompola	(564 = 364 x 462)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRKypreiko x GRRompola	(564 = 347 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRPsevdosyriko x GRRompola	(564 = 445 x 461)
MLVMalvasia nera di Brindisi = GRRompola x MLVMalvasia del Chianti Crete	(564 = 462 x 573)
GRAsprokoritho = GRKolokythas lefkos x GRMalvazia aromatica	(255 = 321 x 363)
GRAsprokoritho = GRKolokythas lefkos x MLVMalvasia di Casorzo	(255 = 321 x 559)
GRAsprokoritho = GRKolokythas lefkos x MLVMalvasia grigiorosa	(255 = 321 x 560)
GRAsprokoritho = GRKolokythas lefkos x MLVMalvasia aromatica Crete	(255 = 321 x 571)
GRAsprokoritho = GRKolokythia x GRMalvazia aromatica	(255 = 322 x 363)
GRAsprokoritho = GRKolokythia x MLVMalvasia di Casorzo	(255 = 322 x 559)
GRAsprokoritho = GRKolokythia x MLVMalvasia grigiorosa	(255 = 322 x 560)
GRAsprokoritho = GRKolokythia x MLVMalvasia aromatica Crete	(255 = 322 x 571)
GRAsprokoritho = GRKorithi lefko x GRMalvazia aromatica	(255 = 329 x 363)
GRAsprokoritho = GRKorithi lefko x MLVMalvasia di Casorzo	(255 = 329 x 559)
GRAsprokoritho = GRKorithi lefko x MLVMalvasia grigiorosa	(255 = 329 x 560)
GRAsprokoritho = GRKorithi lefko x MLVMalvasia aromatica Crete	(255 = 329 x 571)
GRAsprokoritho = GRAnatolitiko aspro x MLVMalvasia di Casorzo	(255 = 254 x 559)
GRAsprokoritho = GRRoditis lefkos / Alepou x MLVMalvasia di Casorzo	(255 = 458 x 559)
GRAsprokoritho = GRRoditis lefkos / Alepou x MLVMalvasia grigiorosa	(255 = 458 x 560)
GRAsprokoritho = GRRoditis lefkos / Alepou x MLVMalvasia aromatica Crete	(255 = 458 x 571)
GRAetonychi kokkino = GRKoutsoumpeli lefko x GRMalvazia di Candia	(242 = 339 x 365)
GRAetonychi kokkino = GRKoutsoumpeli lefko x MLVMalvasia di Candia Crete	(242 = 339 x 572)
GRAetonychi kokkino = GRChakiki oporiko x MLVMalvasia di Candia Crete	(242 = 270 x 572)
GRAetonychi kokkino = GRAkominato x MLVMalvasia di Candia Crete	(242 = 252 x 572)

GRAetonychi kokkino = GRAkominato x GRMalvasia di Candia	(242 = 252 x 365)
GRAetonychi kokkino = CHHumagne Blanc x MLVMalvasia di Candia Crete	(242 = 144 x 572)
GRMoschato Kerkyras = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Schierano	(395 = 95 x 558)
GRMoschato Kerkyras = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Schierano	(396 = 95 x 558)
GRMoschato Kerkyras = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Casorzo	(395 = 95 x 559)
GRMoschato Kerkyras = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Casorzo	(396 = 95 x 559)
GRMoschato Kerkyras = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(395 = 99 x 558)
GRMoschato Kerkyras = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(396 = 99 x 558)
GRMoschato Mazas = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Schierano	(398 = 95 x 558)
GRMoschato Mazas = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Schierano	(399 = 95 x 558)
GRMoschato Mazas = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Casorzo	(398 = 95 x 559)
GRMoschato Mazas = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Casorzo	(399 = 95 x 559)
GRMoschato Mazas = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(398 = 99 x 558)
GRMoschato Mazas = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(399 = 99 x 558)
GRMoschoudi = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Schierano	(406 = 95 x 558)
GRMoschoudi = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Casorzo	(406 = 95 x 559)
GRMoschoudi = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(406 = 99 x 558)
CRNasurla (77 cr) = GRSykiotis x MLVMalvasia Istriana Italy	(178 = 482 x 565)
CRNasurla (77 cr) = GRSykiotis x MLVMalvasia Istria Italy	(178 = 482 x 566)
CRNasurla (77 cr) = GRSykiotis x MLVMalvasia Bela	(178 = 482 x 568)
CRNasurla (77 cr) = GRSykiotis x MLVMalvasia Istriana Crete	(178 = 482 x 574)
CRNasurla (77 cr) = CHGoron* x GRMalvasia istriana	(178 = 139 x 366)
CRNasurla (77 cr) = CHGoron* x MLVMalvasia Istriana Italy	(178 = 139 x 565)
CRNasurla (77 cr) = CHGoron* x MLVMalvasia Istria Italy	(178 = 139 x 566)
CRNasurla (77 cr) = CHGoron* x MLVMalvasia Bela	(178 = 139 x 568)
CRNasurla (77 cr) = CHGoron* x MLVMalvasia Istriana Crete	(178 = 139 x 574)

CRNasurla (77 cr) = GRMalvazia istriana x GRSykiotis	(178 = 366 x 482)
BULDimyat cl.4/24 = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Istriana Italy	(13 = 179 x 565)
BULDimyat cl.4/24 = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Istria Italy	(13 = 179 x 566)
BULDimyat cl.4/24 = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Bela	(13 = 179 x 568)
BULDimyat cl.4/24 = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Istriana Crete	(13 = 179 x 574)
BULDimyat cl.4/24 = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Istriana Italy	(13 = 316 x 565)
BULDimyat cl.4/24 = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Istria Italy	(13 = 316 x 566)
BULDimyat cl.4/24 = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Bela	(13 = 316 x 568)
BULDimyat cl.4/24 = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Istriana Crete	(13 = 316 x 574)
BULDimyat = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Istriana Italy	(12 = 179 x 565)
BULDimyat = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Istria Italy	(12 = 179 x 566)
BULDimyat = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Bela	(12 = 179 x 568)
BULDimyat = CRAMet Adgi Ibram (78 cr) x MLVMalvasia Istriana Crete	(12 = 179 x 574)
BULDimyat = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Istriana Italy	(12 = 316 x 565)
BULDimyat = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Istria Italy	(12 = 316 x 566)
BULDimyat = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Bela	(12 = 316 x 568)
BULDimyat = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Istriana Crete	(12 = 316 x 574)
GRKkrystalli = GRAetonychi skliro x GRMalvazia di Candia	(345 = 246 x 365)
GRKkrystalli = GRAetonychi skliro x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 246 x 572)
GRKkrystalli = GRChourmades x GRMalvazia di Candia	(345 = 274 x 365)
GRKkrystalli = GRChourmades x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 274 x 572)
GRKkrystalli = GRKesorlidiko x GRMalvazia di Candia	(345 = 315 x 365)
GRKkrystalli = GRKesorlidiko x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 315 x 572)
GRKkrystalli = GRKoutsoumpeli lefko x GRMalvazia di Candia	(345 = 339 x 365)
GRKkrystalli = BULBulgar x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 15 x 572)
GRKkrystalli = GRRazaki x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 447 x 572)

GRKrySTALLI = GRRazaki Chakidikis x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 448 x 572)
GRKrySTALLI = GRRazaki kokkino x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 450 x 572)
GRKrySTALLI = GRKoutsoumpeli lefko x MLVMalvasia di Candia Crete	(345 = 339 x 572)
GRKrySTALLI = GRMalvasia di Candia x GRRazaki	(345 = 365 x 447)
GRKrySTALLI = GRMalvasia di Candia x GRRazaki Chakidikis	(345 = 365 x 448)
GRKrySTALLI = GRMalvasia di Candia x GRRazaki kokkino	(345 = 365 x 450)
GRChakiki oporiko = CHHumagne Blanc x GRMalvasia di Candia	(270 = 144 x 365)
GRChakiki oporiko = CHHumagne Blanc x MLVMalvasia di Candia Crete	(270 = 144 x 572)
GRChakiki oporiko = GRAkominato x MLVMalvasia di Candia Crete	(270 = 252 x 572)
GRChakiki oporiko = GRAkominato x GRMalvasia di Candia	(270 = 252 x 365)
GRAthiri = GRDafnato x MLVMalvasia di Casorzo	(258 = 277 x 559)
GRAthiri = GRMantilaria x MLVMalvasia di Casorzo	(258 = 367 x 559)
GRAthiri = MLVMalvasia di Casorzo x MLVMantilaria 30	(258 = 559 x 584)
GRAthiri = GRVilana x MLVMalvasia di Casorzo	(258 = 501 x 559)
MLVDafnato 370 = GRVilana x MLVMalvasia di Casorzo	(577 = 501 x 559)
MLVDafnato 370 = MLVMalvasia di Casorzo x MLVMantilaria 30	(577 = 559 x 584)
MLVDafnato 370 = GRMantilaria x MLVMalvasia di Casorzo	(577 = 367 x 559)
MLVDafnato 370 = GRDafnato x MLVMalvasia di Casorzo	(577 = 277 x 559)
MLVAthirti 24 = GRMantilaria x MLVMalvasia di Casorzo	(575 = 367 x 559)
MLVAthirti 24 = GRDafnato x MLVMalvasia di Casorzo	(575 = 277 x 559)
MLVAthirti 24 = MLVMalvasia di Casorzo x MLVMantilaria 30	(575 = 559 x 584)
MLVAthirti 24 = GRVilana x MLVMalvasia di Casorzo	(575 = 501 x 559)
MLVDafnia 243 = GRTsaousi x MLVMalvasia di Candia Crete	(578 = 493 x 572)
MLVDafnia 243 = GRDafnia x MLVMalvasia di Candia Crete	(578 = 278 x 572)
GRDafnia = MLVMalvasia di Candia Crete x MLVDafnia 243	(278 = 572 x 578)
GRDafnia = GRTsaousi x MLVMalvasia di Candia Crete	(278 = 493 x 572)

GRDafnia = GRMalvazia di Candia x MLVDafnia 243	(278 = 365 x 578)
GRDafnia = GRMalvazia di Candia x GRTsaousi	(278 = 365 x 493)
GRGoustolidi = CRCherny kuymski (81 cr) x MLVMalvasia nera di Brindisi	(300 = 181 x 564)
GRGoustolidi = GRRompola x MLVMalvasia nera di Brindisi	(300 = 462 x 564)
GRGoustolidi = GRFeidia mavri x MLVMalvasia nera di Brindisi	(300 = 287 x 564)
GRRomeiko = GRVidiano x MLVMalvasia nera di Brindisi	(459 = 500 x 564)
GRRomeiko = GRVidiano x MLVMalvasia nera di Brindisi	(459 = 499 x 564)
GRRompola = GRRompola x MLVMalvasia nera di Brindisi	(461 = 462 x 564)
GRRompola = CRCherny kuymski (81 cr) x MLVMalvasia nera di Brindisi	(461 = 181 x 564)
GRRompola = GRFeidia mavri x MLVMalvasia nera di Brindisi	(461 = 287 x 564)
GRProvatina = FRMuscat d'Alexandrie B x MLVMalvasia di Candia Crete	(442 = 94 x 572)
GRProvatina = GRXeromachairouda x MLVMalvasia di Candia Crete	(442 = 505 x 572)
GRProvatina = GRMoschato krevatinisio x MLVMalvasia di Candia Crete	(442 = 397 x 572)
GRProvatina = GRMoschato Alexandreias x MLVMalvasia di Candia Crete	(442 = 388 x 572)
GRProvatina = GRKrystalli x GRMalvazia di Candia	(442 = 345 x 365)
GRProvatina = GREftakoilo x MLVMalvasia di Candia Crete	(442 = 284 x 572)
GRProvatina = GRMalvazia di Candia x GRXeromachairouda	(442 = 365 x 505)
GRSyriki = GREftakoilo x MLVMalvasia di Candia Crete	(484 = 284 x 572)
GRSyriki = FRMuscat d'Alexandrie B x MLVMalvasia di Candia Crete	(484 = 94 x 572)
GRSyriki = GRKrystalli x GRMalvazia di Candia	(484 = 345 x 365)
GRSyriki = GRXeromachairouda x MLVMalvasia di Candia Crete	(484 = 505 x 572)
GRSyriki = GRMalvazia di Candia x GRXeromachairouda	(484 = 365 x 505)
GRSyriki = GRMoschato krevatinisio x MLVMalvasia di Candia Crete	(484 = 397 x 572)
GRSyriki = GRMoschato Alexandreias x MLVMalvasia di Candia Crete	(484 = 388 x 572)
GRKarydato mavro = GRKypreiko x MLVMalvasia de La Ricia	(310 = 347 x 601)
GRKarydato mavro = GRKypreiko x MLVMalvasia nera di Brindisi	(310 = 347 x 564)

GRPsevdosyriko = GRKypreiko x MLVMalvasia nera di Brindisi	(445 = 347 x 564)
GRPsevdosyriko = GRKypreiko x MLVMalvasia de La Ricia	(445 = 347 x 601)
GROpsimo Prosotsanis = GRDafnato x MLVMalvasia di Casorzo	(418 = 277 x 559)
GROpsimo Prosotsanis = GRMantilaria x MLVMalvasia di Casorzo	(418 = 367 x 559)
GROpsimo Prosotsanis = MLVMalvasia di Casorzo x MLVMantilaria 30	(418 = 559 x 584)
GROpsimo Prosotsanis = GRVilana x MLVMalvasia di Casorzo	(418 = 501 x 559)
GRThrapsathiri = GRDafnato x MLVMalvasia di Casorzo	(489 = 277 x 559)
GRThrapsathiri = GRMantilaria x MLVMalvasia di Casorzo	(489 = 367 x 559)
GRThrapsathiri = MLVMalvasia di Casorzo x MLVMantilaria 30	(489 = 559 x 584)
GRThrapsathiri = GRVilana x MLVMalvasia di Casorzo	(489 = 501 x 559)
GRPsilomavro Kalavryton = FRMelon B x MLVMalvasia nera di Lecce	(446 = 91 x 557)
GRPsilomavro Kalavryton = GRMavro Kalavrytiko x MLVMalvasia nera di Lecce	(446 = 370 x 557)
GRBegleri = GRMantilaria x MLVMalvasia di Casorzo	(264 = 367 x 559)
GRBegleri = GRDafnato x MLVMalvasia di Casorzo	(264 = 277 x 559)
GRBegleri = MLVMalvasia di Casorzo x MLVMantilaria 30	(264 = 559 x 584)
GRBegleri = GRVilana x MLVMalvasia di Casorzo	(264 = 501 x 559)
GRKaratsova Naousis = GRPetrachladi x MLVMalvasia Rei	(306 = 432 x 567)
GRKaratsova Naousis = GROpsimo Edessis x MLVMalvasia Rei	(306 = 417 x 567)
GROpsimos Lefko = GROpsimo Edessis x MLVMalvasia Rei	(421 = 417 x 567)
GROpsimos Lefko = GRPetrachladi x MLVMalvasia Rei	(421 = 432 x 567)
GRSatino = GRRoditis x MLVMalvasia nera di Brindisi	(467 = 455 x 564)
GRSatino = GRRoditis x MLVMalvasia nera di Brindisi	(467 = 456 x 564)
GRKrasato = FRRomorantin B x MLVMalvasia fine	(342 = 104 x 555)
GRBampa-Hasan = GRRousias x MLVMalvasia del Chianti Italy	(262 = 464 x 556)
GRBampa-Hasan = GRRousias x MLVMalvasia del Chianti Crete	(262 = 464 x 573)
GRLagorthi = GRRousias x MLVMalvasia del Chianti Italy	(350 = 464 x 556)

GRLagorthi = GRMalvazia del Chianti x GRRousias	(350 = 364 x 464)
GRLagorthi = GRRousias x MLVMalvasia del Chianti Crete	(350 = 464 x 573)
GRKarvouniaris = GRVertzami x MLVMalvasia del Chianti Italy	(309 = 498 x 556)
GRKarvouniaris = GRVertzami x MLVMalvasia del Chianti Crete	(309 = 498 x 573)
GRKarvouniaris = GRMalvazia del Chianti x GRVertzami	(309 = 364 x 498)
GRTsardana = GRVidiano x MLVMalvasia nera di Brindisi	(494 = 499 x 564)
GRTsardana = GRVidiano x MLVMalvasia nera di Brindisi	(494 = 500 x 564)
GRAetonychi = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Rei	(241 = 316 x 567)
GRAetonychi opsimo Iefko = GRNychi Vassilika x MLVMalvasia Rei	(245 = 316 x 567)
BULMisket Vrachanski = GRMavro Mesenikola x MLVMalvasia di Schierano	(56 = 372 x 558)
FRMuscat d' Alsace R = GRMoschato Kerkyras x MLVMalvasia di Casorzo	(95 = 395 x 559)
FRMuscat d' Alsace R = GRMoschato Kerkyras x MLVMalvasia di Casorzo	(95 = 396 x 559)
FRMuscat d' Alsace R = BULTamyanka x MLVMalvasia di Casorzo	(95 = 16 x 559)
FRMuscat d' Alsace R = GRMoschato Mazas x MLVMalvasia di Casorzo	(95 = 398 x 559)
FRMuscat d' Alsace R = GRMoschato Mazas x MLVMalvasia di Casorzo	(95 = 399 x 559)
FRMuscat d' Alsace R = GRMoschoudi x MLVMalvasia di Casorzo	(95 = 406 x 559)
FRMuscat d' Alsace R = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(95 = 99 x 558)
BULTamyanka = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Casorzo	(16 = 95 x 559)
BULTamyanka = FRMuscat à petits grains x MLVMalvasia di Schierano	(16 = 99 x 558)
BULTamyanka = FRMuscat d' Alsace R x MLVMalvasia di Schierano	(16 = 95 x 558)
BULCabernet Sauvignon = MLVMalvasia moscatel fonte grande x MLVCabernet Sauvignon	(1 = 554 x 593)
FRCabernet sauvignon N = MLVMalvasia moscatel fonte grande x MLVCabernet Sauvignon	(76 = 554 x 593)
GRCabernet Sauvignon = MLVMalvasia moscatel fonte grande x MLVCabernet Sauvignon	(269 = 554 x 593)
ALKorith (3 al)* = GRPorniko x MLVMalvasia di Candia Crete	(230 = 438 x 572)
ALKorith (3 al)* = GRMalvazia di Candia x GRPorniko	(230 = 365 x 438)
TURKabarcik = TURBalliboz* x MLVMalvasia moscatel fonte grande	(523 = 510 x 554)

TURGül üzümü = TURSultani Çekirdeksiz * x MLVMalvasia Rei	(524 = 519 x 567)
TURSultani Çekirdeksiz * = TURYuvarlak Çekirdeksiz* x MLVMalvasia grigiorosa	(519 = 526 x 560)
TURSultani Çekirdeksiz * = TURYuvarlak Çekirdeksiz* x MLVMalvasia aromatica Crete	(519 = 526 x 571)
ALTagje e kuqe (7al) = ALKanelles (5al)* x MLVMalvasia Rei	(234 = 232 x 567)
ALKanelles (5al)* = BULChernomorski Briliant x MLVMalvasia Rei	(232 = 71 x 567)
BULZarchin = GRSykiotis x MLVMalvasia nera di Lecce	(46 = 482 x 557)
FRChasselas CB60 = GRPriknadi x MLVMalvasia nera di Lecce	(79 = 441 x 557)
RUSRish Baba = GRAkominato x MLVUnknown Genotype Roubelakis	(132 = 252 x 594)