Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 46 ΚΛΩΝΩΝ VITIS VINIFERA ΚΑΙ 60 ΥΒΡΙΔΙΩΝ VITIS ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ VITIS VINIFERA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΣΗΜΑΝΤΩΝ

ΜΑΡΙΑ Ι. ΖΕΡΒΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ηράκλειο 2001

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 46 ΚΛΩΝΩΝ VITIS VINIFERA ΚΑΙ 60 ΥΒΡΙΔΙΩΝ VITIS ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ VITIS VINIFERA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΣΗΜΑΝΤΩΝ.

Από τη

Μαρία Ι. Ζερβού

Πτυχίο Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 1999

Διατριβή

Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

στη

Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών

από το Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιτροπή αξιολόγησης:

Καθηγήτρια ΚΑΛΛΙΟΠΗ Α. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ

Επίκ. Καθηγήτρια ΕΥΘΥΜΙΑ ΤΣΑΓΡΗ

Ηράκλειο, 2001

Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ 1

1.2 ΧΡΗΣΗ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ. 2

1.2.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ; 2

1.2.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΥ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 7

1.3 ΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ 8

1.3.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ, ΚΛΩΝΩΝ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΩΝ *Vitis vinifera* L. και *Vitis species*. 11

1.3.1.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΗΜΑΝΤΕΣ 12

1.3.1.2 RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OR RFLP. 14

1.3.1.3 RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) 14

1.3.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟΙ ΣΗΜΑΝΤΕΣ; 15

1.3.2.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟ VITIS 17

1.3.2.2 ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ESTs (Expressed Sequence Tags): ΜΙΑ ΝΕΑ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ 18

1.3.2.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥΣ SSR ΔΕΙΚΤΕΣ 20

1.3.2.4 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΩΝ ΣΤΗΝ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΙΟΥ 21

1.3.2.5 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ *VITIS VINIFERA* ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ. 23

1.3.2.6 ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΙΚΟΙ SSR ΔΕΙΚΤΕΣ 24

1.3.2.7 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ SSR ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ VITIS VINIFERA ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ 26

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ 27

2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ 27

2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA 28

2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR 29

2.3.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΤΩΝ PCR- ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ 30

2.3.2 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ PCR 30

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 34

2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΥΤΩΝ. 36

2.6 ΚΛΩΝΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ VITIS VINIFERA ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΑ *VITIS* ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ (*VITIS* SPECIES AND HYBRIDS), ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ 38

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 45

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 95

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 102

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών, του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 2000-2001. Ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά για την συμπαράσταση και τη συνεργασία τους όλο αυτό το διάστημα, αρκετά πρόσωπα, των οποίων η βοήθεια υπήρξε πολύτιμη.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Κ.Α. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, τόσο για την ουσιαστική και καθοριστική καθοδήγηση της σε όλη τη διάρκεια φοίτησης μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών, όσο και για την ηθική και οικονομική υποστήριξη κατά τη διάρκεια εκτέλεσης της διατριβής μου, καθώς και για την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε, σε στιγμές δυσκολιών…

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα, τον ερευνητή κ. Fransois Lefort, για τη χρήσιμη και ωφέλιμη καθοδήγηση του καθώς και για την αρμονική συνεργασία μας, σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Ν. Πανόπουλο για τις χρήσιμες συμβουλές του, και την αμέριστη συμπαράσταση που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την πολύτιμη συμμετοχή του στην διαδικασία δόμησης της επιστημονικής μου προσωπικότητας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ και την Επικ. Καθηγήτρια κα Ευθυμία Τσαγρή, για τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την διόρθωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, ως δεύτερη επιβλέπουσα στην επιτροπή αξιολόγησης αυτής.

Αισθάνομαι ακόμα την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τον ερευνητή Αλέξανδρο Αργυροκαστρίτη. Είναι ο άνθρωπος που με «μύησε» στον κόσμο της επιστημονικής έρευνας και του εργαστηριακού χώρου, ενώ παράλληλα η συμπεριφορά και η επιστημονική πορεία του στον ακαδημαϊκό χώρο με βοήθησαν να συνειδητοποιήσω, ότι οι κορυφαίοι και αυθεντικοί επιστήμονες χαρακτηρίζονται από σεμνότητα, ευγένεια ψυχής, ηθικές αξίες και συνέπεια.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα την ερευνήτρια κα Νίκη Ταβερναράκη, για τις πολύτιμες συμβουλές της, καθώς και για τις χρήσιμες πληροφορίες που μου έδωσε για τον

τομέα του πολλαπλασιαστικού υλικού για την καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και σε δύο ανθρώπους των οποίων η εμπειρία, η σωστή καθοδήγηση και ουσιαστική υποστήριξη, με βοήθησαν να ξεπεράσω σημαντικά εμπόδια: τον ερευνητή Νικόλαο Πριμηκύριο, και την ερευνήτρια Στάσα Παπαδάκη. Θερμά ευχαριστώ και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών: τον Δαμιανό Σκοπελίτη, τον Γιάννη Ντελή, τον Κώστα Πασχαλίδη, τον Ευθύμη Ανδρώνη την Μαριάνθη Πατεράκη, τον Κώστα Καραντεμίρη και την Ελένη Πλιακώνη. Εκτός από ικανότατοι συνεργάτες αποτελούν πλέον για μένα και πολύτιμοι φίλοι…

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την γραμματέα του Μεταπτυχιακού Προγράμματος κα Γεωργία Παπαδάκη για την υπομονή της και την βοήθεια που απλόχερα μου πρόσφερε όλο αυτό το διάστημα.

Θερμά ευχαριστώ τον κ. Στέλιο Μαυράκη για τη σημαντική και ουσιαστική βοήθεια που παρείχε στην έγκαιρη παροχή φυτικού υλικού.

Ευχαριστώ ακόμα και όλα τα υπόλοιπα παιδιά του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών: την Liliana Sfichi, την Μαρία Σφακιανάκη, τον Νίκο Ιωαννίδη, τον Κώστα Λογοθέτη και τον Δημήτρη Κότση. Εύχομαι σε όλους καλή επιτυχία και καλή σταδιοδρομία!

Τέλος θα ήθελα για μία φορά ακόμη να ευχαριστήσω και να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την κατανόηση, την υπομονή και την στήριξη που μου έδωσαν και μου δίνουν, σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ηράκλειο, 2001.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

Οι ελληνικές ποικιλίες αμπέλου αποτελούν σημαντικό τμήμα της διεθνούς δεξαμενής γενετικού υλικού του *Vitis vinifera L.* Τα κέντρα προέλευσης της αμπέλου δεν έχουν ακόμα καθοριστεί, όμως ως πιθανότερα θεωρούνται οι νότιες περιοχές του Καυκάσου, η Μ. Ανατολή ή η Μ. Ασία. Πρόσφατες ιστορικές αναφορές δείχνουν ότι η άμπελος ήταν γνωστή και εχρησιμοποιείτο για την παραγωγή οίνου στο Β. Ιράν από το 6000 π.Χ. (Mc Govern *et al.,* 1995).

Στην Κρήτη, η άμπελος πρωτοεμφανίσθηκε περίπου το 2300 π.Χ. με πιθανή προέλευση την Αίγυπτο. Ακολούθησε η εξάπλωση της στα νησιά του Αιγαίου και την υπόλοιπη Ελλάδα από τους Μινωίτες (Marangou, 1991). Αργότερα, με τους αποικισμούς των Ελλήνων και των Φοινίκων, οι ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera L,* εξαπλώθηκαν στα παράλια της Μεσογείου και τη Δ. Ευρώπη.Εκεί, ορισμένες ποικιλίες προσαρμόστηκαν επιτυχώς σε περιοχές με παρόμοιες κλιματολογικές συνθήκες. Στις περιοχές όπου η άγρια άμπελος προϋπήρχε σε καταφύγια παγετώνων (glacial refugia), τυχαίες ή κατευθυνόμενες διασταυρώσεις δημιούργησαν νέες ποικιλίες, ορισμένες από τις οποίες ενδεχομένως να επανεισήχθησαν στην Ελλάδα σε διαφορετικές περιόδους λόγω των έντονων εμπορικών σχέσεων στη Μεσόγειο. Πρόσφατο παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή γαλλικών ποικιλιών σε δύο διαφορετικές περιόδους, μετά την Απελευθέρωση της Ελλάδας και μετά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο (Kotinis, 1985).

Στην Ελλάδα, εκτιμάται ότι σήμερα καλλιεργούνται περίπου 300 ποικιλίες, ενώ άλλες 500 ποικιλίες δευτερεύουσας σημασίας βρίσκονται σε αμπελογραφικές συλλογές στην Κρήτη, την Αθήνα και τη Θεσσαλονίκη, δίνοντας ένα σύνολο περίπου 800 ποικιλιών (Kotinis, 1985).Το γεγονός ότι η άμπελος εμφανίζεται στην Ελλάδα από την αρχαιότητα καθώς και η χρησιμοποίηση πολλαπλών συνωνύμων και τοπονυμίων για την ίδια ποικιλία, καθιστά δύσκολη τη γενετική ταυτοποίηση τους.

1.2 ΧΡΗΣΗ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ.

Ένας από τους μεγαλύτερους εχθρούς της ευρωπαϊκής αμπέλου είναι η φυλλοξήρα.Ο εμβολιασμός του ευρωπαϊκού αμπελιού πάνω σε υποκείμενα ανθεκτικά στη ριζόβια μορφή της (την πιο επικίνδυνη), είναι ο μόνος τρόπος αποτελεσματικής αντιμετώπισης της. Έτσι, η χρήση των υποκειμένων είναι αναγκαία προϋπόθεση, για να παραμείνουν αμπελουργικές οι «φυλλοξηριώσες» περιοχές.

Σήμερα, τα υποκείμενα χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπισθούν και άλλα σύγχρονα προβλήματα της αμπελοκαλλιέργειας, όπως ποιότητα προϊόντος, αντοχή σε ξηρασία, αλατότητα, νηματώδεις κ.λ.π..

1.2.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ;

Το πρώτο βήμα, μετά την εμφάνιση της Φυλλοξήρας στην Ευρώπη, ήταν η αναζήτηση φυτών ανθεκτικών στη ριζόβια μορφή της. Γρήγορα εντοπίστηκαν ορισμένα «ανθεκτικά» είδη του γένους *Vitis* (κυρίως *Vitis riparia, Vitis rupestris, Vitis berlandieri, Vitis champinii*), στον τόπο προέλευσης του εντόμου (Αμερική). Αυτά είχαν ανθεκτικές ρίζες , αλλά δεν έδιναν τα γνωστά προϊόντα του αμπελιού. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ως **υποκείμενα**, πάνω στα οποία εμβολιάζονταν οι ποικιλίες αμπελιού. Όμως, τα αμερικάνικα είδη δεν ήταν συνηθισμένα στις συνθήκες καλλιέργειας της Ευρώπης. Αποτέλεσμα ήταν να εμφανιστούν στα αμπέλια νέα προβλήματα, με πιο σημαντικό, μεταξύ των, το πρόβλημα της χλώρωσης (κιτρίνισμα) των φύλλων. Βασική αιτία της είναι η μη ανθεκτικότητα των υποκειμένων στην έντονη παρουσία του ανθρακικού ασβεστίου στο έδαφος.

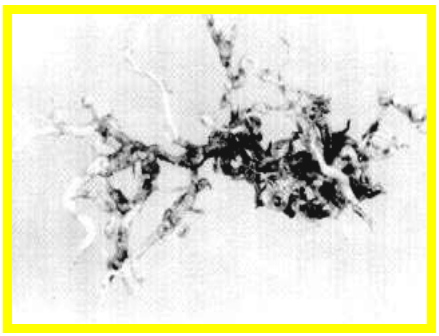
Ακολούθησε εντατική έρευνα, η οποία έδωσε υποκείμενα (κλώνους ή υβρίδια), που συνδυάζουν όσο το δυνατόν καλύτερα τις ιδιότητες των γονέων τους. Τα παραπάνω, εκτός από ικανότητα αντοχής στην φυλλοξήρα, έχουν και ικανότητα προσαρμογής στις συνθήκες καλλιέργειας της Ευρώπης (ανθρακικό ασβέστιο, άλατα εδάφους κ.λ.π.) (Πίνακας 1.2.1.1)

Κλώνοι		*Riparia Gloire de Montpellier, Rupestris du Lot*
Ομάδες Απλών Υβριδίων	***Riparia X Rupestris***	3306 C, 3309 C, 101-14 Mgt, Schwarzmann
	Berlandieri X Riparia	420A Mgt, 161-49C, 34 EM, 125 AA Teleki (5BB, 5C, **SO_4**)
	Berlandieri X Rupestris	Richters = 57 R, 99 R, **110 R**, Σικελικά= **140 Ru, 1103 P**,1447 P
	Vinifera X Rupestris	ARG1, ARG9, 1202C
	Vinifera X Berlandieri	**41B Mgt**, 333 EM, Fercal
Ομάδες Σύνθετων Υβριδίων	***Riparia X Rupestris X Cordifolia***	106-8 Mgt, **44-53 M**
	Solonis X Riparia X Candicans	1613 C**, 1616 C**
	Solonis X Champinii	Harmony, Freedom
	Solonis X Berlandieri	31 R
	Vinifera X Rupestris X Berlandieri	1045 P
	Riparia X Rupestris X Berlandieri	**Gravesac**

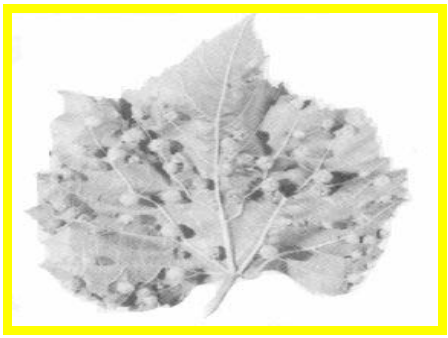
Πίνακας 1.2.1.1. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποκείμενα (κλώνοι και ομάδες υβριδίων).

Σήμερα, η έρευνα στοχεύει στη δημιουργία υποκειμένων, που επιπλέον, να παρουσιάζουν αντοχή σε ιώσεις, νηματώδεις, μυκητολογικές ασθένειες, όπως και να βελτιώνουν την ποιότητα των σταφυλιών (ύψος παραγωγής, χρόνος ωρίμασης κ.λ.π.). Έτσι, τα υποκείμενα έχουν όλο και πιο «σύνθετους» γονείς, από αμερικάνικα είδη, ή και από κάποια ποικιλία του ευρωπαϊκού αμπελιού.

Όταν η φυλλοξήρα φτάσει σ'ένα τόπο, «φιλοξενείται» ακόμη και σε αμπέλια, που έχουν ανθεκτικά υποκείμενα. Τα ανθεκτικά στη Φυλλοξήρα υποκείμενα δεν σημαίνει ότι είναι και απρόσβλητα.



α



β

Εικόνα 1.2.1. Η Φυλλοξήρα προσβάλλει κυρίως τις ρίζες του ευρωπαϊκού αμπελιού (α) και τα φύλλα των αμερικάνικων ειδών (β).

Απλά, έχουν την ικανότητα να αντιστέκονται στην προσβολή πριν αυτή γίνει επικίνδυνη. Γι'αυτό, στις ρίζες τους διατηρούνται μικρότεροι πληθυσμοί, απ'ότι στις ρίζες του ευρωπαϊκού αμπελιού.

Όλα τα «αυτόριζα» φυτά (δηλαδή ποικιλίες του ευρωπαϊκού αμπελιού που φυτεύονται κατευθείαν στο έδαφος) κινδυνεύουν από τη Φυλλοξήρα.Ουδεμία ποικιλία του ευρωπαϊκού αμπελιού εμφανίζει την παραμικρή ανθεκτικότητα. Η μόνη δυνατότητα να μην προσβληθούν τα «αυτόριζα», είναι να φυτευτούν σε «αμμούδες» (αμμώδη εδάφη, με άργιλο μικρότερο από 7%), γιατί, σ'ένα τέτοιο ασταθές έδαφος, η φυλλοξήρα δεν ευνοείται. Ο πολλαπλασιασμός της καθώς και η ταχύτητα προσβολής της, ευνοείται σε αμπελώνες με θερμό κλίμα, όπως η Κρήτη.

Στην Κρήτη, όπως και στην υπόλοιπη Ελλάδα, τα πιο κοινά υποκείμενα είναι τα υβρίδια 110 Richter, 140 Ruggeri, 41 B, 1103 Paulsen, και SO_4.

	41 B *V.berlandieri x V.vinifera*	**1103 P** *V.berlandieri x V.rupestris*	**110 R** *V.berlandieri x V.rupestris*	**140 Ru** *V.berlandieri x V.rupestris*	**SO_4** *V.berlandieri x V.riparia*
Ζωηρότητα	Μικρή	Μέτρια ως μεγάλη	Μέτρια ως μεγάλη	Πολύ μεγάλη	Μέτρια ως μεγάλη
Βλαστικός κύκλος	Μικρός	Μακρύς	Πολύ μακρύς	Πολύ μακρύς	Ποικίλλει
Επίδραση στην Ωρίμαση Σταφυλιών	Πρωίμηση	Οψίμηση	Οψίμηση	Οψίμηση	Ποικίλλει
Συμβατότητα με Vitis Vinifera	Η καλύτερη δυνατή	Καλή	Όχι με ποικιλίες με τάση ανθο-πτωσης και	Όχι με ζωηρές ποικιλίες, γιατί ευνοεί	Παρουσιάζει προβλήματα: Π.χ α) ευπάθεια σε Βοτρύτη, β) δημιουργία

			καρπόπτωσης	τη φτωχή καρπόδεση. Συχνή αποτυχία στον επιτόπιο εμβολιασμό	Τυλώσεων (φελοποίηση κορμού) γ) μικρή πρόσληψη Mg, άρα και «ξήρανση ράχης» Όχι με ποικιλίες που απαιτούν πολύ Μαγνήσιο, (π.χ. Merlot, Cabernet Sauvignon)
Ριζικό σύστημα	Βαθύ, με μέτρια ανάπτυξη	Βαθύ, πολύ δυνατό	Μέτριο	Πολύ βαθύ και πολύ δυνατό	Επιφανειακό

Πίνακας 1.2.1.2. Γενικά χαρακτηριστικά των υποκειμένων

(Από Ταβερναράκη Ν. και Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Ενημερωτικά φυλλάδια για το πολλαπλασιαστικό υλικό, 2001)

Ακολουθεί πίνακας με την προσαρμοστικότητα των υποκειμένων σε διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος (Πίνακας 1.2.1.3).

	41 B	**1103 P**	**110 R**	**140 Ru**	**SO_4**
Κλίμα	Κατάλληλο για ζεστές περιοχές, με ξηρό κλίμα.. Με τη μεγαλύτερη αντοχή στην ξηρασία.	Αντέχει σε ξηρασία περισσότερο από 110R και 140Ru	Εξαιρετικό για περιοχές ζεστές, με ξηρό κλίμα. Μεγάλη αντοχή στην ξηρασία.	Εξαιρετικό για περιοχές ζεστές, με ξηρό κλίμα. Μεγάλη αντοχή στην ξηρασία.	Η συμπεριφορά του ποικίλλει.
Έδαφος	Κατάλληλο για εδάφη με πολύ $CaCO_3$. Δεν ταιριάζει σε αργιλώδη και υγρά εδάφη, όπου ευνοεί την ***«φυσιολογική χλώρωση»,*** ιδίως αν υπάρξουν πολλές βροχές στην αρχή του βλαστικού κύκλου (την άνοιξη).	Κατάλληλο για εδάφη με μέτριο $CaCO_3$, αλλά και για όξινα εδάφη. Μέτρια αντοχή στα άλατα. Μικρή πρόσληψη Κ.	Κατάλληλο για εδάφη με μέτριο $CaCO_3$. Ταιριάζει σε όλα τα εδάφη (και σε όξινα, ή με κακή στράγγιση). Καλό για πλαγιές ή επιφανειακά εδάφη. Μειωμένη πρόσληψη Mg και Κ.	Κατάλληλο για εδάφη με πολύ $CaCO_3$. Καλό για επιφανειακά, ασβεστούχα, ή όξινα, ξηρά και αλατούχα. Ακατάλληλο για βαθιά, γόνιμα και με αρκετό νερό εδάφη (λόγω υπερβολικής ζωηρότητας.). Μικρή πρόσληψη Κ.	Κατάλληλο για εδάφη με πολύ $CaCO_3$. Σε ευρεία κλίμακα εδαφών (και σε όξινα ή υγρά). Κυρίως όμως για ελαφρά, με καλή στράγγιση και χαμηλή γονιμότητα. Μειωμένη πρόσληψη Mg
Εχθροί και ασθένειες	Μέτρια αντοχή σε Φυλλοξήρα, ευαίσθητο σε νηματώδεις.	Υψηλή αντοχή σε Φυλλοξήρα, και νηματώδεις	Υψηλή αντοχή σε Φυλλοξήρα, μέτρια σε νηματώδεις.	Υψηλή αντοχή σε Φυλλοξήρα, μέτρια σε νηματώδεις.	Πολύ υψηλή αντοχή σε Φυλλοξήρα και νηματώδεις. Ευνοεί την ανάπτυξη του Βοτρύτη, λόγω

					μεγάλης ζωηρότητας.
Άλλα σχόλια	Στην Καλιφόρνια εμφανίζει προβλήματα , ως προς την ανθεκτικότητα τη στη Φυλλοξήρα.	Πολύ κοινό σε Ιταλία, νότια Γαλλία, βόρεια Αφρική.	Έχει αργή ανάπτυξη τα πρώτα χρόνια. Από τα πιο σημαντικά υποκείμενα στη Μεσόγειο.	Έχει αργή ανάπτυξη τα πρώτα χρόνια. Πολύ δημοφιλές σε Ιταλία και Β. Αφρική	Έχει αργή ανάπτυξη τα πρώτα χρόνια. Αναπτύσσει πολύ χοντρό «κόμβο», στο σημείο του εμβολιασμού.

Πίνακας 1.2.1.3 Προσαρμοστικότητα υποκειμένων σε διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος.

(Από Ταβερναράκη Ν. και Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Ενημερωτικά φυλλάδια για το πολλαπλασιαστικό υλικό, 2001).

Ορισμένα από τα νέα υποκείμενα, παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, για τις οποίες θα άξιζε να δοκιμαστούν και στις συνθήκες του Νησιού (Πίνακας 1.2.1.4.)

Vitis riparia x Solonis x Vitis candicans:		*Vitis riparia x Vitis rupestris x Vitis condifolia*
	1616 Coudrec	**44-53 Malègue**
Ζωηρότητα	Μέτρια	Μέτρια
Επίδραση στο εμβόλιο	Βελτιώνει το ποσοστό γονιμότητας. Πρωιμίζει την ωρίμαση των σταφυλιών.	Βελτιώνει το ποσοστό γονιμότητας. Πρωιμίζει την ωρίμαση των σταφυλιών.
Εδάφη	Έχει ριζικό σύστημα επιφανειακό (αλλά καλά αναπτυγμένο), γι αυτό είνα σχετικά ευαίσθητο στην ξηρασία. Προτιμά τα γόνιμα, υγρά, άσχημης στράγγισης εδάφη, χωρίς πολύ $CaCO_3$. Φτωχή ανάπτυξη σε άγονα, ελαφρά, αμμώδη εδάφη. Υψηλή αντοχή στα άλατα.	Εχει ριζικό σύστημα βαθύ και πολύ δυνατό, γι αυτό αντέχει στην ξηρασία. Μέτρια αντοχή σε $CaCO_3$. Όμως, σε ασβεστούχα εδάφη, συχνά υποφέρει από έλλειψη Mg. Προτιμά τα όξινα εδάφη.
Εχθροί και ασθένειες	Καλή αντοχή σε Φυλλοξήρα, υψηλή σε ορισμένους νηματώδεις.	Υψηλή αντοχή σε Φυλλοξήρα και νηματώδεις.
Πλεονέκτημα	Η αντοχή στα άλατα. Στη Γαλλία ήδη χρησιμοποιείται στα αλατούχα μεσογειακά εδάφη.	Είναι το πρώτο που παρουσιάζει αντοχή στον μολυσματικό εκφυλισμό.
Vitis riparia x Vitis berlandieri x Vitis rupestris: **Gravesac**		
Μέτριας ζωηρότητας. Προτιμά φτωχά εδάφη με καλή στράγγιση. Προσαρμόζεται σε όξινα, αλλά και σε ασβεστούχα εδάφη. Έχει καλή συμβατότητα, ως τώρα, με το *Vitis vinifera*. Νέο υποκείμενο, που προήλθε από διασταύρωση των 161-49C και 3309C, στο Bordeaux. Το πλεονέκτημα του είναι η μεγάλη προσαρμοστικότητα σε όξινα εδάφη.		

Πίνακας 1.2.1.4. **Ορισμένα από τα νέα υποκείμενα, που παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες.**

(Από Ταβερναράκη Ν. και Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Ενημερωτικά φυλλάδια για το πολλαπλασιαστικό υλικό, 2001)

1.2.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΥ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η επιλογή του κατάλληλου υποκειμένου πρέπει να βασίζεται στα παρακάτω:

- ***Την αντοχή στη φυλλοξήρα.***

  Παραμένει το πιο σημαντικό κριτήριο. Λιγότερο ανθεκτικά είναι αυτά που έχουν γονέα το *Vitis vinifera.* Αλλά και η επικινδυνότητα δεν είναι ίδια παντού. Π.χ. η φυλλοξήρα πολλαπλασιάζεται πιο εύκολα σε αργιλώδη και ασβεστούχα εδάφη, απ΄ότι σε αμμώδη και όξινα.

- ***Την αντοχή στους νηματώδεις.***

  Ενδιαφέρει ιδιαίτερα για αμμώδη, ελαφρά εδάφη. Τα πιο ανθεκτικά υποκείμενα είναι αυτά που έχουν γονέα το *Vitis* champinii (π.χ.τα Dodridge και Salt Creek), ή τα Solonis (τα Harmony, Freedom, Ramsey, 1613C, 1616 C και 44-53 M). Τα παραπάνω είναι ανθεκτικά στους νηματώδεις *Criconemella spp.(*root-knot) και *Xiphinema spp*.

- ***Την ανθεκτικότητα στο $CaCO_3$ του εδάφους.***

  Τα πιο ανθεκτικά υποκείμενα έχουν γονέα το *Vitis vinifera.* Όμως η αντοχή τους επηρεάζεται και διαφοροποιείται από τον τύπο, τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του εδάφους. Για παράδειγμα, υποκείμενα με γονέα τα *Vitis riparia* και *Vitis berlandieri* είναι τα πιο ανθεκτικά σε εδάφη μέτριας μηχανικής σύστασης, ενώ υποκείμενα με γονέα το *Vitis rupestris* σε ελαφρά εδάφη.

- ***Την ανθεκτικότητα στα άλατα του εδάφους.***

  Ιδιαίτερα ανθεκτικά είναι τα υποκείμενα με γονέα τα *Solonis* (1616C και 44-53 M).

- ***Τον τύπο ανάπτυξης του ριζικού συστήματος.***

  Κακή ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, προκαλεί την εμφάνιση προβλημάτων στη βλάστηση. Για παράδειγμα, αυτά που αντέχουν στην ξηρασία, αναπτύσσουν βαθύ ριζικό σύστημα, γι΄αυτό δεν ταιριάζουν σε εδάφη επιφανειακά ή που εμποδίζουν την βαθιά ρίζωση τους.

1.3 ΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Οι ποικιλίες αμπέλου που μελετήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

- ***Μοσχάτο άσπρο.***

Το άσπρο μοσχάτο, διαδεδομένο στην Ελλάδα και ιδίως τη νησιώτικη Ελλάδα, ώστε είναι σχεδόν βέβαιο ότι το καλλιεργούσαν στα νησιά του Αιγαίου και κατά την αρχαιότητα. Ορισμένοι κλασσικοί φιλόλογοι θεώρησαν τις ποικιλίες κλημάτων που λέγονται *vites apianae* από τον Κολουμέλλα (III,2,17) και τον Πλίνιο στη Φυσική Ιστορία του (XIV,81) ως ταυτιζόμενες με τα μοσχάτα, κυρίως διότι η λέξη συνδέεται με τη μέλισσα (apis) που έλκεται προς αυτά, όπως περίπου και η νεότερη ονομασία muscatello μπορεί κι αυτή να συνδέεται με τη λέξη μύγα (musca). Αν και πιθανότερο είναι ότι το muscatello παράγεται από τον ελληνικό όρο μοσχάτο, που κι αυτός προέρχεται από την περσική λέξη moushk (μόσχος), η δυνατότητα να ταυτίζεται το μοσχάτο με τις apianae ποικιλίες αξίζει να μελετηθεί, εφόσον οι ποικιλίες αυτές αναφέρονται σε γλυκά κρασιά. Ο Πλίνιος παρατηρούσε ότι αυτά τα κρασιά είχαν «μια ιδιάζουσα γεύση που δεν ήταν αυτή του κρασιού», και ίσως υπαινίσσεται τη χαρακτηριστική ευωδιά του μοσχάτου , λόγω της οποίας όλες αυτές οι ποικιλίες λέγονται «αρωματικές». Εδώ, μπορούμε να σημειώσουμε ότι, όπως μνημονεύει ο Πλίνιος (Ν.Η. XII,130 και XIV,81), τα κλήματα της ποικιλίας apiana και τα σταφύλια τους οι Έλληνες τα ονόμαζαν ψίθια (*LSJ ψίθιος οίνος, εκ ψιθίας σταφυλής*, υπάρχει και γραφή ψύθιος). Η λέξη πιθανώς συνδέεται με την αψιθιά ή αψίνθιον, ένα φυτό που εκτιμούσαν ιδιαίτερα για τις αρωματικές του ιδιότητες και που το χρησιμοποιούσαν ενίοτε ως μυρωδικό κατά την οινοποίηση έστω κι αν διαφέρει από την ευωδία των μοσχάτων σταφυλιών. Η μήπως πρέπει να συμπεράνουμε, πως ο όρος ψίθιος αντιτίθεται στην ταύτιση της ποικιλίας apiana με τα μοσχάτα;

Οι Έλληνες αμπελογράφοι είναι της γνώμης ότι το μοσχάτο άσπρο προέρχεται από τη Μικρά Ασία, αλλά δεν υπάρχει αναφορά για την ύπαρξη μοσχάτου άσπρου στη Σάμο πριν από τα τέλη του 16ου αιώνα και το νησί, απ΄όσο ξέρουμε, δεν συνδέεται με τον ψίθιο οίνο κατά την αρχαιότητα. Το μοσχάτο άσπρο, που ενδεχομένως είχε εισαχθεί στο νησί μετά τον επανεποικισμό, κυριάρχησε στη Σάμο καθώς αυξάνονταν οι εξαγωγές μοσχάτου κρασιού.

❖ *Μοσχάτο μαύρο.*

Ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται σε Κρήτη, Κέρκυρα, Ζάκυνθο, Κεφαλληνία, Σαντορίνη, Ανάφη, Ικαρία, Ν.Τρικάλων, Καρδίτσας, Αχαϊα, Ηλεία.

❖ *Λιάτικο.*

Ανάμεσα στις μοναδικές ποικιλίες των σταφυλιών της, η Κρήτη έχει και μία που προφανώς ανάγεται σε πανάρχαιους χρόνους. Λέγεται Λιάτικο, και είναι μια κόκκινη ποικιλία, που η γενεαλογία της πηγαίνει τόσο μακριά στο παρελθόν, ώστε οι Έλληνες αμπελογράφοι θεωρούν μια παραλλαγή της ως πρόγονο του κορινθιακού σταφυλιού,που χρησιμοποιούσαν στην Ελλάδα από την αρχαιότητα για την παραγωγή μαύρης σταφίδας. Μια πρόσθετη μαρτυρία για την ηλικία της είναι και το γεγονός ότι φυτεύεται κυρίως στην ανατολική Κρήτη, που είναι μια από τις αρχαιότερες οινοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας. Το όνομα της είναι συντμημένος τύπος του ιουλιάτικο, που αναφέρεται στον Ιούλιο μήνα. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε γενικά στην Κρήτη για να περιγράψει διαφόρων ειδών καρπούς πρώιμης ωρίμανσης, αλλά το Λιάτικο σταφύλι, πραγματικά ωριμάζει στις αρχές Ιουλίου, πράγμα που εξηγεί, εν μέρει τουλάχιστον, τη δημοτικότητα του στην ανατολική Κρήτη. Η ξηρότητα της ατμόσφαιρας αυξάνεται από τα δυτικά προς τα ανατολικά του νησιού, και συνεπώς μια πρωιμότατα ωριμάζουσα ποικιλία εκτιμάται στην Ανατολική πλευρά.

Η περιοχή όπου το Λιάτικο κυριαρχεί στους αμπελώνες είναι η γνωστή ως Σητεία. Η περιοχή αυτή όμως, δεν έχει και το αποκλειστικό προνόμιο στη χρήση του Λιάτικου. Μια άλλη περιοχή νοτιοδυτικά του Ηρακλείου, στην οποία καλλιεργείται το Λιάτικο, είναι οι Δάφνες, στους βόρειους πρόποδες του Ψηλορείτη. Επίσης καλλιεργείται και στις Κυκλάδες, τα Δωδεκάνησα, την Δυτική Πελλοπόνησο και την Ζάκυνθο.

❖ **Μαντηλάρι.**

Ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται σε Κρήτη, Ρόδο, Πάρο, Σαντορίνη, λοιπές Κυκλάδες και Δωδεκάνησα, Αττική, Εύβοια, Χαλκιδική, Νησιά Β.Αιγαίου, Αχαϊα, Ηλεία και Μεσσηνία.

❖ **Κοτσιφάλι.**

Ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται σε Κρήτη και Κυκλάδες. Πρόκειται για μια ποικιλία που ευδοκιμεί σε αργιλώδη εδάφη ασβεστολοθικού χαρακτήρα.

❖ Βιδιανό.

Ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται στο Ν. Ρεθύμνου της Κρήτης.

❖ Σουλτανίνα (Thompson Seedless).

Η φυτογεωγραφική προέλευση του τυπικού κλώνου της καλλιεργούμενης Σουλτανίνας, καθώς και των λευκών και έγχρωμων παραλλαγών αυτής, εντοπίζεται στην παρά την Κασπία θάλασσα επαρχία Σουλτανιέ της Περσίας. Από εκεί η Σουλτανίνα εισήχθη στη Μικρά Ασία , καλλιεργούμενη αρχικά στην κοιλάδα του Έρμου ποταμού (Μαγνησία) και σε περιοχές των παραλίων της Σμύρνης.

Στην Ελλάδα η πρώτη γνωστή περίπτωση καλλιέργειας σημειώνεται στην περιφέρεια της Αργολίδας, στο Ναύπλιο (1838). Στη συνέχεια σημειώνεται έναρξη της καλλιέργειας Σουλτανίνας στην περιφέρεια της Σητείας της ανατολικής Κρήτης (1901), αλλά η αρχική αλματώδης επέκταση της καλλιέργειας της Σουλτανίνας στην Ελλάδα εκδηλώνεται κατά τους πρώτους διωγμούς των Ελλήνων της Ιωνίας (1912-14) και της επακόλουθης εισροής αυτών στη μητροπολιτική Ελλάδα.

Νέα ώθηση στην επέκταση της καλλιέργειας αυτής εκδηλώνεται το 1923, μετά την Μικρασιατική καταστροφή και την μαζική μετανάστευση στην Ελλάδα των Ελλήνων της Μικράς Ασίας. Από την εποχή αυτή σημειώνεται ραγδαία επέκταση της καλλιέργειας Σουλτανίνας στον νομό Ηρακλείου της Κρήτης, λόγω της εγκαταστάσεως πολλών προσφύγων. Επίσης καλλιεργείται στον νομό Κορινθίας και σε μικρότερη κλίμακα απαντά στους νομούς Λασιθίου, Ρεθύμνου, Χανίων, Δωδεκανήσου και Ηλείας.

Η Σουλτανίνα καλλιεργείται σε σημαντικές εκτάσεις στην Τουρκία (Soultaniye Royal, Sirihi Sultani, Cekirdeksiz, Karaburun Sultana, Kishmish), στην Κύπρο, στην Περσία, στο Αφγανιστάν, στην Καλιφόρνια, στην Αυστραλία και την Ν.Αφρική. Επίσης απαντά στην Αιγυπτο, στο Ισραήλ που καταλαμβάνει τα 18% των αμπελοφόρων εκτάσεων. Στο Λίβανο, στην Ιταλία (Sultanina bianca), στην Ισπανία (Sultanina blanca), στην Αλγερία, στη Χιλή και στην Αργεντινή.

Όσον αφορά την καταγωγή της Σουλτανίνας ο καθηγητής Β. Κριμπάς διατύπωσε την άποψη ότι άμεσος πρόγονος του τυπικού καλλιεργούμενου κλώνου Σουλτανίνας είναι η εγγίγαρτος παραλλαγή της, το Αγριοσουλτανί, που απαντά

στην Κρήτη, και όσον αφορά τον απώτερο πρόγονο αυτής, αποδέχονται ότι αυτός πρέπει να ανήκει στην ποικιλία Ραζακί.

1.3.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ, ΚΛΩΝΩΝ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΩΝ *Vitis vinifera L.* και *Vitis* species.

Μέχρι τη δεκαετία του ’70, η ταυτοποίηση των γενοτύπων *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 αποτελεσματικότητα της. Επίσης απαιτείται η χρήση νωπών δειγμάτων, που δυσχεραίνει το έργο των αμπελογράφων.

Πιο συγκεκριμένα, οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για τη μελέτη της ταυτοποίησης και διαφοροποίησης των ποικιλίων, η αμπελογραφία και η αμπελομετρία, 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 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. Διάφορες τεχνικές για τον μοριακό χαρακτηρισμό των οργανισμών αναπτύχθηκαν τα τελευταία είκοσι χρόνια (Karp *et al.,* 1998), και οι περισσότερες από αυτές έχουν εφαρμοστεί στη μελέτη της διαφοροποίησης ποικιλιών αμπέλου.

Η χρησιμότητα διαφόρων ενζυμικών συστημάτων για **ισοενζυμική ανάλυση** των ποικιλιών αμπελιού, μελετήθηκε από τους Schaefer (1971), Staurakakis and

Loukas (1983), Benin *et al.* (1998), Eiras-Dias *et al*. (1989), and Calo *et al.* (1989). Όμως, η έκφραση των ενζύμων ίσως να εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού ή τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Μόνο ενζυμικά συστήματα τα οποία δεν εμφανίζουν μεταβολές σε διαφορετικές συνθήκες, μπορούν να θεωρηθούν ως ισοενζυμικοί δείκτες. Αυτό περιορίζει τον αριθμό των διαθέσιμων δεικτών, και επακόλουθα μειώνει τον βαθμό πολυμορφισμού και διαφοροποίησης που αναδεικνύει η ισοενζυμική 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.

Το επόμενο βήμα στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών ήταν η ανάλυση σε επίπεδο **DNA**, αφού το DNA ενός συγκεκριμένου φυτού είναι ταυτόσημο σε όλα τα κύτταρα κάθε ιστού, και σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Το DNA μπορεί να ληφθεί από κάθε τύπου διαθέσιμο ιστό, και η ανάλυση του μπορεί να διεξαχθεί οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια του έτους. Τα χαρακτηριστικά του DNA δεν επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες των φυτών. Επομένως, η ανάλυση του DNA 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 αυτών. Οι αλλαγές αυτές σε επίπεδο DNA μπορούν να δειχτούν με διάφορους τρόπους: απευθείας μέσω του DNA ή 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.

1.3.1.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΗΜΑΝΤΕΣ

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

1. **Πολυμορφισμοί στις πρωτεΐνες:**

- **Αποθηκευτικές πρωτεΐνες σπόρου.**

- **Ισοένζυμα και αλλοένζυμα:** είναι διαφορετικές μοριακές μορφές ενός ενζύμου. Τα αλλοένζυμα είναι διαφορετικές μοριακές μορφές ενός ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα ενός γενετικού τόπου. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μοριακές μορφές ενός ενζύμου που κωδικοποιούνται από περισσότερους του ενός γενετικούς τόπους.

2. **Πολυμορφισμοί στο DNA:**

- **Πολυμορφισμοί ζεύγους βάσεων:** αλλαγές, προσθήκη ή διαγραφή μιας βάσης.
- **Αναδιάταξη μιας αλληλουχίας DNA:** διαγραφή, 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 μινιδορυφορικές 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. Αυτές είναι οι μινιδορυφόροι, 15-70 base pairs (bp), και οι μικροδορυφόροι, 2-6 bp.

Το μεγάλο πλεονέκτημα των DNA πολυμορφισμών εκτός από την υψηλή συχνότητα τους, αποτελεί το γεγονός ότι δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ανάλυση τους μπορεί να διεξαχθεί σε οποιοδήποτε όργανο και κατά την διάρκεια οποιουδήποτε αναπτυξιακού σταδίου του φυτού.

Ο αριθμός των τεχνικών που ανιχνεύουν πολυμορφισμούς του DNA είναι σταθερά αυξανόμενος. Το σύνολο αυτών των τεχνικών στηρίζονται σε διαφορετικούς τύπους ηλεκτροφορητικών ζωνών. Αυτές είναι αποτέλεσμα διαφορών στο μήκος των παρατηρούμενων τμημάτων του DNA. Τα τμήματα αυτά προκύπτουν:

- Από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (RFLPs, CAPS, Microsatellites)
- Με πολλαπλασιασμό 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.

1.3.1.2 RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OR RFLP.

Στην τρέχουσα δεκαετία, αναπτύχθηκαν οι μοριακοί σημαντές του DNA, όπως οι RFLPs και RAPDS (This *et al*., 1997, Ye *et al.,* 1998, κ.α.), για τη γενετική ταυτοποίηση των γενοτύπων *Vitis*. Όμως, ούτε αυτές οι μέθοδοι έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το πρωτεϊνικό πρότυπο επηρεάζεται από ενδογενείς (αναπτυξιακούς κ.α.) και εξωγενείς (περιβαλλοντικούς, κ.α.) παράγοντες, ενώ οι μοριακοί σημαντές (RFLPs, RAPDs, κ.α.) δεν επιτρέπουν την διάκριση όλων των ποικιλιών, για τις οποίες έχουν μελετηθεί. Επιπρόσθετα, οι παραπάνω μέθοδοι είναι αρκετά χρονοβόρες κι έχουν υψηλό κόστος.

Σε μία κλασσική RFLP ανάλυση, το γενωμικό DNA επεξεργάζεται με ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, το οποίο κόβει το DNA σε τμήματα διαφόρων μηκών, 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 ενός περιοριστικού ενζύμου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας θέσης περιορισμού ή την απώλεια μιας υπάρχουσας, έτσι ώστε να αλλάζουν τα μεγέθη των ζωνών που δίνει η πέψη με αυτό το ένζυμο. 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.

1.3.1.3 RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό μέσω PCR συγκεκριμένων γενωμικών τμημάτων χρησιμοποιώντας μόνο ένα μικρού μήκους εκκινητή και χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης. Ο εκκινητής μπορεί να προσδεθεί σε διαφορετικές θέσεις, διασκορπισμένες στο γένωμα.

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 της μεθόδου, 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 μετατρεπόμενοι σε SCARs, εξακολουθούν να παραμένουν χρήσιμοι για την χαρτογράφηση του γενώματος, όταν συνδυάζονται μ'ένα συγκεκριμένο φαινότυπο (Lahogue *et al.,* 1998; This *et al*., 2000).

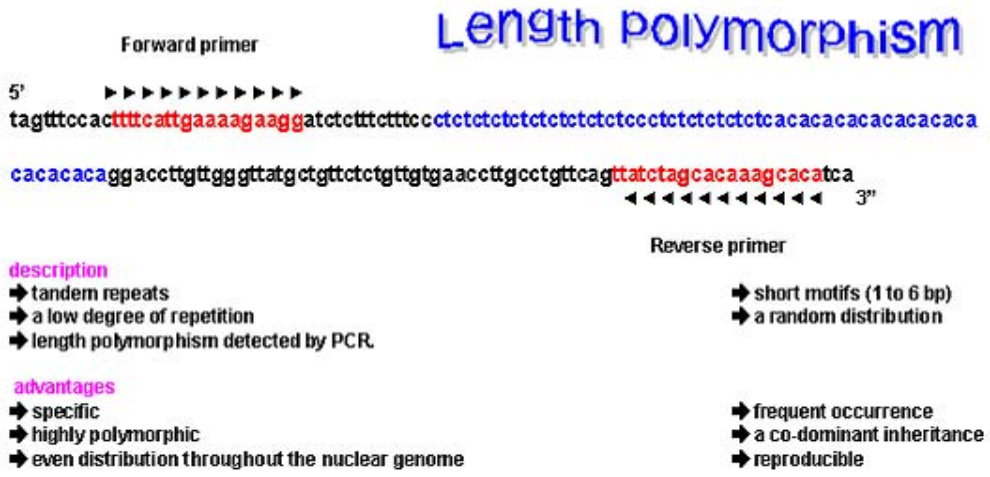
Επειδή καμιά από τις παραπάνω μεθοδολογίες δεν πληρούσε τις προϋποθέσεις ενός ιδανικού συστήματος ταυτοποίησης, η έρευνα καταλληλότερων μοριακών δεικτών οδήγησε στους μικροδορυφορικούς σημαντές. Οι παραπάνω, έχοντας ήδη μελετηθεί σε ζωντανούς οργανισμούς (και τον άνθρωπο), αναπτύχθηκαν επίσης και στο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

1.3.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟΙ ΣΗΜΑΝΤΕΣ;

Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων απλών αλληλουχιών (π.χ. CACACA…) στο φυτικό πυρηνικό DNA, αναδείχτηκε από τον Delseny *et al*. (1983). Επακόλουθα φάνηκε, ότι απλές αλληλουχικές επαναλήψεις (καλούνται και μικροδορυφόροι) ήταν συχνές στους περισσότερους οργανισμούς, περιλαμβανομένων των φυτικών και οργανιδικών γενωμάτων (Lagercrantz *et al.,* 1993; Wang *et al*., 1994), και ότι αυτές οι αλληλουχίες αναπαριστούν μία σημαντική πηγή γενετικής ποικιλότητας (Tautz *et al*., 1986), χρήσιμης 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, που καλούνται επίσης και ως sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR) ή simple sequence length polymorphisms (SSLP), αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις, που χαρακτηρίζονται από βραχέα μοτίβα (1 έως 6 bp), μικρό βαθμό επαναληψιμότητας (5 έως 100 επαναλήψεις) και τυχαία κατανομή στο γονιδίωμα (10^4 με 10^5 per genome).

Παρ' ότι ορισμένοι απαντώνται συχνά σε μεταγραφικές μονάδες, καμία συγκεκριμένη λειτουργία δεν μπορεί να αποδοθεί στους μικροδορυφόρους και ίσως διατηρούνται αποκλειστικά χάρη στην ικανότητα 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.



Εικ.1.3.2 Παράδειγμα μικροδορυφορικού τόπου, δινουκλεοτιδικού τύπου, από το Vitis vinifera (Εικόνα από Greek Vitis Database, A multimedia web-backed genetic database for germplasm management of Vitis resources in Greece, By Francois LEFORT and Kalliopi A. ROUBELAKIS-ANGELAKIS, Laboratory of Plant Physiology and Biotechnology, Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece).

Οι μικροδορυφόροι εμφανίζουν υψηλό πολυμορφισμό, παρουσιάζουν συνεπικρατή κληρονομικότητα, επιτρέποντας έτσι τον διαχωρισμό μεταξύ ομοζυγωτικών και ετεροζυγωτικών καταστάσεων σε διπλοειδείς οργανισμούς, εμφανίζονται συχνά και συνήθως κατανέμονται ομοιόμορφα στο πυρηνικό γονιδίωμα, όπου εμφανίζουν ουδέτερη συμπεριφορά, όσον αφορά την επιλογή. Είναι υπερπολυμορφικοί επειδή συνήθως δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες κι επομένως, καμιά μεταλλαγή δεν μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία τους. Είναι δυνατόν να ανιχνευθούν τόσο στο πυρηνικό γένωμα όσο και στο χλωροπλαστικό (Lefort 1999, Vendramin *et al.* 1996), αλλά ακόμα και στο μιτοχονδριακό (Lefort 1999, Soranzo *et al.* 1998a). Ο πολυμορφισμός του μήκους τους, λόγω διαφορετικού αριθμού επαναλήψεων εντός της μικροδορυφορικής περιοχής, ανιχνεύεται εύκολα με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν τους μικροδορυφόρους πολύ χρήσιμους μοριακούς σημαντές τόσο στη βασική όσο και την εφαρμοσμένη έρευνα.

Σημαντές έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στην Αμπελουργία για ταυτοποίηση ποικιλιών, για μελέτες καταγωγής, για επιβεβαίωση ή ακύρωση συνωνύμων (Cipriani

et al., 1994, Thomas *et al*., 1994, Botta *et al*., 1995, Bowers and Meredith, 1997 Sefc *et al.,* 1997, 1998 a,b), καθώς και για μελέτες γενετικής ποικιλότητας (Sefc *et al.,* 1999b,c), ή για την κατασκευή γενετικού χάρτη της αμπέλου (Riaz and Meredith, 1999). Επίσης, με τους συγκεκριμένους μικροδορυφόρους έχει μελετηθεί η ποικιλότητα κλωνικών σειρών (Vignani *et al*., 1996, Silvestronio *et al.* 1997). Εξ'άλλου, η συλλογή τέτοιων μικροδορυφορικών αλληλουχιών σε Βάσεις Δεδομένων, που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εμπορικούς σκοπούς πιστοποίησης, βρίσκεται υπό προετοιμασία (Scott *et al.,* 1996; Thomas *et al*., 1998). Τα μικροδορυφορικά πρότυπα, αναπαριστάνονται από τα μεγέθη των αλληλομόρφων που ανιχνεύονται, και δίνονται σε bp (base pairs).

Η ταυτοποίηση και ο καθορισμός των μικροδορυφορικών δεικτών σ΄'έναν οργανισμό είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία που περιλαμβάνει την κατασκευή και την ανίχνευση γενωμικών βιβλιοθηκών καθώς και τον σχεδισμό των απαραίτητων PCR εκκινητών. Ευτυχώς, μικροδορυφορικοί εκκινητές που αποκτούνται για ένα είδος, πολύ συχνά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συγγενικά είδη του ίδιου γένους και κάποιες φορές, μεταξύ υποομάδων της ίδιας φυλογενετικής οικογένειας.

1.3.2.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟ VITIS.

Πρώτοι οι Thomas *et al.* (1993), ανακάλυψαν την χρήση του επαναληπτικού DNA για την ταυτοποίηση ποικιλιών αμπελιού. Έδειξαν, ότι μικροδορυφορικές αλληλουχίες υπήρχαν άφθονες στο αμπέλι, και ότι ήταν πολύ χρήσιμες για την ταυτοποίηση ποικιλιών *V.vinifera*. Επιπλέον, αλληλουχίες μικροδορυφορικών εκκινητών διατηρούνταν μεταξύ των ειδών *Vitis* και *Muscadinia* (Thomas and Scott, 1993). Δείχτηκε ακόμα, μέσω της γενεαλογικής ανάλυσης, ότι τα μικροδορυφορικά αλληλόμορφα κληρονομούνται με συνεπικρατή Μεντελιανό τρόπο (Thomas and Scott, 1993) επιβεβαιώνοντας την χρησιμότητα τους για γενετική χαρτογράφηση και εξακρίβωση φυλογενετικών συσχετίσεων (Thomas *et al*., 1994).

Η ακολουθούμενη διαδικασία για την ανάπτυξη ενός μικροδορυφορικού δείκτη, περιλαμβάνει την κατασκευή μιας γενωμικής βιβλιοθήκης από μια ποικιλία ή υποκείμενο αμπελιού, ανίχνευση της γενωμικής βιβλιοθήκης με μικροδορυφορικούς ανιχνευτές, αλληλούχιση των κλώνων που περιλαμβάνουν τις μικροδορυφορικές περιοχές, σχεδιασμό των PCR εκκινητών από τις αλληλουχίες που περιβάλλουν την μικροδορυφορική περιοχή, καθορισμό των PCR συνθηκών και χαρακτηρισμό των μικροδορυφορικών πολυμορφισμών. Συνολικά, περίπου 40 μικροδορυφορικοί δείκτες

έχουν αναπτυχθεί σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία (Thomas *et al.*, 1993; Bowers *et al.,*1996; 1999b; Sefc *et al.,* 1999).

Η αναζήτηση περισσότερων μικροδορυφορικών τόπων, που να χρησιμοποιούνται ως σημαντές για το είδος *Vitis,* είναι ο στόχος της διεθνούς προσπάθειας γενετιστών, που ασχολούνται με το είδος αυτό, δηλαδή να αναπτύξουν τεχνογνωσία, που μέχρι πρόσφατα μελετούνταν μόνο στην Ιατρική και τη Ζωολογία. Η διαθεσιμότητα σημαντών θα χρησιμεύει όχι μόνο στη δημιουργία γενετικού χάρτη του είδους *Vitis vinifera,* όπου τα γονίδια μπορούν να συνδέονται με τέτοιους σημαντές, αλλά επίσης η εύρεση περισσότερων σημαντών δίνει τη δυνατότητα ανεύρεσης ειδικών για την ποικιλία αλληλομόρφων, ή ακόμα καλύτερα, ειδικών για την ποικιλία τόπων, που θα μειώσουν δραστικά το κόστος προσδιορισμού του γενοτύπου για τη βέλτιστη ακρίβεια.

1.3.2.2 ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ESTs (Expressed Sequence Tags): ΜΙΑ ΝΕΑ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ (Sefc et al., 2001).

Οι περισσότερες από τις πρώτες μελέτες, που έγιναν σε μικροδορυφόρους στον άνθρωπο, τα ζώα και τα φυτά, στηρίχτηκαν σε δημοσιευμένες βάσεις δεδομένων όπως του EMBL και της Genbank, που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές μικροδορυφορικών τόπων. Η παραπάνω μέθοδος, βρίσκει ακόμα εφαρμογή και πρόσφατα παραδείγματα αποτελούν οι μικροδορυφορικές περιοχές που ταυτοποιήθηκαν στην πατάτα (Milbourne *et al*., 1998), το κριθάρι (Becker and Heun, 1995), την τομάτα (Smulders *et al*., 1997), καθώς και σε πολλά άλλα φυτικά είδη (Gupta *et al.,* 1996).

Σχετικά νέοι τύποι βάσεων δεδομένων είναι εκείνοι που περιλαμβάνουν δεδομένα τύπου cDNA και ESTs (Expressed Sequence Tags). Ταυτοποίηση μικροδορυφόρων σε ESTs, είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά κατά τη μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος (Haddad *et al*., 1997), κι έχει γίνει διαθέσιμη στα φυτά τα τελευταία χρόνια.

Τα ESTs, είναι μικρού μήκους (100-150 bp) μοναδιαίες αλληλουχίες της ‘3 μη μεταφραζόμενης περιοχής των γονιδίων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του πλήρους cDNA κλώνου. Από αυτά μπορούν να προκύψουν STSs, και μ΄αυτόν τον τρόπο STSs (Sequence Tagged Sites) και cDNA κλώνοι να ενσωματωθούν στους φυσικούς χάρτες ή μέσω της τεχνολογίας ακτινοβολημένων υβριδίων, στους γενετικούς χάρτες. Τα STSs είναι μοναδιαίες αλληλουχίες DNA

μικρού μεγέθους (100-150 bp) που ανιχνεύονται με την αντίδραση PCR σε κλώνους γενωμικού DNA.

Στις μέρες μας, η τεχνολογία των ESTs έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία στο ρύζι (Miyao *et al.,* 1996; Cho *et al*.,2000), και την άμπελο (Scott *et al.,* 2000b).

Ανίχνευση των EST βάσεων δεδομένων, είναι μια γρήγορη και φτηνή διαδικασία για ταυτοποίηση μικροδορυφορικών τόπων οποιουδήποτε μοτίβου και τύπου επαναληπτικότητας, και οδηγεί στην απόκτηση PCR εκκινητών με υψηλά συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης, που επιτρέπουν εξειδικευμένη λειτουργία μεταξύ ευρέου φάσματος ταξινομικών βαθμίδων, συγκρινόμενοι με εκκινητές που βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές του γενώματος. Οι ESTs προερχόμενοι δείκτες, συσχετιζόμενοι με γονιδιακά πλούσιες περιοχές του γενώματος, ίσως αποδειχθούν εξαιρετικά χρήσιμοι για την γενετική χαρτογράφηση. Όμως ο υψηλός βαθμός συντήρησης αυτών των περιοχών, μειώνει το επίπεδο πολυμορφισμού, συγκριτικά με τους μικροδορυφόρους οι οποίοι λειτουργούν αποκλειστικά σχεδόν, ως ουδέτεροι δείκτες.

Φυσικά, η ταυτοποίηση μικροδορυφορικών τόπων από EST βάσεις δεδομένων, στηρίζεται στην προϋπάρχουσα γνώση αυτού του τύπου δεδομένων. Για την άμπελο, ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων έχει δημοσιευτεί από τους Ablett *et al*.(1998), κι έχει ανιχνευτεί για μικροδορυφορικούς δείκτες από τους Scott *et al.*(2000b). Περισσότεροι από 100 μικροδορυφόροι έχουν ταυτοποιηθεί και η επιπλέον μελέτη κάποιων από αυτούς τους γενετικούς τόπους, έδειξε αρκετά υψηλό πολυμορφισμό για να επιτρέψει τη διάκριση ποικιλιών και υποκειμένων αμπέλου.

1.3.2.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥΣ SSR ΔΕΙΚΤΕΣ.

Η πρωταρχική μελέτη μικροδορυφορικών περιοχών από τους Thomas and Scott (1993) στο CSIRO Plant Industry, της Αυστραλίας, κατέληξε στη δημοσίευση της ταυτοποίησης σε επίπεδο DNA, 26 ποικιλιών *V. Vinifera* και 6 πρόσθετων ειδών *Vitis* όσο και *Muscadinia rotundifolia.* Αυτή η μελέτη επακόλουθα επεκτάθηκε σε περισσότερους από 80 γενότυπους, περιλαμβάνοντας υποκείμενα αμπέλου, ποικιλίες οινοποιίας, ποικιλίες επιτραπέζιων σταφυλιών καθώς και ποικιλίες σταφιδοποίησης (Thomas *et al.,* 1994). Πρόσφατα, μια DNA βάση δεδομένων μικροδορυφορικών προτύπων, περισσότερων από 200 γενοτύπων, αναπτύχθηκε στο CSIRO.

Η αναπαράσταση των μικροδορυφορικών ζωνών είναι σχετικά απλή διαδικασία, και τα δεδομένα αποθηκεύονται με τη μορφή μεγεθών αλληλομόρφων εκφρασμένων σε base pairs (bp). Τα μικροδορυφορικά δεδομένα, που αποκτούνται από ένα μελετούμενο άτομο, αναπαριστούν το μικροδορυφορικό πρότυπο ολόκληρης της ποικιλίας, όπου αυτό ανήκει. Τα αποτελέσματα της μικροδορυφορικής ανάλυσης μπορούν να αναπαραχθούν και να συγκριθούν από διαφορετικά ερευνητικά εργαστήρια ή σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η δυνατότητα των μικροδορυφορικών δεικτών να ταυτοποιήσουν και να διαχωρίσουν ποικιλίες και υποκείμενα αμπελιού, έχει δειχτεί από διάφορες μελέτες (Thomas and Scott, 1993; Thomas *et al.,* 1994; Cipriani *et al.,* 1994; Bowers *et al.,* 1996; Sefc *et al*., 1998a;1998b;1998c; 1998d;1999;Sanchez-Escribano *et al*., 1999). Προκειμένου να περιοριορισθεί ο αριθμός των μικροδορυφορικών δεικτών που απαιτούνται για έναν επιτυχή διαχωρισμό ποικιλιών, είναι απαραίτητο να επιλεγούν οι δείκτες εκείνοι που μας παρέχουν τις περισσότερες γενετικές πληροφορίες.

Η ποικιλομορφία ενός γενετικού τόπου περιγράφεται κυρίως από τις συχνότητες των αλληλομόρφων του. Δύο τέτοιες μονάδες μέτρησης, αποτελούν οι εξής:

- Propability of Identity (PI) (Paettkau *et al*.,1995, εφαρμόστηκε στην γονιδιακή μελέτη της αμπέλου από τους Sefc *et al*., 1999, 2000).
- Discrimination Power (D) (Tessier *et al*.,1999), στηρίζεται στον τρόπο σύνδεσης ή στις γενοτυπικές συχνότητες σ΄ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο.

Και οι δύο παραπάνω μονάδες μέτρησης, περιγράφουν την πιθανότητα, δύο μη σχετιζόμενες μεταξύ τους ποικιλίες να μπορούν να διαχωριστούν από ένα συγκεκριμένο δείκτη.

Στους υπερπολυμορφικούς μικροδορυφορικούς γενετικούς τόπους του Vitis, οι τιμές του pI μπορούν να κυμαίνονται στο 0,05, που αντιστοιχεί σε 5% πιθανότητα, μη συγγενικές μεταξύ τους ποικιλίες να μοιράζονται τον ίδιο γονότυπο. Συνδυάζοντας τα δεδομένα πέντε υψηλά πολυμορφικών μικροδορυφορικών δεικτών, η θεωρητική πιθανότητα για μη διαχωρίσιμα μικροδορυφορικά πρότυπα, από διαφορετικές ποικιλίες, είναι μικρότερη του 10^{-5} (Sefc *et al*.,1999).

Μία υψηλή τιμή του D, αντιπροσωπεύει χαμηλή πιθανότητα μη διαχωρισμού των μελετούμενων ποικιλιών (1-D), και τιμές του D όπως 0,895 και 0,697, έχουν υπολογιστεί για ένα υψηλά κι έναν μέτρια πολυμορφικό μικροδορυφορικό τόπο, αντίστοιχα (Tessier *et al.,* 1999).

Εξ΄αιτίας της υψηλής διαχωριστικής δύναμης της γενετικής ανάλυσης, η εύρεση ταυτόσημων γενοτύπων σε δύο διαφορετικά φυτά, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι αυτά τα φυτά ανήκουν στην ίδια ποικιλία. Ακόμα, η μικροδορυφορική ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιήσει φυτά άγνωστης προέλευσης, συγκρίνοντας τον γενότυπο αυτών με γνωστούς γενοτύπους ποικιλιών που έχουν καταχωρηθεί σε βάση δεδομένων. Επίσης,η μικροδορυφορική ανάλυση μπορεί να εφαρμοστεί για να καθοριστεί και να επιβεβαιωθεί η παρουσία συνωνύμων, π.χ. ταυτόσημοι γενότυποι που είναι ευρέως γνωστοί με διαφορετικά ονόματα, καθώς και για να μελετηθεί η ποικιλότητα κλωνικών σειρών (Vigniani *et al*., 1996, Silvetronio *et al.,* 1997). Π.χ. η μικροδορυφορικής ανάλυση των Ιταλικών ποικιλιών οινοποιίας έδειξε ότι οι ποικιλίες Refosco di Faedis και Refoscono είναι συνώνυμες (Cipriani *et al*.,1994), καθώς και οι ποικιλίες Favorita, Pigato, και Vermentino (Botta *et al.,* 1995). Όμοια, η πορτογαλική ποικιλία Moscatel de Setubal φάνηκε ότι ήταν ταυτόσημη με τις ποικιλίες Muscat of Alexandria (Lopes *et al*., 1999) και Moschato Alexandreias (Lefort *et al.,* 2000a). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η μικροδορυφορική ανάλυση δεν επιβεβαίωσε όλες τις περιπτώσεις συνωνύμων που είχαν βρεθεί πριν, βάσει ισοενζυμικού πολυμορφισμού όπου χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα τεσσάρων ενζύμων (Eiras-Dias and Bruno-Sousa,2000), στις Πορτογαλικές ποικιλίες. Αυτό απέδειξε και την υψηλή διαχωριστική ικανότητα των μικροδορυφορικών δεικτών.

1.3.2.4 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΩΝ ΣΤΗΝ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΙΟΥ.

Οι περισσότερες από τις ποικιλίες αμπελιού που υπάρχουν σήμερα, χρονολογούνται αρκετούς αιώνες πριν. Εξ'αιτίας της μεγάλης σημαντικότητας των, είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον να κατανοήσουμε τα γενετικά γεγονότα που οδήγησαν στο σημερινό φάσμα των καλλιεργούμενων ποικιλιών.

Χρησιμοποιώντας μεθόδους γενετικής ανάλυσης, «πατρικές» ποικιλίες καθώς και οι απόγονοι αυτών μπορούν να αναγνωριστούν, και γενεαλογικές αναλύσεις που περιγράφουν την γενετική ιστορία των ποικιλιών αμπελιού, είναι δυνατό να εξαχθούν. Ενώ τύποι μοριακών δεικτών όπως είναι τα RAPDs και τα ισοένζυμα, βρίσκουν περιορισμένη εφαρμογή σε γενεαλογικές μελέτες (Ohmi *et al*., 1993; Buscher *et al.,* 1994), οι μικροδορυφόροι φαίνεται ότι είναι οι καταλληλότεροι δείκτες για την παραπάνω έρευνα, κληρονομούμενοι ως γνωστόν, με συνεπικρατή Μεντελιανό τρόπο. Σε μια διασταύρωση, κάθε ένα από τα άτομα της πατρικής γενιάς, μεταβιβάζει ένα αλληλόμορφο για κάθε γενετικό τόπο στον απόγονο του, και επακόλουθα, κάθε αλληλόμορφο που απαντάται σ΄ένα άτομο θα πρέπει να συναντάται και τουλάχιστον στον ένα από τους δύο γονείς του (πίνακας 1.3.2.4).

Locus	St.Laurent	Zweigelt	Blaufränkisch
ssrVrZAG7	157:157	155:157	155:155
ssrVrZAG15	175:177	165:175	165:165
SsrVrZAG21	200:206	202:206	202:206
ssrVrZAG 25	225:236	225:236	225:225
ssrVrZAG 30	149:151	147:151	147:149
ssrVrZAG 47	163:167	157:163	157:172
ssrVrZAG 64	139:163	139:159	139:159
ssrVrZAG 67	126:152	126:139	139:149
ssrVrZAG 79	238:246	236:238	236:250

Πίνακας 1.3.2.4. Παράδειγμα συνεπικρατούς Μεντελιανής κληρονόμησης των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων στην ελεγχόμενη διασταύρωση St. Laurent x Blaufränkisch. Σε κάθε γενετικό τόπο, ένα αλληλόμορφο από κάθε γονέα μεταφέρεται στην ποικιλία-απόγονο της πατρικής διασταύρωσης, Zweigelt. Οι αριθμοί αναπαριστούν τα μεγέθη των αλληλομόρφων σε base pairs [Sefc et al. (1997)].

Επομένως, εξετάζοντας την σύσταση των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων ενός ατόμου, και τους δύο υποθετικούς γονείς του, είναι πιθανό να αποδεχτούμε ή να απορρίψουμε την προτεινόμενη καταγωγή αυτού.

Προκειμένου να εξασφαλισθεί ένα ικανοποιητικό επίπεδο αξιοπιστίας για τις γενεαλογικές μελέτες, χρησιμοποιώντας αποκλειστικά μικροδορυφορικούς δείκτες, είναι απαραίτητο να συμπεριληφθούν δεδομένα από ένα μεγάλο αριθμό μη σχετιζόμενων μεταξύ τους, γενετικών τόπων. Η έρευνα για πατρικές ποικιλίες και για ποικιλίες που προκύπτουν από διασταύρωση των παραπάνω, σε μία συλλογή ποικιλιών αμπέλου, διεξάγεται συγκρίνοντας τα πρότυπα των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, σχηματίζοντας και μελετώντας όλους τους πιθανούς συνδυασμούς τριών ποικιλιών, προκειμένου να καθορισθεί για κάθε συνδυασμό, το πιθανό ζεύγος ποικιλιών που περιλαμβάνει τα αλληλόμορφα της τρίτης (θυγατρικής) ποικιλίας. Για τον περιορισμό της πιθανότητας σφάλματος κατά την παραπάνω μελέτη, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μικροδορυφορικών δεικτών.

1.3.2.5 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ *VITIS VINIFERA* ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.

Η καλλιέργεια αμπέλου, έχει μια παράδοση αρκετών χρόνων στην Νότια και Κεντρική Ευρώπη. Ήδη από το 2300 π.Χ., οι Μινωίτες και οι Κυκλαδίτες άρχισαν να μαθαίνουν και να εφαρμόζουν τεχνικές καλλιέργειας πιθανότατα από την γειτονική τους Αίγυπτο (Marangou, 1991). Μέθοδοι καλλιέργειας αμπελιού και παραγωγής κρασιού, ήταν γνωστές στους Αιγύπτιους ήδη από το 6000 π.Χ.(Mc Govern *et al*., 1995; 1996). Από το 800 π.Χ, οι Έλληνες και οι Φοίνικες κατάφεραν να μεταφέρουν τις γνώσεις για τις παραπάνω τεχνικές σε περιοχές της Δύσης. Από αρχαία κείμενα, στηρίζεται ότι οι Ρωμαίοι μετέφεραν την τεχνογνωσία για την καλλιέργεια αμπελιού σε περιοχές της σημερινής Γαλλίας, Γερμανίας και Αυστρίας. Δεν είναι απίθανο βέβαια να προϋπήρχαν στις παραπάνω περιοχές ποικιλίες αμπελιού πριν από την εμφάνιση των Ελλήνων και των Ρωμαίων. Επίσης τονίζεται ότι «άγρια» είδη αμπέλου υπήρχαν άφθονα σε περιοχές της Νότιας και Κεντρικής Ευρώπης, και ότι διασταυρώσεις μεταξύ ποικιλιών αμπελιού διαφορετικών περιοχών ίσως να υπήρξαν καθοριστικές.

Σήμερα δεν είναι γνωστό πόσες από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες μιας περιοχής είναι μοναδικές για την περιοχή αυτή, και δεν αποτελούν συνώνυμα ποικιλιών που καλλιεργούνται και κάπου αλλού. Μία αξιόπιστη μέθοδος για την επίλυση τέτοιου είδους προβλημάτων, θα αποτελούσε ο καθορισμός και η σύγκριση σταθερών γενετικών προτύπων που προκύπτουν από δείγματα διεθνώς

καλλιεργούμενων ποικιλιών. Χρησιμοποιώντας μικροδορυφορικούς δείκτες, ταυτόσημα γενετικά πρότυπα μπορούν να αποτελέσουν ισχυρή ένδειξη για την ταυτοποίηση συνωνύμων, εντός και μεταξύ, των μελετούμενων περιοχών.

Μία συγκριτική μελέτη των τυπικών, για τις Ευρωπαϊκές περιοχές καλλιέργειας αμπέλου, ποικιλιών, που καλύπτει περιοχές από την Ελλάδα έως την Πορτογαλία (Sefc *et al*., 2000), έδειξε μία ομοιόμορφα υψηλή γενετική ποικιλομορφία σε όλα τα εξεταζόμενα γενετικά αποθέματα αμπελιού. Ο υψηλός αριθμός ετερόζυγων ατόμων που απαντήθηκαν, υπερέβαλε τον αναμενόμενο βαθμό ετεροζυγωτίας που στηρίζεται σ΄ένα τυχαίο συνδυασμό αλληλομόρφων. Γενικότερα, από τη συλλογή δεδομένων που αφορούν ποικιλίες αμπέλου διαφαίνεται ότι, οι τελευταίες είναι αρκετά πολυμορφικές στους μικροδορυφορικούς τόπους, και εμφανίζουν υψηλή ετεροζυγωτία. Τα παραπάνω διακρίνουν όχι μόνο τις ποικιλίες *V. Vinifera* αλλά και άλλα είδη *Vitis* (Botta *et al*., 1995, Thomas *et al*.,1994, Thomas and Scott 1993).

Πριν από την συστηματική καλλιέργεια τους, τα φυτά αμπέλου, ήταν δίοικα, και επεδείκνυαν υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας μέσω ετερομιξίας.

Η επιλογή επιτυχημένων, όσον αφορά την καλλιέργεια, φυτών αμπελιού, ευνοεί τα ετερόζυγα φυτά, ενώ παράλληλα η περίσσεια ετεροζυγωτίας είναι πιθανώς αποτέλεσμα τόσο ανθρώπινης όσο και φυσικής επιλογής, ενάντια στην ομοζυγωτία.

1.3.2.6 ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΙΚΟΙ SSR ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι μικροδορυφόροι βρίσκονται και στο χλωροπλαστικό γονιδίωμα, παρ'ότι οι αλληλουχίες είναι απλούστερες, βραχύτερες και λιγότερο πολυμορφικές. Στην άμπελο, ο χλωροπλάστης κληρονομείται από τον θηλυκό γονέα. Οι χλωροπλαστικοί μικροδορυφόροι είναι κατά το πλείστον μονονουκλεοτιδικού τύπου και είναι λιγότερι πολυμορφικοί, σε σχέση με τους πυρηνικούς μικροδορυφόρους. Επίσης, αποδίδουν ένα αλληλόμορφο ανά άτομο, διότι αν και ο αριθμός των χλωροπλαστών, που βρίσκονται σ΄ένα κύτταρο, μπορεί να είναι μεγάλος, ανήκουν όλοι στον ίδιο γενετικό τύπο. Ο ρυθμός των μεταλλάξεων είναι επίσης μικρότερος, διότι δεν υφίσταται μειωτικός ανασυνδυασμός στους χλωροπλάστες. Το γονιδίωμα του χλωροπλάστη εξελίσσεται με διαφορετική ταχύτητα σε σύγκριση με αυτό του πυρήνα και τέτοιοι δείκτες παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη μελέτη του αποικισμού καθώς και της μεταφοράς γονιδίων σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές.

Η ταυτοποίηση με τέτοιου τύπου μικροδορυφόρους έχει ιδιαίτερη σημασία για διασταυρώσεις, όταν είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τους γονείς ή για να

προσδιοριστούν οι πρόγονοι γνωστών ποικιλιών. Επίσης είναι αποτελεσματική για τη συμπλήρωση των δεδομένων του πυρήνα σε περίπτωση ασάφειας.

Πέντε οικουμενικοί χλωροπλαστικοί μικροδορυφορικοί δείκτες που αναπτύχθηκαν πρόσφατα (Weising and Gardner, 1999), δοκιμάστηκαν σε 77 ποικιλίες αμπελιού από την Ελλάδα και άλλες γεωγραφικές περιοχές (Lefort *et al*., 2000a; 2000b). Τα χαρακτηριστικά τους φαίνονται στον πίνακα 1.3.2.6 που ακολουθεί.

Primer name	Primer sequence	Length in bases	Exp. annealing temperature	Allele size range in Angiosperms
ccmp2 [F]	gatcccggacgtaatcctg	19	50	166-234
ccmp2 [R]	atcgtaccgagggttcgaat	20		
ccmp3 [F]	cagaccaaaagctgacatag	20	50	89-119
ccmp3 [R]	gtttcattcggctcctttat	20		
ccmp4 [F]	aatgctgaatcgaygaccta	20	50	115-220
ccmp4 [R]	ccaaaatattbggaggactct	21		
ccmp6 [F]	cgatgcatatgtagaaagcc	20	50	93-111
ccmp6 [R]	cattacgtgcgactatctcc	20		
ccmp10 [F]	tttttttttagtgaacgtgtca	22	50	91-300
ccmp10 [R]	ttcgtcgdcgtagtaaatag	20		

Πίνακας 1.3.2.6. Πέντε οικουμενικοί χλωροπλαστικοί μικροδορυφορικοί δείκτες που αναπτύχθηκαν πρόσφατα (Weising and Gardner, 1999).

Και οι πέντε από αυτούς έδωσαν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Οι 5 cp SSR γενετικοί τόποι απέδωσαν ένα σύνολο 13 αλληλομόρφων που οι συνδυασμοί αυτών, έδωσαν 17 χλωροπλαστικούς απλότυπους. Τα μεγέθη των αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο βρέθηκε να κυμαίνονται στην περιοχή των προηγούμενων δημοσιευμένων μεγεθών αλληλομόρφων για 27 είδη αγγειόσπερμων (Weising and Gardner, 1999). Οι τέσσερις από τους πέντε τόπους ήταν υψηλά πολυμορφικοί στις μελετούμενες ποικιλίες αμπέλου, και η γονιδιακή απόκλιση ήταν υψηλή με 17 ανιχνευόμενους απλότυπους στις 77 ποικιλίες αμπέλου.

Δεν υπάρχει σαφής συσχετισμός μεταξύ γεωγραφικών περιοχών και χλωροπλαστικών γενοτύπων, παρά μόνο μια τάση για μερικές ποικιλίες. Όταν οι πυρηνικοί μικροδορυφόροι αδυνατούν να διαχωρίσουν τις ποικιλίες, ένας

συμπληρωματικός καθορισμός του γενοτύπου με τους χλωροπλαστικούς μικροδορυφόρους μπορεί να διευκρινίσει κάθε ασάφεια.

1.3.2.7 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ SSR ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ VITIS VINIFERA ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η ύπαρξη νέων μοριακών δεικτών για την άμπελο, αποτελεί ισχυρό εργαλείο για την γενετική χαρτογράφηση του σε συνδυασμό και με άλλους μοριακούς δείκτες που ήδη έχουν ταυτοποιηθεί, όπως είναι οι RFLPs, CAPS, AFLPs και RAPDs. Η κατασκευή ενός γενετικού χάρτη της αμπέλου, προϋποθέτει την εύρεση χρήσιμων, πολυμορφικών δεικτών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε πολυάριθμες γενεαλογικές ομάδες και σχετιζόμενα μεταξύ των taxa.

Οι μικροδορυφορικοί εκκινητές που έχουν αναπτυχθεί για το *Vitis vinifera* έδειξαν ότι παρέχουν ομόλογα PCR προϊόντα σε αρκετά από τα είδη *Vitis* της Βόρειας Αμερικής (Thomas and Scott,1993; Sefc *et al*.,1998a) καθώς και σε είδη *Vitis* της Ασίας (Grando *et al*., 1999). Τα ευρήματα αυτά δίνουν την ευκαιρία της χρήσης των SSR για τον συνδυασμό γενετικών χαρτών από διαφορετικά είδη *Vitis*.

Οι Grando *et al*., (2000b,2000c), κατασκεύασαν ένα γενετικό χάρτη σύνδεσης, στηριζόμενοι σε μικροδορυφορικούς και AFLPs δείκτες στον F1 πληθυσμό μιας διασταύρωση μεταξύ *Vitis vinifera cv. Moschato bianco x Vitis riparia.* (Grando *et al.,*2000b;2000c).

Πρόσφατα, μια άλλη ερευνητική ομάδα κατάφερε να τοποθετήσει ένα γονίδιο που ελέγχει το φύλο, στην άμπελο, πάνω σ΄ένα γενετικό χάρτη (Dalbo *et al*., 2000). Οι χάρτες για τα υβρίδια Horizon (‘*Seyval’ x ‘Schuyler’*) και Illinois (*V. Cinerea* B9 x *Vitis rupestris B38*), κατασκευάστηκαν με CAPS, AFLPs και RAPDs και SSRs, καλύπτοντας μια περιοχή 1199 cM και δέκα ομόλογες ομάδες σύνδεσης ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 16 SSRs, και 2 CAPS. Ένας μοναδικός γενετικός τόπος που ελέγχει το φύλο, χαρτογραφήθηκε κοντά σ΄έναν SSR δείκτη.

Η κατασκευή ενός γενετικού χάρτη της αμπέλου, θα συμβάλλει στην ταυτοποίηση δεικτών, που σχετίζονται στενά με σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά αυτής, όπως η ανθεκτικότητα σε διάφορες ασθένειες, η ανάπτυξη των φυτών και η ποιότητα των καρπών.

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Για την επιτυχή απομόνωση DNA από φύλλα αμπελιού, πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφοροι παράγοντες όπως η σύσταση του διαλύματος εκχύλισης, ο τρόπος εκχύλισης, ο ιστός που θα 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 επιλεχθεί 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 DNάσες 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 προστατεύουν τα ένζυμα από δέσμευση τους 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 μικρού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως θειόλες (θειογλυκολικό οξύ, β-μερκαπτοαιθανόλη και κυστεϊνη) που εμποδίζουν την οξείδωση των φαινολών.
- Για τη διαλυτοποίηση των προσδεδεμένων σε μεμβράνες ενζύμων, χρησιμοποιούνται διαφοροι 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, σχηματιζοντας 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)*:*

Εκατό mg από φύλλα φυτού *Vitis vinifera L.* (φρέσκα ή διατηρημένα στους -20^0 C), ελήφθησαν από πρέμνα που διατηρούνται στο θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα φύλλα λειοτριβήθηκαν με την προσθήκη υγρού αζώτου σε γουδί, και ακολούθως προστέθηκε 1 ml του DNA extraction buffer (50 mM TRIS pH 8.0 50 mM EDTA pH 8.0, 0.4 LiCl,1% CTAB, 2% PVP, 0.5% TWEEN 20, 1.1 M NaCl) καθώς και 10 μl από 2-mercaptoethanol, προκειμένου να διαρρηχθούν οι πλασματικές μεμβράνες.Το προκύπτον διάλυμα επωάζεται για 15 min στους 65 °C σε υδατόλουτρο (LAUDA RM6) στο εσωτερικό ενός Eppendorf tube. Ακολούθως, 0.5ml από διάλυμα chloroform/isoamyl alcohol (24:1) προστίθενται στο παραπάνω διάλυμα και ακολουθεί καλή ανακίνηση. Το μείγμα φυγοκεντρείται για 1 min στις 14000 rpm . Περίπου 0.8 ml από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε καινούριο αποστειρωμένο eppendorf tube και ίσος όγκος ισοπροπανόλης προστίθεται σε αυτό. Ακολούθως, το μείγμα ανακινείται και επωάζεται για 15 min στον πάγο για να κατακρημνιστεί το DNA, και φυγοκεντρείται για 1 min στις 14000 rpm. Μετά την φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και 1 ml αιθανόλης προστίθεται στην πελλέτα, και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 14000 rpm. Η αιθανόλη απομακρύνεται και η πελλέτα αφήνεται να στεγνώσει . Τελικά 100 μl από TE pH 8 (που αποτελείται από 10 mM TRIS • Cl (pH 8.0) και 1 mM EDTA (pH 8.0)), προστίθενται στην πελλέτα και ακολουθεί 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 από 460 δείγματα, που διατηρούνται σε θερμοκρασία –20^0 C.

2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA.

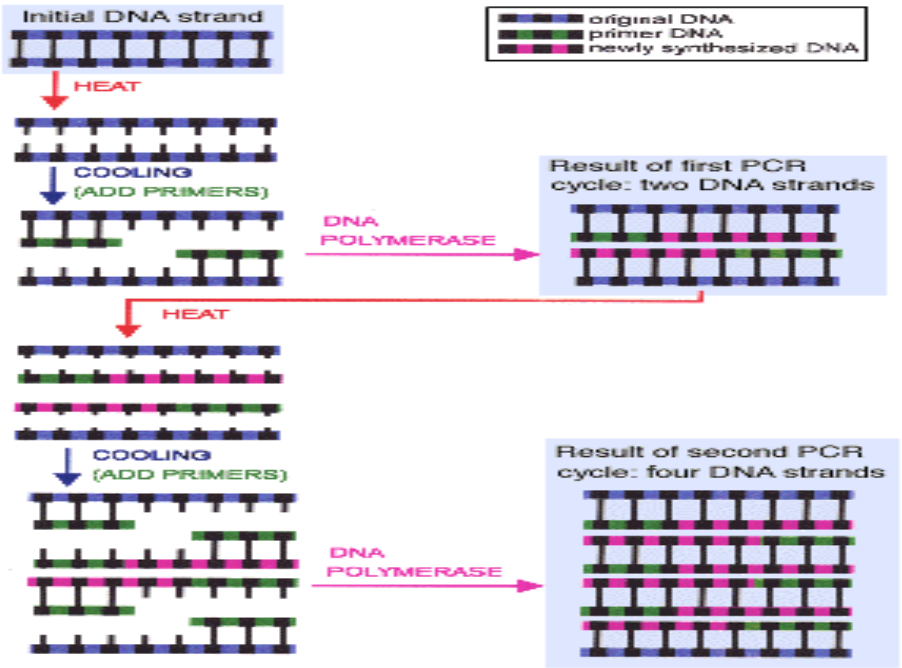
Το συνολικό ποσό του DNA σ΄ένα δείγμα προσδιορίσθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (PERKIN-ELMER, Lamda 20). Ως γνωστόν, τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260 nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης απορροφούν στα 260 nm αλλά και στα 280 nm, όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά. Για να είναι καθαρό το δείγμα, πρέπει η απορρόφηση στα 260 nm να είναι σχεδόν διπλάσια της απορρόφησης στα 280 nm. Γίνονται επομένως δύο μετρήσεις και

υπολογίζεται ο λόγος OD_{260}/OD_{280}. Ο λόγος αυτός πρέπει να είναι 1,6-2. Η ποσοτικοποίηση γίνεται από τη τιμή της απορρόφησης μιας αραίωσης του αρχικού δείγματος όγκου 1 ml (π.χ. αραίωση 5:1000) στα 260 nm. Για μεγαλομοριακό DNA ισχύει ότι OD260=1, που σημαίνει ότι στο 1 ml που μετρήθηκε περιέχονται 50 μg DNA. Γενικά βρίσκει εφαρμογή η παρακάτω σχέση:

DNA concentration = (A 260) x OD of 1.0 x 200 / 1000 μl
(μg / μl) (μg / μl) (Dilution factor)

2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR

Η αντίδραση PCR (Polymerase Chain Reaction=Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης), είναι μία τεχνική με την οποία μια μικρή αλληλουχία DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί $>10^6$ φορές σε λίγες ώρες, μέσω δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και επαναλαμβανόμενων κύκλων πολυμερισμού από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) (Εικόνα 3). Η αντίδραση επιτρέπει την ανάλυση μιας μικρής αλληλουχίας από ελάχιστα ποσά DNA (~ 10 ng).



Εικ. 3. **Αντίδραση PCR** .

2.3.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΤΩΝ PCR- ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 20-30 bp, σχεδιασμένα από τις αλληλουχίες εκατέρωθεν της επανάληψης του μικροδορυφόρου, έτσι ώστε να 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 του ενός σημεία και παραγωγή περισσότερων του ενός προϊόντων.
- Να μην περιέχουν παλίνδρομες αλληλουχίες για να μην σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές.
- Να έχουν τυχαία κατανομή βάσεων και παρόμοιο ποσοστό %GC. Αυτό είναι σημαντικό για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας τήξης Tm, 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 (Tm). Για να μπορούν δύο εκκινητές να υβριδοποιούνται με την αλληλουχία-στόχο στις ίδιες συνθήκες, πρέπει να έχουν παρόμοιο Tm. Το Tm ενός ολιγονουκλεοτιδίου υπολογίζεται εμπειρικά από τον τύπο:

$$(Tm)= (A \text{ ή } T) * 2^0C + (G \text{ ή } C)* 4^0 C$$

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

- Να απέχουν μεταξύ τους απόσταση τέτοια ώστε να μπορεί να πολλαπλασιαστεί με PCR (< 1Kb).

2.3.2 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ PCR

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση PCR είναι:

- **DNA:** Χρησιμοποιούνται 50ng φυτικού DNA.
- **PCR-εκκινητές:**

1. Για την ταυτοποίηση 60 ειδών ή υβριδίων Vitis που χρησιμοποιούνται ως rootstock (υποκείμενα), και τα οποία ελήφθησαν από τη συλλογή του Πανεπιστημίου Κρήτης, και το Institute of Viticulture, Floriculture and Vegetable Crops of Heraklion, χρησιμοποιήθηκαν 7 ζεύγη εκκινητών οι οποίοι, εν περιλήψει, αποκτήθηκαν ως εξής:

μία εμπλουτισμένη σε μικροδορυφορικές περιοχές DNA βιβλιοθήκη του *Vitis vinifera cv* Syrah κατασκευάστηκε με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Edwards *et al*. 1996. Σαράντα οκτώ βακτηριακοί κλώνοι που περιείχαν ανασυνδυασμένα πλασμίδια επιλέχθηκαν τυχαία. Τα πλασμίδια καθαρίστηκαν με το Quantum Plasmid Miniprep kit (Bio-Rad, USA) και αλληλουχήθηκαν με simultaneous bi-directional sequencing (SBS).ακολούθησε ανάλυση αυτών σε ένα Licor 4200 DNA sequencer (Licor, Lincoln, Nebraska, USA). Από τους 48 αυτούς κλώνους αποκτήθηκαν 50 DNA αλληλουχίες που περιείχαν 7 νέους μικροδορυφορικούς τόπους οι οποίοι ήταν χρησιμοποιήσιμοι ως SSR δείκτες. Από τους παραπάνω 7 νέους μικροδορυφορικούς τόπους, σχεδιάστηκαν 7 ζεύγη εκκινητών:

Primer name	*GenBank Accession*	Vitis Microsatellite Consortium Identification	Repeat motifs	Primer sequence	Length in bases	Annealing temperature Tm.
UCH11-F	AF143257	VMC9b5F	(GA)15	ATgcccgAgAAgAgTcgAgAA	21	65
UCH11-R		VMC9b5R		cTgccgTTTgggTAAgATgcT	21	65
UCH12-F	AF143258	VMC9c1F	(CT)17 (CA)13	TTTTcATTgAAAAgAAggA	19	53
UCH12-R		VMC9c1R		TgTgcTTTgTgcTAgATAA	19	52
UCH19-F	AF143266	VMC9d3F	(CT)23	gATTTgAAAgTcgAAAgccAg g	22	64
UCH19-R		VMC9d3R		TgcAAAgAcTgTgAgATgAgg g	22	64
UCH29-F	AF143277	VMC9f2F	(CT)18	AAAcATgATcTgATgcAggTg A	22	62
UCH29-R		VMC9f2R		AAccTgTTgATgAAAgggAA A	22	63
UCH2-F	AF143247	VMC9a2.1F	(AG)15	AgcTcggcTAgcTgcAAAATc	21	65
UCH2-R		VMC9a2.1R		AcccTTcccTcTTcAAAAccc	21	64
UCH35-F	AF143283	VMC9g4F	(CT)17	AAATgTgcAAgTTgAAgAgg gA	22	63
UCH35-R		VMC9g4R		AgAccgTTcAAAcAAgcAAA Tg	22	63
UCH40-F	AF143288	VMC9h4_2F	Imperfect run of (GCA)n(ACA)m	gcAgTTgATgcAAAAcAAcAg T	22	62

UCH40-R		VMC9h4_2R	equivalent to 60 repeats	cAcATcATTcATTgATgAggc T	22	62

Πίνακας 2.3.2.1 Επτά ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τους 7 νέους μικροδορυφορικούς τόπους UCH2, UCH11, UCH 12, UCH19, UCH29, UCH35, UCH40.

❖ Για την γενετική ταυτοποίηση 46 ποικιλιών *Vitis vinifera L.*, που ελήφθησαν από τη συλλογή του θερμοκηπίου του Πανεπιστημίου Κρήτης, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ζεύγη εκκινητών για τους εξής SSR γενετικούς τόπους: VVS1, VVS2 από *Vitis vinifera L.* (Thomas and Scott 1993), ZAG 21, ZAG 62 από το *Vitis riparia* (Sefc et al., 1999a, Centre for Applied genetics, University of Agriculture, Vienna).

Primer name	Primer sequence	Length in bases	Exp. annealing temperature Tm	Allele size range (bp)
ssrVrZAG21 [F]	tcattcactcactgcattcatcggc	25	50	190-214
ssrVrZAG21 [R]	ggggctactccaaagtcagttcttg	25		
ssrVrZAG62 [F]	Ggtgaaatgggcaccgaacacacgc	25	50	185-203
ssrVrZAG62 [R]	Ccatgtctctcctcagcttctcagc	25		
VVS1 [F]	Acaattggaaaccgcgtggag	21	60.5	160-205
VVS1 [R]	cttctcaatgatatctaaaaccatg	25	51	
VVS2 [F]	cagcccgtaaatgtatccatc	21	53.4	129-155
VVS2 [R]	aaattcaaaattctaattcaactgg	25	52.1	

Πίνακας 2.3.2.2 Πυρηνικοί SSR εκκινητές από το Centre for Applied genetics, University of Agriculture, Vienna.

* Σε όλες τις περιπτώσεις, οι forward εκκινητές είχαν σημανθεί με το Licor IR800 fluorochrome (MWG-Blotech GmbH) Σε κάθε ανίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 20 pmole από κάθε εκκινητή.

❖ **dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP).** Χρησιμοποιούνται 250 μM από κάθε νουκλεοτίδιο στην αντίδραση.

❖ **BSA (Bovine Serum Albumin):** Η BSA διευκολύνει και σταθεροποιεί την Taq πολυμεράση, αλλά δεν είναι πάντα απαραίτητο συστατικό της αντίδρασης. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 100μg/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 $(NH_4)_2SO_4$.
- **$MgCl_2$:** Το σημαντικότερο στοιχείο είναι το $MgCl_2$, του οποίου η συγκέντρωση μπορεί να μεταβάλλεται από 5 ως 25 mM, ανάλογα με το είδος των εκκινητών και τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης, Γι΄αυτό, πρέπει να προσδιορίζεται η καλύτερη συγκέντρωση $MgCl_2$. 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.
- **H_2O:** απιονισμένο και αποστειρωμένο.

2.3.2.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Επίσης για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

- Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής (PTC-100 thermal cycler, M.J. Research Inc., Watertown, Ma.,USA)
- Σωληνίσκοι χωρητικότητας 0.5 ml, κατάλληλοι για χρήση στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, αποστειρωμένοι με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για 20 min.

2.3.2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Παρασκευάσθηκε κοινό μίγμα για όλες τις αντιδράσεις. Ο όγκος κάθε αντίδρασης είναι 20 μl.

Παράδειγμα υπολογισμών:

10X Taq buffer	**2 λ**
dNTPs 2.5 mM	**1λ**
$MgCl_2$ 50mM	**1λ**
Primer F	**1μM=α**
Primer R	**1μM=β**
Taq πολυμεραση (1u/μλ)	**0.5λ**
H_2O	**14.5-(α+β)**

- Το κοινό μίγμα μοιράζεται σε αποστειρωμένα PCR-tubes.
- Σε κάθε ένα από αυτά, προστίθεται 1 λ DNA.
- Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση για 2-3 sec.

2.3.2.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

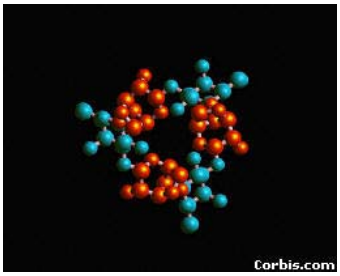
Γενικά ισχύουν οι εξής συνθήκες αντίδρασης (Sefc 1998):

- Αρχική αποδιάταξη του DNA : 95 °C / 5 min
- 10 κύκλοι :
  - υβριδοποίηση εκκινητή και αλληλουχίας-στόχου: 30 s στην αντίστοιχη θερμοκρασία υβριδοποίησης (Πίνακας 1).
- Αποδιάταξη του DNA: 94 °C/30 s
  - 23 κύκλοι των 30 sec, στην αντίστοιχη θερμοκρασία υβριδοποίησης (Πίνακας 1).
- Επέκταση του εκκινητή από την Taq πολυμεράση: 89 °C/30 s.
- Αυτόματος τερματισμός της αντίδρασης στους 4° C.

* Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο χαρακτηρίζει κάθε ζεύγος εκκινητών και γενικά είναι 3-10^{0}C μικρότερη από το Tm των εκκινητών. Εκκινητές με υψηλό GC% (υψηλό Tm) υβριδοποιούνται σε θερμοκρασίες >55^{0}C. Χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης (<50 ^{0}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. Ο χρόνος της επέκτασης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου. Επέκταση 30 sec αρκεί για PCR προϊόντα μεγέθους 400-500 bp.

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

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 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.

2.4.1 ΥΛΙΚΑ

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 χρωστική bromophenol blue, χρησιμοποιείται για την καθήλωση του DNA όταν αυτό φορτώνεται 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 όταν φωτιστεί με 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.

2.4.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- 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.

2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΥΤΩΝ.

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 ναϋλον 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 φθωρίζουσα ουσία (στην εργασία μας, όλοι οι οι forward εκκινητές έχουν σημανθεί με το Licor IR800 fluorochrome (MWG-Blotech GmbH)). Προκειμένου να αναλυθούν τα τμήματα PCR, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα αλληλόμορφα και να μετρηθεί το μέγεθος τους με ακρίβεια, χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος αναλυτής νουκλεοτιδικών αλληλουχιών Licor 2400. Ο στόχος είναι ένας υψηλής ανάλυσης διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η σήμανση των εκκινητών με τη χρήση φθορίζουσας ουσίας καθιστά τα τμήματα DNA, που προκύπτουν από την PCR, ανιχνεύσιμα με τη βοήθεια ανιχνευτή laser, ο οποίος αποθηκεύει τα δεδομένα ως μια εικόνα του πηκτώματος αναλυμένη με τη χρήση του λογισμικού Gene Profiler v3.52 (Scanalytics, Fairfax,Va., USA). Διαφορά μιας βάσης bp, είναι διακριτή. Ένα τέτοιο πρότυπο αναλύεται με τη βοήθεια ενός προγράμματος Η/Υ, οπότε επιτυγχάνεται ο ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους των αλληλομόρφων. Τα μεγέθη αυτά σε bp είναι τα δεδομένα των αλληλομόρφων, που θα αποθηκεύονται σε μία γενετική βάση δεδομένων. Μια ποικιλία χαρακτηρισμένη σε 9 περιοχές για παράδειγμα, θα δίνει 18

δεδομένα σε bp, που αντιστοιχούν σε 18 αλληλόμορφα, άσχετα με το αν το άτομο είναι ομόζυγο ή ετερόζυγο σε έναν ή περισσότερους τόπους.

Τυπικά, μετά την αντίδραση της PCR με τους μικροδορυφορικούς εκκινητές, θα προκύψουν και θα γίνουν ορατές στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης:

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

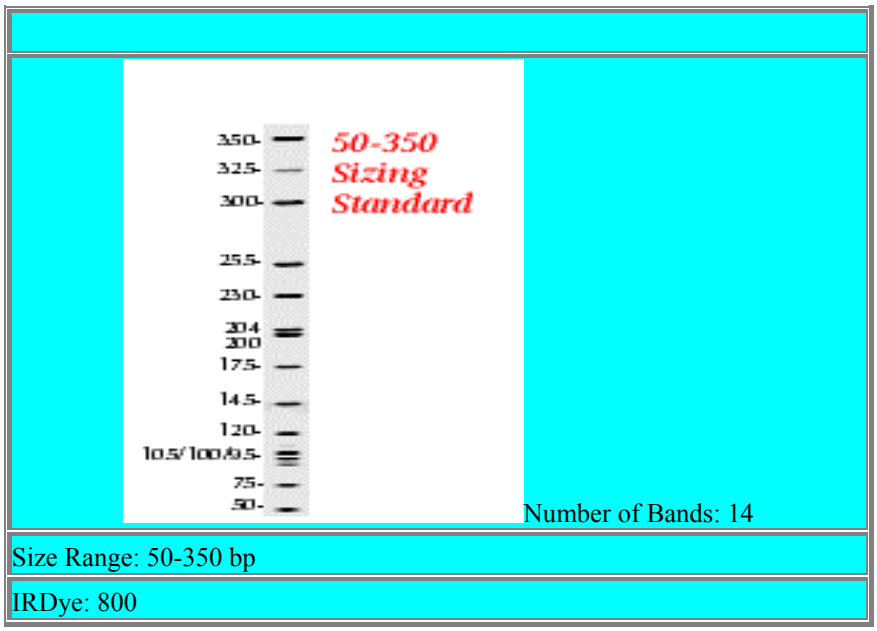
Κάποια υποκείμενα ή ποικιλίες Vitis, δεν έχουν καθόλου αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο που εξετάζεται και δίνουν έναν null – null γενότυπο. Ένα null αλληλόμορφο θα μπορούσε να παρατηρηθεί όταν το DNA, που αναπαριστάνει το γενετικό τόπο είναι παρόν, όμως ο πολλαπλασιασμός του μέσω της αντίδρασης PCR εμποδίζεται από DNA μεταλλαγές (σημειακές μεταλλαγές DNA, διαγραφές ή προσθήκες) στις θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών, ή ακόμα όταν το DNA που αναπαριστάνει το γενετικό τόπο δεν είναι παρόν στο γένωμα της υπό μελέτη ποικιλίας.

2.5.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Τα δείγματα DNA υφίστανται την ακόλουθη επεξεργασία πριν την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αλληλούχισης πολυακρυλαμίδης: ανάλογα με την ένταση των ζωνών που έδωσαν κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης, προσαρμόζεται η αναλογία προϊόντος PCR και sequencing loading buffer, που θα χρησιμοποιηθεί και αποτελείται από 10 ml formamide (p.G), 200μl EDTA pH 8.0, 0.5 M, και 10mg χρωστικής bromophenol blue.
- Ακολούθως τα δείγματα αποδιατάσσονται για 5 min στους 96^0 C και τοποθετούνται αμέσως σε μίγμα νερού και πάγου.
- Προετοιμάζεται το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης Long Ranger 8% (BMA, Rockland, Me, USA), με 1xTBE, και 7M ουρίας Ο όγκος του μείγματος συμπληρώνεται μέχρι τα 30 ml με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει αναμειγνύεται και φιλτράρεται, και σ΄αυτό προστίθενται 200 μl από 10% APS και 20 μl TEMED. Ακολούθως το μίγμα τοποθετείται στις κατάλληλες γυάλινες πλάκες και αφήνεται να πολυμεριστεί για δύο ώρες. Μετά τον πολυμερισμό το πήκτωμα τοποθετείται στον αυτόματο αναλυτή

νουκλεοτιδικών αλληλουχιών Licor 4200(Licor, Lincoln, NE), σε TBE 1X, και ηλεκτροφορείται για 20 λεπτά πριν φορτώσουμε σε αυτό τα δείγματα μας.

- Τα δείγματα τοποθετούνται στο πήκτωμα, μαζί με έναν δείκτη μοριακού βάρους (LI-COR, IRD800, 4000-44B, 50-350bp, Εικ.4.1) και ηλεκτροφορούνται για πέντε ώρες.
- Το πρόγραμμα Data Collection χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ηλεκτροφορετικών παραμέτρων.



Εικ 4.1 Δείκτης μοριακού βάρους (50-350 Size Standard LI-COR) που χρησιμοποιείται κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αλληλούχισης πολυακρυλαμίδης.

2.6 ΚΛΩΝΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ VITIS VINIFERA ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΑ VITIS ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ (VITIS SPECIES AND HYBRIDS), ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.

Στόχος αυτής της Διατριβής ήταν η γενετική ταυτοποίηση 46 κλώνων των ποικιλιών *Vitis vinifera* (Πίν. 4.1), για τους 4 μικροδορυφορικούς τόπους, VVS1, VVS2, ZAG21, ZAG62, και 60 υβριδίων και κλώνων *Vitis* που χρησιμοποιούνται (τα περισσότερα), ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera*, για τους 7 μικροδορυφορικούς τόπους UCH2, UCH11, UCH12, UCH19, UCH29, UCH35 και UCH40. Σκοπός ήταν η επιβεβαίωση ή ακύρωση της ταυτότητας και των μελετούμενων κλώνων και υβριδίων, αντίστοιχα. Η παραπάνω μελέτη, ειδικά όσον

αφορά την περίπτωση των υβριδίων *Vitis* που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα, κρίνεται απαραίτητη, εφόσον πιθανά λάθη κατά την διάρκεια του καθορισμού, του πολλαπλασιασμού και της διανομής των, πολύ δύσκολα θα ανιχνευθούν άμεσα και έγκαιρα από τον καλλιεργητή. Συγκριτικά με τις ποικιλίες, ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων υποκειμένων, είναι αρκετά μικρότερος, όμως είναι σημαντική η ακριβής και προσεκτική ταυτοποίηση αυτών, εφόσον αυτά καθορίζουν και την παραγωγικότητα των αμπελώνων.

Στους ακόλουθους πίνακες δίνονται τα στοιχεία των 46 κλώνων των ποικιλιών *Vitis vinifera* (Πίνακας 2.6.1), για τους 4 μικροδορυφορικούς τόπους, VVS1, VVS2, ZAG21, ZAG62, και 60 υβριδίων και κλώνων *Vitis* (Πίνακας 2.6.2 και 2.6.3) που χρησιμοποιούνται (τα περισσότερα), ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera* (η αναγραφή των ονομάτων των δειγμάτων που εξετάστηκαν, ακολουθεί το πιο πρόσφατο transliteration frame ISO 843, το οποίο πλέον χρησιμοποιείται διεθνώς).

Ονόματα	**No**	**Κωδικός θερμοκηπίου**	**Προέλευση**
Kotsifali	557	K 242	Boutaris Skalani
Kotsifali	563	K240	Orfanoudakis Em. Kounavoi
Kotsifali	568	K241	Orfanoudakis Em. Kounavoi
Kotsifali	578	K240b	Orfanoudakis Em. Kounavoi
Kotsifali	580	K240a	Orfanoudakis Em. Kounavoi
Kotsifaloliatiko	582	K27	Kalamitisi Alex. Chania
Kotsifaloliatiko	574	K28	Kalamitisi Alex. Chania
Kotsifaloliatiko	579	K26	Kalamitisi Alex. Chania
Liatiko	562	K162	Patsos Spiliou
Liatiko	564	K164	Patsos Spiliou
Liatiko	570	K386	Dafnes Irakleiou
Liatiko	571	K384	Dafnes Irakleiou
Liatiko	573	K161	Patsos Spiliou
Liatiko	586	K163	Patsos Spiliou
Liatiko	588	K173	Patsos Spiliou
Liatiko	592	K170	Patsos Spiliou
Liatiko	593	K172	Patsos Spiliou
Liatiko	594	K388	Dafnes Irakleiou
Liatiko	595	K174	Patsos Spiliou
Liatiko	576	K387	Dafnes Irakleiou
Mantilari	551	K309	Choudetsi Irakleiou
Mantilari	554	K306	Choudetsi Irakleiou
Mantilari	566	K308	Choudetsi Irakleiou
Mantilari	569	K285	Kounavoi Irakleiou
Mantilari	589	K310	Choudetsi Irakleiou
Mantilari	590	K311	Choudetsi Irakleiou
Moschato aspro	552	K13	Samos Karagiannis
Moschato aspro	553	K9	Samos Anastasiou
Moschato aspro	556	K8	Samos Zafeiropoulou

Moschato aspro	560	K4	Samos Papadam
Moschato aspro	565	K10	Samos Anastasiou
Moschato aspro	567	K16	Papageorgiou
Moschato aspro	577	K15	Samos Mattheou
Moschato aspro	584	K5	Samos Papadam
Moschato aspro	585	K14	Samos Mattheou
Moschato mavro (Drakopoulos)	550	K1	Samos Papadam
Moschato Spinas	555	K4	Maza Chanion
Moschato Spinas	572	K6	Maza Chanion
Moschato Spinas	575	K2	Maza Chanion
Moschato Spinas	581	K1	Maza Chanion
Moschato Spinas	583	K5	Maza Chanion
Vidiano	558	K185	Mikra Anogeia Rethymnis
Vidiano	559	K184	Mikra Anogeia Rethymnis
Vidiano	561	K186	Mikra Anogeia Rethymnis
Vidiano	587	K187	Mikra Anogeia Rethymnis
Vidiano	591	K188	Mikra Anogeia Rethymnis

Πίνακας 2.6.1 ΚΛΩΝΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ VITIS VINIFERA ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Ονόματα όπως αναφέρονται στη συλλογή	**Ονόματα γενοτύπων**	**DNA**
420A	Millardet et Grasset 420A	17
110 Richter Greek	-	27
Rupestris du Lot	Rupestris du Lot	32
Couderc 1613	Couderc 1613	33
140 Ruggeri	140 Ruggeri	299
1103 Paulsen	1103 Paulsen	39
Dogridge	Dog Ridge	40
110 Richter Greek	-	43
Salt Creek	Salt Creek	46
41B	Millardet et Grasset 41B	53
LN33	LN33	54
SO4	Selektion Oppenheim 4	55
ARGNo1	Aramon Rupestris Ganzin 1	56
5BB	Kobber 5BB	223
Couderc 16149	Couderc 16149	274
1103 Paulsen	1103 Paulsen	270
110 Richter	110 Richter	271
Couderc 16149	Couderc 161-50	272
Unknown	?	273
1103 Paulsen	1103 Paulsen	256
1103P?1	1103 Paulsen	265
1103P?2	1103 Paulsen	266
1103P?3	1103 Paulsen	261
1103P?4	1103 Paulsen	264

1103P?5	1103 Paulsen	262
1103P?6	1103 Paulsen	257
1103P?7	1103 Paulsen	263
1103P?8	1103 Paulsen	259
1103P?9	1103 Paulsen	260
1103P?10	1103 Paulsen	258
140 Ruggeri	Ruggeri 140	267
140 Ru?1	140 Ruggeri	268
141 Ru?2	140 Ruggeri	269
Salt Creek	Salt Creek	416
3306 C	Couderc 3306	420
16149 C	Couderc 161-51	413
1103 Paulsen	Paulsen 1103	415
101-14	Millardet et Grasset 101-14	414
Harmony	Harmony 1FV A1 V1-11	437
Fercal	Fercal	427
Riparia Gloire	Gloire de Montpellier	449
Rupestris du Lot	Rupestris du Lot	450
3309	Couderc 3309	442
Couderc 16149	Couderc 161-52	441
15711	Couderc 157-11	440
34 EM	Ecole Montpellier 34	448
5C Teleki	Teleki 5C	444
SO4	Selektion Oppenheim 5	443
57R	Richter 57	447
140 Ru	Ruggeri 140	433
1045 Paulsen	Paulsen 1045	422
41B	Millardet et Grasset 41B	425
Fercal	Fercal	438
1616 C	Couderc 1616	428
31 R	Richter 31	429
LN33	LN33	421

Πίνακας 2.6.2. ΚΛΩΝΟΙ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΑ VITIS ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΩΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ (VITIS SPECIES AND HYBRIDS), ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.

Ονόματα όπως αναφέρονται στη συλλογή	**Ονόματα γενοτύπων**	**DNA**
Mission	Mission	419
Riesling	Riesling	134
Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	111
Thompson seedless	Thompson seedless	36

Πίνακας 2.6.3 ΚΛΩΝΟΙ *VITIS* ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Πάρακάτω, δίνονται πρόσθετα στοιχεία για τους κλώνους και τα υβρίδια Vitis που μελετήθηκαν (Πίν.2.6.4).

Πίνακας 2.6.4 Πρόσθετες πληροφορίες για τους κλώνους και τα υβρίδια Vitis που μελετήθηκαν.

Names found in the collections of the university of Crete and NAGREF Heraklion	**Real names (European Vitis database)**	**Species or Pedigrees**
ARG 1	Aramon Rupestris Ganzin 1 Aramon Rupestris 1, ARG 1, Aramon Ganzin 1	*V. vinifera Aramon Noir x V. rupestris du Lot*
420A	Kobber 420A	*V. berlandieri X V. riparia*
Paulsen 1103	1103 Paulsen	*V. berlandieri Resseguier 2 x V. rupestris du Lot*
Millardet et Grasset 41B	41B	*V. vinifera Chasselas x V. berlandieri*
1613	Couderc 1613	*Solonis X Othello* *Solonis x Othello* *Othello = Clinton x Black Hamburg* *Clinton = V.riparia x V.labrusca* *Solonis = natural hybrid between V. riparia and V candicans or V. riparia x V. longii* Synonyms *V. longii, V. solonis*
Paulsen 1103	1103 Paulsen	*V. berlandieri Resseguier 2 x V. rupestris du Lot*
Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	*Vitis vinifera*
Thompson seedless	Thompson seedless/Soultanina	*Vitis vinifera*
31 R	Richter 31	*"V. berlandieri Resseguier 1 x Novo Mexicana; Novo Mexicana = (V. riparia x V. rupestris x V. candicans); Or V. berlandieri Resseguier 2 x Novo Mexicana"*
Riesling	Riesling	*Vitis vinifera*

1613	Couderc 1613	*"Solonis X Othello; Solonis x Othello; Othello = Clinton x Black Hamburg; Clinton = V.Riparia x V. Labrusca; Solonis = natural hybrid between V. riparia and V. Candicans or V. riparia x V. longii; Synonyms V. longii, V. solonis"*
1616 C	Couderc 1616	*V.longii x V.riparia Gloire de Montpellier*
Couderc 16-149	Couderc 161-49	*V.berlandieri X V.riparia*
157-11	Couderc 157.11	*V. berlandieri De La Sorres x V. riparia Gloire*
3306 C	Couderc 3306	*V. riparia Tomenteux x V. rupestris Martin*
3309 V. riparia Tomentotesa x V. Rupestris Magtin	Couderc 3309 3309 C	*V. riparia Tomenteux x V. rupestris Martin*
Dog Ridge	Dog Ridge Dogridge	*V. rupestris x V. candicans* *= V. champinii*
34 EM	Ecole Montpellier 34 34 EM	*V. berlandieri Ecole x V. riparia*
Couderc 161-49	16-149C	*V.berlandieri X V.riparia*
Fercal	Fercal	*(V. berlandieri X V. vinifera Colombard) X EM 333*
Riparia Gloire	Gloire de Montpellier Riparia Portalis, Riparia Michel, Riparia Martineau, Riparia Gloire, Gloria Martineau, riparia Krupnolistnaya, Riparia, Riparia a grandes de Touraine, Riparia a grndes feuilles, Riparia cu Frunce Mari, Riparia Gloire de Montpellier, Riparia Gloire de Touraine, Riparia Gloria, Riparia Glorie, Riparia Gluar, Riparia Laprorta, Riparia Martinaud, Riparia Saporta, Riparia Gluar de Monpele, Riparia Gloire 2, Gloria Michel	*V. riparia*
Harmony 1 FV A1 V1-11	Harmony	*Couderc 1613 X Dogridge*
5BB	Kobber 5 BB Teleki 5 BB, Kobrovska, 5 BB	*V. berlandieri x V.Riparia* *Teleki 5BB = V. riparia x V. berlandieri*
LN 33	LN33	*Couderc 1613 x V. vinifera Soultanina*
Fercal	Fercal	*(V. berlandieri X V. vinifera Colombard) X EM 333*
41B	Millardet et Grasset 41 B 41B	*V. vinifera Chasselas x V. berlandieri*

101-14	Millardet et Grasset 101- 14	*V. riparia X V. rupestris*
Mission	Mission Mission's Grape, California, El Paso	*V. vinifera*
1045 Paulsen	Paulsen 1045	*V.berlandieri Resseguier 2 x V. rupestris Ganzin 1 Ganzin 1 = V. vinifera Aramon x V. rupestris = Aramon Rupestris Ganzin* *Or* *V. berlandieri 2 x (V. vinifera Aramon x V. rupestris)*
1103 Paulsen	Paulsen 1103	*V. berlandieri Resseguier 2 x V. rupestris du Lot*
Richter 31	31 R	*Solonis X Berlandieri*
57R	Richter 57	*V. berlandieri Resseguier 1 X Vitis rupestris Martin*
110 Richter	Richter 110	*V. berlandieri Resseguier 2 x V. rupestris Martin*
110 Richter Californian clone	Richter 110	
110 Richter Greek clone	Richter 110	
140 Ruggieri	Ruggeri 140 Ruggieri 140	*V. berlandieri Resseguier 2 x V. rupestris du Lot*
Rupestris du Lot	Rupestris du Lot Rupestris Colineau, Rupestris Richter, Rupestris Suas, Rupestris Phenomene, Rupestris Saint-George, Rupestris Lacastelle, Rupestris Reich, Rupestris Monricola, Rupestris St. George Erige	*V. rupestris*
Rupestris du Lot St-Georges	Rupestris du Lot St-Georges Rupestris Colineau, Rupestris Richter, Rupestris Suas, Rupestris Phenomene, Rupestris Saint-George, Rupestris Lacastelle, Rupestris Reich, Rupestris Monricola, Rupestris St. George Erige	*V. rupestris*
Salt Creek	Salt Creek Ramsey	*V. doaniana* *Hybrids of V. candicans*
SO4	Selektion Oppenheim 4 SO4	*V. berlandieri Ressegiuer x V. riparia* *Kobber 5BB Sel.*
5C Teleki	Teleki 5C 5 C, Geisenheim 5 C	*V. berlandieri x V. riparia*
8B Teleki	Teleki 8B 8 B, Teleki	*V.berlandieri x V. riparia*

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ταυτοποίηση των παραπάνω 46 κλώνων των ποικιλιών *Vitis vinifera*, για τους 4 μικροδορυφορικούς τόπους, VVS1, VVS2, ZAG21, ZAG62, και των 60 υβριδίων Vitis που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera*, για τους 7 μικροδορυφορικούς τόπους UCH2, UCH11, UCH12, UCH19, UCH29, UCH35 και UCH40, πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (βλ.Υλικά-Μέθοδοι). Τα μεγέθη των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων ελέγχθηκαν με τον αυτόματο αναλυτή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών Licor 2400 , και με τη χρήση του λογισμικού Gene Profiler v3.52 (Scanalytics). Τα ζητούμενα μεγέθη αλληλομόρφων για κάθε περίπτωση, δίνονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 3.1 και Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.1. Τα μεγέθη των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων για τα 60 υβρίδια και κλώνους Vitis.

Real names	DNA	UCH2	UCH2	UCH11	UCH11	UCH12	UCH12	UCH19	UCH19	UCH29	UCH29	UCH35	UCH35	UCH40	UCH40
420A	17	162	146	246	242	166	149	212	198	288	207	177	153	300	273
110 Richter Greek	27	156	147	260	244	170	161	196	182	285	285	149	133	276	264
Rupestris du Lot	32	160	147	252	244	161	135	188	182	295	285	149	133	276	270
Couderc 1613	33	162	155	240	220	166	152	204	182	288	274	151	151	264	243
140 Ruggeri	299	164	147	252	252	152	135	192	182	295	290	149	133	270	270
1103 Paulsen	39	160	156	252	244	158	135	196	182	295	284	133	133	276	273
Dogridge	40	152	152	245	242	196	145	186	174	285	282	167	147	273	252
110 Richter Greek	43	165	165	248	244	166	166	198	198	308	211	153	153	306	273
Salt Creek	46	170	149	244	244	147	145	182	174	297	285	161	159	267	237
41B	53	168	147	242	238	166	166	198	196	290	288	175	133	294	285
LN33	54	155	155	244	220	166	149	202	182	300	274	167	151	300	264
SO4	55	156	156	260	245	234	170	196	188	289	284	133	133	273	264
ARGNo1	56	160	156	248	238	166	164	192	186	296	292	175	157	258	258
5BB	223	156	156	260	245	234	170	196	188	289	284	133	133	273	264
Couderc 16149	274	168	160	241	226	222	149	192	188	313	289	133	133	273	270
1103 Paulsen	270	156	156	252	244	158	135	196	182	295	284	133	133	276	273
110 Richter	271	156	147	244	244	170	161	196	182	285	285	149	133	276	264
Couderc 16149	272	168	160	241	226	222	149	192	188	313	289	133	133	273	270
Unknown	273	168	160	243	240	210	163	196	186	304	302	169	159	267	258
1103 Paulsen	256	156	156	252	244	158	135	196	182	295	284	133	133	276	273
1103P?1	265	178	162	244	242	166	149	202	192	300	211	181	167	300	258
1103P?2	266	178	162	244	242	166	149	202	192	300	211	181	167	300	258
1103P?3	261	178	162	244	242	166	149	202	192	300	211	181	167	300	258
1103P?4	264	178	162	244	242	166	149	202	192	300	211	181	167	300	258
1103P?5	262	178	162	244	242	166	149	202	192	300	211	181	167	300	258

1103P?6	257	178	162	244	242	166	149		192	300	211	181		300	258
1103P?7	263	178		244	242	166	149	202		300	211	181		300	258
1103P?8	259	178	162	244		166	149	202	192		211	181	167		258
1103P?9	260	178		244	242	166	149	202		300	211	181	167	300	258
	258	178	162	244	242		149	202	192	300	211		167	300	258
140 Ruggeri	267		147	252	252	152	135	192	182	295	290	149	133	270	270
140 Ru?1	268	165	162	246	242	166	149	198	198	288	207	177	153	300	273
141 Ru?2	269	165	162		242	166	149	198	198	288	207	177	153	300	273
Salt Creek	416	170	149	244	244	147	145	182	174	297	285	161	159	267	237
3306 C	420	170	149	244	244	147	145	182	174	297	285	161	159	267	237
Couderc 16149	413	168	160	241	226	222	149	192	188	313	289	133	133	273	270
1103 Paulsen	415	156	156	252	244	158	135	196	182	295	284	133	133	276	273
101-14	414	166	166	249	237	198	166	188	186	290	274	165	157	267	252
Harmony	437	166	164	245	240	198	184	188	188	289	289	157	147	264	252
Fercal	427	172	172	246	237	174	172	204	186	303	300	167	133	273	249
Riparia Gloire	449	168	166	245	241	234	222	188	188	289	282	161	161	273	264
Rupestris du Lot	450	160	147	252	244	161	135	188	182	295	285	149	133	276	270
3309	442	168	160	243	240	210	163	196	186	304	302	169	159	267	258
Couderc 16149	441	168	160	241	226	222	149	192	188	313	289	133	133	273	270
15711	440	166	147	245	239	232	163	186	186	282	282	169	159	267	258
34 EM	448	156	156	240	230	163	163	192	188	303	274	133	133	270	264
5C Teleki	444	156	156	252	245	222	158	198	188	284	282	161	133	264	264
SO4	443	164	147	252	252	152	135	192	182	295	290	149	133	270	270
57R	447	156	147	252	244	161	156	192	188	290	285	149	133	273	270
140 Ru	433	164	147	252	252	152	135	192	182	295	290	149	133	270	270
1045 Paulsen	422	147	147	260	252	170	161	198	188	285	284	173	133	276	273
41B	425	168	147	242	238	166	166	198	196	290	288	175	133	294	285
Fercal	438	172	170	246	237	174	172	204	186	303	300	167	133	273	264
1616 C	428	170	166	240	240	152	152	190	186	308	282	159	149	264	264
31 R	429	172	156	240	237	172	162	188	186	300	286	167	149	249	243
LN33	421	178	155	244	220	166	149	202	182	300	274	167	151	300	264

Mission	419	190	147	263	242	166	149	192	192	288	207	181	153	309	273
Riesling	134	165	163	263	242	166	149	192	192	308	207	165	165	312	279
Cabernet Sauvignon	111	200	165	263	244	166	149	204	178	285	211	165	165	279	273
Thompson seedless	36	178	162	244	242	166	149	202	192	300	211	181	167	300	258

Πίνακας 3.2. Τα μεγέθη των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων για τους 46 κλώνους των ποικιλιών *Vitis vinifera*

DNA	Real names	VVS1	VVS1	VVS2	VVS2	ZAG21	ZAG21	ZAG62	ZAG62
557	Kotsifali	180	180	144	142	214	190	193	187
563	Kotsifali	180	180	144	142	214	190	193	187
568	Kotsifali	180	180	144	142	214	190	193	187
578	Kotsifali	180	180	144	142	214	190	193	187
580	Kotsifali	180	180	144	142	214	190	193	187
582	Kotsifaloliatiko	180	180	144	142	206	190	199	187
574	Kotsifaloliatiko	180	180	144	142	206	190	199	187
579	Kotsifaloliatiko	180	180	144	142	206	190	199	187
562	Liatiko	187	180	144	134	206	206	203	199
564	Liatiko	187	180	144	134	206	206	203	199
570	Liatiko	187	180	144	134	206	206	203	199
571	Liatiko	187	180	144	134	206	206	203	199
573	Liatiko	187	180	144	134	206	206	203	199
586	Liatiko	180	180	132	132	206	206	195	185
588	Liatiko	187	180	142	134	206	206	203	199
592	Liatiko	187	180	142	134	206	206	203	199
593	Liatiko	187	180	142	134	206	206	203	199
594	Liatiko	187	180	142	134	206	206	203	199
595	Liatiko	187	180	142	134	206	206	203	199
576	Liatiko	187	180	142	134	206	206	203	199

551	Mantilari	180	180	144	144	204	190	201	195
554	Mantilari	180	180	144	144	204	190	201	195
566	Mantilari	180	180	144	144	204	190	201	195
569	Mantilari	180	180	144	144	204	190	201	195
589	Mantilari	180	180	144	144	204	190	201	195
590	Mantilari	180	180	144	144	204	190	201	195
552	Moschato aspro	180	180	132	132	204	190	195	185
553	Moschato aspro	180	180	132	132	206	206	195	185
556	Moschato aspro	180	180	132	132	206	206	195	185
560	Moschato aspro	180	180	132	132	206	206	195	185
565	Moschato aspro	180	180	132	132	206	206	195	185
567	Moschato aspro	180	180	132	132	206	206	195	185
577	Moschato aspro	180	180	132	132	206	206	195	185
584	Moschato aspro	180	180	144	144	206	206	199	187
585	Moschato aspro	180	180	132	132	206	202	195	185
550	Moschato mavro (Drakopoulos)	180	180	132	132	206	206	195	185
555	Moschato Spinas	180	180	132	132	206	206	195	185
572	Moschato Spinas	180	180	132	132	206	206	195	185
575	Moschato Spinas	180	180	132	132	206	206	195	185
581	Moschato Spinas	180	180	142	134	206	206	195	185
583	Moschato Spinas	187	180	144	144	206	206	203	187
558	Vidiano	180	180	144	142	206	202	199	187
559	Vidiano	180	180	144	142	206	202	199	187
561	Vidiano	180	180	144	142	206	202	199	187
587	Vidiano	180	180	144	142	206	202	199	187
591	Vidiano	180	180	144	142	206	202	199	187

Με τη χρήση του προγράμματος IDENTITY 1.0 (Wagner and Sefc, 1999, Austria), υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα:

- Η τιμή PI [Probability of identity, PI=Spi4+SS(2pipj)2] (Paetkau et al.1995).
- Η τιμή r (probability of null alleles, r=(He-Ho)/(1+He). He. (Brookfield 1996). He και Ho, είναι η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, αντίστοιχα ($He=1-\Sigma pi^2$).
- Ο αριθμός των αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο.
- Οι συχνότητες των αλληλομόρφων.
- Το άθροισμα των ανιχνευόμενων αλληλομόρφων.
- Αναμενόμενη ετεροζυγωτία (Nei 1973).
- Παρατηρούμενη ετεροζυγωτία.

❖ Στους πίνακες που ακολουθούν δίνονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά τη μελέτη των 46 κλώνων των ποικιλιών Vitis vinifera:

Πίνακας 3.3. Διάταξη των μελετούμενων δειγμάτων κατά την στατιστική επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος IDENTITY 1.0.

List of clones	DNA
Clone1: Kotsifali	557
Clone2: Kotsifali	563
Clone3: Kotsifali	568
Clone4: Kotsifali	578
Clone5: Kotsifali	580
Clone6: Kotsifaloliatiko	582
Clone7: Kotsifaloliatiko	574
Clone8: Kotsifaloliatiko	579
Clone9: Liatiko	562
Clone10: Liatiko	564
Clone11: Liatiko	570
Clone12: Liatiko	571
Clone13: Liatiko	573
Clone14: Liatiko	586
Clone15: Liatiko	588
Clone16: Liatiko	592
Clone17: Liatiko	593
Clone18: Liatiko	594
Clone19: Liatiko	595
Clone20: Liatiko	576
Clone21: Mantilari	551
Clone22: Mantilari	554
Clone23: Mantilari	566
Clone24: Mantilari	569
Clone25: Mantilari	589
Clone26: Mantilari	590
Clone27: Moschato aspro	552
Clone28: Moschato aspro	553
Clone29: Moschato aspro	556
Clone30: Moschato aspro	560
Clone31: Moschato aspro	565
Clone32: Moschato aspro	567
Clone33: Moschato aspro	577
Clone34: Moschato aspro	584
Clone35: Moschato aspro	585
Clone36: Moschato mavro (Drakopoulos)	550
Clone37: Moschato Spinas	555
Clone38: Moschato Spinas	572
Clone39: Moschato Spinas	575
Clone40: Moschato Spinas	581
Clone41: Moschato Spinas	583
Clone42: Vidiano	558
Clone43: Vidiano	559
Clone44: Vidiano	561

Clone45: Vidiano	587
Clone46: Vidiano	591

Παρακάτω δίνονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά την στατιστική επεξεργασία (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4. Τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά την στατιστική επεξεργασία των μεγεθών των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο που μελετήθηκε.

Locus 1 : 'VVS1'

Number of Alleles :	2	
	180	187
Allele Frequency	0.86957	0.13043
Standard Deviation	0.03511	0.03511
95% upper conf. Limit	0.91690	0.19889
sum	92	
Heterozygosity - expected:	0.226843	
- observed:	0.260870	
Estimated Frequency of Null Alleles:	-0.027735	
Paternity Exclusion Probability :	0.100557	
Probability of Identity (PI):	0.674958	

Locus 2 : 'VVS2'

Number of Alleles :	4			
	132	134	142	144
Allele Frequency	0.28261	0.13043	0.21739	0.36957
Standard Deviation	0.04694	0.03511	0.04300	0.05032
95% upper conf. Limit	0.36518	0.19889	0.29565	0.45497
sum	92			
Heterozygosity - expected:	0.719282			
- observed:	0.543478			
Estimated Frequency of Null Alleles:	0.102254			
Paternity Exclusion Probability :	0.465985			
Probability of Identity (PI):	0.232545			

Locus 3 : 'ZAG21'

Number of Alleles :	6					
	190	202	203	204	206	214
Allele Frequency	0.16304	0.06522	0.01087	0.07609	0.63043	0.05435
Standard Deviation	0.03851	0.02574	0.01081	0.02764	0.05032	0.02364
95% upper conf. Limit	0.23585	0.12119	0.04726	0.13462	0.70838	0.10746
sum	92					
Heterozygosity - expected:	0.562854					
- observed:	0.478261					
Estimated Frequency of Null Alleles:	0.054128					
Paternity Exclusion Probability :	0.353079					
Probability of Identity (PI):	0.288189					

Locus 4 : 'ZAG62'

Number of Alleles :				7			
	185	187	193	195	199	201	203
Allele Frequency	0.15385	0.16484	0.05495	0.21978	0.21978	0.06593	0.12088
Standard Deviation	0.03782	0.03889	0.02389	0.04341	0.04341	0.02601	0.03417
95% upper conf. Limit	0.22596	0.23830	0.10860	0.29871	0.29871	0.12246	0.18830
sum				91			

Heterozygosity - expected:	0.830576
- observed:	1.000000
Estimated Frequency of Null Alleles:	-0.092552
Paternity Exclusion Probability :	0.659990
Probability of Identity (PI):	0.096199

Total Exclusion Probability : 0.894350028998
Total Probability of Identity (PI): 4.351421e-003

Όσον αφορά τους 46 κλώνους ποικιλιών *Vitis vinifera,* φαίνονται παρακάτω οι κλώνοι που βάσει της μικροδορυφορικής ανάλυσης για τους 4 προαναφερθέντες μικροδορυφορικούς τόπους, εμφανίζονται να έχουν ταυτόσημους γονοτύπους (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5. Οι κλώνοι που βάσει της μικροδορυφορικής ανάλυσης για τους 4 προαναφερθέντες μικροδορυφορικούς τόπους, εμφανίζονται να έχουν ταυτόσημους γονοτύπους.

(563)	Kotsifali - (557)	Kotsifali
(568)	Kotsifali - (557)	Kotsifali
(568)	Kotsifali - (563)	Kotsifali
(578)	Kotsifali - (557)	Kotsifali
(578)	Kotsifali - (563)	Kotsifali
(578)	Kotsifali - (568)	Kotsifali
(580)	Kotsifali - (557)	Kotsifali
(580)	Kotsifali - (563)	Kotsifali
(580)	Kotsifali - (568)	Kotsifali
(580)	Kotsifali - (578)	Kotsifali
(574)	Kotsifaloliatiko - (582)	Kotsifaloliatiko
(579)	Kotsifaloliatiko - (582)	Kotsifaloliatiko
(579)	Kotsifaloliatiko - (574)	Kotsifaloliatiko
(564)	Liatiko - (562)	Liatiko
(570)	Liatiko - (562)	Liatiko
(570)	Liatiko - (564)	Liatiko
(571)	Liatiko - (562)	Liatiko
(571)	Liatiko - (564)	Liatiko
(571)	Liatiko - (570)	Liatiko
(573)	Liatiko - (562)	Liatiko
(573)	Liatiko - (564)	Liatiko
(573)	Liatiko - (570)	Liatiko
(573)	Liatiko - (571)	Liatiko
(592)	Liatiko - (588)	Liatiko
(593)	Liatiko - (588)	Liatiko
(593)	Liatiko - (592)	Liatiko
(594)	Liatiko - (588)	Liatiko
(594)	Liatiko - (592)	Liatiko
(594)	Liatiko - (593)	Liatiko
(576)	Liatiko - (588)	Liatiko
(576)	Liatiko - (592)	Liatiko
(576)	Liatiko - (593)	Liatiko
(576)	Liatiko - (594)	Liatiko
(554)	Mantilari - (551)	Mantilari
(566)	Mantilari - (551)	Mantilari
(566)	Mantilari - (554)	Mantilari
(569)	Mantilari - (551)	Mantilari
(569)	Mantilari - (554)	Mantilari
(569)	Mantilari - (566)	Mantilari
(589)	Mantilari - (551)	Mantilari
(589)	Mantilari - (554)	Mantilari
(589)	Mantilari - (566)	Mantilari
(589)	Mantilari - (569)	Mantilari
(590)	Mantilari - (551)	Mantilari

(590) Mantilari - (554) Mantilari
(590) Mantilari - (566) Mantilari
(590) Mantilari - (569) Mantilari
(590) Mantilari - (589) Mantilari
(553) Moschato aspro - (586) Liatiko
(556) Moschato aspro - (586) Liatiko
(556) Moschato aspro - (553) Moschato aspro
(560) Moschato aspro - (586) Liatiko
(560) Moschato aspro - (553) Moschato aspro
(560) Moschato aspro - (556) Moschato aspro
(565) Moschato aspro - (586) Liatiko
(565) Moschato aspro - (553) Moschato aspro
(565) Moschato aspro - (556) Moschato aspro
(565) Moschato aspro - (560) Moschato aspro
(567) Moschato aspro - (586) Liatiko
(567) Moschato aspro - (553) Moschato aspro
(567) Moschato aspro - (556) Moschato aspro
(567) Moschato aspro - (560) Moschato aspro
(567) Moschato aspro - (565) Moschato aspro
(577) Moschato aspro - (586) Liatiko
(577) Moschato aspro - (553) Moschato aspro
(577) Moschato aspro - (556) Moschato aspro
(577) Moschato aspro - (560) Moschato aspro
(577) Moschato aspro - (565) Moschato aspro
(577) Moschato aspro - (567) Moschato aspro
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (586) Liatiko
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (553) Moschato aspro
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (556) Moschato aspro
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (560) Moschato aspro
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (565) Moschato aspro
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (567) Moschato aspro
(550) Moschato mavro (Drakopoulos) - (577) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (586) Liatiko
(555) Moschato Spinas - (553) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (556) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (560) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (565) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (567) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (577) Moschato aspro
(555) Moschato Spinas - (550) Moschato mavro (Drakopoulos)
(572) Moschato Spinas - (586) Liatiko
(572) Moschato Spinas - (553) Moschato aspro
(572) Moschato Spinas - (556) Moschato aspro
(572) Moschato Spinas - (560) Moschato aspro
(572) Moschato Spinas - (565) Moschato aspro
(572) Moschato Spinas - (567) Moschato aspro
(572) Moschato Spinas - (577) Moschato aspro
(572) Moschato Spinas - (550) Moschato mavro (Drakopoulos)
(572) Moschato Spinas - (555) Moschato Spinas
(575) Moschato Spinas - (586) Liatiko
(575) Moschato Spinas - (553) Moschato aspro
(575) Moschato Spinas - (556) Moschato aspro
(575) Moschato Spinas - (560) Moschato aspro
(575) Moschato Spinas - (565) Moschato aspro
(575) Moschato Spinas - (567) Moschato aspro
(575) Moschato Spinas - (577) Moschato aspro
(575) Moschato Spinas - (550) Moschato mavro (Drakopoulos)
(575) Moschato Spinas - (555) Moschato Spinas
(575) Moschato Spinas - (572) Moschato Spinas
(559) Vidiano - (558) Vidiano

(561)	Vidiano - (558)	Vidiano
(561)	Vidiano - (559)	Vidiano
(587)	Vidiano - (558)	Vidiano
(587)	Vidiano - (559)	Vidiano
(587)	Vidiano - (561)	Vidiano
(591)	Vidiano - (558)	Vidiano
(591)	Vidiano - (559)	Vidiano
(591)	Vidiano - (561)	Vidiano
(591)	Vidiano - (587)	Vidiano

Με τη βοήθεια του IDENTITY 1.0, υπολογίστηκαν επίσης και δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.6), οι πιθανοί συνδυασμοί πατρικών ατόμων-απογόνων, στηριζόμενοι σε συνεπικρατή Μεντελιανή κληρονόμηση των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, στη μορφή «απόγονος = γονέας 1Χ γονέας 2».

Πίνακας 3.6 Οι πιθανοί συνδυασμοί πατρικών ατόμων-απογόνων, στηριζόμενοι σε συνεπικρατή Μεντελιανή κληρονόμηση των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, στη μορφή «απόγονος = γονέας 1Χ γονέας 2». Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τους κωδικούς αριθμούς των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 557 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 557 x 576)

Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 557 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (582 = 557 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (574 = 557 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (579 = 557 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 557 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 557 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 557 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 557 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 557 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 557 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 557 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 557 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 557 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 557 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 557 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 557 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 557 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 557 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 557 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 563 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 563 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 563 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (582 = 563 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (574 = 563 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (579 = 563 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 563 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 563 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 563 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 563 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 563 x 559)

Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 563 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 563 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 563 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 563 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 563 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 563 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 563 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 563 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 563 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 563 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 568 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 568 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 568 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (582 = 568 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (574 = 568 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (579 = 568 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 568 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 568 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 568 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 568 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 568 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 568 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 568 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 568 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 568 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 568 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 568 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 568 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 568 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 568 x 591)

Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 568 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 578 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 578 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 578 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (582 = 578 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (574 = 578 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (579 = 578 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 578 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 578 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 578 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 578 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 578 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 578 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 578 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 578 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 578 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 578 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 578 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 578 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 578 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 578 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 578 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 562)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 564)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 570)

Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 570)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 571)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 573)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 588)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 592)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 593)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 594)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 595)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (582 = 580 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (574 = 580 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko (579 = 580 x 576)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (582 = 580 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (574 = 580 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro (579 = 580 x 584)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 580 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 580 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 580 x 558)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 580 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 580 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 580 x 559)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 580 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 580 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 580 x 561)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 580 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 580 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 580 x 587)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (582 = 580 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (574 = 580 x 591)
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano (579 = 580 x 591)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 582 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 582 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 582 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 582 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 582 x 562)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 582 x 562)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 582 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 582 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 582 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 582 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 582 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 582 x 564)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 582 x 564)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 582 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 582 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 582 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 582 x 570)

Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 582 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 582 x 570)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 582 x 570)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 582 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 582 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 582 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 582 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 582 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 582 x 571)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 582 x 571)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 582 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 582 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 582 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 582 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 582 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 582 x 573)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 582 x 573)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 582 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 582 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 582 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 582 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 582 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 582 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 582 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 582 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 582 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 582 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 582 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 582 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 582 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 582 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 582 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 582 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 582 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 582 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 582 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 582 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 582 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 582 x 595)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (581 = 582 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 582 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 582 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 582 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 582 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 582 x 576)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Moschato Spinas (584 = 582 x 583)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 582 x 558)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 582 x 559)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 582 x 561)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 582 x 587)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 582 x 591)

Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 574 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 574 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 574 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 574 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 574 x 562)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 574 x 562)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 574 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 574 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 574 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 574 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 574 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 574 x 564)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 574 x 564)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 574 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 574 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 574 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 574 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 574 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 574 x 570)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 574 x 570)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 574 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 574 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 574 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 574 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 574 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 574 x 571)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 574 x 571)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 574 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 574 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 574 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 574 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 574 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 574 x 573)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 574 x 573)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 574 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 574 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 574 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 574 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 574 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 574 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 574 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 574 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 574 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 574 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 574 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 574 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 574 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 574 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 574 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 574 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 574 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 574 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 574 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 574 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 574 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 574 x 595)

Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 574 x 595)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (581 = 574 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 574 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 574 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 574 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 574 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 574 x 576)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Moschato Spinas (584 = 574 x 583)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 574 x 558)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 574 x 559)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 574 x 561)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 574 x 587)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 574 x 591)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 579 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 579 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 579 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 579 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 579 x 562)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 579 x 562)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 579 x 562)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 579 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 579 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 579 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 579 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 579 x 564)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 579 x 564)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 579 x 564)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 579 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 579 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 579 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 579 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 579 x 570)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 579 x 570)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 579 x 570)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 579 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 579 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 579 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 579 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 579 x 571)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 579 x 571)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 579 x 571)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 579 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 579 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 579 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 579 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 579 x 573)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatiko (584 = 579 x 573)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (583 = 579 x 573)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 579 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 579 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 579 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 579 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 579 x 588)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 579 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 579 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 579 x 592)

Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 579 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 579 x 592)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 579 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 579 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 579 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 579 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 579 x 593)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 579 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 579 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 579 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 579 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 579 x 594)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (588 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (592 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (593 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (594 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (576 = 579 x 595)
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatiko (581 = 579 x 595)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (562 = 579 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (564 = 579 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (570 = 579 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (571 = 579 x 576)
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatiko (573 = 579 x 576)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Moschato Spinas (584 = 579 x 583)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 579 x 558)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 579 x 559)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 579 x 561)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 579 x 587)
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano (584 = 579 x 591)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (588 = 562 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (592 = 562 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (593 = 562 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (594 = 562 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (576 = 562 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 562 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Moschato aspro (583 = 562 x 584)
Moschato aspro = Liatiko x Moschato Spinas (584 = 562 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 562 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 562 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 562 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 562 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 562 x 558)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 562 x 558)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 562 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 562 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 562 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 562 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 562 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 562 x 559)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 562 x 559)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 562 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 562 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 562 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 562 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 562 x 561)

Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 562 x 561)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 562 x 561)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 562 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 562 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 562 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 562 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 562 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 562 x 587)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 562 x 587)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 562 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 562 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 562 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 562 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 562 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 562 x 591)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 562 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 562 x 591)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (588 = 564 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (592 = 564 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (593 = 564 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (594 = 564 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (576 = 564 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 564 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Moschato aspro (583 = 564 x 584)
Moschato aspro = Liatiko x Moschato Spinas (584 = 564 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 564 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 564 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 564 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 564 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 564 x 558)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 564 x 558)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 564 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 564 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 564 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 564 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 564 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 564 x 559)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 564 x 559)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 564 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 564 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 564 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 564 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 564 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 564 x 561)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 564 x 561)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 564 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 564 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 564 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 564 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 564 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 564 x 587)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 564 x 587)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 564 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 564 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 564 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 564 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 564 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 564 x 591)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 564 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 564 x 591)

Liatiko = Liatiko x Liatiko (588 = 570 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (592 = 570 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (593 = 570 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (594 = 570 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (576 = 570 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 570 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Moschato aspro (583 = 570 x 584)
Moschato aspro = Liatiko x Moschato Spinas (584 = 570 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 570 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 570 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 570 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 570 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 570 x 558)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 570 x 558)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 570 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 570 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 570 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 570 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 570 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 570 x 559)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 570 x 559)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 570 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 570 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 570 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 570 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 570 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 570 x 561)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 570 x 561)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 570 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 570 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 570 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 570 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 570 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 570 x 587)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 570 x 587)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 570 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 570 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 570 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 570 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 570 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 570 x 591)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 570 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 570 x 591)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (588 = 571 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (592 = 571 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (593 = 571 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (594 = 571 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (576 = 571 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 571 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Moschato aspro (583 = 571 x 584)
Moschato aspro = Liatiko x Moschato Spinas (584 = 571 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 571 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 571 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 571 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 571 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 571 x 558)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 571 x 558)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 571 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 571 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 571 x 559)

Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 571 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 571 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 571 x 559)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 571 x 559)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 571 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 571 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 571 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 571 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 571 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 571 x 561)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 571 x 561)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 571 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 571 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 571 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 571 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 571 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 571 x 587)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 571 x 587)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 571 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 571 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 571 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 571 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 571 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 571 x 591)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 571 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 571 x 591)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (588 = 573 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (592 = 573 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (593 = 573 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (594 = 573 x 595)
Liatiko = Liatiko x Liatiko (576 = 573 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 573 x 595)
Moschato Spinas = Liatiko x Moschato aspro (583 = 573 x 584)
Moschato aspro = Liatiko x Moschato Spinas (584 = 573 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 573 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 573 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 573 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 573 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 573 x 558)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 573 x 558)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 573 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 573 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 573 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 573 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 573 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 573 x 559)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 573 x 559)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 573 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 573 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 573 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 573 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 573 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 573 x 561)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 573 x 561)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 573 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 573 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 573 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 573 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 573 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 573 x 587)

Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 573 x 587)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 573 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 573 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 573 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 573 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 573 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 573 x 591)
Moschato aspro = Liatiko x Vidiano (584 = 573 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (583 = 573 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 588 x 595)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (562 = 588 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (564 = 588 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (570 = 588 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (571 = 588 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (573 = 588 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (562 = 588 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (564 = 588 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (570 = 588 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (571 = 588 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (573 = 588 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 588 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 588 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 588 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 588 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 588 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 588 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 588 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 588 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 588 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 588 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 588 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 588 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 588 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 588 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 588 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 588 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 588 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 588 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 588 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 588 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 588 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 588 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 588 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 588 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 588 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 592 x 595)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (562 = 592 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (564 = 592 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (570 = 592 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (571 = 592 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (573 = 592 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (562 = 592 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (564 = 592 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (570 = 592 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (571 = 592 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (573 = 592 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 592 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 592 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 592 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 592 x 558)

Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 592 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 592 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 592 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 592 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 592 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 592 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 592 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 592 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 592 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 592 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 592 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 592 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 592 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 592 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 592 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 592 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 592 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 592 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 592 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 592 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 592 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 593 x 595)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (562 = 593 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (564 = 593 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (570 = 593 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (571 = 593 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (573 = 593 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (562 = 593 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (564 = 593 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (570 = 593 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (571 = 593 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (573 = 593 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 593 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 593 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 593 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 593 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 593 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 593 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 593 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 593 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 593 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 593 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 593 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 593 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 593 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 593 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 593 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 593 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 593 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 593 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 593 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 593 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 593 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 593 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 593 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 593 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 593 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 594 x 595)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (562 = 594 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (564 = 594 x 584)

Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (570 = 594 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (571 = 594 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (573 = 594 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (562 = 594 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (564 = 594 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (570 = 594 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (571 = 594 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (573 = 594 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 594 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 594 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 594 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 594 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 594 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 594 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 594 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 594 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 594 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 594 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 594 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 594 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 594 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 594 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 594 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 594 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 594 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 594 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 594 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 594 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 594 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 594 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 594 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 594 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 594 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko (581 = 595 x 576)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (582 = 595 x 551)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (574 = 595 x 551)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (579 = 595 x 551)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (582 = 595 x 554)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (574 = 595 x 554)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (579 = 595 x 554)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (582 = 595 x 566)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (574 = 595 x 566)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (579 = 595 x 566)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (582 = 595 x 569)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (574 = 595 x 569)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (579 = 595 x 569)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (582 = 595 x 589)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (574 = 595 x 589)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (579 = 595 x 589)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (582 = 595 x 590)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (574 = 595 x 590)
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari (579 = 595 x 590)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (562 = 595 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (564 = 595 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (570 = 595 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (571 = 595 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (573 = 595 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (588 = 595 x 581)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (592 = 595 x 581)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (593 = 595 x 581)

Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (594 = 595 x 581)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (576 = 595 x 581)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (562 = 595 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (564 = 595 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (570 = 595 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (571 = 595 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (573 = 595 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 595 x 558)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (581 = 595 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 595 x 559)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (581 = 595 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 595 x 561)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (581 = 595 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 595 x 587)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (581 = 595 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (588 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (592 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (593 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (594 = 595 x 591)

Liatiko = Liatiko x Vidiano (576 = 595 x 591)
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano (581 = 595 x 591)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (562 = 576 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (564 = 576 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (570 = 576 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (571 = 576 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro (573 = 576 x 584)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (562 = 576 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (564 = 576 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (570 = 576 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (571 = 576 x 583)
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas (573 = 576 x 583)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 576 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 576 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 576 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 576 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 576 x 558)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 576 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 576 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 576 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 576 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 576 x 559)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 576 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 576 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 576 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 576 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 576 x 561)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 576 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 576 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 576 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 576 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 576 x 587)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (562 = 576 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (564 = 576 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (570 = 576 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (571 = 576 x 591)
Liatiko = Liatiko x Vidiano (573 = 576 x 591)
Moschato aspro = Moschato Spinas x Vidiano (584 = 583 x 558)
Moschato aspro = Moschato Spinas x Vidiano (584 = 583 x 559)
Moschato aspro = Moschato Spinas x Vidiano (584 = 583 x 561)
Moschato aspro = Moschato Spinas x Vidiano (584 = 583 x 587)
Moschato aspro = Moschato Spinas x Vidiano (584 = 583 x 591)

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 εξετάζεται, και συνολικά για όλους τους μελετούμενους γενετικούς τόπους, υπολογίζονται οι ακόλουθες αναλογίες πιθανοτήτων:

1. 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.

2. Η αναλογία της πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (τυχαίο άτομο Χ προτεινόμενος γονέας 1) =Χ x (1).
3. Η αναλογία της πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (συγγενικό άτομο του προτεινόμενου γονέα 2 x προτεινόμενος γονέας 1) = rel(2) x (1).
4. Η αναλογία πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (προτεινόμενος γονέας 2 x τυχαία ποικιλία) = (2) x Χ.
5. Η αναλογία πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (προτεινόμενος γονέας 2 x συγγενικό άτομο του προτεινόμενου γονέα 1) = (2) x rel(1).

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

Η κληρονόμηση 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 υπολογίζονται πάνω από το 95% όριο εμπιστοσύνης των παρατηρούμενων συχνοτήτων των αλληλομόρφων. Μέρος των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7. Οι προκύπτουσες αναλογίες πιθανοτήτων (1,2,3,4,5, βλ. κείμενο), όπως υπολογίστηκαν από το IDENTITY 1.0 software.

Προτεινόμενη Διασταύρωση	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Liatiko	1.45e+000	8.58e-001	8.27e-001	8.20e+000	2.41e+000
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Moschato aspro	5.81e+000	3.43e+000	1.75e+000	3.64e+000	1.72e+000
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Vidiano	2.90e+000	1.72e+000	1.24e+000	2.87e+000	1.56e+000
Kotsifaloliatiko = Kotsifali x Kotsifaloliatiko	2.90e+000	1.72e+000	1.24e+000	7.16e-001	7.96e-001
Kotsifaloliatiko = Kotsifaloliatiko x Kotsifaloliatiko	1.16e+001	2.87e+000	1.60e+000	2.87e+000	1.60e+000

Kotsifaloliatiko = Kotsifaloliatiko x Moschato aspro	1.16e+001	2.87e+000	1.60e+000	7.28e+000	2.32e+000
Kotsifaloliatiko = Kotsifaloliatiko x Moschato Spinas	2.90e+000	7.16e-001	8.00e-001	6.55e+000	2.23e+000
Kotsifaloliatiko = Kotsifaloliatiko x Vidiano	5.81e+000	1.43e+000	1.07e+000	5.74e+000	2.11e+000
Kotsifaloliatiko = Kotsifaloliatiko x Kotsifaloliatiko	1.16e+001	2.87e+000	1.60e+000	2.87e+000	1.60e+000
Kotsifaloliatiko =Kotsifaloliatiko x Vidiano	5.81e+000	1.43e+000	1.07e+000	5.74e+000	2.11e+000
Vidiano = Kotsifaloliatiko x Vidiano	1.13e+001	1.12e+001	2.50e+000	1.63e+000	1.17e+000
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Liatikc	1.26e+000	7.88e-001	8.34e-001	1.78e+000	1.22e+000
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatikc	4.60e+000	1.04e+001	2.55e+000	1.46e+000	1.11e+000
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Moschato Spinas	2.51e+000	1.58e+000	1.10e+000	1.42e+000	1.13e+000
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano	2.51e+000	1.58e+000	1.18e+000	1.58e+000	1.18e+000
Kotsifali = Kotsifali x Kotsifali	2.11e+002	1.22e+001	2.64e+000	1.22e+001	2.64e+000
Kotsifali = Kotsifali x Kotsifaloliatiko	5.27e+001	3.05e+000	1.67e+000	3.11e+001	3.22e+000
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Kotsifaloliatiko	2.51e+000	1.58e+000	1.18e+000	1.58e+000	1.18e+000
Moschato Spinas = Kotsifaloliatiko x Liatikc	4.60e+000	1.04e+001	2.55e+000	1.46e+000	1.11e+000
Liatiko = Kotsifaloliatiko x Liatikc	4.19e+000	2.37e+001	3.48e+000	4.97e-001	6.87e-001

Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Moschato Spinas	2.51e+000 1.58e+000 1.10e+000 1.42e+000 1.13e+000
Moschato aspro = Kotsifaloliatiko x Vidiano	2.51e+000 1.58e+000 1.18e+000 1.58e+000 1.18e+000
Liatiko = Liatiko x Liatiko	3.35e+001 3.97e+000 1.80e+000 3.97e+000 1.80e+000
Moschato aspro = Liatiko x Moschato Spinas	2.51e+000 3.55e+000 1.54e+000 1.42e+000 1.08e+000
Liatiko = Liatiko x Vidiano	4.19e+000 4.97e-001 6.87e-001 2.37e+001 3.48e+000
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano	4.60e+000 1.46e+000 1.11e+000 1.04e+001 2.55e+000
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano	4.60e+000 1.46e+000 1.11e+000 1.04e+001 2.55e+000
Liatiko = Liatiko x Moschato aspro	1.68e+001 1.99e+000 1.36e+000 2.37e+001 3.48e+000
Liatiko = Liatiko x Moschato Spinas	1.68e+001 1.99e+000 1.36e+000 5.32e+000 1.98e+000
Liatiko = Moschato aspro x Moschato mavro (Drakopoulos)	3.29e+001 8.04e+000 2.35e+000 4.02e+000 1.66e+000
Liatiko = Moschato aspro x Moschato Spinas	6.58e+001 8.04e+000 2.35e+000 8.04e+000 2.35e+000
Kotsifaloliatiko = Liatiko x Mantilari	1.45e+000 1.07e+001 2.64e+000 1.09e+000 9.19e-001
Moschato Spinas = Liatiko x Liatiko	1.17e+000 1.09e+000 9.19e-001 1.72e+000 1.14e+000
Moschato Spinas = Liatiko x Vidiano	1.17e+000 1.30e+000 1.09e+000 2.14e+000 1.15e+000
Moschato Spinas = Moschato aspro x Moschato aspro	6.58e+001 8.04e+000 2.35e+000 8.04e+000 2.35e+000
Moschato aspro = Moschato aspro x Moschato mavro (Drakopoulos)	6.58e+001 8.04e+000 2.35e+000 8.04e+000 2.35e+000

Moschato Spinas = Moschato aspro x Moschato mavro (Drakopoulos)	6.58e+001 8.04e+000 2.35e+000 8.04e+000 2.35e+000
Moschato mavro (Drakopoulos) = Moschato aspro x Moschato Spinas	6.58e+001 8.04e+000 2.35e+000 8.04e+000 2.35e+000
Vidiano = Moschato aspro x Vidiano	2.26e+001 1.42e+001 2.75e+000 3.26e+000 1.70e+000
Moschato aspro = Moschato Spinas x Vidiano	2.51e+000 1.42e+000 1.13e+000 1.58e+000 1.10e+000

- Ακολούθως, δίνονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά τη μελέτη των 60 υβριδίων Vitis που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια Vitis vinifera .

Πίνακας 3.8 Διάταξη των μελετούμενων δειγμάτων κατά την στατιστική επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος IDENTITY 1.0.

Κλώνοι που μελετήθηκαν

Clone1: 420A

Clone2: 110 Richter Greek

Clone3: Rupestris du Lot

Clone4: Couderc 1613

Clone5: 140 Ruggeri

Clone6: 1103 Paulsen

Clone7: Dogridge

Clone8: 110 Richter Greek

Clone9: Salt Creek

Clone10: 41B

Clone11: LN33

Clone12: SO4

Clone13: ARGNo1

Clone14: 5BB

Clone15: Couderc 16149

Clone16: 1103 Paulsen

Clone17: 110 Richter

Clone18: Couderc 16149

Clone19: Unknown

Clone20: 1103 Paulsen

Clone21: 1103P?1

Clone22: 1103P?2

Clone23: 1103P?3

Clone24: 1103P?4

Clone25: 1103P?5

Clone26: 1103P?6

Clone27: 1103P?7

Clone28: 1103P?8

Clone29: 1103P?9

Clone30: 1103P?10

Clone31: 140 Ruggeri

Clone32: 140 Ru?1

Clone33: 141 Ru?2

Clone34: Salt Creek

Clone35: 3306 C

Clone36: Couderc 16149

Clone37: 1103 Paulsen

Clone38: 101-14

Clone39: Harmony

Clone40: Fercal

Clone41: Riparia Gloire

Clone42: Rupestris du Lot

Clone43: 3309

Clone44: Couderc 16149

Clone45: 15711

Clone46: 34 EM

Clone47: 5C Teleki

Πίνακας 3.9 Τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά την στατιστική επεξεργασία των μεγεθών των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο που μελετήθηκε.

Locus 1 : 'UCH2'

Number of Alleles : 18

146 147 149 152 155 156 160 162 163 164 165 166 168 170 172 178 190 200

Allele Frequency: 0.00833 0.12500 0.02500 0.01667 0.03333 0.16667 0.08333 0.12500 0.00833 0.04167 0.05000 0.05000 0.07500 0.04167 0.03333 0.10000 0.00833 0.00833

Standard Deviation 0.00830 0.03019 0.01425 0.01169 0.01639 0.03402 0.02523 0.03019 0.00830 0.01824 0.01990 0.01990 0.02404 0.01824 0.01639 0.02739 0.00830 0.00830

95% upper conf. Limit 0.03649 0.18307 0.06092 0.04912 0.07220 0.22985 0.13458 0.18307 0.03649 0.08312 0.09378 0.09378 0.12459 0.08312 0.07220 0.15424 0.03649 0.03649

sum 120

Heterozygosity - expected: 0.906528

- observed: 0.783333

Estimated Frequency of Null Alleles: 0.064617

Paternity Exclusion Probability : 0.812003

Probability of Identity (PI): 0.030565

Locus 2 : 'UCH11'

Number of Alleles : 18

220 226 230 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 248 249 252 260 263

Allele Frequency 0.02500 0.03333 0.00833 0.03333 0.02500 0.00833 0.06667 0.04167 0.15833 0.01667 0.25833 0.05833 0.04167 0.01667 0.00833 0.14167 0.03333 0.02500

Standard Deviation 0.01425 0.01639 0.00830 0.01639 0.01425 0.00830 0.02277 0.01824 0.03332 0.01169 0.03996 0.02140 0.01824 0.01169 0.00830 0.03183 0.01639 0.01425

95% upper conf. Limit 0.06092 0.07220 0.03649 0.07220 0.06092 0.03649 0.11448 0.08312 0.22060 0.04912 0.32888 0.10422 0.08312 0.04912 0.03649 0.20195 0.07220 0.06092

sum 120

Heterozygosity - expected: 0.870833

- observed: 0.850000

Estimated Frequency of Null Alleles: 0.011136

Paternity Exclusion Probability : 0.749920

Probability of Identity (PI): 0.050154

Locus 3 : 'UCH12 '

Number of Alleles : 22

135 145 147 149 152 156 158 161 162 163 164 166 170 172 174 184 196 198 210 222 232 234

Allele Frequency 0.08333 0.03333 0.02500 0.19167 0.05833 0.00833 0.04167 0.05000 0.00833 0.04167 0.00833 0.23333 0.04167 0.02500 0.01667 0.00833 0.00833 0.01667 0.01667 0.05000 0.00833 0.02500
Standard Deviation 0.02523 0.01639 0.01425 0.03593 0.02140 0.00830 0.01824 0.01990 0.00830 0.01824 0.00830 0.03861 0.01824 0.01425 0.01169 0.00830 0.00830 0.01169 0.01169 0.01990 0.00830 0.01425
95% upper conf. Limit 0.13458 0.07220 0.06092 0.25731 0.10422 0.03649 0.08312 0.09378 0.03649 0.08312 0.03649 0.30230 0.08312 0.06092 0.04912 0.03649 0.03649 0.04912 0.04912 0.09378 0.03649 0.06092
sum 120
Heterozygosity - expected: 0.884028
- observed: 0.916667
Estimated Frequency of Null Alleles: -0.017324
Paternity Exclusion Probability : 0.775512
Probability of Identity (PI): 0.040605

Locus 4 : 'UCH19 '

Number of Alleles : 12

	174	178	182	186	188	190	192	196	198	202	204	212
Allele Frequency	0.03333	0.00833	0.15000	0.09167	0.15000	0.00833	0.21667	0.10000	0.09167	0.10833	0.03333	0.00833
Standard Deviation	0.01639	0.00830	0.03260	0.02634	0.03260	0.00830	0.03761	0.02739	0.02634	0.02837	0.01639	0.00830
95% upper conf. Limit	0.07220	0.03649	0.21130	0.14446	0.21130	0.03649	0.28441	0.15424	0.14446	0.16393	0.07220	0.03649

sum 120
Heterozygosity - expected: 0.867083
- observed: 0.866667
Estimated Frequency of Null Alleles: 0.000223

Paternity Exclusion Probability : 0.733133
Probability of Identity (PI): 0.059874

Locus 5 : 'UCH29'

Number of Alleles : 20

	207	211	274	282	284	285	286	288	289	290	292	295	296	297	300	302	303	304	308	313
Allele Frequency	0.04167	0.10833	0.04167	0.05000	0.06667	0.10833	0.00833	0.05833	0.07500	0.06667	0.00833	0.08333	0.00833	0.02500	0.13333	0.01667	0.02500	0.01667	0.02500	0.03333
Standard Deviation	0.01824	0.02837	0.01824	0.01990	0.02277	0.02837	0.00830	0.02140	0.02404	0.02277	0.00830	0.02523	0.00830	0.01425	0.03103	0.01169	0.01425	0.01169	0.01425	0.01639
95% upper conf. Limit	0.08312	0.16393	0.08312	0.09378	0.11448	0.16393	0.03649	0.10422	0.12459	0.11448	0.03649	0.13458	0.03649	0.06092	0.19254	0.04912	0.06092	0.04912	0.06092	0.07220

sum 120
Heterozygosity - expected: 0.924167
- observed: 0.933333
Estimated Frequency of Null Alleles: -0.004764

Paternity Exclusion Probability : 0.846737

Probability of Identity (PI): 0.020791

Locus 6 : 'UCH35'

Number of Alleles : 15

	133	147	149	151	153	157	159	161	165	167	169	173	175	177	181
Allele Frequency	0.30833	0.01667	0.09167	0.03333	0.05000	0.02500	0.05833	0.05000	0.04167	0.14167	0.02500	0.00833	0.02500	0.02500	0.10000
Standard Deviation	0.04216	0.01169	0.02634	0.01639	0.01990	0.01425	0.02140	0.01990	0.01824	0.03183	0.01425	0.00830	0.01425	0.01425	0.02739
95% upper conf. Limit	0.38127	0.04912	0.14446	0.07220	0.09378	0.06092	0.10422	0.09378	0.08312	0.20195	0.06092	0.03649	0.06092	0.06092	0.15424

sum 120

Heterozygosity - expected: 0.852361

- observed: 0.733333

Estimated Frequency of Null Alleles: 0.064257

Paternity Exclusion Probability : 0.721681

Probability of Identity (PI): 0.058264

Locus 7 : 'UCH40 '

Number of Alleles : 17

	237	243	249	252	258	264	267	270	273	276	279	285	294	300	306	309	312
Allele Frequency	0.02500	0.01667	0.01667	0.02500	0.13333	0.12500	0.05833	0.13333	0.18333	0.07500	0.01667	0.01667	0.01667	0.13333	0.00833	0.00833	0.00833
Standard Deviation	0.01425	0.01169	0.01169	0.01425	0.03103	0.03019	0.02140	0.03103	0.03532	0.02404	0.01169	0.01169	0.01169	0.03103	0.00830	0.00830	0.00830
95% upper conf. Limit	0.06092	0.04912	0.04912	0.06092	0.19254	0.18307	0.10422	0.19254	0.24820	0.12459	0.04912	0.04912	0.04912	0.19254	0.03649	0.03649	0.03649

sum 120

Heterozygosity - expected: 0.885556

- observed: 0.883333

Estimated Frequency of Null Alleles: 0.001179

Paternity Exclusion Probability : 0.769910

Probability of Identity (PI): 0.045291

Total Exclusion Probability : 0.999972356371

Total Probability of Identity (PI): 2.044687e-010

Παρακάτω, φαίνονται τα υποκείμενα που βάσει της μικροδορυφορικής ανάλυσης για τους 7 προαναφερθέντες μικροδορυφορικούς τόπους, εμφανίζονται να έχουν ταυτόσημους γονοτύπους:

Πίνακας 3.10 Οι κλώνοι που βάσει της μικροδορυφορικής ανάλυσης για τους 4 προαναφερθέντες μικροδορυφορικούς τόπους, εμφανίζονται να έχουν ταυτόσημους γονοτύπους

(223)	5BB - (55)	SO4
(272)	Couderc 16149 - (274)	Couderc 16149
(256)	1103 Paulsen - (270)	1103 Paulsen
(266)	1103P?2 - (265)	1103P?1
(261)	1103P?3 - (265)	1103P?1
(261)	1103P?3 - (266)	1103P?2
(264)	1103P?4 - (265)	1103P?1
(264)	1103P?4 - (266)	1103P?2
(264)	1103P?4 - (261)	1103P?3
(262)	1103P?5 - (265)	1103P?1
(262)	1103P?5 - (266)	1103P?2
(262)	1103P?5 - (261)	1103P?3
(262)	1103P?5 - (264)	1103P?4
(257)	1103P?6 - (265)	1103P?1
(257)	1103P?6 - (266)	1103P?2
(257)	1103P?6 - (261)	1103P?3
(257)	1103P?6 - (264)	1103P?4
(257)	1103P?6 - (262)	1103P?5
(263)	1103P?7 - (265)	1103P?1
(263)	1103P?7 - (266)	1103P?2
(263)	1103P?7 - (261)	1103P?3
(263)	1103P?7 - (264)	1103P?4
(263)	1103P?7 - (262)	1103P?5
(263)	1103P?7 - (257)	1103P?6
(259)	1103P?8 - (265)	1103P?1
(259)	1103P?8 - (266)	1103P?2
(259)	1103P?8 - (261)	1103P?3
(259)	1103P?8 - (264)	1103P?4
(259)	1103P?8 - (262)	1103P?5
(259)	1103P?8 - (257)	1103P?6
(259)	1103P?8 - (263)	1103P?7
(260)	1103P?9 - (265)	1103P?1
(260)	1103P?9 - (266)	1103P?2
(260)	1103P?9 - (261)	1103P?3
(260)	1103P?9 - (264)	1103P?4
(260)	1103P?9 - (262)	1103P?5
(260)	1103P?9 - (257)	1103P?6
(260)	1103P?9 - (263)	1103P?7
(260)	1103P?9 - (259)	1103P?8
(258)	1103P?10 - (265)	1103P?1
(258)	1103P?10 - (266)	1103P?2
(258)	1103P?10 - (261)	1103P?3
(258)	1103P?10 - (264)	1103P?4
(258)	1103P?10 - (262)	1103P?5
(258)	1103P?10 - (257)	1103P?6
(258)	1103P?10 - (263)	1103P?7
(258)	1103P?10 - (259)	1103P?8
(258)	1103P?10 - (260)	1103P?9
(267)	140 Ruggeri - (299)	140 Ruggeri
(269)	141 Ru?2 - (268)	140 Ru?1

(416)	Salt Creek - (46)	Salt Creek
(420)	3306 C - (46)	Salt Creek
(420)	3306 C - (416)	Salt Creek
(413)	Couderc 16149 - (274)	Couderc 16149
(413)	Couderc 16149 - (272)	Couderc 16149
(415)	1103 Paulsen - (270)	1103 Paulsen
(415)	1103 Paulsen - (256)	1103 Paulsen
(450)	Rupestris du Lot - (32)	Rupestris du Lot
(442)	3309 - (273)	Unknown
(441)	Couderc 16149 - (274)	Couderc 16149
(441)	Couderc 16149 - (272)	Couderc 16149
(441)	Couderc 16149 - (413)	Couderc 16149
(443)	SO4 - (299)	140 Ruggeri
(443)	SO4 - (267)	140 Ruggeri
(433)	140 Ru - (299)	140 Ruggeri
(433)	140 Ru - (267)	140 Ruggeri
(433)	140 Ru - (443)	SO4
(425)	41B - (53)	41B
(36)	Tompson seedless - (265)	1103P?1
(36)	Tompson seedless - (266)	1103P?2
(36)	Tompson seedless - (261)	1103P?3
(36)	Tompson seedless - (264)	1103P?4
(36)	Tompson seedless - (262)	1103P?5
(36)	Tompson seedless - (257)	1103P?6
(36)	Tompson seedless - (263)	1103P?7
(36)	Tompson seedless - (259)	1103P?8
(36)	Tompson seedless - (260)	1103P?9
(36)	Tompson seedless - (258)	1103P?10

Με τη βοήθεια του IDENTITY 1.0 software, υπολογίστηκαν επίσης, και δίνονται στην λίστα που ακολουθεί, οι πιθανοί συνδυασμοί πατρικών ατόμων-απογόνων, στηριζόμενοι σε συνεπικρατή Μεντελιανή κληρονόμηση των αλληλομόρφων, στη μορφή «απόγονος=γονέας 1Χ γονέας 2». Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τους κωδικούς αριθμούς των δειγμάτων που μελετήθηκαν:

Πίνακας 3.11 Οι πιθανοί συνδυασμοί πατρικών ατόμων-απογόνων, στηριζόμενοι σε συνεπικρατή Μεντελιανή κληρονόμηση των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, στη μορφή «απόγονος = γονέας 1Χ γονέας 2». Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τους κωδικούς αριθμούς των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

110 Richter = 110 Richter Greek x Rupestris du Lot (271 = 27 x 32)
110 Richter = 110 Richter Greek x Rupestris du Lot (271 = 27 x 450)
1103 Paulsen = Rupestris du Lot x 1103 Paulsen (39 = 32 x 270)
1103 Paulsen = Rupestris du Lot x 1103 Paulsen (39 = 32 x 256)
1103 Paulsen = Rupestris du Lot x 1103 Paulsen (39 = 32 x 415)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?1 (421 = 33 x 265)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?2 (421 = 33 x 266)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?3 (421 = 33 x 261)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?4 (421 = 33 x 264)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?5 (421 = 33 x 262)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?6 (421 = 33 x 257)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?7 (421 = 33 x 263)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?8 (421 = 33 x 259)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?9 (421 = 33 x 260)
LN33 = Couderc 1613 x 1103P?10 (421 = 33 x 258)
LN33 = Couderc 1613 x LN33 (54 = 33 x 421)
LN33 = Couderc 1613 x Tompson seedless (421 = 33 x 36)
Rupestris du Lot = 1103 Paulsen x 57R (32 = 39 x 447)
Rupestris du Lot = 1103 Paulsen x 57R (450 = 39 x 447)
LN33 = LN33 x 1103P?1 (421 = 54 x 265)
LN33 = LN33 x 1103P?2 (421 = 54 x 266)
LN33 = LN33 x 1103P?3 (421 = 54 x 261)
LN33 = LN33 x 1103P?4 (421 = 54 x 264)
LN33 = LN33 x 1103P?5 (421 = 54 x 262)
LN33 = LN33 x 1103P?6 (421 = 54 x 257)
LN33 = LN33 x 1103P?7 (421 = 54 x 263)
LN33 = LN33 x 1103P?8 (421 = 54 x 259)
LN33 = LN33 x 1103P?9 (421 = 54 x 260)
LN33 = LN33 x 1103P?10 (421 = 54 x 258)

LN33 = LN33 x Tompson seedless (421 = 54 x 36)
1103 Paulsen = 1103 Paulsen x Rupestris du Lot (39 = 270 x 450)
1103 Paulsen = 1103 Paulsen x Rupestris du Lot (39 = 256 x 450)
1103 Paulsen = 1103 Paulsen x Rupestris du Lot (39 = 415 x 450)
Fercal = Fercal x 31 R (427 = 438 x 429)

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 εξετάζεται, και συνολικά για όλους τους μελετούμενους γενετικούς τόπους, υπολογίζονται οι ακόλουθες αναλογίες πιθανοτήτων:

1. 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.
2. Η αναλογία της πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (τυχαίο άτομο X προτεινόμενος γονέας 1) =X x (1).
3. Η αναλογία της πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (συγγενικό άτομο του προτεινόμενου γονέα 2 x προτεινόμενος γονέας 1) = rel(2) x (1).
4. Η αναλογία πιθανότητας, για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (προτεινόμενος γονέας 2 x τυχαία ποικιλία) = (2) x X.
5. Η αναλογία πιθανότητας για: (προτεινόμενοι γονείς) έναντι (προτεινόμενος γονέας 2 x συγγενικό άτομο του προτεινόμενου γονέα 1) = (2) x rel(1).

Οι πιθανότητες για τους προτεινόμενους γονείς προκύπτουν από τους νόμους του Mendel, ενώ οι πιθανότητες για τυχαία άτομα υπολογίζονται από τις συχνότητες αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Η κληρονόμηση 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 υπολογίζονται πάνω από το 95% όριο εμπιστοσύνης των παρατηρούμενων συχνοτήτων των αλληλομόρφων. Μέρος των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 3.12 Οι προκύπτουσες αναλογίες πιθανοτήτων (1,2,3,4,5, βλ. κείμενο), όπως υπολογίστηκαν από το IDENTITY 1.0 software.

Προτεινόμενη διασταύρωση	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
110 Richter = 11(Richter Greek x Rupestris du Lo	1.95e+005	6.71e+001	5.51e+000	2.04e+003	1.43e+001
1103 Paulsen = Rupestris du Lot x 1103 Paulser	1.47e+005	3.69e+003	1.75e+001	7.76e+001	5.75e+000
LN33 = Couder 1613 x 1103P?1	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?2	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?3	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?4	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?5	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?6	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?7	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?8	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?9	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
LN33 = Couder 1613 x 1103P?10	1.93e+005	4.88e+002	1.09e+001	2.73e+004	1.94e+001
Rupestris du Lot = 1103 Paulsen x 57F	7.10e+004	1.78e+003	1.53e+001	1.74e+003	1.51e+001

LN33 = LN33 x 1103P?1 2,3,4,5,6,7,8,9,1(	3.86e+005	4.36e+001	4.79e+000	5.47e+004	2.63e+001
LN33 = LN33 x Tompson seedles:	3.86e+005	4.36e+001	4.79e+000	5.47e+004	2.63e+001
1103 Paulsen = 1103 Paulsen x Rupestris du Lo	1.47e+005	7.76e+001	5.75e+000	3.69e+003	1.75e+001
Fercal = Fercal x 31 F	8.87e+007	4.02e+003	1.36e+001	6.37e+004	2.58e+001

Με τη βοήθεια του Population genetic software υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις, τόσο για τις 7 ποικιλίες και τους 46 κλώνους των παραπάνω ποικιλιών *Vitis vinifera*, όσο και για τα 60 υβριδια Vitis που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera*, κάνοντας χρήση της μονάδας μέτρησης γενετικής απόστασης DAS (Shared allele distance) που αναπτύχθηκε από τους Chakraborty and Jin, 1993:

- Μεταξύ ατόμων:

$$D_{SA_I} = 1 - P_{SA_I}$$, όπου

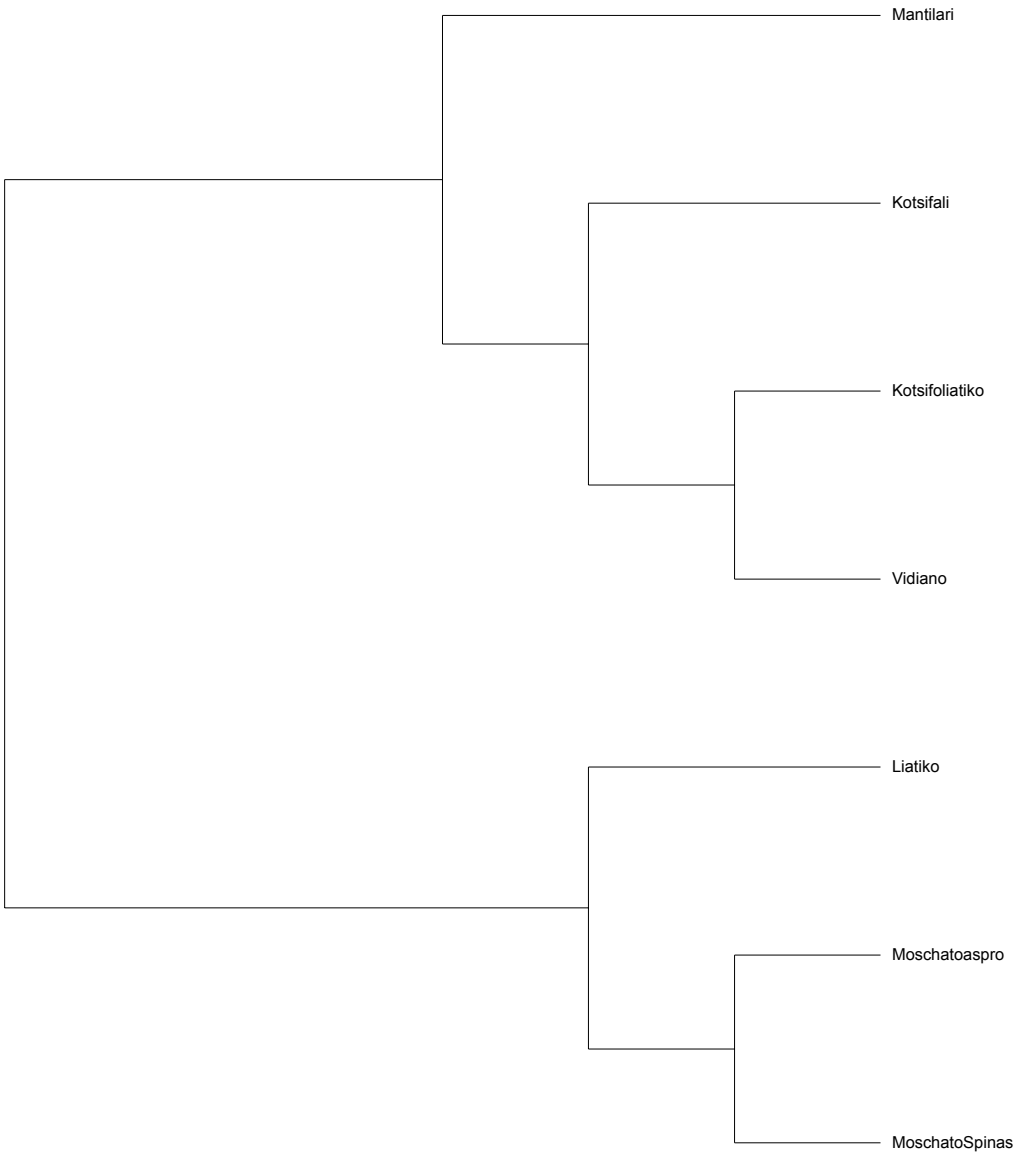
$$P_{SA_I} = \frac{\sum_j^r S}{2r}$$

και όπου ο αριθμός των κοινών αλληλομόρφων S αθροίζεται για όλους τους τόπους r.

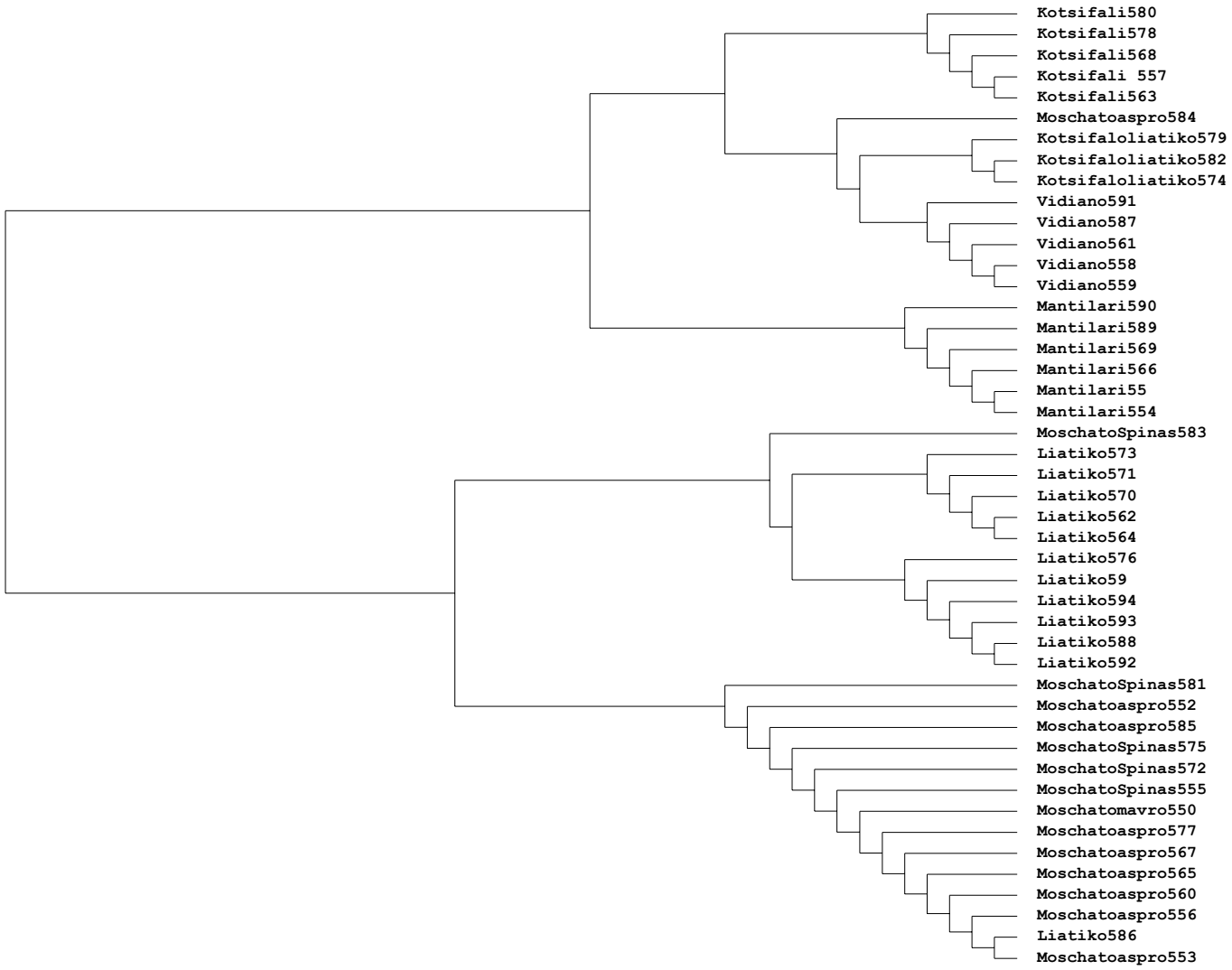
- Μεταξύ πληθυσμών:

$$D_{SA_B} = 1 - \frac{2\overline{P}_{SA_B}}{\overline{P}_{SA_X} + \overline{P}_{SA_Y}}$$

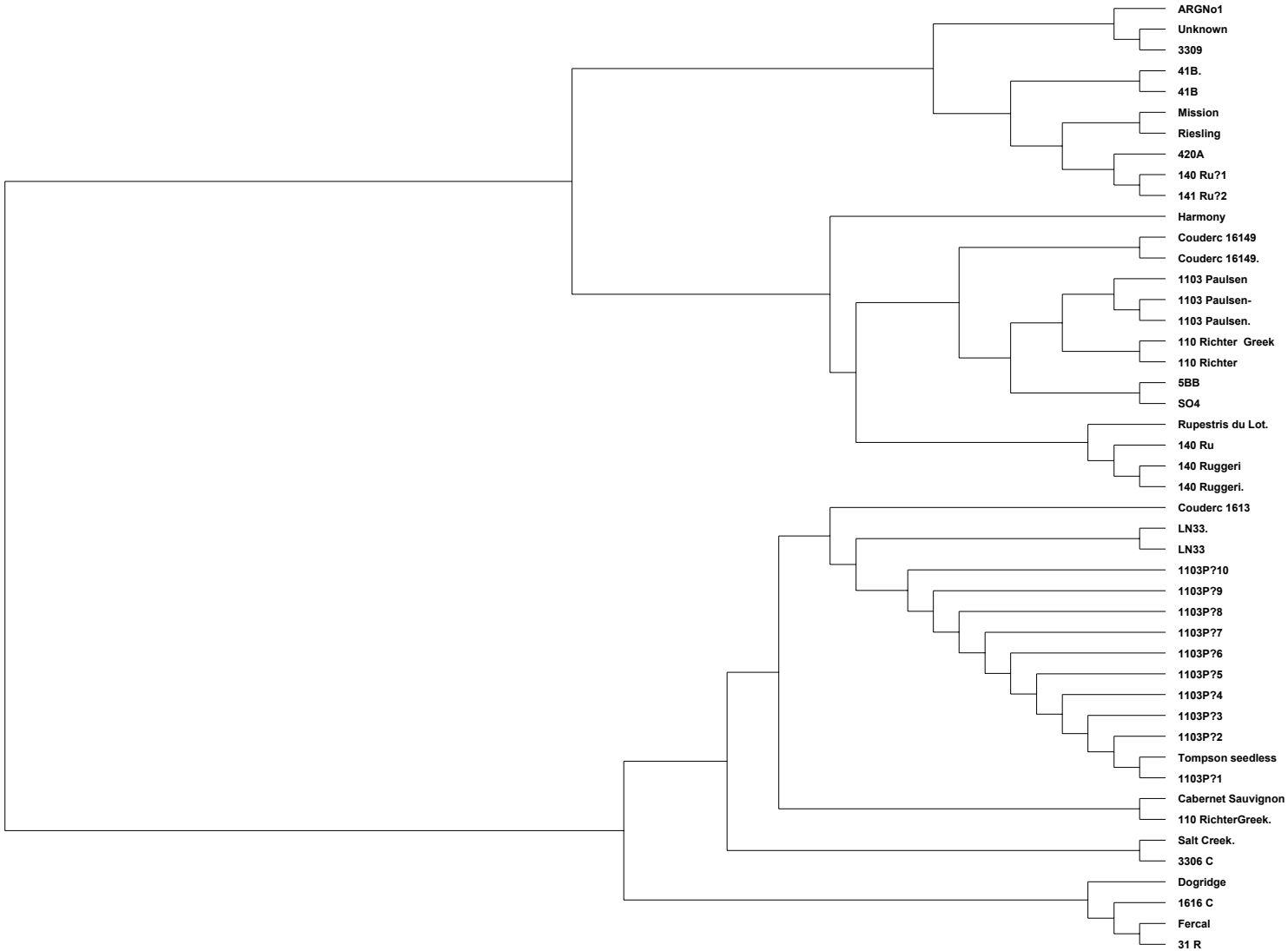
όπου οι μέσες τιμές των κοινών αλληλομόρφων μεταξύ και εντός των πληθυσμών X και Y , $\overline{P}_{SA_B}$ $\overline{P}_{SA_X}$ $\overline{P}_{SA_Y}$ αντίστοιχα, υπολογίζονται συνολικά με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς για τα εξεταζόμενα άτομα. Ακολούθως με τη βοήθεια του TREEVIEW software, σχεδιάστηκαν τα φαινογράμματα που ακολουθούν:



Εικόνα 3.1. Φαινόγραμα με τις κύριες ποικιλίες *Vitis vinifera*, κλώνοι των οποίων μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν γενετικά.



Εικόνα 3.2 Φαινόγραμα με τους κλώνους των ποικιλιών *Vitis vinifera*, που μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν γενετικά.



Εικόνα 3.3 Φαινόγραμα με τα υβριδια Vitis που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera*, τα οποία μελετήθηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός της παρούσας διατριβής, ήταν η γενετική ταυτοποίηση 46 κλώνων των ποικιλιών *Vitis vinifera*, για τους 4 μικροδορυφορικούς τόπους, VVS1, VVS2, ZAG21, ZAG62, και 60 υβριδίων Vitis που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια Vitis vinifera, για τους 7 μικροδορυφορικούς τόπους UCH2, UCH11, UCH12, UCH19, UCH29, UCH35 και UCH40.

❖ Όσον αφορά τους 46 κλώνους των ποικιλιών *Vitis vinifera*, που μελετήθηκαν, για τους 4 μικροδορυφορικούς τόπους, ο αριθμός των παρατηρούμενων αλληλομόρφων κυμαίνεται από 2 αλληλόμορφα στον γενετικό τόπο VVS1, 4 αλληλόμορφα στον VVS2, 6 αλληλόμορφα στον ZAG21 και 7 αλληλόμορφα στον γενετικό τόπο ZAG62. Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία εμφανίζεται με υψηλότερη τιμή από την αναμενόμενη σε δύο από τους τέσσερις μελετούμενους γενετικούς τόπους.

Η υψηλότερη τιμή αναμενόμενης ετεροζυγωτίας εμφανίζεται στον γενετικό τόπο ZAG62, ο οποίος αναδεικνύεται στον τόπο με το μεγαλύτερο πληροφοριακό περιεχόμενο. Η στατιστική μελέτη στον τόπο αυτό, επέδειξε την παρουσία 7 αλληλομόρφων, τιμή παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας υψηλότερης από την αναμενόμενη, αρνητική τιμή συχνότητας null αλληλομόρφων και PI=0,096.

Η συχνότητα των null αλληλομόρφων εμφανίζεται να έχει αρνητικές τιμές στους τόπους VVS1 και ZAG62, ενώ στους τόπους VVS2 και ZAG21 εμφανίζει θετικές μεν, αλλά αρκετά χαμηλές τιμές. Στον γενετικό τόπο ZAG21, η μη ομοιόμορφη κατανομή των αλληλομόρφων ανέδειξε αρκετά υψηλή τιμή PI (PI=0,288), γεγονός που τον αναδεικνύει σε μικρού πληροφοριακού περιεχομένου, για γενετική μικροδορυφορική ταυτοποίηση, τόπο.

Η επεξεργασία των μικροδορυφορικών προτύπων των 46 ποικιλιών *Vitis vinifera*, που μελετήθηκαν, για τους 4 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 στους μελετούμενους κλώνους ποικιλιών *Vitis vinifera.* Η παραπάνω ανάλυση, οδήγησε στην εξαγωγή των ακόλουθων συμερασμάτων:

- Στην ποικιλία Kotsifali, τα προτεινόμενα συνώνυμα, εμφανίστηκαν μεταξύ ατόμων που ανήκουν μόνο στην παραπάνω ποικιλία. Η διαπίστωση αυτή, αποτελεί ικανοποιητική **ένδειξη** για την επιβεβαίωση ότι τα παραπάνω δείγματα ανήκουν στην ίδια προαναφερόμενη ποικιλία. Η ίδια διαπίστωση επαναλήφθηκε και για τα δείγματα των ποικιλιών Kotsifoliatiko, Mantilari και Vidiano.
- Από τα 12 μελετούμενα δείγματα Liatikou, τα 11 εμφανίζουν περιπτώσεις συνωνυμίας μεταξύ των αποκλειστικά, ενώ το 12^0 δείγμα, Liatiko 586, εμφανίζεται ως πιθανό συνώνυμο με :
  1. Το Moschato aspro (553).
  2. Το Moschato aspro (556).
  3. Το Moschato aspro (565).
  4. Το Moschato aspro (560).
  5. Το Moschato aspro (567).
  6. Το Moschato aspro (577).
  7. Το Moschato mavro (Drakopoulos) (550).
  8. Το Moschato Spinas (555).
  9. Το Moschato Spinas (572).
  10. Το Moschato Spinas (575).
- Ακόμα, το Moschato mavro (Drakopoulos) (550) εμφανίζεται ως πιθανό συνώνυμο με 6 διαφορετικά άτομα Moschato asprou (553,556,560,565,567,577) καθώς και με το Moschato Spinas (572) ,το Moschato Spinas (555) και το Moschato Spinas (575).
- Παράλληλα, το Moschato Spinas (555), εμφανίζει πιθανή συνωνυμία με τα παραπάνω 6 διαφορετικά άτομα Moschato aspro.
- Ακόμα το Moschato Spinas (572), εμφανίζει πιθανή συνωνυμία και με τα 6 άτομα Moschato asprou που αναφέρθηκαν , καθώς και με το Moschato Spinas (555).
- Το Moschato Spinas (575), εμφανίζει πιθανή συνωνυμία και με τα 6 πραναφερθέντα άτομα Moschato aspro, και με τα Moschato Spinas (555) και (572).

  Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με τα δεδομένα των φαινογραμάτων 1 και 2, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ισχυρές ενδείξεις, όχι απαραίτητα όμως και αποδείξεις, για τις παρακάτω διαπιστώσεις:
- Στην παρούσα διατριβή δεν αναζητήθηκαν φυλογενετικές μεταξύ των μελετούμενων δειγμάτων. Επιχειρήθηκε μόνο η ταυτοποίηση αυτών, με τη χρήση επιλεγμένων μικροδορυφορικών σημαντών. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα, συμπεραίνουμε ότι οι 5 εξεταζόμενοι κλώνοι της ποικιλίας Kotsifali, οι 3 κλώνοι της

ποικιλίας Kotsifaloliatiko, οι 5 κλώνοι της ποικιλίας Vidiano, και οι 6 κλώνοι της ποικιλίας Mantilari, εμφανίζουν κοινή εξελικτική προέλευση (βλ. Εικόνα 3.2).

- Οι εξεταζόμενοι κλώνοι της ποικιλίας Liatiko, εμφανίζονται ομαδοποιημένοι, ενώ οι κλώνοι των ποικιλιών Moschato aspro και Moschato Spinas εμφανίζονται σε κοινή ομάδα, εμαφανίζοντας, όπως είδαμε, αρκετές περιπτώσεις συνωνυμίας μεταξύ των .
- Επιβεβαιώνεται η ταυτότητα των δειγμάτων Kotsifali 580, 578, 568, 557, 563, Kotsifaloliatiko 579, 582, 574, Vidiano 591, 587, 561, 558, 559, Mantilari 590, 589, 569, 566, 55, 554, Liatiko 573, 571, 570, 562, 564, 576, 59, 594, 593, 588, 592, καθώς και τα δείγματα Moschato aspro 552, 585, 577, 567, 565, 560, 556, 553.
- Ο κλώνος Liatiko 586, εμφανίζεται να σχετίζεται περισσότερο με τα εξεταζόμενα άτομα των ποικιλιών Moschato aspro και Moschato Spinas, και όχι με τα υπόλοιπα άτομα της ποικιλίας Liatiko που εξετάστηκαν. Αυτό μας δείχνει ότι το συγκεκριμένο δείγμα, δεν ανήκει στην ποικιλία Λιάτικο.
- Το ίδιο σμβαίνει και με το άτομο Moschato Spinas 583, και το άτομο Moschato aspro 584. Το άτομο Moschato Spinas 583 εμφανίζει μεγαλύτερη γενετική συσχέτιση με τα δείγματα Liatiko, ενώ το άτομο Moschato aspro 584 εμφανίζει μεγαλύτερη γενετική συσχέτιση με τα εξεταζόμενα άτομα Kotsifaloliatiko και Vidiano.

  Οι παραπάνω παρατηρήσεις, αφ'ενός επιβεβαιώνουν εν μέρει, για τα περισσότερα δείγματα, την προτεινόμενη ταυτότητα τους, και αφ΄ετέρου, όσον αφορά τα δείγματα που εμφανίζονται να παρεκλίνουν γενετικά από τα υπόλοιπα εξεταζόμενα άτομα της ποικιλίας στην οποία αναγράφεται ότι ανήκουν, αποτελούν σημαντικές και απαραίτητες ενδείξεις πιθανής λανθασμένης ταυτότητας αυτών. Εκτενέστερη μελέτη και ανάλυση με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού μικροδορυφορικών εκκινητών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, θα μας επιβεβαιώσει με σημαντικότατη ακρίβεια και θα ολοκληρώσει παράλληλα, τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης.

- Όσον αφορά την μελέτη των 60 υβριδίων *Vitis* που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera*, χρησιμοποιήθηκαν, όπως έχει ήδη αναφερθεί 7 ζεύγη μικροδορυφορικών εκκινητών. Η στατιστική μελέτη των παραπάνω δειγμάτων ανέδειξε ένα μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο: 18 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH2, 18 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH11, 22 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH12, 12 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH19, 20 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH29, 15 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH35 και 17 αλληλόμορφα για τον γενετικό τόπο UCH40.

- Ως γενετικός τόπος με το υψηλότερο πληροφοριακό γενετικό περιεχόμενο αναδεικνύεται ο UCH12, με 22 αλληλόμορφα, βαθμό παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας μεγαλύτερο από τον αντίστοιχο της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας, αρνητική τιμή συχνότητας των non-amplifying (null) αλληλομόρφων, και χαμηλή τιμή του PI (propability of identity).
- Σε όλους τους γενετικούς τόπους, που εξετάστηκαν, οι τιμές της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας προσέγγιζαν ή υπερέβαιναν τις τιμές της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας.
- Ακόμα, οι συχνότητες των non-amplifying (null) αλληλομόρφων ήταν αρνητικές ή θετικές εξαιρετικά χαμηλών τιμών, και οι τιμές των PI (propability of identity), εμφανίζονταν σημαντικά χαμηλές.
- Τα παραπάνω χαρακτηριστικά, αναδεικνύουν τους παραπάνω μικροδορυφορικούς τόπους εξαιρετικά χρήσιμους για γενετική ταυτοποίηση, αναδεικνύοντας σημαντικό γενετικό πληροφοριακό περιεχόμενο.

Η στατιστική ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων, επιβεβαίωσε την ταυτότητα κάποιων ατόμων που μελετήθηκαν, ενώ παράλληλα αναίρεσε την ταυτότητα κάποιων άλλων:

- Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του ατόμου 5BB (223) που εμφανίζεται ως συνώνυμο του $SO_{4.}$ (55) (5BB = V. *Berlandieri x V. riparia*, $SO_{4.}$= *V. berlandieri Ressegiuer x V. riparia).*
- Το άτομο Couderc 3306C (420) (*V. riparia Tomenteux x V. rupestris Martin*), εμφανίζει πιθανή συνωνυμία με δύο διαφορετικά άτομα Salt Greek (*V. doaniana)*
- Τρία διαφορετικά άτομα 140 Ruggeri (299, 433 και 267), εμφανίζουν συνωνυμία με το ίδιο άτομο $SO_{4.}$ (443).
- 10 διαφορετικά άτομα 1103P?1-10, εμφανίζονται ως συνώνυμα με το ίδιο δείγμα Thompson seedless (36).
- Διαπιστώθηκε ακόμα η ταυτότητα ενός αγνώστου δείγματος που εμφανίζει τελικά, ταυτόσημο γενότυπο βάσει μικροδορυφορικής ανάλυσης, με το άτομο Couderc 3309 (442).

Συνοπτικά από τα παραπάνω, μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- Επιβεβαιώνεται η ταυτότητα των δειγμάτων Couderc 16149, 274, 272.
- Επιβεβαιώνεται η ταυτότητα των δειγμάτων 1103 Paulsen 415, 270, 265.
- Το δείγμα 5BB (223), δεν ανήκει στην ομάδα των Kobber 5BB, αλλά προσεγγίζει την ομάδα των $SO_{4.}$(Selektion Oppenheim).

- Ολόκληρη η σειρά των 1103P?1-10, ανήκει στην ομάδα των Thompson seedless. Δεν πρόκειται για δείγματα που ανήκουν στο σύνολο των 1103 Paulsen υποκειμένων.
- Το άτομο SO_4. (443), δεν ανήκει στην οικογένεια των Selektion Oppenheim, αλλά πρόκειται για δείγμα που μάλλον ανήκει στην οικογένεια των 140 Ruggeri.
- Η ταυτότητα του άγνωστου μελετούμενου δείγματος με κωδικό αριθμό 273, φαίνεται να προσεγγίζει την ταυτότητα του δείγματος Couderc 3309 (442).
- Τα δείγματα 140 Ru?1(268) και 140 Ru?2 (269), δεν είναι 140 Ruggeri.
- Το δείγμα Couderc 3306 (420), ανήκει στην ομάδα των Salt Creek.
- Οι πιθανές γενετικές συσχετίσεις μεταξύ των δειγμάτων που μελετήθηκαν φαίνονται και στην εικόνα 3.3. Στα φαινογράματα που παρατίθενται, δεν δίνονται οι ακριβείς φυλογενετικές σχέσεις των υβριδίων *Vitis* που μελετούνται, αλλά αναδεικνύονται οι πιθανές, βάσει γενοτύπου, ομαδοποιήσεις των μελετούμενων δειγμάτων.

Οι παραπάνω ενδείξεις για πιθανή σύγχυση των ταυτοτήτων κάποιων ειδών και υβριδίων *Vitis* που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα για την καλλιέργεια *Vitis vinifera*, αποτελούν το πρώτο και απαραίτητο βήμα για την ολοκληρωμένη ταυτοποίηση και την γενοτυπική μελέτη των εξεταζόμενων ατόμων. Απαιτείται πρόσθετη συγκριτική μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό μικροδορυφορικών εκκινητών, για την πλήρη επιβεβαίωση ή μη της ταυτότητας των δειγμάτων που εξετάζονται.

2. Στον δρόμο της εμπορικής ταυτοποίησης των ποικιλιών (Sefc et al., 2001)

Ο σωστός και έγκαιρος καθορισμός της ταυτότητας των χρησιμοποιούμενων ειδών, κλώνων και υβριδίων *Vitis* , καθίσταται εξαιρετικά σημαντικός τόσο για τον τομέα της καλλιέργειας αμπελιού, όσο και για τον τομέα της ερευνητικής μελέτης της αμπέλου σε γενετικό επίπεδο. Ακριβής γνώση της γενετικής ταυτότητας των παραπάνω φυτών θα επιτρέψει την πληρέστερη μελέτη του γονιδιώματος των πιο παραγωγικών ποικιλιών και κλώνων, επιτρέποντας κατ΄επέκταση και την παραπέρα γενετική βελτίωση τους.

Τα μικροδορυφορικά DNA πρότυπα, καθίστανται σταδιακά εξαιρετικής σημασίας για τον καθορισμό και την προστασία νέων ποικιλιών αμπέλου. Οι νέες ποικιλίες μπορούν να κατοχυρωθούν μέσω μιας πατέντας ή από το PBR (Plant Breeders Rights). Οι πατέντες μπορούν να κατοχυρώσουν όχι μόνο εξειδικευμένες

ποικιλίες αλλά φυτά γενικότερα στο σύνολο τους, ενώ το PBR είναι εξειδικευμένο για φυτικές ποικιλίες μόνο. Μία νέα ερευνητική ομάδα της Διεθνούς Ένωσης για την Προστασία Νέων Ποικιλιών (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV), μελετά την χρήση του DNA προτύπου για την ταυτοποίηση των ποικιλιών και την προστασία μέσω PBR. Τέσσερις νέες Αυστραλιανές ποικιλίες παραγωγής κρασιού (Cienna, Vermilion, Rubienne και Tyrian) έχουν πρόσφατα κατοχυρωθεί από το PBR, και μέρος της PBR υποβολής περιλαμβάνει DNA μικροδορυφορικά πρότυπα.

Ο καθορισμός DNA προτύπων κυρίως εμφανίζει την δυνατότητα ανάδειξης ενός τρόπου ποιοτικού ελέγχου για τους καλλιεργητές και τους οινολόγους. Οι ανάγκες της αγοράς για παραγωγή υψηλής ποιότητας κρασιού, οδηγεί τους καλλιεργητές στην απαίτηση να συμπεριλάβουν τον έλεγχο καθορισμού DNA προτύπου, προκειμένου να επιβεβαιώσουν ότι η ονομασία της ποικιλίας που αναγράφεται στο μπουκάλι του παραγόμενου κρασιού είναι ακριβής. DNA πρότυπα μπορούν να αποκτηθούν μέσω εκχύλισης DNA από χυμό σταφυλιού μετά από σύνθλιψη τους.

Ισοενζυμικοί πολυμορφισμοί, πρόσφατα καθορισμένοι στο σταφύλι (Moreno-Arribas *et al*., 1999), θα μπορούσαν ακόμα να λειτουργούν ανταγωνιστικά ως προς τους μικροδορυφορικούς σημαντές, όταν η ετεροζυγωτία των ποικιλιών της καλλιεργούμενης περιοχής είναι μειωμένη. Κάποιοι πελάτες της εμπορικής DNA ταυτοποίησης σταφυλιών έχουν χρησιμοποιήσει την μέθοδο αυτή για τον καθορισμό της ποικιλίας στην καλλιεργούμενη περιοχή και για την ταυτοποίηση των παραγόμενων σταφυλιών.

Νέες ρυθμίσεις που έχουν καθοριστεί τα τελευταία 20 χρόνια από την Ευρωπαϊκή Ένωση καθορίζουν εξειδικευμένα τις ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κρασιού, σταφίδας και επιτραπέζιου σταφυλιού, κάθε χώρας-μέλους. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της σταφίδας και των επιτραπέζιων σταφυλιών, οι παραπάνω ρυθμίσεις υπάγονται κυρίως στην ανάγκη του καταναλωτή για ακριβή καθορισμό της ονομασίας του προϊόντος, ενώ στην περίπτωση ειδικά των επώνυμων κρασιών, αναφερόμαστε πλέον στην ανάγκη προστασίας σημαντικών οικονομικών συμφερόντων. Η μοριακή ταυτοποίηση στην περίπτωση αυτή τόσο των καλλιεργούμενων ποικιλιών όσο και υποκειμένων, καθίσταται εξαιρετικά σημαντική για την προστασία των καλλιεργητών σταφυλιού από πιθανά λάθη.

Όπως φάνηκε από την πραπάνω μελέτη, οι μικροδορυφορικοί σημαντές αποδεικνύονται εξαιρετικά χρήσιμοι για την ακριβή ταυτοποίηση ποικιλιών αμπελιού, για την εξακρίβωση συνωνύμων, για τον καθορισμό γενετικών συσχετίσεων και για γενετική χαρτογράφηση. Η χρήση εξειδικευμένων DNA σημαντών θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στην επίλυση αρκετών προβλημάτων που αντιμετωπίζουν οι γενετιστές. Είναι φανερό ότι κανένας άλλος μοριακός δείκτης ή τεχνολογία δεν έχει αναδείξει τόσο χρήσιμη πληροφορία σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα για τους γενετιστές της αμπέλου.

Άλλοι μοριακοί δείκτες όπως οι AFLPs (Sensi *et al*., 1996, Cervera *et al*., 1998, Goto-Yamamoto, 2000, Martinez-Zepater *et al*., 2000) ή ISSR (inter-simple sequence repeats, Moreno et al., 1998), έχουν ήδη χαρακτηριστεί στην άμπελο και οι δυνατότητες τους υπόκεινται σε αυστηρή μελέτη. Οι παραπάνω θα μπορούσαν να βρούν εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου οι μικροδορυφόροι δεν παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία.

Σίγουρα, αποτελεί ελπιδοφόρο όραμα ότι η χρήση μικροδορυφορικών σημαντών τόσο για την ταυτοποίηση ποικιλιών ή υποκειμένων κατά τη φάση της καλλιέργειας όσο και για τον καθορισμό του χυμού του σταφυλιού πριν από την οινοποίηση, θα αποτελέσει σύντομα διαδικασία ρουτίνας για την παγκόσμια βιομηχανία παραγωγής κρασιού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ambrosi, H., Dettweiler-Münch, E., Rühl, E.H., Schmid, J., and F. Schumann (1998) Guide des cépages, 300cépages et leurs vins [Guide of grape cultivars, 300 cultivars and their wines, in French]. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, pp. 176-179.
2. Ablett, E.M., Lee, L.S., and R.J. Henry (1998) Analysis of grape ESTs. Acta Hort. 528(1): 273-275.
3. Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., and P.B. Cregan (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in Soybean. Genetics 132: 131-139.
4. Bauer, F. and E. Zyprian (1997) Identification of grapevine rootstock cv. Börner and differentiation of 125 AA from 5 BB and SO4. Vitis 36(4): 185-189.
5. Becker, J. and M. Heun (1995) Barley microsatellites: allele variation and mapping. Plant Mol. Biol. 27: 835-845.
6. Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L., and F. Bonhomme (1996 – 1998) Laboratoire Génome et Populations,CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
7. Benin, M., Gasquez, J., Mahfoudi, A., and R. Bessis (1988) Caractérisation biochimique des cépages de *Vitis vinifera* L. par électrophorèse d' isoenzymes foliaires: essai de classification des variétés. Vitis 27: 157-172.
8. Vlachos MB (1991**)** Αμπελογραφία [Ampelography], Publication House of the Aristotelian University of Salonica, Salonica.
9. Botta, R., Scott, N.S., Eynard, I., and M.R. Thomas (1995) Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. Vitis 34(2): 99-102.
10. Bourquin, J.-C, Otten, L., and B. Walter (1991) Identification of grapevine rootstocks by RFLP. C.-R. Acad. Sci. Paris, Sér. III, 312: 593-598.
11. Bourquin, J.-C., Otten, L., and B. Walter (1995) PCR-RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Parthenocissus* and its application to the identification of rootstock***s.*** Vitis 34(2): 103-108.
12. Bourquin, J.-C., Sonko, A., Otten, L., and B. Walter (1993) Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 87: 31-438.

13. Bourquin, J.-C., Tournier, P., Otten, L., and B. Walter (1992) Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. Vitis 31: 157-162 .
14. Bowers, J., Boursiquot, J.M., This, P., Chu, K., Johansson, H., and C. Meredith (1999a) Historical genetics: The parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. Science 285: 1562-1565.
15. Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., and C.P. Meredith (1996) Isolation and characterization of new poly-morphic simple sequence repeat loci in grape *(Vitis vinifera* L.). Genome 39: 628-633.
16. Bowers, J.E., Dangl, G.S., and C.P. Meredith (1999b) Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. Am. J. Enol. Vitic. 50(3): 243-246.
17. Bowers, J.E. and C.P. Meredith (1997) The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. Nat. Genet. 16: 84-87.
18. Brookfield, J.F.Y. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. Mol. Ecol. 5: 453-455.
19. Brown, S.M., Hopkins, M.S., Mitchell, S.E., Senior, M.L., Wang, T.Y., Duncan, R.R., Gonzalez-Candelas, F., and S. Kresovich (1996) Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum *[Sorghum bicolor* L. Moench]. Theor. Appl. Genet. 93: 190-198.
20. Büscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O., and R. Blaich (1994) On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). Vitis 33: 15-17.
21. Büscher, N., Zyprian, E., and R. Blaich (1993) Identification of grapevine cultivars by DNA analysis: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. Vitis 32: 187-188.
22. Cabello, F., Ortiz, J.M., Borrego, J., and E. Dettweiler (1999) Red Europea de bancos de germoplasma de vid, Proyeto Europeo GENRES 081 La semana vitivinicola 2.736: 166-169.
23. Calo, A., Costacurta, A., Paludetti, G., Calo, G., Aruselkar, S., and D. Parfit (1989) The use of isoenzyme markers to characterize grape cultivars. Rivista Vitic. Enol. 42(1): 15-22.
24. Cervera, M.-T., Cabezas, J.A., Sancha, J.C., Martinez de Toda, F., and J.M. Martinez-Zapater (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.

25. Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N., and S. Cartinhour (2000) Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice *(Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Gene*t.* 100: 713-722.
26. Cipriani, G., Frazza, G., Peterlunger, E., and R. Testolin (1994) Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. Vitis 33: 211-215.
27. Collins, G.G. and R.H. Symons (1993) Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR tech-nique. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 105-112.
28. Dalbo, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Steinkellner, H., Sefc, K.M., and B.I. Reisch (2000) Gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. Genome 43(2): 333-340.
29. Delseny, M., Laroche, M., and P. Penon (1983) Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. Biochem. Bioph. Res. Commun. 116: 113-20.
30. Eiras-Dias, J.E. and R. Bruno-Sousa (1998) Isoenzymatic polymorphism differentiation of Portuguese grapevine cultivars. Am. J. Enol. Vitic. 49(1): 86-90.
31. Eiras-Dias, J.E., Sousa, S., Cabral F., and I. Carralho (1989) Isoenzymatic characterization of Portuguese vine varieties of *Vitis vinifera* L. Rivista Vitic. Enol. 42(1): 23-26.
32. Felsenstein, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package. Cladistics 5: 164-166
33. Filippetti, I., Silvestroni, O., Thomas, M.R., and C. Intrieri (1999) Diversity assessment of seedlings from self-pollinated Sangiovese grapevines by ampelography and microsatellite DNA analysis. Vitis 38: 67-71.
34. Franks, T., He, D.G., and M.R. Thomas (1998) Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants-genotypic and phenotypic analysis. Mol. Breed. 4: 321- 333.
35. Gogorcena, Y., Arulsekar, S., Dandekar, A.M., and D.E. Parfitt (1993) Molecular markers for grape characteri-zation. Vitis 32: 183-185
36. Goudet, J. (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. J. Here*d.* 86(6): 485-486.
37. Goto-Yamamoto, N. (2000) Phenetic clustering of grapes *(Vitis* spp.) by AFLP analysis. Breed. Sci. 50(1): 53-57.
38. Grando, M.S. and C. Frisinghelli (1998) Grape microsatellite markers: Sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. Vitis 37-79-82.

39. Grando, M.S., Bellin, D., Madini, A., Stefanini, M., Pozzi, C., and R. Velasco (2000c) Construction of an AFLP and SSR genetic map of *Vitis* from an interspecific hybrid population. Proc. Plant & Animal Ge-nome VIII, San Diego, CA January 9-12, 2000.
40. Grando, M.S., Frisinghelli, C. and M. Stefanini (2000a) Genotyping of local grapevine germplasm. Acta Hort.. 528(1): 183-187.
41. Grando, M.S., Frisinghelli, C., and M. Stefanini (2000b) Polymorphism and distribution of molecular markers in a segregating population derived from the cross Moscato bianco x *Vitis riparia.* Acta Hort. 528(1):209-213
42. Grando, M.S., Tomasi, F., Iacono, F., and M. Stefanini (1999) Caratterizzazione e polimorfismo di nuovi loci SSR del genoma di vite, in Proc. XLIII Convegno Annuale SIGA, Molveno (Italy) 22-25 September 1999.
43. Guerra, B. and C.P. Meredith (1995) Comparison of *Vitis berlandieri* x *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. Vitis 34(2): 109-112.
44. Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., and B. Ramesh (1996) Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. Current Sci. 70: 45-54.
45. Haddad, L.A., Fuzikawa, A.K., and S.D.J. Pena (1997) Simultaneous detection of size and sequence polymorphisms in the transcribed trinucleotide repeat D2S196E (EST00493). Hum. Genet. 99: 796-800.
46. Hartl, D.L. and A.G. Clark (198*9)* Principles of Population Genetics. 2 nd E*d.,* Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets.
47. Hong, L.I., Walker, M.A., and H. Lin. (1998) Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. Am. J. Enol. Vitic. 49: 403-407.
48. Jean-Jacques, I., Defontaine, A., and J.N. Hallet (1993) Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. Vitis 32: 189-190.
49. Karp, A., Ingram. D.S., and P. Isaac (Eds).(1998) Molecular Tools for Screening Biodiversit*y,* Chapman andHall.
50. Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S., and M.R. Thomas (1995) An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within citrus and related species. Genome 38: 349-355.
51. Kourakou-Dragona, S. (1987) La Grèce vinicole [Viticultural Greece, in French]. Ed. Organisme Hellènique pour la Promotion des Exportations, Athens, Greece.

52. Κριμπάς Β.Δ. «Καταγωγή και μεταλλαγαί της Σουλτανίνας». 1933. Πρακτικά Ακαδημίας Αθηνών, τόμος 8, σελ. 201-205.
53. Lagercrantz, U., Ellengren, H., and L. Andersson (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plant and vertebrates. Nucleic Acids Res. 21(5): 1111-1115.
54. Lahogue, F., This, P., and A. Bouquet (1998) Identification of a codominant SCAR marker linked to seedless-ness character in grapevine. Theor. Appl. Genet. 97 (5-6): 950-959.
55. Lamboy, W.F. and C.G. Alpha (1998) Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape *(Vitis* L.) species. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123:182-188.
56. Lefort, F. and G.C. Douglas (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Ace*r, *Fraxinu*s, *Prunus* and *Quercu*s. Ann. Forest Sci. 56:259-263.
57. Lefort F, Echt C, Streiff R & Vendramin GG (1999) Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics. Forest Genetics. 6(1): 5-10
58. Lefort, F., Anzidei, M., Roubelakis-Angelakis, K.A., and G.G. Vendramin (2000a) Microsatellite profiling of the Greek Muscat cultivars with nuclear and chloroplast SSRs markers. Quaderni della Scuola di Special-izzazione in Scienze Viticole ed Enologiche 23:56-80.
59. Lefort, F., Anzidei, M., Roubelakis-Angelakis K.A., and G.G. Vendramin (2000b) Characterization of grapevine with universal chloroplast microsatellite markers, 6 th Intern. Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Heraklion, Crete, Greece, 11-16 June 2000. Book of Abstracts, p. 200.
60. Lefort, F., Poisse, E., Kyvelos, C.J., and K.A. Roubelakis-Angelakis (2000c) Genetic relationships within the Greek cultivars of *Vitis vinifera* assessed by microsatellite markers. 6th Intern. Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Heraklion, Crete, Greece, 11-15 June 2000. Book of Abstracts, p. 199. (http://www.biology.uch.gr/meetings/book.pdf) Visual poster at http://www.biology.uch.gr/gvd.
61. Lefort, F. and K.A. Roubelakis-Angelakis (2000a) The Greek *Vitis* Database, a multimedia webbacked genetic database for germplasm management of *Vitis* resources in Greece. J. Wine Re*s.* 11(3): 233-242.

62. Lefort, F. and K.A. Roubelakis-Angelakis (2000b) [Development of a database for Greek grapevine cultivars; in Greek with English summary]. *I*n: Proceedings of the 9th Symposium "Arts and Techniques of Viticulture and Enology in Northern Greece", Ed.. ETBA, Athens, Greece. (in press).
63. Lefort, F, Kybelos K.J., Zervou M, Edwards, K.J., & Roubelakis-Angelakis, K.A. 2001. Characterization of new microsatellite loci from Vitis vinifera and their conservation in some Vitis species and hybrids. Molecular Ecology Notes (accepted).
64. Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., and B.I. Reisch (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Biol. Rep. 12: 6-13.
65. Lopes, M.S., Sefc, K.M., Eiras Dias, E., Steinkellner H., Laimer da Câmara Machado M., and A. da Câmara Machado (1999) The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collec-tion. Theor. Appl. Genet. 99: 733-739.
66. Loureiro M.D., Martinez M.C., Boursiquot J.M., and P. This (1998) Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* "Albarino" and some similar grapevine cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 842-848.
67. Maletic, E., Sefc, K.M., Steinkellner H., Kontic, J.K., and I. Pejic (1999) Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and the detection of synonymous cultivars in neighboring regions. Vitis 38: 79-83.
68. Marangou, A. (1991) Le vin et les amphores de Crète: de l'époque classique à l'époque impériale [The wine and the amphores of Crete: from the classic era to the imperial era; in French]. (Ed.) Ecole Française d'Athènes, Athens.
69. Martinez-Zapater, J.M., Cabezas, J.A., and M.T. Cervera (2000) AFLPs in genetic identification and genome analysis of grapevines. Acta Hort. 528(1): 105-111.
70. McGovern, P.E., Fleming, S.J., and S.H. Katz (1995) The origins and ancient history of wine. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
71. McGovern, P.E., Glusker, D.L., and L.J. Exner (1996) Neolithic resinated wine. Nature 381: 480-481.
72. McGovern PE,, Glusker DL, Moreau RA, Nuñez A, Beck CW, Simpson E, Butrym ED, Exner LJ, Stout EC. A funerary feast fit for King Midas. Nature 402:863-864 70.
73. McGovern PE (1996) Vin extraordinaire. The Sciences, Nov/Dec 1996 : 27-31

74. McGovern PE, Hartung U, Badler VR, Glusker DL, Exner LJ (1997) The beginning of winemaking and viniculture in the Ancient Near east and Egypt. Expedition 39(1): 3-21 .

75. McGovern PE**.** Wine of Egypt's golden age: an archeochemical perspective. Journal of Egyptian Archaeology 83: 69-108

76. McGovern PE (1998) Wine for eternity. Archaeology Jul/Aug 1998:28-34

77. Meredith, C.P., Bowers, J.E., Riaz, S., Handley, V., Bandman, E.B., and G.S. Dangl (1999) The identity and parentage of the variety known in California as Petite Sirah. Am. J. Enol. Vitic. 50: 236-242.

78. Milbourne, D., Meyer, R.C., Collins, A.J., Ramsay, L.D., Gebhardt, C., and R. Waugh (1998) Isolation, characterisation and mapping of simple sequences repeat loci in potato. Mol. Gen.. Genet. 259: 233-245.

79. Minch, E. (1997) MICROSAT, Version 1.5b. Stanford University Medical Center, Stanford.

80. Miyao, A., Zhong, H.S., Monna, L., Yano, M., Yamamoto, K., Havukkala, I., Minobe, Y., and T. Sasaki (1996) Characterization and genetic mapping of simple sequence repeats in the rice genome. DNA Res. 500: 233-238.

81. Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine, Edited by Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis, Kluwer Academic Publishers.

82. Moreno, S., Gogorcena, Y., J.M. Ortiz (1995) The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine *(Vitis vinifera* L.). Sci. Hort. 62: 237-243.

83. Moreno, S., Martín J.P., and J.M. Ortíz (1998) Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. Euphytica 101: 117-125.

84. Moreno-Arribas, M.V., Cabello, F., Polo M.C., Martin-Alvarez, P.J., and E. Pueyo (1999) Assessment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera* L. cul-tivars. J. Agric. Food Chem. 47: 114-120.

85. Morgante, M. and A.M. Olivieri (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant J. 3: 175-182.

86. Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 283-292.

87. Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.

88. Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

89. Ntavidi OX (1982) Ελληνική Αμπελολογία (Δοκίμιο). Τόμος Γ '. Στοιχεία Αμπελογραφίας [Greek Grapevine Studies, Band 3, Elements of Ampelography, in Greek]. Second edition, Athens, Greece.

90. Ohmi, C., Wakana, A., and S. Shiraishi (1993) Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpreta-tion of GPI-2 and PGM-2 isoenzymes. Euphytica 65: 195-202.

91. Olmo, H.P. (1976) Grapes. *In:* Evolution of Crop Plants, Simmonds, N.W., (Ed.). Longman, London, pp. 294-298.

92. Paetkau. D., Calvert, W., Stirling, I., and C. Strobeck (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Mol. Ecol. 4: 347-354.

93. Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applic. Biosci. 12: 357-358.

94. Parfitt, D.E. and S. Arulsekar (1989) Inheritance and isoenzyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. J. Am. Sci. Hort. Sci. 114: 486-491.

95. Plinius the Elder (1st century AD) Historia naturalis, XIV.

96. Plinius the Elder (1st century AD) Historia naturalis, XXII. (Latin-French Edition, André Jacquet ed., Les Belles Lettres, 1971.

97. Raymond, M. and F. Rousset (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism, J. Hered. 86: 248-249

98. Rives, M. (1961) Bases génétiques de la sélection clonale chez la vigne. Ann. Amél. Plantes 11: 337-348.

99. Robinson, J. (1994) The Oxford Companion to Wine, Oxford University Press, Oxford.

100. Sanchez-Escribano, E.M., Martin, J.P., Carreno, J., and J.L. Cenis (1999) Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. Genome 42: 87-93.

101. Schaeffer, H. (1971) Enzympolymorphismus in Rebenblaettern. Phytochemistry 10: 2601-2607.

102. Scott, K.D., Abblet, E.M., Lee, L.S., and R.J. Henry (2000a) AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. Euphytica 113: 245-249.

103. Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rosseto, M., Abblet, E.M., Lee, L.S., and R.J. Henry (2000b) Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor. Appl. Genet. 100: 723-726.

104. Scott, N.S., Sas, A.N., Weeks, S., Murphy, A., and M.R. Thomas (1996) The DNA typing service for identifi-cation of grapevines. Austr. Grapegr. Winemaker. 309a: 126-129.

105. Sefc, K.M., Steinkellner, H., Wagner, H.W., Glössl, J., and F. Regner (1997) Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevines. Vitis 36: 179-183.

106. Sefc, K.M., Regner F., Glössl J., and H. Steinkellner (1998a) Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. Vitis 37: 15-20.

107. Sefc, K.M., Guggenberger, S., Regner, F., Lexer, C., Glössl, J., and H. Steinkellner (1998b) Genetic analysis of grape berries and raisins using microsatellite markers. Vitis 37: 123-125.

108. Sefc, K.M., Steinkellner, H., Glössl, J., Kampfer, S., and F. Regner (1998c) Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. Theor. Appl. Genet. 97: 227-231.

109. Sefc, K.M., Regner, F., Glössl, J. and H. Steinkellner (1998d) Monitoring der genetischen Variabilität und Pedigree Studien bei Weinreben, Bericht über die 49. Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, pp. 71-73.

110. Sefc, K.M., Regner F., Turetschek E., Glössl J., and H. Steinkellner (1999) Identification of microsatellite sequences in *Vitis* riparia and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. Genome 42: 367-373.

111. Sefc, K.M., Lopes, M.S., Lefort F., Botta R., Roubelakis-Angelakis K.A., Ibanez J., Pejic I., Wagner H.W., Glössl J., and H. Steinkellner (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor. Appl. Genet. 100: 498-505.

112. Sefc K.M., Lefort, F., Grando M.S., Scott K., Steinkellner H, Thomas M.R. (2001) Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. And: Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine, K.A.Roubelakis-Angelakis (editor), Kluwer Publishers, Amsterdam. pp 433-463.

113. Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W., and S. Biricotti (1996) Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. Vitis 35: 183-188.

114. Shannon, C.E. and W. Weaver (1949) The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana.

115. Silvestroni, O., Di Pietro, D., Intrieri, C., Vignani, R., Filippetti, I., Del Casino, C., Scali, M., and M. Cresti (1997) Detection of genetic diversity among clones of cv. Fortana *(Vitis vinifera* L.) by microsatellite DNA polymorphism analysis. Vitis 36: 147-150.

116. Smulders, M.J.M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., and B. Vosman (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor. Appl. Genet. 97: 264-272.

117. Stavrakakis, M. and M. Loukas (1983) The between -and within- grape-cultivars genetic variation. Sci. Hort. 19: 321-334.

118. Stavrakakis, M.N. and K. Biniari (1998) Genetic study of grape cultivars belonging to the Muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. Vitis 37: 119-122.

119. Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Ben-Hayyim, G., Beckmann, J., and D. Gidoni (1990) Genomic DNA finger-printing of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. Vitis 29: 223-227.

120. Tautz, D., Trick, M., and G. Dover (1986) Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature 322: 652-653.

121. Tautz, D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *I*n: DNA fingerprinting*, State of the ar*t, S.D.J. Pena S.D.J., R. Chakraborty, J.T. Epplen, and A.J. Jeffreys (Eds). Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 21-28.

122. Ταβερναράκη Νίκη και Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Ενημερωτικά φυλλάδια για το πολλαπλασιαστικό υλικό, 2001.

123. Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J.M., and A. Charrier (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theor. Appl. Genet. 89: 171-177.

124. This, P., Cuisset, C., and J.M. Boursiquot (1997) Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. Am. J. Enol. Vitic. 48: 492-501.

125. This, P., Lahogue, F., Adam-Blondon A.F., Doligez A., and A. Bouquet (2000) Towards marker-assisted selection for seedlessness in grapevine. Acta Hort. 528(1): 221-229

126. Thomas, M.R., Cain, P., and N.S. Scott (1994) DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. Plant Mol. Biol. 25: 939-949.

127. Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P., and N.S. Scott (1993) Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. Theor. Appl. Genet. 86: 173-180.

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

129. Thomas, M.R. and N.S. Scott (1994) Microsatellite sequence tagged site markers: simplified technique for rapidly obtaining flanking sequences. Plant Mol. Biol. 12: 58-64.

130. Tschammer, J. and E. Zyprian (1994) Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. Vitis 33: 249-250.

131. Wagner, H.W. and K. M. Sefc (1999) IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.

132. Walker, M.A. and J.M. Boursiquot (1992) Ampelographic and isoenzyme data correcting the misnaming of the grape rootstock SO4 at the University of California, Davis. Am. J. Enol. Vitic. 43: 261-265.

133. Walter, T.W., Posluszny, U., and P.G. Kevan (1989) Isoenzyme analysis of the grape *(Viti*s). I. A practical solution. Can. J. Bot. 67: 2894-2899.

134. Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G., and S.D. Tanksley (1994) Survey of plant short tandem repeats. Theor. Appl. Genet. 88: 1-6.

135. Weir, B.S. and C.C. Cockerham (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.

136. Weir, B.S. (1996) Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

137. Weising, K. and R.C. Gardner (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequencerepeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome 42: 9-19.

138. Wolf, T. (1996) Untersuchungen an Holz zur Sortenidentifikation von Rebunterlagssorten mit Hilfe der RAPD-Methode. Thesis, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

139. Wolf, T., Eimert, K., and R. Ries (1999) Reliable identification of grapevine rootstock varieties using RAPD PCR on woody samples. Austr. J. Grape Wine Res. 5: 34-38.

140. Wright, S. (1978) Variability within and among populations, Volume 4, The University of Chicago Press, Chicago.

141. Xu, H. and A.T. Bakalinsky (1996) Identification of grape *(Viti*s) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. Hort.Science 32: 267-268.

142. Ye, G.N., Soylemezoglu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W.F., Pool, R.M., and B.I. Reisch (1998) Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. Vitis 37: 33-38.

143. Yeh, F.C. and T.J.B. Boyle (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belgian J. Bot. 129:157.

144. Winkler A.J. General Viticulture, University of California Press, 1972.