



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην
Επιστήμη Οίνου και Ζύθου
Κατεύθυνση: Οίνος**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Συγκριτική Μελέτη Μεθόδων Ταυτοποίησης Ποικιλιών Αμπέλου

**Σταυρόπουλος Χαράλαμπος
ΑΜ: 20213**

Επιβλέπων: Μπανίλας Γεώργιος, Αναπλ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2022



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

**Master of Science in
Wine and Beer Science
Option: Wine**

Master Thesis

Comparative Study of Vine Variety Identification Methods

**Stavropoulos Charalampos
Reg. Nr: 20213**

Supervisor: Banilas George, Assoc. Professor

ATHENS, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:

«Συγκριτική Μελέτη Μεθόδων Ταυτοποίησης Ποικιλιών Αμπέλου»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	Δρ. Γεώργιος Μπανίλας
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	Δρ. Ηλίας Κόρκας
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	Δρ. Δανάη Γκίζη

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογράφων/-ουσα Σταυρόπουλος Χαράλαμπος, με Α.Μ. 20213, φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος».

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα

Σταυρόπουλος Χαράλαμπος

(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

Περίληψη

Η άμπελος ανήκει στην Οικογένεια *Vitaceae* η οποία έκανε την εμφάνιση της πριν από 100 εκατομμύρια χρόνια. Με το πέρασμα του χρόνου πολλά από τα είδη της προσαρμόστηκαν στις εδαφοκλιματικές συνθήκες διαφόρων περιοχών και παρέμειναν έως τις μέρες μας. Λόγω του σημαντικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει το γένος *Vitis* και συγκεκριμένα τα υπογένη *Muscadinia* και *Euvitis*, καθώς επίσης και λόγω διαφόρων παραγόντων, όπως η εμφάνιση της φυλλοξήρας, του ωιδίου, ο μεγάλος αριθμός των ειδών και ποικιλιών, τα συνώνυμα ονόματα και το γεγονός ότι η ποικιλία της αμπέλου παίζει σημαντικό ρόλο στη ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος, καθιστάτε η διάκριση και ταυτοποίηση των ποικιλιών αμπέλου αναγκαία.

Στη παρούσα μελέτη γίνεται μια εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση της αμπελογραφικής περιγραφής, των βασικών βιοχημικών καθώς και των σημαντικότερων μοριακών μεθόδων. Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε απαραίτητο να γίνει βιβλιογραφική ανασκόπηση της αμπελογραφικής περιγραφής, των βιοχημικών καθώς και των μοριακών μεθόδων που θεωρούνται οι κυριότερες μέθοδοι ταυτοποίησης, με σκοπό να γίνει μια συγκριτική τους μελέτη παρουσιάζοντας τα πλεονεκτήματα καθώς και τα όποια μειονεκτήματα κάθε μεθόδου. Περιγράφονται οι κυριότερες μέθοδοι ταυτοποίησης ποικιλιών και των αντίστοιχων τεχνικών στις οποίες στηρίζονται, ενώ γίνεται μια εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση των εφαρμογών τους στην άμπελο. Τέλος πραγματοποιείται σύγκριση των μεθόδων και παρουσιάζονται τα συμπεράσματα.

Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αμπελογραφική περιγραφή (μορφολογικοί δείκτες), αν και απολύτως απαραίτητη, δεν μπορεί από μόνη της να διακρίνει αμπέλια σε επίπεδο ποικιλίας, ιδιαίτερα μεταξύ συγγενικών ποικιλιών, ενώ δεν μπορεί να διακρίνει κλώνους ποικιλιών και υποκείμενα. Οι βιοχημικές μέθοδοι (βιοχημικοί δείκτες) επιτυγχάνουν διάκριση μεταξύ ποικιλιών χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών, χωρίς όμως και αυτές να παρέχουν διάκριση μεταξύ κλώνων των ίδιων ποικιλιών και μεταλλάξεων. Τόσο οι μορφολογικοί όσο και οι βιοχημικοί δείκτες έχουν το ενδογενές μειονέκτημα ότι επηρεάζονται από το περιβάλλον. Το κενό αυτό που δημιουργείται καλύπτεται με τις μοριακές μεθόδους (μοριακοί δείκτες) που βασίζονται στη χρήση της PCR, όπως ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) και οι μικροδορυφόροι ή απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple sequence repeats – SSRs) επιτυγχάνοντας επιπλέον τη διάκριση κλώνων αλλά και φυλογενετική ανάλυση των ποικιλιών της αμπέλου.

Λέξεις κλειδιά: *Vitis vinifera*, αμπελογραφία, βιοχημικοί δείκτες, μοριακοί δείκτες, διάκριση ποικιλιών, ταυτοποίηση ποικιλιών.

Abstract

The vine belongs to *Vitaceae* family, which appeared 100 million years ago. Over time, many of its species have adapted to the soil-climatic conditions of various areas and have survived to the present day. Due to the interest of the genus *Vitis*, and in particular the subgenus *Muscadinia* and *Euvitis*, as well as due to various other factors, such as the appearance of phylloxera, powdery mildew, the large number of species and varieties, the synonymous or homonymous names and the fact that the grape variety plays an important role in the quality of the product, it is very important to develop methods for efficient discrimination and identification of vines and vine varieties.

In the present study, an extensive bibliographic review of the viticultural, biochemical and the most important molecular methods are described and compared, presenting the advantages as well as the disadvantages of each method. The main identification methods and the corresponding techniques on which they have been based are described, while an extensive bibliographic review of their applications in grapevines is made. Finally, the methods are compared and conclusions are presented.

The study concludes that the viticultural description (morphological markers), although absolutely necessary, may not distinguish grapevines at the level of variety, especially between closely related varieties, while it cannot distinguish clones and rootstocks. Biochemical methods (biochemical markers) may discriminate between varieties using gel electrophoresis to separate proteins, but they also do not provide distinction between clones of the same variety or mutations. Both morphological and biochemical markers have the inherent disadvantage of being influenced by the environment. This is overcome by molecular methods (molecular markers) based on the use of PCR, such as Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and microsatellites or Simple sequence repeats (SSR), that may also discriminate clones of the same cultivar and be used in phylogenetic analysis of grapevine varieties.

Keywords: *Vitis vinifera*, ampelography, biochemical markers, molecular markers, cultivar discrimination, variety identification.

Αφιερωμένο σε όσους πραγματικά
θα χαιρόντουσαν ... και χαίρονται μαζί μου,
με την ολοκλήρωση και αυτού του στόχου.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ολοκλήρωσης του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη Οίνου και Ζύθου” του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Δρ. Μπανίλα Γεώργιο, για την καθοδήγηση και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Κόρκα Ηλία και κα. Γκίζη Δανάη για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κ. Ράλλη Σταμάτη για τον δανεισμό πολύτιμων σημειώσεων, καθώς και όλους όσους με βοήθησαν με τον δικό τους τρόπο για την ολοκλήρωση αυτού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	v
1 Εισαγωγή	1
1.1 Καταγωγή της αμπέλου	1
1.2 Βοτανική ταξινόμηση της αμπέλου	3
1.3 <i>Vitis vinifera</i> L.	5
1.4 Ανάγκη Ταξινόμησης-Διάκρισης.....	7
1.5 Σκοπός της εργασίας	7
2 Συστήματα αμπελογραφικής περιγραφής	8
2.1 Αμπελογραφική περιγραφή	8
2.1.1 Μορφολογική ταξινόμηση	8
2.1.2 Αμπελομετρική ταξινόμηση	9
2.1.3 Φαινολογική ταξινόμηση	9
2.2 Αμπελογραφία.....	10
2.2.1 Φαινοτυπική ταξινόμηση.....	11
2.3 Εφαρμογές της μεθόδου	11
2.4 Κώδικας Αμπελογραφικής Περιγραφής.....	13
2.5 Μειονεκτήματα της μεθόδου-Περιορισμοί.....	15
3 Βιοχημικές Μέθοδοι.....	16
3.1 Αρχή της μεθόδου-Ισοένζυμα	16
3.2 Ισοηλεκτρική εστίαση-Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	17
3.3 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα της μεθόδου	17
3.4 Εφαρμογή της μεθόδου των ισοενζύμων	18
4 Νέες Τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας	23
4.1 Ηλεκτροφόρηση	23
4.2 Τεχνική της Αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης- PCR	24
4.3 Αλληλούχηση.....	26

5	Μοριακές Μέθοδοι	26
5.1	Μοριακοί δείκτες.....	26
5.2	Τεχνικές βασισμένες στον Υβριδισμό.....	28
5.2.1	Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	28
5.2.2	Εφαρμογή της μεθόδου RFLP	29
5.2.3	Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου.....	30
5.3	Τεχνικές βασισμένες σε PCR.....	31
5.3.1	Τεχνικές βασισμένες στη PCR με χρήση τυχαίων Εκκινήτων	31
5.3.2	Τεχνικές βασισμένες στη PCR με στοχευμένες αλληλουχίες.....	43
6	Συμπεράσματα & Συζήτηση	57
	Παράρτημα I	61
	Παράρτημα II	63
	Βιβλιογραφία.....	66
	Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία.....	66
	Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	66

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1	Οι 11 σειρές του υπογένους <i>Euvitis</i> και τα 62 είδη που περιλαμβάνουν	4
Πίνακας 6.1.	Σύγκριση διαφόρων χαρακτηριστικών των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης	57
Πίνακας 6.2	Σύγκριση χαρακτηριστικών δυσκολίας εφαρμογής των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης	57

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1	Μελανόμορφος αμφορέας με μυθικό τρύγο και παραγωγή κρασιού από σατύρους, που αποδίδεται στο ζωγράφο του Άμαση. π. 540 π.Χ. Würzburg, Martin von Wagner Museum, University of Würzburg	2
Εικόνα 2.1	Σχήμα αυξανόμενης κορυφής: α) κλειστό, β) μετρίως ανοιχτό, γ) ανοιχτό	9
Εικόνα 2.2	Χαρακτήρες οδόντων: α) ευθείες β) κυρτές γ) κοίλες δ) κοίλη-κυρτή ε) διπλή σειρά οδόντων	9
Εικόνα 2.3	Τα Φαινολογικά στάδια της αμπέλου σύμφωνα με τους Baillod και Baggiolini (1993).	10
Εικόνα 2.4	Χνούδι : α) αραχνοϋφής β) χνοώδης γ) βαμβακώδης δ) μεταξώδης ε) βελουδοειδής	11
Εικόνα 3.1	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου	17
Εικόνα 4.1	Φθορισμός με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου και χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας	24
Εικόνα 4.2	Σχηματική παράσταση προσκόλησης των εκκινητών με τη βοήθεια της πολυμεράσης	25
Εικόνα 5.1	Μεταφορά DNA σε μεμβράνη που υβριδίζει κατά Southern	29
Εικόνα 5.2	Υβριδισμός DNA σε μεμβράνη	29
Εικόνα 5.3	Διαχωρισμός σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου	32
Εικόνα 5.4	Σχηματική περιγραφή της μεθόδου AFLP	39
Εικόνα 5.5	Σχηματική παράσταση των GA SSR αλληλουχιών τριών διαφορετικών γονότυπων	44
Εικόνα 5.6	Σχηματική παραλλαγή αλληλουχίας DNA με δυο αλληλόμορφα C και T	53

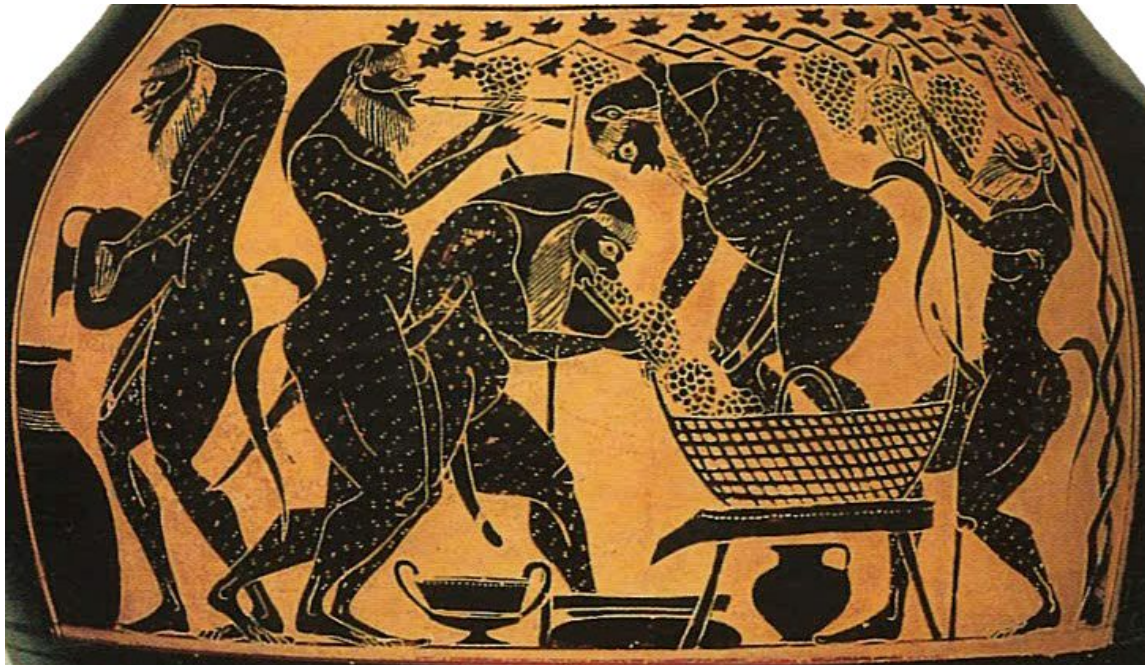
1 Εισαγωγή

Μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες η οποία διατηρεί από την αρχαιότητα έως τις μέρες μας ξεχωριστή θέση στην Γεωργία είναι αυτή της αμπέλου. Σύμφωνα με τις αναφορές του Ομήρου διάφορες πόλεις στην αρχαιότητα χαρακτηρίζονταν με επίθετα πολυστάφυλος, αμπελόεσσα (Αρβανιτίδης, 1990) στις οποίες προφανώς καλλιεργούσαν σε μεγάλες εκτάσεις την άμπελο. Σήμερα σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία (2021) στα αποτελέσματα της Ετήσιας Γεωργικής Στατιστικής Έρευνας για το έτος 2019 η συνολική καλλιεργούμενη έκταση της αμπέλου είναι 870.100 στρέμματα, από τα οποία τα 495.000 αφορούν τις οινοποιήσιμες ποικιλίες, τα 98.900 τα επιτραπέζια σταφύλια και τα 276.200 τα σταφιδάμπελα. Με την άμπελο την οινοφόρο *Vitis vinifera* L. να περιλαμβάνει περισσότερες από 9.000 καλλιεργούμενες ποικιλίες σε όλο τον κόσμο και να είναι το πιο σημαντικό είδος του γένους *Vitis* της οικογένειας των Αμπελιδών -*Vitaceae* που ενδιαφέρει την παραγωγική αμπελοργία.

1.1 Καταγωγή της αμπέλου

Σύμφωνα με παλαιοντολογικά ευρήματα η οικογένεια των Αμπελιδών εμφανίστηκε πριν 100 εκατ. έτη, κατά την κρητιδική υποπερίοδο του μεσοζωικού αιώνα (Λογοθέτης, 1967). Εμφάνισε σημαντική εξάπλωση στη περιοχή της σημερινής νοτιοανατολικής Ασίας, σύμφωνα με ευρήματα που βρέθηκαν κατά τον καινοζωικό αιώνα πριν από 70 εκατ. έτη. Τα είδη *V. artica*, *V. sachalinensis*, *V. teutonica*, *V. segannensis* και *V. brittanika* εμφανίστηκαν πριν από 60 έως 25 εκατ. έτη κατά τις υποπεριόδους ηώκαινο και ολιγόκαινο, στις αντίστοιχες περιοχές της Γροιλανδίας, Ανατολικής Ασίας, Γερμανίας και Ρωσίας, καθώς επίσης στην Γαλλία και τέλος στην Αγγλία. Στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στην Γαλλία και Ολλανδία βρέθηκαν για πρώτη φορά υπολείμματα του είδους *V. vinifera*, χρονολογούμενα πριν από 25 έως 2 εκατ. χρόνια κατά τις υποπεριόδους μειοκαίνου και πλειοκαίνου. Την ίδια χρονική περίοδο διαπιστώνεται η παρουσία των ειδών *V. braunii* στην Ιταλία, *V. lanata* στη Γαλλία, *V. praevinifera* στη Γαλλία και ευρωπαϊκή Ρωσία, *V. tokaynensis* στην Ουγγαρία, *V. silvestris* στην Ολλανδία, Γερμανία, Πολωνία και Δανία, ενώ στην Ισπανία βρέθηκαν τα *V. labrusca* και *V. flexuosa*. Ενώ κατά τις υποπεριόδους πλειόκαινου και ολόκαινου των τελευταίων 2 εκατ. ετών διαπιστώθηκε η παρουσία του είδους *V. ausoniae* σε όλη την Ευρώπη καθώς επίσης βρέθηκε και στην Κύμη της Εύβοιας. Κατά την περίοδο των παγετώνων που ξεκίνησε πριν από 2 εκατ. χρόνια και τερματίστηκε πριν από 10.000 χρόνια,

λόγω των συνθηκών που επικράτησαν κατά την μετακίνηση των παγετώνων, πολλά είδη της αμπέλου εξαφανίστηκαν και διατηρήθηκαν μόνο τα απολιθώματά τους, ενώ άλλα κατάφεραν να επιβιώσουν σε περιοχές που οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες το επέτρεπαν (Σταύρακας, 2010).



Εικόνα: 1.1 Μελανόμορφος αμφορέας με μυθικό τρύγο και παραγωγή κρασιού από σατύρους, που αποδίδεται στο ζωγράφο του Αμαση. π. 540 π.Χ. Würzburg, Martin von Wagner Museum, University of Würzburg (Πηγή: <https://www.leivithrapark.gr>)

Η καλλιεργούμενη μορφή της αμπέλου εμφανίστηκε περίπου πριν από 7500 χρόνια ως φυτό αναρριχώμενο σε δασικές και παραποτάμιες περιοχές, με την περιοχή του Καυκάσου να θεωρείται η αρχική τοποθεσία στην οποία η άμπελος βρήκε ευνοϊκές εδαφικές και κλιματικές συνθήκες κατά την περίοδο των παγετώνων και ξεκίνησε η καλλιέργειά της, όπου στη συνέχεια διαδόθηκε στη περιοχή της Μεσοποταμίας. Στην Αίγυπτο καλλιεργούνταν πριν από 6000 έτη, ενώ στην Ελλάδα εξαπλώθηκε γύρω στο 3.000 π.Χ, από όπου και διαδόθηκε στην Ιταλία και από εκεί σε άλλες χώρες της Ευρώπης, της Αμερικής, της Αυστραλίας και της Αφρικής (Νούση, χ.η).

1.2 Βοτανική ταξινόμηση της αμπέλου

ΑΘΡΟΙΣΜΑ: ΣΠΕΡΜΑΤΟΦΥΤΑ

ΣΥΝΟΜΟΤΑΞΙΑ: ΑΓΓΕΙΟΣΠΕΡΜΑ

ΚΛΑΣΗ: ΔΙΚΟΤΥΛΑ

ΥΠΟΚΛΑΣΗ: ΔΙΑΛΥΠΕΤΑΛΑ

ΤΑΞΗ: RAMNALES

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: VITACEAE

Το αμπέλι ανήκει στην οικογένεια των Αμπελιδών -*Vitaceae* ή *Ampelidaceae*, η οποία υπάγεται στο Φύλο *Tererinthales – Rubiales* και στην Τάξη των *Rhamnales*. Με τον αριθμό των γενών που συστηματικά κατατάσσονται στην Οικογένεια των Αμπελιδών να μην είναι απολύτως ξεκάθαρος, καθώς σύμφωνα με τον Planchon το 1887 αναφέρονται 10 γένη, ενώ ο Suessenguth το 1953 ανεβάζει τον αριθμό των γενών σε 12, καταλήγοντας το 1988 ο Gallet να αναγνωρίζει τα 18 γένη, τα οποία παρουσιάζονται στο Παράρτημα I.

Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γένος *Vitis tournef. L.*, στο οποίο υπάγονται οι άμπελοι που παρουσιάζουν πρακτικό ενδιαφέρον για την Αμπελουργία και καλλιεργούνται σε όλα τα μέρη της γης, στα οποία επικρατούν κατάλληλες εδαφικές και κλιματικές συνθήκες, οι οποίες καθιστούν δυνατή την βλάστηση τους. Αυτά τα μέρη είναι κυρίως των εύκρατων κλιμάτων του βορείου ημισφαιρίου, όπως η Ασία, η Κεντρική και Βόρεια Αμερική. Τα φυτά που περιλαμβάνει είναι πολυετή θαμνώδη που βλαστάνουν κάθε χρόνο, δίνοντας βλαστούς που στη συνέχεια ξυλοποιούνται σε κλιματίδες μεγάλου μήκους και οι οποίες φέρουν έλικες, με τις οποίες αναρριχώνται στα διάφορα υποστηρίγματα (Σταύρακας, 2010). Το γένος *Vitis* διαιρείται στα υπογένη *Muscadinia* που έχει $2n = 40$ χρωμοσώματα και *Euvitis* που έχει $2n = 38$ χρωμοσώματα.

Το υπογένος *Muscadinia* περιλαμβάνει τα τρία είδη της αμερικάνικης ηπείρου *V. rotundifolia Michaux*, *V. rotundifolia Michaux*, *V. rotundifolia Michaux* και *V. rotundifolia Michaux*, τα οποία παρουσιάζουν επιτυχία στη μεταξύ τους φυσική διασταύρωση, με τα παραγόμενα υβρίδια να είναι γόνιμα και παραγωγικά. Ο φλοιός των φυτών σχίζεται σε ακανόνιστα τμήματα και κατά πλάκες, με τους κόμπους να μην έχουν διάφραγμα, ενώ οι έλικες δεν διακλαδίζονται και το ξύλο είναι σκληρό και η εντεριόνη λίγη. Οι ράγες ωριμάζουν σταδιακά και η πρόσφυση τους με τον ποδίσκο είναι χαλαρή, τα γίγαρτα είναι ωοειδή με όχι τόσο εμφανή χάλαζα, η οποία περιβάλλεται από έντονες πτυχώσεις (Σταύρακας, 2010). Επίσης οι ράγες τους έχουν λίγο χυμό και μικρή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, ενώ τα φύλλα τους είναι παλαμοσχιδή, σχεδόν πλήρη.

Οι ποικιλίες του είδους *Vitis rotundifolia* έχουν ιδιαίτερη αξία για την αμπελουργία, καθώς διαθέτουν γονίδια αντοχής στη φυλλοξήρα, τους νηματώδεις και τον μολυσματικό εκφυλισμό της αμπέλου και με διασταύρωση τους με ποικιλίες των ειδών του υπογένους *Euvitis* προκύπτουν υποκείμενα ανθεκτικά στα τρία παραπάνω παθογόνα (Σταύρακας, 2010). Με την προϋπόθεση ότι η μεταξύ των δύο υπογενών διασταύρωση να πραγματοποιείται μόνο όταν χρησιμοποιείται το υπογένος *Muscadinia* ως άρρηνη γονέας. Επίσης θεωρείται ότι τα είδη του υπογένους *Muscadinia* είναι ο ενδιάμεσος κρίκος μεταξύ των ειδών του γένους *Vitis* και του γένους *Ampelopsis*, λόγω των μορφολογικών, ανατομικών και καρυολογικών ομοιοτήτων που παρουσιάζουν μεταξύ τους.

Το υπογένος *Euvitis* σύμφωνα με αναφορά του Gallet το 1967, περιλαμβάνει 62 είδη τα οποία τα κατατάσσει στις 11 σειρές όπως φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Πίνακας 1.1 Οι 11 σειρές του υπογένους *Euvitis* και τα 62 είδη που περιλαμβάνουν.

1η σειρά: <i>Candicansae</i>	<i>V. candicans</i> , <i>V. doaniana</i> , <i>V. longii</i> , <i>V. coriacea</i> , <i>V. simpsonii</i> , <i>V. champinii</i>
2η σειρά: <i>Labruscae</i>	<i>V. labrusca</i> , <i>V. coignetiae</i>
3η σειρά: <i>Caribaeae</i>	<i>V. caribaea</i> , <i>V. blancoii</i> , <i>V. lanata</i>
4η σειρά: <i>Arizonae</i>	<i>V. arizonica</i> , <i>V. californica</i> , <i>V. girdiana</i> , <i>V. treleasei</i>
5η σειρά: <i>Cinereae</i>	<i>V. cinerea</i> , <i>V. berlandieri</i> , <i>V. baileyana</i> , <i>V. bourgeana</i>
6η σειρά: <i>Aestivalae</i>	<i>V. aestivalis</i> , <i>V. bicolor</i> , <i>V. linccumii</i> , <i>V. bourquina</i> , <i>V. gigas</i> , <i>V. rufotomentosa</i>
7η σειρά: <i>Cordifoliae</i>	<i>V. cordifolia</i> , <i>V. illex</i> , <i>V. helleri</i> , <i>V. monticola</i> , <i>V. rubra</i>
8η σειρά: <i>Flexuosae</i>	<i>V. flexuosa</i> , <i>V. thunbergii</i> , <i>V. betulifolia</i> , <i>V. reticulata</i> , <i>V. amurensis</i> , <i>V. piasezkii</i> , <i>V. embergeri</i> , <i>V. pentagona</i> , <i>V. chunganensis</i> , <i>V. chungii</i> , <i>V. piloso-nerva</i> , <i>V. balansaeana</i> , <i>V. hancockii</i> , <i>V. hexamera</i> , <i>V. pedicellata</i> , <i>V. retordii</i> , <i>V. seguinii</i> , <i>V. silvestrii</i> , <i>V. tsoii</i> , <i>V. bryoniifolia</i> κ.λ.π.
9η σειρά: <i>Spinosaе</i>	<i>V. armata</i> , <i>V. davidii</i> , <i>V. romanetii</i>
10η σειρά: <i>Ripariae</i>	<i>V. riparia</i> , <i>V. rupestris</i>
11η σειρά	<i>V. vinifera</i> , <i>V. sylvestris</i>

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω το υπογένος *Vitis* περιλαμβάνει παραπάνω από 70 είδη τα οποία χωρίζονται σε διάφορες γεωγραφικές ομάδες με πολυπληθέστερη αυτή της Βόρειας Αμερικής με περίπου 37 είδη αυτοφυή, ενώ ακολουθεί η ομάδα των ασιατικών ειδών και το μοναδικό είδος της Ευρασίας και της μεσογειακής λεκάνης το *V. vinifera* L., γνωστό ως η άμπελος η οينوφόρος.

Η διασταύρωση αλλά και ο εμβολιασμός μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών του υπογένους είναι επιτυχής, με τα υβρίδια που προκύπτουν να είναι γόνιμα και παραγωγικά. Ο φλοιός των φυτών σχίζεται και αποκολλάται σε μακριές λωρίδες, τα γόνατα των κληματίδων φέρουν διάφραγμα, ενώ οι έλικες είναι διακλαδισμένες δισχιδείς ή τρισχιδείς, με το ξύλο να είναι μαλακό και άφθονη εντεριώνη. Η πρόσφυση των ραγών με τον ποδίσκο είναι ισχυρή και τα γίγαρτα είναι απιοειδή και έχουν καλοσχηματισμένη και εμφανή χάλαζα (Σταύρακας, 2010). Επιπλέον ο χυμός των ραγών έχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, οξέων και άλλων οργανικών ουσιών, ενώ τα φύλλα είναι παλαμοσχιδή με πέντε κύριες νευρώσεις.

1.3 *Vitis vinifera* L.

Το είδος *V. vinifera* L., σύμφωνα με τον De Lattin (1939) διαιρέθηκε σε τρία υποείδη:

Vitis vinifera sylvestris, Gmelin - Άγρια οиноφόρος άμπελος. Το υποείδος αυτό το συναντάμε στην κεντρική και μεσημβρινή Ευρώπη εκτός από την Αίγυπτο και την Αραβία, ενώ στην Ελλάδα το βρίσκουμε σε τοποθεσίες της Θράκης, της Μακεδονίας, της Ηπείρου, της Θεσσαλίας, της Ευρυτανίας, της Βοιωτίας, της Εύβοιας και της Πελοποννήσου. Περιγράφεται ως φυτό υγρόφιλο το οποίο βρίσκεται στις παρυφές των δασών σε εδάφη προσχωσιγενή, και κατά μήκος των ποταμών, απαντάται όμως και σε ξηρά εδάφη. Σε σχέση με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες αντέχει περισσότερο στο ψύχος και μπορεί να πάρει μεγάλες διαστάσεις (Σταύρακας, 2010).

Vitis vinifera caucasica, Vavilon - Καυκασιανή οиноφόρος Άμπελος. Θεωρείται ασιατικό υποείδος το οποίο περιλαμβάνει ποικιλίες που καλλιεργούνται στη Μολδαβία, τη νότια Ρωσία, την Αρμενία, τον Καύκασο, την ανατολική Μικρά Ασία, την Περσία, το Τουρκεστάν και το Κασμίρ (Σταύρακας, 2010).

Vitis vinifera sativa, De Cadole – Καλλιεργούμενη άμπελος. Το υποείδος αυτό περιλαμβάνει όλες τις καλλιεργούμενες ποικιλίες της αμπέλου (Σταύρακας, 2010).

Μια πιο σύγχρονη και ικανοποιητική υποδιαίρεση της οиноφόρου Αμπέλου, είναι αυτή που παρουσίασε ο Negroul (1946), σύμφωνα με την οποία κατέταξε τις διάφορες ποικιλίες με οικογεωγραφικά κριτήρια και σε υποομάδες, κυριότερες των οποίων είναι:

Η *Proles pontica* – Ποντία, στην οποία περιλαμβάνονται όλες οι παλαιές ποικιλίες αμπέλου και οι οποίες κατατάσσονται σε δυο υποομάδες, τη *georgica* και τη *balkanica*, όπου η τελευταία περιλαμβάνει και τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου. Με τις ποικιλίες να βρίσκονται

γύρω από την περιοχή του Εύξεινου Πόντου δηλαδή τη Γεωργία, τη Μικρά Ασία, την Ελλάδα, τη Βουλγαρία και τη Ρουμανία (Σταύρακας, 2010).

Η *Proles occidentalis* – Δυτική, η οποία περιλαμβάνει τις παλαιές ποικιλίες της Δυτικής Ευρώπης και κυρίως τις ποικιλίες οινοποιίας της Γαλλίας, Γερμανίας, Ισπανίας και Πορτογαλίας (Σταύρακας, 2010).

Η *Proles orientalis* – Ανατολική, η οποία περιλαμβάνει ποικιλίες από τη Μέση Ανατολή, την Περσία και τη Μεσοποταμία και η οποία διακρίνεται σε δυο υποφυλές τη *casprica* η οποία περιλαμβάνει τις παλαιές ποικιλίες οινοποιίας της αγρίας οινοφόρου αμπέλου, που βρίσκονται στην περιοχή του Νταγκεστάν, Αζερμπαϊτζάν και Τουρκμενιστάν και την *antasiatica* στην οποία κατατάσσονται οι επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου, οι οποίες απαντώνται στην Ανατολική Ασία (Σταύρακας, 2010).

Παρόλα αυτά στην παραγωγική αμπελουργία οι ποικιλίες των ειδών του γένους *Vitis* κατατάσσονται με κριτήριο τη χρήση για την οποία προορίζεται το παραγόμενο προϊόν. Οι κατηγορίες αυτές αναφέρονται παρακάτω ως εξής:

- 1) Ποικιλίες οινοποιίας, για την παραγωγή οίνων και οινικών προϊόντων
- 2) Ποικιλίες σταφιδοποιίας για την παραγωγή σταφίδων μετά την αποξήρανση των σταφυλιών
- 3) Ποικιλίες επιτραπέζιων σταφυλιών για την παραγωγή σταφυλιών προς νωπή κατανάλωση
- 4) Ποικιλίες κατάλληλες για την παραγωγή χυμού σταφυλιών
- 5) Ποικιλίες κατάλληλες για την παραγωγή σταφυλιών προς κονσερβοποίηση
- 6) Είδη και ποικιλίες για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού ανθεκτικού στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας

Με τις πρώτες πέντε κατηγορίες να αφορούν κατά κύριο λόγο ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου και η έκτη κατηγορία να περιλαμβάνει είδη και ποικιλίες της Βόρειας Αμερικής, οι οποίες αποτελούν τα υποκείμενα στα οποία εμβολιάζονται οι ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου (Σταυρακάκης, 2010).

1.4 Ανάγκη Ταξινόμησης-Διάκρισης

Η εμφάνιση της φυλλοξήρας, του ωιδίου και του περονόσπορου στην Ευρώπη, το γεγονός ότι η ποικιλία της αμπέλου παίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος, καθώς και ο μεγάλος αριθμός των ειδών και των ποικιλιών που περιλαμβάνει το γένος *Vitis* αλλά και τα πολλά συνώνυμα ονόματα που αναφέρονται σε κάθε ποικιλία και αποδίδονται:

1. στο μεγάλο αριθμό χρωμοσωμάτων του γένους
2. στον υψηλό βαθμό μορφολογικής και γενετικής ετερογένειας
3. στη μεγάλη γεωγραφική διασπορά
4. στη συσσώρευση βλαστικών μεταλλάξεων εξαιτίας και της μακράιωνης καλλιέργειας της αμπέλου
5. στις φυσικές και τεχνητές διασταυρώσεις που έλαβαν χώρα σε μεγάλη κλίμακα
6. στην ευχέρεια αγενούς πολλαπλασιασμού των ποικιλιών αμπέλου που αφενός μεν διατηρεί την ποικιλότητα αυτή αφετέρου δε αποτελεί και το μοναδικό τρόπο εγκατάστασης παραγωγικών αμπελώνων

οδήγησαν στην ανάγκη για ταξινόμηση και διάκριση της οиноφόρου αμπέλου αρχικά με τη μέθοδο της αμπελογραφικής περιγραφής, ακολουθούμενη στη συνέχεια από προσπάθειες διάκρισης των ποικιλιών της αμπέλου με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων, ενώ πλέον σήμερα με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας και τη χρήση των μοριακών δεικτών, η ταυτοποίηση και διάκριση των ειδών και των ποικιλιών της αμπέλου πραγματοποιείται με τις μοριακές μεθόδους (Σταύρακας, 2010).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής εργασίας είναι να περιγράψει τις μεθόδους ταυτοποίησης της αμπέλου: Συστήματα αμπελογραφικής περιγραφής, βιοχημικές και μοριακές μεθόδους και να τις συγκρίνει μεταξύ τους, καθώς επίσης και να παρουσιάσει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς κάθε μεθόδου.

2 Συστήματα αμπελογραφικής περιγραφής

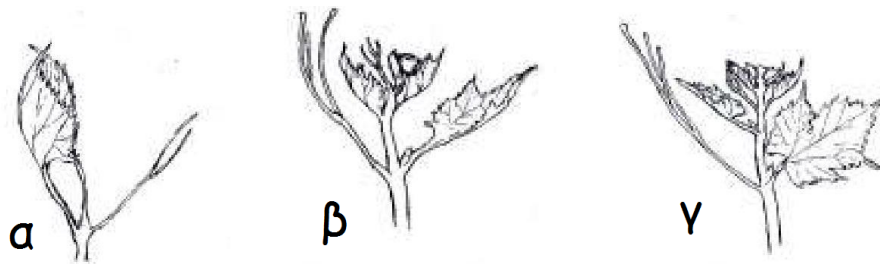
Παραπάνω από 200 συστήματα αμπελογραφικής περιγραφής και ταξινόμησης των ποικιλιών του είδους *vitifera* έχουν προταθεί από τα τέλη του 18ου αιώνα. Με τον Helbling το 1777 να παρουσιάζει το πρώτο σχέδιο ταξινόμησης των ποικιλιών της οινοφόρου αμπέλου, τις οποίες κατατάσει σε τρεις κλάσεις ανάλογα με το χρώμα των ραγών σε λευκές, ροδόχρωμες και ερυθρές και διαιρώντας στη συνέχεια κάθε κλάση σε δυο υποκλάσεις ανάλογα με το σχήμα των ραγών σε στρογγυλές και επιμήκεις (Σταύρακας, 2010).

2.1 Αμπελογραφική περιγραφή

Για τον παραπάνω σκοπό αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η μεθοδολογία της αμπελογραφικής περιγραφής. Η οποία διαφέρει από την κλασική βοτανική περιγραφή καθώς αναφέρεται σε επίπεδο κλώνου και όχι ποικιλίας, δηλαδή αναφέρεται σε άτομα που προέρχονται με αγενή πολλαπλασιασμό, από τον ίδιο οφθαλμό ενός και μόνο μητρικού φυτού και έχουν το ίδιο γονότυπο μεταξύ τους. Με την πλειονότητα των αμπελογραφικών περιγραφικών συστημάτων που ακολούθησαν να βασίζονται στη μορφολογική, αμπελομετρική, φαινολογική και φαινοτυπική ταξινόμηση (Σταυρακάκης, 2010).

2.1.1 Μορφολογική ταξινόμηση

Η μορφολογική ταξινόμηση βασίζεται κυρίως στους μορφολογικούς χαρακτήρες των διαφόρων οργάνων της αμπέλου όπως χρώμα, σχήμα, μέγεθος, χνοασμός. Το 1804 και το 1875 ο Frege και ο Hogg αντίστοιχα, κατέταξαν με βάση το χρώμα και το σχήμα των ραγών τις ποικιλίες σε διάφορες κλάσεις και υποκλάσεις (Σταύρακας, 2010). Ο χνοασμός διαφόρων οργάνων της αμπέλου χρησιμοποιήθηκε αρχικά το 1814 από τον Clemente για να περιγράψει τις ποικιλίες της Ανδαλουσίας, καθώς επίσης χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια από τον Clock το 1829 και τον Kolemati το 1847, ενώ το χρώμα των ραγών, το σχήμα των φύλλων και η γεύση του χυμού χρησιμοποιήθηκε από τους Acarbi το 1825 και Milano το 1842 (Σταυρακας, 2010). Ο Rovasenda το 1877 εκτός από το χρώμα των ραγών και τη γεύση του χυμού συμπεριέλαβε στα κριτήρια ταξινόμησης το χνοασμό των φύλλων και της νεαρής βλάστησης, φτάνοντας το 1906 στον Malon που πρότεινε η διάκριση και η ταξινόμηση να γίνεται σε κλάσεις και τάξεις, λαμβάνοντας ως κριτήρια το χρώμα και το σχήμα των ραγών, τη γεύση του χυμού και την εποχή ωρίμανσης των σταφυλιών (Σταύρακας, 2010).



Εικόνα 2.1: Σχήμα αυξανόμενης κορυφής: α) κλειστό, β) μετρίως ανοιχτό, γ) ανοιχτό (Πηγή: ΟΙΥ, 2001)

2.1.2 Αμπελομετρική ταξινόμηση

Η αμπελομετρική ταξινόμηση στηρίζεται στις μετρήσεις των ραγών, φύλλων, των γωνιών που σχηματίζουν οι νευρώσεις. Το 1841 ο Trummer βασιζόμενος στο μήκος και το πλάτος των ραγών ταξινόμησε τις ποικιλίες, ενώ το 1874 ο Oudart χρησιμοποίησε ως κριτήριο ταξινόμησης το μήκος των μεσογονατίων διαστημάτων, φτάνοντας το 1876 στον Goethe ο οποίος έλαβε υπόψη του ως κριτήρια ταξινόμησης τη μορφή των φύλλων, τη μορφή των λοβών, των οδόντων και της γωνίας που σχηματίζεται από το κεντρικό και τα δυο παράπλευρα νεύρα (Σταύρακας, 2010). Την αμπελομετρική ταξινόμηση χρησιμοποίησαν επίσης οι Metzger το 1187, ο Ravaz το 1902, ο Rodriguez το 1952, ο Galet το 1952, οι Alleweldt και Dettweiler το 1989 και οι Tomažič και Korošec-Koruza το 2003.

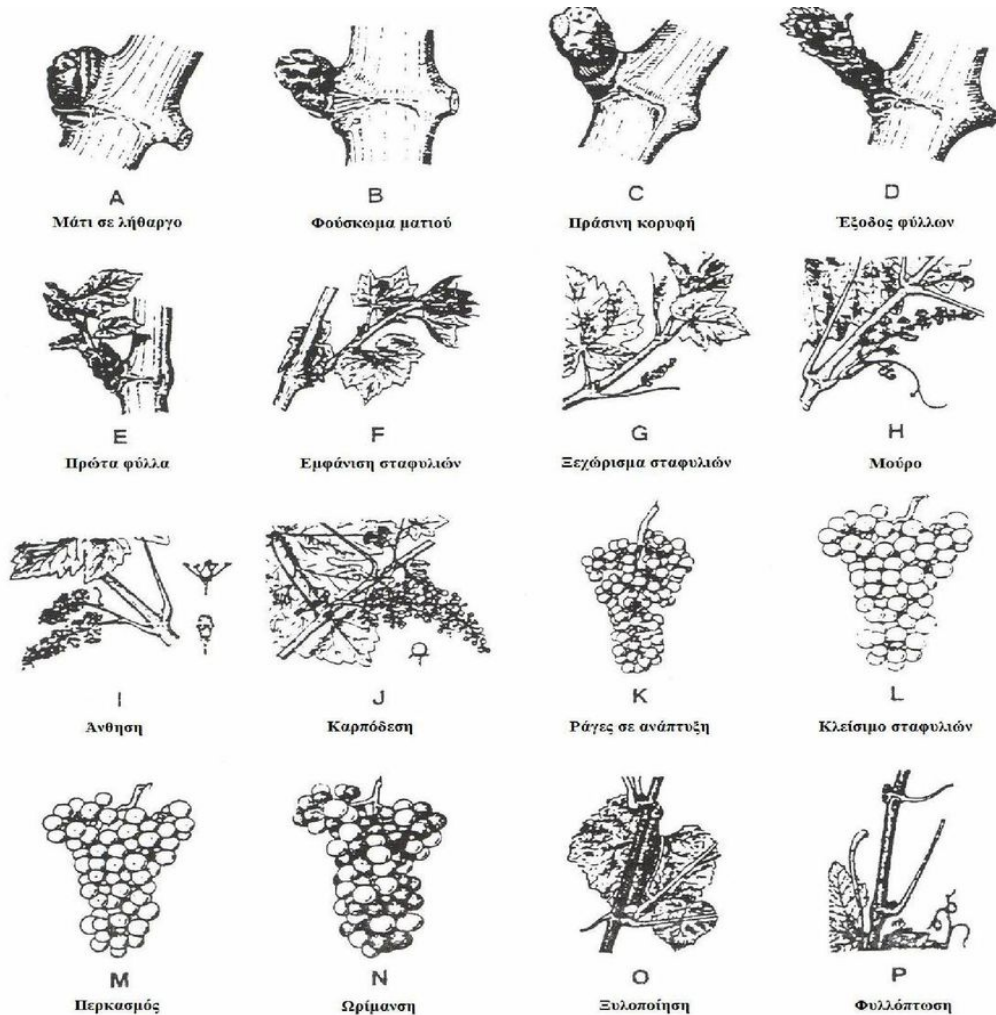


Εικόνα 2.2: Χαρακτήρες οδόντων : α) ευθείες β) κυρτές γ) κοίλες δ) κοίλη-κυρτή ε) διπλή σειρά οδόντων (Πηγή: ΟΙΥ, 2001)

2.1.3 Φαινολογική ταξινόμηση

Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται στα διάφορα φαινολογικά στάδια της αμπέλου, όπως η εκβλάστηση των λανθανόντων οφθαλμών, ο χρόνος έναρξης και πλήρους βλάστησης, ο χρόνος έναρξης και πλήρους άνθησης, ο χρόνος έναρξης και πλήρους ωρίμανσης των σταφυλιών, καθώς ο χρόνος φυλλόπτωσης (Σταυρακάκης, 2010). Το 1888 ο Pulliat κατάταξε τις ποικιλίες της αμπέλου σε πρώιμες, πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης περιόδου, προσθέτοντας και υποπεριόδους, λαμβάνοντας υπόψη του ως κριτήριο ταξινόμησης το χρόνο ωρίμανσης και ως σημείο αναφοράς την εποχή ωρίμανσης της ποικιλίας *Chassellas dore*

(Σταύρακας, 2010). Αυτή η κατάταξη αντιστοιχεί σήμερα στις πρώιμες, μέσο-πρώιμες, κανονικής περιόδου ωρίμανσης, μέσο-όψιμες και όψιμες ποικιλίες.



Εικόνα 2.3: Τα Φαινολογικά στάδια της αμπέλου σύμφωνα με τους Baillod και Baggiolini (1993). (Βασισμένο στην πηγή: Keler, 2015)

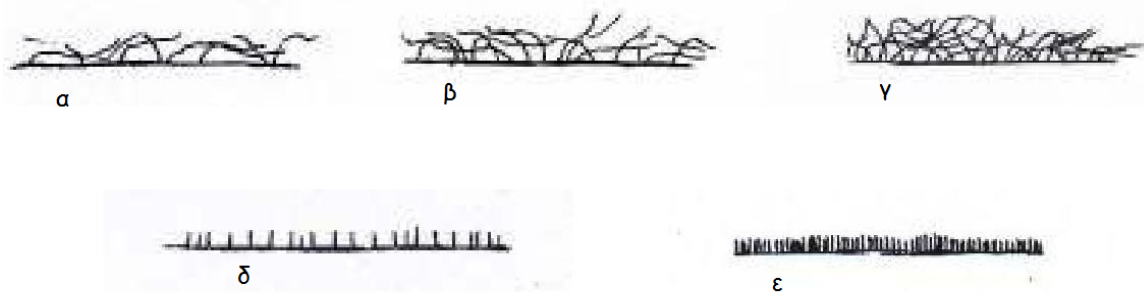
2.2 Αμπελογραφία

Ο όρος Αμπελογραφία προέρχεται από τις λέξεις άμπελος και (περι)γράφω και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό D. Sachs το 1661 στο βιβλίο του “Ampelografia” όπου περιγράφει με λεπτομέρεια τα διάφορα όργανα της αμπέλου. Ο όρος αυτός όμως καθιερώθηκε μετά από 150 χρόνια το έτος 1807 από τον Ισπανό Don Simon de Rojas Clemente στο “Δοκίμιο επί των ποικιλιών αμπέλου της Ανδαλουσίας” και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η γενίκευση του από άλλους συγγραφείς (Σταύρακας, 2010).

Θέλοντας να δώσουμε έναν ορισμό για την Αμπελογραφία θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι ο κλάδος της Αμπελουργίας που έχει ως αντικείμενο τη μελέτη και την περιγραφή των χαρακτήρων και των ιδιοτήτων των ειδών, ποικιλιών ή κλώνων της αμπέλου, που συμβάλουν στη φαινοτυπική διακύμανση, την καλλιεργητική και οικονομική αξιολόγηση των ιδιοτήτων τους στην παραγωγική αμπελουργία (Σταύρακας, 2010) .

2.2.1 Φαινοτυπική ταξινόμηση

Η φαινοτυπική ταξινόμηση στηρίζεται στην ομαδοποίηση των πρέμων με τον ίδιο φαινότυπο και συγκεκριμένα στο χνοασμό της αυξανόμενης κορυφής της νεαρής βλάστησης, του ποώδους βλαστού, των ανεπτυγμένων φύλλων καθώς και στις μετρήσεις των χαρακτήρων του φύλλου για τον προσδιορισμό του φυλλικού τύπου. Προτάθηκε αρχικά το 1902 από τον Ravaz και στη συνέχεια από τον Gallet το 1952, με τον Ravaz να ασχολείται αποκλειστικά με τη φαινοτυπική ταξινόμηση των ειδών, των ποικιλιών και των υβριδίων των αμερικανικών αμπέλων, ενώ ο Gallet να συμπεριλαμβάνει επιπλέον και τις ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου (Σταύρακας, 2010) .



Εικόνα 2.4: Χνούδι : α) αραχνοϋφής β) χνώδης γ) βαμβακώδης δ) μεταξώδης ε) βελουδοειδής (Πηγή: OIV, 2001)

2.3 Εφαρμογές της μεθόδου

Θα πρέπει να σημειωθεί πως η πρώτη προσπάθεια αμπελογραφικής μελέτης στην Ελλάδα είναι το στιχούργημα που γράφτηκε το 1601 και δημοσιεύτηκε το 1880 από τον Κατραμή και αναφερόταν στις γνωστές για την εποχή εκείνη καλλιεργούμενες ποικιλίες της Ζακύνθου (Σταύρακας, 2010). Στη συνέχεια ο Γρηγόριος Παλαιολόγος μετά την ελληνική επανάσταση αναγνώρισε 20 διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες αμπέλου, ενώ στο έργο Δοκίμιον Αγρονομίας του ιερέως Αρσενίου Πανδή αναφέρονται 30 ποικιλίες αμπέλου, το χρώμα τους καθώς και το κατάλληλο έδαφος καλλιέργειας τους (Σταύρακας, 2010). Το 1875 ο Ορφανίδης στο βιβλίο του Γεωπονικά, έκανε κατάταξη των ελληνικών ποικιλιών διαιρώντας αυτές σε

τρεις κλάσεις με βάση το χρώμα τους σε λευκές, ξανθές ή κόκκινες και μελανές, επίσης διαίρεσε κάθε κλάση σε τρεις υποκλάσεις ανάλογα με το σχήμα των ραγών σε

- σφαιρικές
- ωοειδείς, κωνοειδείς, ελλειψοειδείς
- κυλινδρικές, γαμψές,

υπολογίζοντας αυτές σε περισσότερες από 500 (Σταύρακας, 2010).

Στη συνέχεια ο Πονηρόπουλος το 1888 διέκρινε τις ελληνικές ποικιλίες σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

- οινοποιίας, τις οποίες υπολόγισε σε 30
- βρώσιμες ή λοιπές, τις οποίες προσδιόρισε σε περισσότερες από 200

ενώ έκανε στη συνέχεια την ονομαστική και κατά Δήμο κατάταξη αυτών των ποικιλιών (Σταύρακας, 2010). Επίσης ο Γεννάδιος από το 1885 έως το 1896 δημοσίευσε συνοπτικές μελέτες στο βιβλίο *Ελληνική Γεωργία*, που αναφερόντουσαν σε ποικιλίες που καλλιεργούνταν στα διάφορα διαμερίσματα της τότε μικρής Ελλάδας, ξεχωρίζοντας αυτές σε ποικιλίες οινοφόρους και παραγωγής επιτραπέζιων σταφυλιών (Σταύρακας, 2010).

Στην Ελλάδα μετά από αρκετά χρόνια και κατά το έτος 1938 μελετήθηκαν και ταξινομήθηκαν περίπου 200 ελληνικές ποικιλίες με το σύστημα ταξινόμησης των ποικιλιών του Κριμπά, το οποίο βασιζόταν στη σχέση μήκος ράγας προς μήκος γιγάρτου, η οποία θεωρείται σταθερή σύμφωνα με τον Κριμπά (Σταύρακας, 2010). Ενώ ως συμπληρωματικά κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν το σχήμα και το χρώμα των ραγών καθώς και οι χαρακτήρες του φύλλου πως το σχήμα, το μέγεθος του ελάσματος, ο χνοασμός. Επίσης σημαντική προσφορά είναι και αυτή του Λογοθέτη (1961), καθώς το 1961 πρότεινε για τις ελληνικές συνθήκες την ταξινόμηση με βάση την εποχή ωρίμανσης των σταφυλιών και σε σύγκριση με την εποχή ωρίμανσης των σταφυλιών της ποικιλίας *Chasselas dore*, με τα χρονικά όρια διαχωρισμού των εποχών να είναι 12-15 μέρες. Σύμφωνα με αυτό το σύστημα τα σταφύλια κατατάσσονται ως:

- Πολύ πρώιμα
- Πρώιμα
- Ενδιάμεσης εποχής ωρίμανσης (I εποχή) *Chasselas dore*
- Μέσης εποχής ωρίμανσης (II εποχή)

- Μέσης-ημιοψίμου εποχής ωρίμανσης (III εποχή)
- Ημιοψίμου εποχής ωρίμανσης (IV εποχή)
- Όψιμα

Αμπελογραφικές περιγραφές των ελληνικών ποικιλιών της αμπέλου έχει πραγματοποιήσει επίσης ο καθηγητής Νταβίδης το 1956 και 1975, παρουσιάζοντας αυτές στα αντίστοιχα βιβλία “Επιτραπέζια σταφυλαί και Στοιχεία Αμπελογραφίας”, καθώς και ο καθηγητής Βλάχος το 1986 στο βιβλίο “Αμπελογραφία” (Σταύρακας, 2010), ενώ αναφορές σε ελληνικές ποικιλίες αμπέλου με αρκετά αμπελογραφικά, σταφυλολογικά και οινολογικά στοιχεία περιέχονται στις αμπελογραφικές μελέτες των Molon το 1906, του Guillon το 1895, του Pulliat το 1897 και των Viala και Vermorel από το 1902 έως 1910 (Σταύρακας 2010).

2.4 Κώδικας Αμπελογραφικής Περιγραφής

Για το καλό της Αμπελογραφίας διαπιστώθηκε αρκετά νωρίς η ανάγκη δημιουργίας ενός κοινά αποδεκτού και σαφώς καθορισμένου συστήματος αμπελογραφικής περιγραφής, βασιζόμενο στην περιγραφή συγκεκριμένων αμπελογραφικών χαρακτήρων των οργάνων της αμπέλου καθώς και βαθμονόμησης αυτών μέσα από συγκεκριμένη ορολογία που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένους αριθμούς. Καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο δυνατή τη ψηφιοποίηση των αμπελογραφικών περιγραφών των επιμέρους χαρακτήρων και τη χρήση κατάλληλου λογισμικού για την επεξεργασία τους. Με τους συνολικά 13 αμπελογραφικούς χαρακτήρες των οργάνων της αμπέλου που περιγράφονται και οι οποίοι είναι η κορυφή νεαρού βλαστού μήκους 10=20cm ή εκβλάστημα, ο ποώδης-νεαρός βλαστός, τα νέα φύλλα της κορυφής, τα νέα φύλλα της βάσης, το τυπικό αναπτυγμένο φύλλο, το άνθος, οι έλικες, η σταφυλή, η ράγα, το γίγαρτο, η κλιματίδα, ο κορμός και η ρίζα ηλικίας ενός έτους (Σταύρακας, 2010), να διακρίνονται σε:

- ποιοτικούς, οι οποίοι εκφράζονται πάντα με συγκεκριμένες τιμές της κλίμακας
- ποσοτικούς, που μπορούν να μετρηθούν και παίρνουν τιμές από 1-9. Με τις τιμές 1-3 να αντιπροσωπεύουν τη χαμηλή ένταση έκφρασης του χαρακτήρα και οι αριθμοί 7-9 την ισχυρή έκφραση
- εναλλακτικούς, που επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ παρουσίας ή απουσίας του χαρακτήρα και παίρνουν τις τιμές 9 και 1 αντίστοιχα.

Προς αυτή την κατεύθυνση κινήθηκαν η Διεθνής Ένωση για την Προστασία των Φυτικών Δημιουργιών ή U.P.O.V- International Union for the Protection of New Varieties of plant, το

Διεθνές Γραφείο Αμπέλου και Οίνου ή O.I.V- Office International de la Vigne et du Vin και η Διεθνής Επιτροπή για τις Γενετικές Πηγές των φυτών ή I.B.P.G.R- International Board for Plant Genetic Recouerces, όπου υιοθέτησαν έναν κοινό Κώδικα Αμπελογραφικής Περιγραφής των ειδών και ποικιλιών της αμπέλου για την ταυτοποίηση, τη διάκριση και την ταξινόμηση τους (Σταυρακάκης 2010).

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, για κάθε αμπελογραφική περιγραφή μιας ποικιλίας να απαιτείται, σύμφωνα με την κωδικοποίηση του O.I.V, η βαθμολόγηση των χαρακτηριστικών που παρουσιάζονται στο Παράρτημα II.

Ενώ η Διεθνή Αμπελογραφική Επιτροπή έχει προτείνει για να είναι ολοκληρωμένη μια αμπελογραφική μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής (Σταύρακας, 2010):

1. Το όνομα της ποικιλίας
2. Τα συνώνυμα
3. Την προέλευση και τη διάδοση
4. Την αμπελογραφική περιγραφή των 13 χαρακτήρων που αναφέρθηκαν προηγουμένως
5. Τις φαινολογικές παρατηρήσεις:
 - Εκβλάστηση, ημερομηνία κατά την οποία εκβλαστάνει το 50% περίπου των οφθαλμών
 - Άνθηση, αρχή-πλήρης-τέλος
 - Έναρξη ωρίμανσης- περκασμός
 - Ωρίμανση, ημερομηνία τεχνολογικής ωριμότητας ή ωρίμανσης σκοπιμότητας, κατά την οποία οι σταφυλές αποκτούν τους καλύτερους δυνατούς χαρακτήρες για δεδομένη χρήση
 - Φυλλόπτωση
6. Τις καλλιεργητικές ιδιότητες:
 - Ζωηρότητα
 - Παραγωγικότητα, αριθμός και θέση σταφυλών ανά καρποφόρο βλαστό, στρεμματική απόδοση σε διάφορα σχήματα και διαφορετικό οικολογικό περιβάλλον
 - Διαμόρφωση
 - Κλάδεμα καρποφορίας
 - Εδάφη στα οποία προσαρμόζεται η ποικιλία
 - Γονιμότητα των ταχυφυών

- Συγγένεια, εμβολισμού και στον αμπελώνα με τα υποκείμενα της αμπέλου
7. Την αντοχή στους εχθρούς, τις ασθένειες και τις διάφορες αντίξοες συνθήκες
 8. Τον προορισμό χρήσης, οινοποίηση,νωπή κατανάλωση, για παραγωγή χυμών, για κονσερβοποίηση
 9. Την οικονομική σημασία της ποικιλίας.

2.5 Μειονεκτήματα της μεθόδου-Περιορισμοί

Η ταυτοποίηση της αμπέλου που πραγματοποιείται με την παραδοσιακή αμπελογραφική περιγραφή, βασιζόμενη στην περιγραφή των αμπελογραφικών χαρακτήρων όπως των φύλλων, της νεαρής κορφής, της σταφυλής παρουσιάζει σημαντικές δυσχέρειες και περιορισμούς. Με τους περιορισμούς που προκύπτουν ως προς την αξιοπιστία της μεθόδου να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως τον κατάλληλο χρόνο παρατήρησης, την επιλογή του κατάλληλου οργάνου ή τμήμα του, την υγεία του πρέμνου, την εμπειρία του αμπελογράφου καθώς και στο μικρό αριθμό των ειδικών αμπελογράφων που υπάρχουν (This et al., 2004). Η έκφραση των παραπάνω αμπελογραφικών χαρακτηριστικών επηρεάζονται επίσης τόσο από την άμεση ή έμμεση επίδραση του ανθρώπου όσο και από αυτή του περιβάλλοντος, οδηγώντας στη διαφοροποίηση και τη μεταβλητότητα τους (Σταύρακας, 2010), καθιστώντας αυτά λιγότερα χρήσιμα για την ταξινόμηση στενά συγγενών ποικιλιών (Aradhya, 2002). Η χρήση των κληματίδων ως εμπορεύσιμο πολλαπλασιαστικό υλικό και ο απαιτούμενος χρόνος των 4-5 ετών που απαιτούνται για να εμφανιστούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ενήλικων πρέμνων, περιορίζει την ταυτοποίηση τους (This et al., 2004) καθώς επίσης και η ταυτοποίηση των υποκειμένων με τη μέθοδο αυτή είναι αδύνατη, εφόσον δεν αναπτύσσονται ποτέ τα φύλλα ή άλλα αμπελογραφικά χαρακτηριστικά (Κωνσταντίνου, 2010). Η προϋπόθεση των ώριμων και καλά αναπτυγμένων φύλλων που απαιτείται για την μορφολογική αξιολόγηση, καθιστά δύσκολη την εφαρμογή της μεθόδου καθ' όλη την διάρκεια του έτους, περιορίζοντας τη μόνο κατά την βλαστική περίοδο (Κωνσταντίνου, 2010), αλλά και ο μεγάλος αριθμός των 24.000 ονομάτων και συνωνύμων που πιθανολογείται ότι ανήκουν σε περισσότερες από 9.000 ποικιλίες της οινοφόρου αμπέλου, καθιστούν το έργο της ταυτοποίησης με τη μέθοδο αυτή εξαιρετικά δυσχερές αν όχι εντελώς αδύνατο (Σταυρακάκης,2010).

3 Βιοχημικές Μέθοδοι

Οι βιοχημικές μέθοδοι έκαναν την εμφάνισή τους τη δεκαετία του 1970, βρίσκοντας εφαρμογή στον διαχωρισμό των φλαβονοειδών και καροτινοειδών με τη βοήθεια της χρωματογραφίας και της ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών (Σταύρακας, 2010).

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης βασίστηκε στην ανίχνευση του ενζυμικού πολυμορφισμού των πρωτεϊνών, ο οποίος δίνει τη γενετική σύσταση του φυτού, προερχόμενος από φυτικούς ιστούς των φύλλων ή της γύρης (Σταύρακας, 2010). Με τις φαινοτυπικές διαφορές ή ομοιότητες που παρατηρούνται, να οφείλονται σε ανάλογη διαφορετικότητα που υπάρχει στο γενετικό υλικό και όχι στην επίδραση από το περιβάλλον (Νικολάου, 2012), με την αλληλουχία νουκλεοτιδίων και τη τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών να είναι πιο σταθερές, καθώς είναι προϊόντα των γονιδίων. Έτσι με τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών στις ισοενζυμικές τους μορφές, μπορεί να πραγματοποιηθεί γενετική σήμανση, διάκριση και ταυτοποίηση αρκετών ειδών φυτών καθώς και αυτών της αμπέλου, λόγω του πολυμορφισμού που εμφανίζουν μερικές από τις πρωτεΐνες των φυτών (Sefc et al, 2001). Με τα ισοένζυμα να αποτελούν τους βιοχημικούς δείκτες (Τσαυτάρης et al., 2012) και με λίγο περισσότερους από 20 πολυμορφισμούς ισοενζύμων να έχουν εντοπιστεί σε φυτά της αμπέλου (Reisch, 1998).

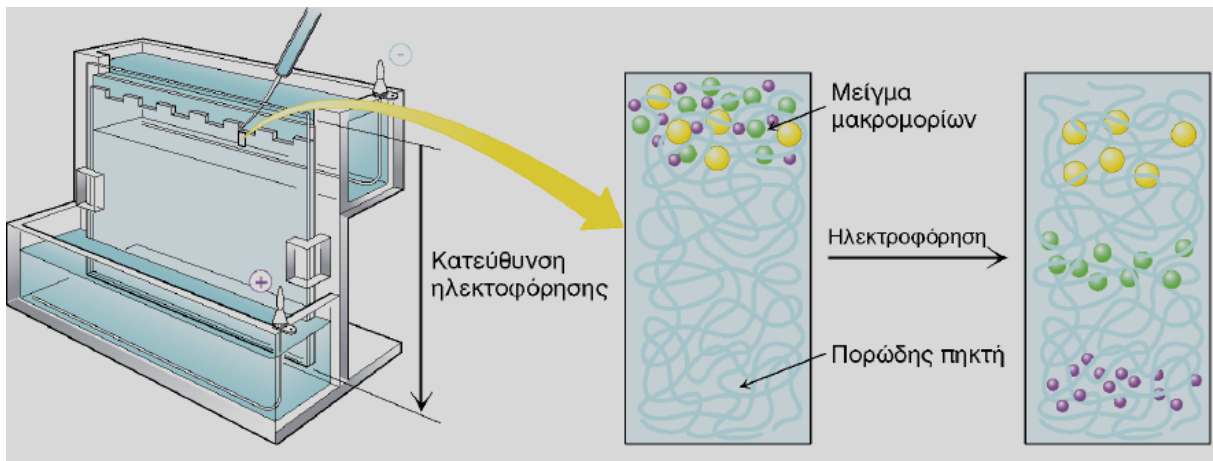
3.1 Αρχή της μεθόδου-Ισοένζυμα

Η μέθοδος βασίζεται στο ότι τα ισοένζυμα είναι δομικές παραλλαγές ενός ενζύμου που ενώ διαφέρουν στη σύστασή τους σε αμινοξέα με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικές ιδιότητες όπως μοριακό βάρος ή μετακίνηση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, έχουν την ίδια καταλυτική δραστηριότητα (Τσαυτάρης et al, 2012). Τα ισοένζυμα μπορούν να διαχωριστούν μέσω ηλεκτροφόρησης ή ισοηλεκτρικής εστίασης (Magdeldin, 2012). Η ισοενζυμική ανάλυση διαχωρίζει σε ηλεκτροφόρηση τις διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που κωδικοποιούνται τόσο από αλληλόμορφα γονίδια όσο και από μη αλληλόμορφα γονίδια. Έτσι άτομα ενός πληθυσμού που φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα που κωδικοποιούν ένα ενζυμικό σύστημα, θα παράγουν πολυπεπίδια με διαφορές στη σύστασή τους σε αμινοξέα και οι διαφορές αυτές θα είναι ανιχνεύσιμες στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο σαν διαφορετικές ζώνες που μεταναστεύει κάθε ένζυμο (Τσαυτάρης et al., 2012).

3.2 Ισοηλεκτρική εστίαση-Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Το ηλεκτρικό φορτίο των πρωτεϊνών καθορίζεται από την αναλογία των όξινων και αλκαλικών μοριακών μερών και από τον ρυθμό διάσπασης τους, με τον ρυθμό διάσπασης να καθορίζεται από το pH του περιβάλλοντος του μορίου. Με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης να είναι το pH στο οποίο το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν (Magdeldin, 2012).

Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιείται με την μετακίνηση των πρωτεϊνών υπό τάση, μετακινούμενες μέσα σε ένα λεπτό πήκτωμα από πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης -το οποίο έχει διαβαθμιζόμενη τιμή pH - μέχρις ότου η τιμή του pH γίνει ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (Magdeldin, 2012).



Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Πηγή: Berg et al. 2011)

3.3 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα της μεθόδου

Η μέθοδος των ισοενζύμων φαίνεται να είναι χρήσιμο εργαλείο για την διάκριση μεταξύ των ποικιλιών καθώς τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν άμεσα τον γονότυπο, είναι ανεξάρτητα από το περιβάλλον και η εξαγωγή των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σχεδόν από κάθε φυτικό ιστό (Soylemezoglu et al, 1998). Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία στην περίπτωση διάκρισης στενά συγγενικών ποικιλιών, προερχόμενες από διασταύρωση, αλλά δεν είναι σε θέση να διαφοροποιήσει μεταλλαγμένα ή προερχόμενα φυτά μη αμφιγονικής αναπαραγωγής (Soylemezoglu et al, 1998). Επίσης η χρήση των ισοενζύμων σαν δείκτες είναι περιορισμένη κυρίως επειδή και ο αριθμός των ισοενζυμικών συστημάτων που μπορεί να διακρίνουμε στα φυτά είναι μικρός και περιορίζεται από τον αριθμό των ενζύμων που μπορεί να βαφούν για αναγνώριση σε πηχτή αμύλου ή ακρυλαμίδης (Τσαυτάρης et al., 2012). Επιπλέον οι

πρωτεΐνες επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και περιβαλλοντικές συνθήκες (Μπινιάρη, 2000), ενώ η εκχύλιση των ενζύμων δημιουργήσε τα δικά της προβλήματα καθώς απαιτεί για καλύτερα αποτελέσματα μόνο φρέσκους και νεαρούς ιστούς φύλλων (Soylemezoglu et al, 1998). Ενώ σε πολλές περιπτώσεις η πλήρη σύμπτωση των ισοενζυμικών ζωνών μεταξύ δύο ποικιλιών δεν σημαίνει ότι υπάρχει πάντοτε απουσία γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ τους, αλλά απλά δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί (Μπινιάρη, 2000).

3.4 Εφαρμογή της μεθόδου των ισοενζύμων

Ο Wolfe το 1976 προσδιόρισε 60 οινοποιήσιμες και επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου με ηλεκτροφόρηση, αναλύοντας τα ένζυμα αμινοπεπτιδάσης της λευκίνης, οξειδάσης ινδοφαινόλης, όξινης φωσφατάσης, κατεχολικής οξειδάσης, αλκοολικής αφυδρογονάσης, εστεράσης και υπεροξειδάσης, με τα τέσσερα πρώτα ένζυμα να βρέθηκαν τα πιο χρήσιμα για την διάκριση των ποικιλιών (Wolfe, 1976).

Στο χρονικό διάστημα από το 1980 έως το 1989 πραγματοποιήθηκαν πολλές εφαρμογές της μεθόδου με κυριότερες αυτές του Samaan και Wallace που πραγματοποίησαν ορολογικές αναλύσεις πρωτεϊνών γύρης σε πέντε ποικιλίες της αμπέλου (Samaan & Wallace, 1981), του Schwennesen όπου προσπάθησε να διακρίνει μεταξύ τους την ποικιλία σταφυλιού Superior Seedless και ενός κλώνου της, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως τα ισοένζυμα της κατεχολικής οξειδάσης και της εστεράσης από το σύνολο 12 ενζύμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό τους (Schwennesen, 1981). Ο Wolfe πραγματοποίησε με τη χρήση των ραγών, διάκριση μεταξύ των ποικιλιών Perlette, Thompson Seedless και της ποικιλίας πρώιμης ωρίμανσης χωρίς σπόρους Superior Seedless (Schwennesen et al, 1982). Επίσης μελετήθηκαν 27 καλλιεργούμενες και άγριες μορφές από τέσσερα είδη *Vitis*, με τη βοήθεια 12 πολυμορφικών ισοενζυμικών συστημάτων, κάνοντας χρήση εκχυλισμάτων που προέρχονται από ξυλώδη ιστό και ενός πρωτοκόλλου για την αποφυγή αδρανοποίησης των ισοενζύμων από πολυφαινολικά και άλλα υλικά, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι 27 από τα 29 στελέχη εμφάνισαν μοναδικά σχέδια ζωνών για τα ισοένζυμα γλυκόζη - 6 - φωσφορική ισομεράση, φωσφορικής πεπτιδάσης και όξινης φωσφατάσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση αγνώστων δειγμάτων αμπέλου (Subden et al, 1987). Ενώ απομονώθηκαν από το φλοιώμα 71 ειδών και ποικιλιών *Vitis* ισοένζυμα, τα οποία διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης. Οι υπεροξειδάσες (EC) παρουσίασαν ένα μοτίβο που

μπόρεσε να διαφοροποιηθεί σε παραπάνω από 8 ζώνες εντός του εύρους pH 6-11 (Bachmann και Blaich, 1988). Τα Αμερικάνικα και Ασιατικά άγρια είδη παρουσίασαν μια ελαφρά μετατόπιση του ισοηλεκτρικού σημείου μιας ζώνης ενζύμων σε σύγκριση με τις ποικιλίες *Vitis vinifera* (Bachmann & Blaich, 1988). Καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε και η γενετική ανάλυση 11 πολυμορφισμών ισοενζύμων στους απογόνους της διασταύρωσης των δυο υβριδίων της αμπέλου Cayuga White X Aurore (Weeden et al, 1988). Καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχει επαρκής πολυμορφισμός στο αμπέλι και ότι η γενετική ανάλυση μπορεί να επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας υπάρχοντες απογόνους ή απογόνους που παράγονται εύκολα από εξαιρετικά ετερόζυγους κλώνους (Weeden et al, 1988). Σημαντικό γεγονός ήταν επίσης η παρουσίαση μιας πρακτικής και φθηνής διαδικασίας που επιτρέπει την ταχεία εκχύλιση και την ανάλυση μιας μεγάλης σειράς 40 ενζύμων, από τα οποία τα 14 ήταν σταθερά αναλύσιμα και έδειξαν διακύμανση μεταξύ των ποικιλιών σε τρία ρυθμιστικά συστήματα γέλης – ηλεκροδίου (Walters et al, 1989). Ενώ με τον διαχωρισμό των ισοενζύμων της ισομεράσης της φωσφορικής γλυκόζης και της φωσφογλυκομουτάσης από εκχυλίσματα φύλλων, μπόρεσαν να διακριθούν 19 ποικιλίες της αμπέλου ηλεκτροφορητικά (Calo et al, 1989). Επίσης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση γέλης αμύλου η ταυτοποίηση των υβριδίων μεταξύ *Vitis vinifera* X *Muscadinia rotundifolia* (Chararro et al, 1989). Στην Ισπανία ταυτοποιήθηκαν 6 κλώνοι της ποικιλίας Garnacha, με τη χρήση του ισοενζυμικού συστήματος της υπεροξειδάσης (PER) ενώ το ισοενζυμικό σύστημα της φωσφατάσης (ACE) δεν διαχώρισε τα στελέχη που μελετήθηκαν (Royo et al, 1989). Στην Πορτογαλία με την ανάλυση των τριών ενζύμων όξινης φωσφατάσης, α-εστεράσης και γλουταμικής οξαλικής τρανσαμινάσης παρουσίασαν μικρές ισοενζυμικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών που αναλύθηκαν, χωρίς να προκύψουν ενδοκλωνικές διαφορές (Eiras-Dias et al. 1989). Επίσης διαχωρίστηκαν σε 52 ομάδες 145 ισοένζυμα, προερχόμενα από τα φύλλα, μέσω ηλεκτρόλησης σε πηχτή αμύλου, χρησιμοποιώντας τα ισοένζυμα της γλυκοζοφωσφορικής ισομεράσης (GPI) και της φωσφογλυκομουτάσης (PGM), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι 24 ποικιλίες είχαν μοναδικούς συνδυασμούς μοτίβων των παραπάνω ισοενζύμων (Parfitt και Arulsekhar, 1989)

Ολόκληρη τη δεκαετία του 1990 συνεχίστηκε η εφαρμογή της μεθόδου και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ισοηλεκτρικής εστίασης για την ισοενζυμική ανάλυση της όξινης φωσφατάσης (ACPH) της ισομεράσης της φωσφορικής γλυκόζης (GPI) και της φωσφογλυκομουτάσης (PGM), με σκοπό την αποκάλυψη των διαφορών των ισοενζυμικών προτύπων που υπάρχουν μεταξύ μητρικών φυτών και των κλωνικά πολλαπλασιαζόμενων με

ιστοκαλλιέργεια φυτών των ποικιλιών της αμπέλου Barbara, Queen, Dolcetto και Delight (Botta et al, 1990). Ενώ στην Ιταλία με την βοήθεια των ισοενζυμικών συστημάτων ισομεράσης της φωσφορικής γλυκόζης (GPI) και της φωσφογλυκομουτάσης (PGM) αποδείχθηκε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ του παραδοσιακού τύπου Cabernet franc που καλλιεργείται στην Γαλλία και του τύπου Cabernet franc που καλλιεργείται στην περιοχή Veneto στην Ιταλία, πιθανολογώντας ο τύπος αυτός να είναι Carmenere (Calo et al, 1990). Επίσης 22 ποικιλίες της αμπέλου και 4 υποκείμενα ταυτοποιήθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμιδικού 7 ισοενζυμικών συστημάτων, που περιλάμβαναν την όξινη φωσφατάση (ACPH), εστεράση (EST), κατεχολική οξειδάση (CO), γλουταμική οξαλική τρανσαμινάση (GOT), γλυκοσφορική ισομεράση (GPI), υπεροξειδάση (PER) και μηλική αφυδρογονάση (MDH). Καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα συστήματα ACPH, CO, EST MDH και PER να είναι τα καταλληλότερα για τον χαρακτηρισμό των ποικιλιών (Altube et al, 1991). Στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνιας πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση μέσω του ισοενζύμου της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AAT) δυο φυτών του υποκειμένου Teleki 5C όπου λανθασμένα είχαν αποδοθεί στο υποκείμενο SO4 μέσω αμπελογραφικής περιγραφής, καθώς είχαν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά (Walker & Boursiquot, 1992). Στον Καναδά χρησιμοποιήθηκαν τα ισοένζυμα της όξινης φωσφατάσης, της γλυκόζη-6- φωσφορικής ισομεράσης καθώς και της πεπτιδάσης ως βάση σύγκρισης για να μετρηθεί η γενετική σταθερότητα 14 κλώνων της ποικιλίας Chardonnay, του υβριδίου Blanc Seyval καθώς και ενός αυτόχθονου είδους *Vitis riparia* σε μια έκταση 1000 km (Subden et al, 1992). Ενώ στην Ιαπωνία μέσω των ισοενζυμικών συστημάτων της ισομεράσης της φωσφορικής γλυκόζης (GPI) και φωσφογλυκομουτάσης (PGM) διερευνήθηκε η προέλευση των ποικιλιών της αμπέλου Hiro Hamburg, Pione, Kosshu Sanjaku και Cannon Hall Muscat (Ohmi et al, 1992). Μελετήθηκε επίσης μέσω ισοενζυμικών συστημάτων η ομοιότητα μεταξύ των ποικιλιών Norton και Cynthiana, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι δυο ποικιλίες μπορεί να προέρχονται από τον ίδιο κλώνο (Bruce et al, 1993). Ενώ πραγματοποιήθηκε και μελέτη με θέμα την ανάλυση του ισοενζύμου της υπεροξειδάσης μέσω ισοηλεκτρικής εστίασης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 313 διαφορετικών ποικιλιών και ειδών της αμπέλου, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το πολυμορφικό ισοένζυμο της υπεροξειδάσης επαρκεί για την ομαδοποίηση των ποικιλιών και τη διάκριση μεταξύ δυο δειγμάτων (Bachmann, 1994). Την ίδια περίοδο χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα ζωνών των ισοενζύμων της ισομεράσης της φωσφορικής γλυκόζης (GPI) και φωσφογλυκομουτάσης (PGM), αναλύοντας 99 διπλοειδή ποικιλίες, 20 διπλοειδή φυτά από 8 άγρια είδη αμπέλου καθώς και φυτά προερχόμενα από την

μεταξύ τους διασταύρωση, αποσκοπώντας στην ανίχνευση της υβριδικής προέλευσης των φυτών της αμπέλου κατά την τριπλοειδή διασταύρωση τους (Shiraishi et al, 1994).

Στα μέσα της δεκαετίας χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση γέλης αμύλου για την παραγωγή μοτίβων ισοενζύμων, μέσω των οποίων πραγματοποιήθηκε η διάκριση 60 υποκειμένων της αμπέλου που υπήρχαν στη συλλογή του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια (Walker & Liu, 1995), ενώ την Ισπανία αξιολογήθηκαν για την ταυτοποίηση ποικιλιών και κλώνων φυτών της αμπέλου τα ισοενζυμικά συστήματα εστεράσης και κατεχολικής οξειδάσης, καταλήγοντας στο αποτέλεσμα ότι τα συστήματα ισοενζύμων που μελετήθηκαν έδωσαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών αλλά όχι και μεταξύ των κλώνων (Royo et al, 1997).

Ενώ προς το τέλος της δεκαετίας στην Κίνα με τη βοήθεια του ισοενζύμου της υπεροξειδάσης (PER), μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης πολυακρυλαμίδιου ταξινομήθηκαν 76 κλώνοι από 12 άγρια είδη και εγχώριες ποικιλίες (Zhisheng & Puchao, 1998). Την ίδια περίοδο στην Ισπανία ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια των ισοενζυμικών συστημάτων της υπεροξειδάσης (PER), κατεχολικής οξειδάσης (CO), γλουταμικής οξαλικής τρανσαμινάσης (GOT), υπεροξειδίου δισμουτάσης (SOD), εστεράσης (EST) και όξινης φωσφατάσης (ACP) μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης πολυακρυλαμίδιου 43 ποικιλίες επιτραπέζιων σταφυλιών (Sanchez-Escribano et al, 1998). Επίσης στην Ισπανία μελετήθηκαν 10 ισοενζυμικά συστήματα για να εξακριβωθεί η γενετική ομοιογένεια της ποικιλίας Albarino – *Vitis vinifera* L. που παρουσίαζαν 24 φυτά (Vidal et al, 1998). Ενώ 20 ποικιλίες της αμπέλου συμπεριλαμβανομένων των Moscato d'Amburgo, Italia, Sultanina, Bicante διαχωρίστηκαν το 1999 σε 9 ομάδες μέσω των ισοενζυμικών συστημάτων της γλυκοσφορικής ισομεράσης (GPI) και φωσφογλυκομουτάσης (PGM) (Crespan et al, 1999).

Το χρονικό διάστημα από το 2000 έως τις μέρες μας διαπιστώνεται μια μείωση στη χρήση της μεθόδου, καθώς έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι ταυτοποίησης για την άμπελο. Παρόλα αυτά το 2001 με την ανάλυση των ισοενζυμικών συστημάτων της ισομεράσης της φωσφορικής γλυκόζης (GPI) και φωσφογλυκομουτάσης (PGM), 64 περιπτώσεις συνώνυμων και ομώνυμων ονομασιών ποικιλιών που ανήκαν στην οικογένεια των Μοσχάτων ταυτοποιήθηκαν (Crespan & Milani, 2001). Στην Ουγγαρία μέσω της χρήσης της ισοηλεκτρικής εστίασης προσδιορίστηκαν διάφορα είδη και ποικιλίες της αμπέλου, βασιζόμενη στη σύγκριση προτύπων ισοενζύμων της εστεράσης και υπεροξειδάσης (Stefanovits-Banyai et al, 2002), καθώς επίσης στην ίδια χώρα και στην προσπάθεια να ταυτοποιηθούν δυο παλιές Ουγγρικές ποικιλίες και τα υβρίδια τους, χρησιμοποιήθηκαν τα 5

ισοενζυμικά συστήματα υπεροξειδίου δισμουτάσης (SOD), μηλικής αφυδρογονάσης (MDH), κατεχολικής οξειδάσης (CO), υπεροξειδάσης (PER) και διαφωράσης (DIA), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το ισοενζυμικό σύστημα της κατεχολικής οξειδάσης είναι το καταλληλότερο για ταυτοποίηση των παραπάνω ποικιλιών και υβριδίων (Hajos-Novak & Hajdu, 2003). Στη γενετική τράπεζα της Alcala de Henares στη Μαδρίτη εκτός από την αμπελογραφική περιγραφή και τη μοριακή μέθοδο των μικροδορυφόρων χρησιμοποιήθηκαν τα ισοενζυμικά συστήματα όξινης φωσφατάσης, κατεχολικής οξειδάσης, γλουταμινικής οξαλικής τρανσαμινάσης και υπεροξειδίου δισμουτάσης για την διάκριση σε επίπεδο ποικιλίας 621 φυτών (Ortiz et al, 2004). Ενώ στη Βραζιλία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης για να προσδιοριστεί η σχέση μεταξύ των τεσσάρων έγχρωμων ποικιλιών Italia, Rubi, Benitaka, Brasil που παραδοσιακά καλλιεργούνται στην περιοχή της Marialva, όπου και διαπιστώθηκε επίσης πως δεν παρουσιάζουν καμία αλληλική παραλλαγή τα ισοενζυμικά συστήματα εστεράσης (EST), μηλικής αφυδρογονάσης (MDH), υπεροξειδάσης (POD), γλουταμική αφυδρογονάση (GTDH), αλκαλικής φωσφατάσης (AKP), όξινης φωσφατάσης (ACP) και ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AAT), ενώ φαίνεται ότι είναι κλώνοι της ίδιας ποικιλίας (Collet et al, 2005). Με τη βοήθεια των ισοενζυμικών συστημάτων της κατεχολικής οξειδάσης (CO) και όξινης φωσφατάσης (ACP) ταυτοποιήθηκαν ως διαφορετικές οι ποικιλίες Kéknyelű και Picolit, παρότι στον Διεθνή Κατάλογο της Αμπέλου στον ιστότοπο <http://www.Genes.De/idb/vitis/> παρουσιάζονται ως συνώνυμες (Jahnke, 2006). Επίσης πραγματοποιήθηκε μελέτη στην Κορέα η οποία μέσω ισοενζυμικών αναλύσεων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ποικιλία της αμπέλου Gaeryangmeoru (*Vitis sp.*) προέρχεται από διασταύρωση μεταξύ ειδών Ευρωπαϊκής και Αμερικάνικης Υβριδικής Ομάδας ή των μεταξύ τους υβριδίων και όχι μεταξύ της διασταύρωσης των *V. flexuosa* και της ποικιλίας Concord, που μέχρι εκείνη τη στιγμή πίστευαν ότι προερχόταν (Young-Sik Park et al, 2007). Επίσης πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας 40 από 48 ποικιλιών της αμπέλου μέσω βιοχημικών δεικτών, αναλύοντας τα 4 ισοενζυμικά συστήματα κατεχολικής οξειδάσης (CO), γλουταμικό οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT), όξινη φωσφατάση (ACP) και υπεροξειδάση (PER) με ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμίδιου (Jahnke et al, 2009), ενώ στη Βραζιλία χρησιμοποιήθηκαν τα ισοενζυμικά συστήματα της α- και β- εστεράσης σε γέλη πολυακρυλαμίδιου για την ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας αμερικάνικων ειδών *Vitis labrrouseca* και υβριδικών ποικιλιών της αμπέλου (Orasmo et al, 2010). Ενώ τελευταία πραγματοποιήθηκε στην Νοτιοανατολική Τουρκία ισοενζυμική ανάλυση της όξινης φωσφατάσης (ACP), κατεχολικής οξειδάσης (CO), γλουταμικής οξαλοξικής τρανσαμινάσης (GOT) , μηλικής αφυδρογονάσης (MDH) και υπεροξειδάσης

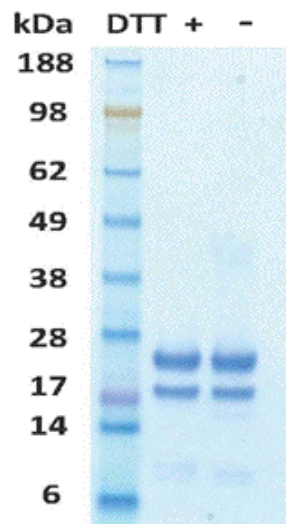
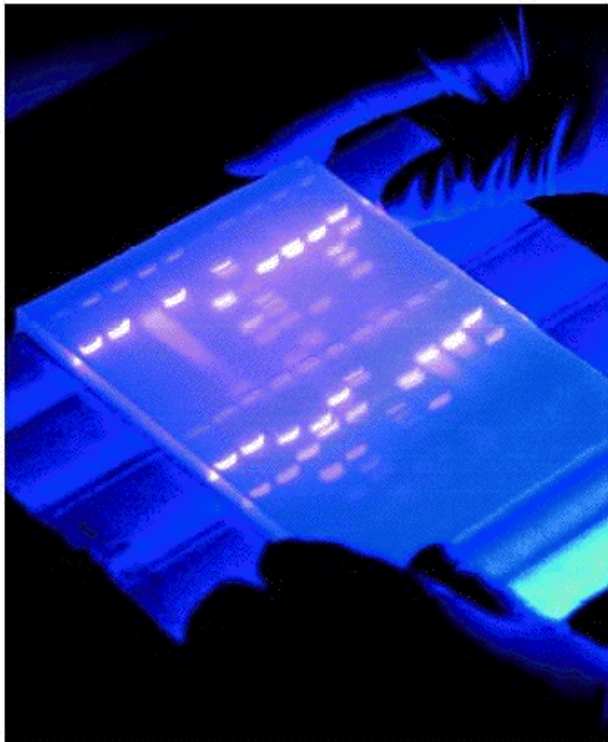
(PER), σε 114 άγρια φυτά της αμπέλου, που τα αποκαλούν Jackal grapes μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης πολυακρυλαμιδίου (Soylemezoglu et al, 2014).

4 Νέες Τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει πολυάριθμες ανακαλύψεις και δημιουργηθεί νέες τεχνικές στη Μοριακή Βιολογία, οι οποίες έχουν άμεση σχέση με τον χειρισμό των νουκλεϊκών οξέων όπως η απομόνωση τους, η κατεργασία τους με ένζυμα, η ηλεκτροφόρηση τους, η μεταφορά σε μεμβράνη και ο υβριδισμός τους. Με τη σειρά τους έδωσαν ώθηση για δημιουργία νεότερων τεχνικών μοριακής ανάλυσης των οργανισμών όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και η αλληλούχιση, βρίσκοντας εφαρμογή στη γενετική ανάλυση και την γενετική ταυτοποίηση φυτών (Τσαυτάρης et al., 2012).

4.1 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι η πιο διαδεδομένη, απλή και αξιόπιστη τεχνική για την ανάλυση του DNA, βασισμένη στο γεγονός ότι σε αλκαλικό pH οι φωσφορικές ομάδες του DNA ιονίζονται, με αποτέλεσμα τα μόρια που τοποθετούνται στο πεδίο της ηλεκτροφόρησης να μετακινούνται προς την άνοδο. Σε ένα πήκτωμα από gel αγαρόζης, η ευκινησία των μορίων εξαρτάται από το μέγεθος και τη διαμόρφωση τους. Συγκεκριμένα τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα προς την άνοδο, τα κυκλικά μόρια είναι λιγότερο ευκίνητα σε σχέση με τα ίδιου μεγέθους γραμμικά. Το μέγεθος του γραμμικού DNA μπορεί να υπολογιστεί από την απόσταση που διανύουν τα μόρια, μέσω της αντίστροφης σχέσης μεταξύ της κινητικότητας του μορίου και του λογαρίθμου του μοριακού βάρους, ενώ τα διάφορα μόρια που διαχωρίζονται με την ηλεκτροφόρηση μπορούν να παρατηρηθούν μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο καθώς αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (Νεραντζής et al., 2015).



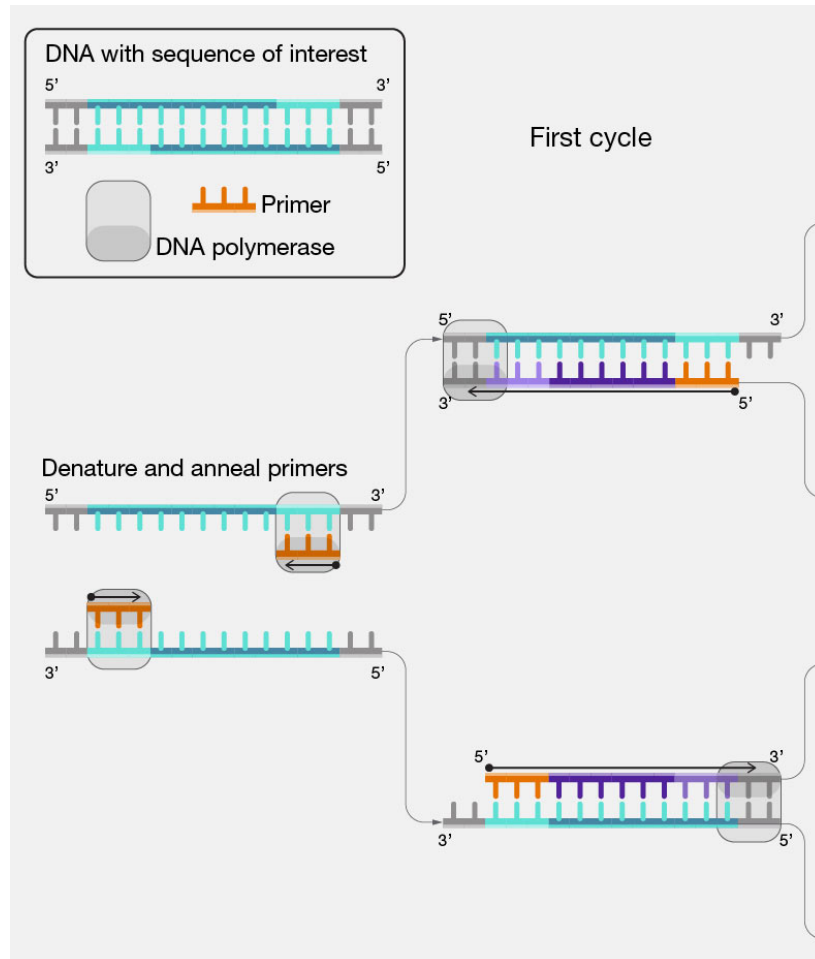
Εικόνα 4.1 : Φθορισμός με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου και χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας
Πηγή: <https://comis.med.uvm.edu>

4.2 Τεχνική της Αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης- PCR

Η τεχνική αυτή επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό ενός κομματιού DNA με τη χρήση του ενζύμου της πολυμεράσης, δίνοντας την δυνατότητα από μερικά αρχικά μόρια DNA να παραχθούν εκατομμύρια αντίγραφα του, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθος του με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης. Η τεχνική αυτή βασίζεται σε μια ενζυμική αντίδραση για τη σύνθεση του DNA η οποία χρειάζεται νουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (primers), ένα ένζυμο (Taq πολυμεράση) και μια μήτρα DNA (Νεραντζής et al., 2015).

Στην απλούστερη μορφή της χρησιμοποιείται ένα ένζυμο πολυμερισμού του DNA (πολυμεράση) το οποίο διαθέτει την ικανότητα να αναγνωρίζει έναν εκκινητή και να συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA, τοποθετώντας νουκλεοτίδια συμπληρωματικά της αρχικής αλυσίδας DNA. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA-στόχου όταν στα άκρα του υβριδίζουν δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία των άκρων στις αντίθετες αλυσίδες του στόχου. Με την ποσότητα του DNA-στόχου να πολλαπλασιάζεται εκθετικά με κάθε

επανάληψη της αντίδρασης, φτάνοντας από μερικά πικογραμμάρια σε μερικά μικρογραμμάρια μετά από 30-40 επαναλήψεις (Τσαυτάρης et al., 2012).



Εικόνα 4.2 Σχηματική παράσταση προσκόλλησης των εκκινήτων με τη βοήθεια της πολυμεράσης (Πηγή: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>)

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκυκλοποιητή, ένα ειδικό μηχάνημα που επιτυγχάνει ταχύτατη εναλλαγή θερμοκρασιών. Με κάθε μια αντίδραση να αποτελεί έναν κύκλο της PCR, ο οποίος περιλαμβάνει τα εξής 3 βασικά στάδια:

1. Της μετουσίωσης του DNA, όπου με θέρμανση περίπου στους 95 °C αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA και ξεχωρίζουν οι δυο αλυσίδες του

2. Τον υβριδισμό των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονές αλυσίδες του DNA σε μια χαμηλότερη θερμοκρασία γύρω στους 50-60 °C για να σχηματιστεί μια δομή διπλής έλικας όπου μπορεί η πολυμεράση να προσθέσει νουκλεοτίδια στο 3'ελεύθερο άκρο του εκκινητή
3. Την αντιγραφή της αλυσίδας με προσθήκη συμπληρωμένων νουκλεοτιδίων στους 72 °C, με τη χρήση μιας θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης

4.3 Αλληλούχιση

Με τον όρο αλληλούχιση εννοούμε τον καθορισμό της σειράς διαδοχής-αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στο DNA. Με την αλληλούχιση του γονιδιώματος της αμπέλου να ολοκληρώνεται το 2007 (Jaillon et al, 2007), δίνοντας μας το πλεονέκτημα να μπορούμε να προσδιορίσουμε όλες τις γενετικές διαφορές σημαντικών γονοτύπων και να αποδίδουμε διαφορές σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα αντίστοιχα γονίδια που τα ελέγχουν (Τσαυτάρης et al., 2012).

5 Μοριακές Μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται στην ανάλυση δεικτών που αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που ούτως ή άλλως εμφανίζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, με τους πολυμορφισμούς στις βάσεις του DNA να μην εξαρτώνται από τα αναπτυξιακά στάδια του φυτού (Χατζόπουλος, 2021). Παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό κατηγοριών ο οποίος οφείλεται στις διάφορες τεχνικές με τις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση αυτών των διαφορών καθώς και οι συνεχώς νέες τεχνικές επιτρέπουν την ανάπτυξη νέων δεικτών (Τσαυτάρης et al., 2012). Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους σύμφωνα με τους Agarwal et al., (2008) σε πολλά σημαντικά σημεία όπως στην απαιτούμενη ποσότητα γενετικού υλικού, στο επίπεδο του πολυμορφισμού που ανιχνεύεται, στην εξειδίκευση ως προς το γενετικό τόπο, στην επαναληψιμότητα, στα τεχνικά μέσα και φυσικά στο κόστος χρήσης.

5.1 Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA με μήκους λίγων νουκλεοτιδίων, με τον μικρότερο σε μέγεθος να αντιπροσωπεύεται από μια νουκλεοτιδική βάση, χωρίς την απαραίτητη και την άμεση επίδραση στο φαινότυπο, και ως εκ τούτου δεν

επηρεάζονται από το περιβάλλον (Χατζόπουλος, 2021). Η ανάπτυξης τους βασίζεται στις διαφορές που επικρατούν στην αλληλουχία του DNA μεταξύ αλληλόμορφων γονιδίων (Τσαυτάρης et al., 2012).

Ξεκίνησαν να αναπτύσσονται τη δεκαετία του 1980 και από τότε μια τεράστια ποικιλία δεικτών έχει επινοηθεί για τη διευκόλυνση της γενετικής ανάλυσης. Η παρουσία τους ή μη στο γονιδίωμα χρησιμεύει για τη διάκριση διαφορετικών ατόμων ή με άλλα λόγια διαφορετικών γενότυπων (Τσαυτάρης et al., 2012), αρκεί να ικανοποιούν τα περισσότερα από τα παρακάτω κριτήρια ώστε να αποδώσουν τη μέγιστη αποτελεσματικότητα (Χατζόπουλος, 2021):

- 1) Να παρουσιάζουν πολυμορφισμό
- 2) Να υπάρχει μια απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλόμορφους, όλοι άμεσα ταυτοποιήσιμοι
- 3) Να επικρατεί ένας υψηλός δείκτης κληρονομικότητας, έτσι ώστε η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του μοριακού δείκτη να είναι σταθερή κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που εμφανίζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων
- 4) Να υπάρχει διασπορά των μοριακών δεικτών και στην ιδανική περίπτωση η ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα
- 5) Να ισχύει η ανεξαρτησία από τη βιωσιμότητα και το φαινότυπο των φυτών
- 6) Να μην έχει υψηλό κόστος και αρνητικές συνέπειες στο φυτό η μεθοδολογία της αναγνώρισης και ταυτοποίησης, να είναι εύκολη, ακριβής και προσιτή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των φυτών και συγκεκριμένα όταν τα φυτά αναπτυχθούν τόσο ώστε από ένα τμήμα του φυτού να μπορεί να απομονωθεί μια ικανοποιητική ποσότητα DNA
- 7) Να επιτρέπεται η ταχεία προσέγγιση και τα αποτελέσματα να είναι άμεσα προσβάσιμα για ανάλυση

Οι κύριες τεχνικές ανίχνευσης μοριακών πολυμορφισμών σύμφωνα με τους Τσαυτάρη et al., (2012) διαχωρίζονται σε αυτές που βασίζονται:

- στον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων χωρίς να βασίζονται σε PCR,
- στον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας που στηρίζεται σε PCR
- στην αλληλούχιση συγκεκριμένων περιοχών που στηρίζεται σε PCR

- στην τεχνολογία των μικρο-συστοιχιών που ανιχνεύουν πολυμορφισμούς σε επίπεδο γονιδιώματος χωρίς να απαιτείται προηγούμενη γνώση συγκεκριμένων αλληλουχιών,στηριζόμενες σε PCR

ενώ μπορούν οι μοριακοί δείκτες επίσης να κατηγοριοποιηθούν με βάση το είδος των μοριακών διαφορών που ανιχνεύουν σε μια αλληλουχία και βασίζονται:

- Στην ανίχνευση μεταλλάξεων στη θέση πρόσδεσης των εκκινητών της PCR
- Στην ένθεση ή την απαλοιφή μιας αλληλουχίας μεταξύ των εκκινητών ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων
- στην αλλαγή του αριθμού γραμμικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μεταξύ δυο εκκινητών ή των θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων
- Στην ανίχνευση μονονουκλιδικών πολυμορφισμών

Καθώς επίσης μπορούν οι βασικές τεχνικές των μοριακών δεικτών να ταξινομηθούν απλά σε δύο κατηγορίες βάση της χρήσης PCR σύμφωνα με τους Agarwal et al., (2008) σε:

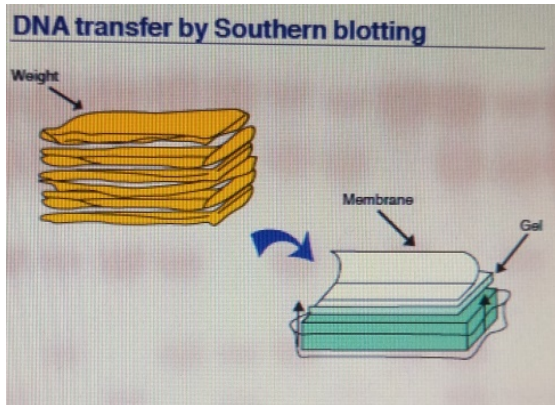
1. Τεχνικές βασισμένες στον υβριδισμό ή που δεν βασίζονται σε PCR
2. Τεχνικές που βασίζονται σε PCR

5.2 Τεχνικές βασισμένες στον Υβριδισμό

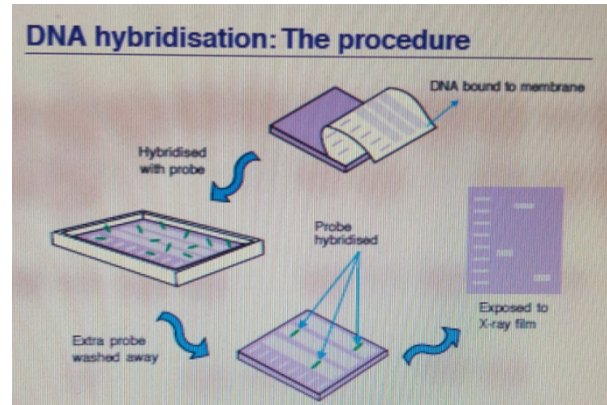
5.2.1 Πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων περιορισμού – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Τη δεκαετία του 1970 αναπτύχθηκε το πρώτο σύστημα μοριακών δεικτών, περιλαμβάνοντας τους μοριακούς δείκτες RFLP (Τσαυτάρης et al., 2012). Η μεθοδολογία τους βασίζεται σε δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία, την πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και τη μεταφορά του σε μεμβράνες όπου το δεσμευμένο DNA υβριδίζεται με ένα συμπληρωματικό τμήμα DNA (DNA probe) κατά Southern. Η μέθοδος δηλαδή βασίζεται στον υβριδισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA και ανιχνεύει κυρίως μεταλλάξεις σε θέσεις κοπής περιοριστικών ενζύμων και ένθεση ή απαλοιφή μιας αλληλουχίας μεταξύ δυο θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων. Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το πολύπλοκο γονιδίωμα των οργανισμών σε διακριτά τμήματα συγκεκριμένου μεγέθους, που μπορεί να κυμαίνονται από μερικές βάσεις μέχρι μερικές χιλιάδες βάσεις. Τα τμήματα αυτά στη συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης. Παρόλα αυτά το πρότυπο των περιορισμένων τμημάτων του γονιδιωματικού DNA που προέρχεται από διάφορα πολυμορφικά άτομα στην πηγή της αγαρόζης δεν είναι διακριτό

αλλά διάχυτο και μετά από τον υβριδισμό και τη χρήση του ανιχνευτή που είναι ραδιενεργά σημασμένος ή χημικά τροποποιημένος εμφανίζεται ένα πρότυπο των πολυμορφικών ζωνών (Χατζόπουλος, 2021).



Εικόνα 5.1: Μεταφορά DNA σε μεμβράνη που υβριδίζει κατά Southern (Πηγή: Vicenta & Fulton, 2003)



Εικόνα 5.2 : Υβριδισμός DNA σε μεμβράνη (Πηγή: Vicenta & Fulton, 2003)

5.2.2 Εφαρμογή της μεθόδου RFLP

Η τεχνική αυτή παρουσιάστηκε από τον Blaiich το 1989 ως ένα εργαλείο για τη διαφοροποίηση των καλλιεργειών της αμπέλου (Blaiich, 1989). Όπου μόνο μέσα στο χρονικό διάστημα της δεκαετίας του 1990 παρουσίασε ιδιαίτερη εφαρμογή και όχι στη συνέχεια. Το 1991 από το συνολικό DNA που εξήχθη από φύλλα, 8 καλλιεργειών *Vitis vinifera*, από την ποικιλία Concord και από το υποκείμενο F-3309, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το δενδρόγραμμα όπως προκύπτει από τους RFLP δείκτες συμφωνούσε σχετικά καλά με τη μορφολογική ταξινόμηση των φυτών που αναλύθηκαν (Yamamoto et al, 1991). Οι γονείς και οι απόγονοι από δύο διασταυρώσεις Cayuga White x Aurore και NY62.136.2 x Yates, εξετάστηκαν για την παρουσία πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι μπορεί να εμφανιστεί στην πρώτη απογονική γενιά σε ξυλώδη φυτά όπως της αμπέλου, που έχουν σχετικά υψηλό επίπεδο ετεροζυγωτίας (Mauro et al, 1992). Την ίδια περίοδο οι Bourquin et al., (1992) αναγνώρισαν δεκαέξι υποκείμενα αμπέλου, με DNA προερχόμενο από το ξύλο της αμπέλου, επίσης σαράντα έξι δείγματα αμπέλου *V. vinifera*. L συγκρίθηκαν και βρέθηκαν 111 κατάλληλα ή μοναδικά θραύσματα περιορισμού που αποκάλυψαν σημαντικό επίπεδο πολυμορφισμού και μπόρεσαν να

ταξινομηθούν σε 6 ομάδες, ενώ επιβεβαιώθηκαν και μέσω των αμπελογραφικών δεδομένων (Bourquin et al., 1993).

Στα μέσα της δεκαετίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για να συγκριθούν ποικιλίες του υποκειμένου *Vitis berlandieri* με *Vitis riparia* καθώς και τέσσερα υβρίδια προερχόμενα από την μεταξύ τους διασταύρωση (Guerra & Meredith, 1995). Πραγματοποιήθηκε επίσης αξιολόγηση της γενετικής ομοιότητας 33 ποικιλιών *Vitis vinifera* L (Bowers & Meredith, 1996) και μιας ομάδας από 62 γονότυπους όπου και κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δέντρο (Paludetti et al, 1996). Πραγματοποιήθηκε επίσης εξαγωγή DNA από ιστούς του καμβίου υποκειμένων της αμπέλου *Vitis spp* και *Muscadinia rotundifolia* Small. Γεγονός το οποίο χαρακτηρίζεται σημαντικό αφού επιτρέπει την εξαγωγή του DNA κατά τη διάρκεια του ληθάργου ή από εμβολιασμένα υποκείμενα που δεν έχουν φύλλα, με το DNA που παραλαμβάνεται να είναι κατάλληλο για τη μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικού θραύσματος (Lin & Walker, 1997). Ενώ το 1998 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για να αναλυθεί η σχέση μεταξύ των άγριων και των καλλιεργήσιμων ειδών αμπέλου στη Κορέα, στην Ιαπωνία και στην Κίνα (Goto-Yamamoto et al, 1998).

5.2.3 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Η τεχνική αυτή δεν εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, είναι αξιόπιστη και έχει χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ταυτοποίηση και διάκριση ειδών και ποικιλιών της αμπέλου (Μπινιάρη, 2000). Οι δείκτες RFLP κληρονομούνται με συγκυρίαρχο τρόπο και μπορεί να είναι απεριόριστοι σε αριθμό, ενώ η αλληλουχία του κάθε ανιχνευτή-δείκτη δεν χρειάζεται να είναι γνωστή (Τσαυτάρης et al., 2012), ενώ χαρακτηρίζονται ως σχετικά υψηλά πολυμορφικοί και μπορούν να αναπαραχθούν σε μεγάλο βαθμό (Agarwal et al., 2008). Επίσης τα στυπώματα DNA μπορούν να αναλυθούν επανειλημμένα με απογύμνωση και επανάληψη με διαφορετικούς ανιχνευτές, ενώ με τη μέθοδο αυτή μπορούν να εξεταστούν πολλά δείγματα ταυτόχρονα (Agarwal et al., 2008).

Παρόλο που η τεχνική αυτή έχει πολύ καλή επαναληψιμότητα, δεν χρησιμοποιείται πλέον ευρέως, θεωρείται χρονοβόρα, περιλαμβάνει ακριβά, ραδιενεργά και τοξικά αντιδραστήρια (Agarwal et al., 2008), απαιτεί υψηλής ποιότητας και μεγάλη ποσότητα (10mg ανά πέψη) γονιδιωματικού DNA (Karp et al., 1997) , επίσης απαιτείται να γίνουν αρκετοί συνδυασμοί μεταξύ των τμημάτων DNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ανιχνευτές και των διαφόρων ενζύμων περιορισμού με σκοπό να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός που μπορεί να αξιοποιηθεί (Χατζόπουλος, 2021).

5.3 Τεχνικές βασισμένες σε PCR

Οι παραπάνω περιορισμοί σύμφωνα με τους Agarwal et al., (2008) είχαν ως αποτέλεσμα να οδηγήσουν στη δημιουργία νέων τεχνικών με λιγότερο πολύπλοκα τεχνικά χαρακτηριστικά και οι οποίες βασίζονται στην PCR, με τις τεχνικές αυτές να κατηγοριοποιούνται με τη σειρά τους σύμφωνα με το μήκος και την γνώση της αλληλουχίας των εκκινητών σε αυτές που :

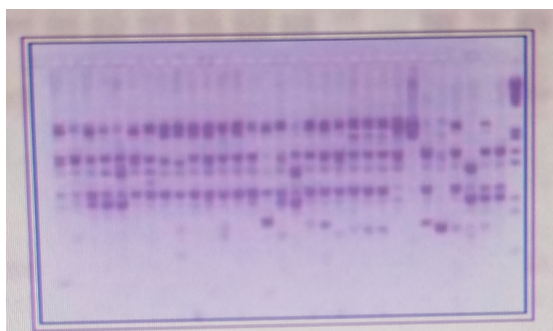
1. Στηρίζονται σε τυχαίους εκκινητές ή τεχνικές μη ειδικής αλληλουχίας
2. Στηρίζονται σε στοχευμένες αλληλουχίες

5.3.1 Τεχνικές βασισμένες στη PCR με χρήση τυχαίων Εκκινητών

5.3.1.1 Τυχαία Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA - Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Η τεχνική του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA ήταν η πρώτη εφαρμογή αξιοποίησης της PCR για την ανίχνευση γενετικής παραλλακτικότητας σε επίπεδο DNA (Τσαυτάρης et al., 2012), βασίζεται στη χρήση ενός μόνο τυχαίου εκκινητή - συνήθως δεκαμερή - ανά αντίδραση, για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη PCR με τη θερμοανθεκτική πολυμεράση TaqI (Χατζόπουλος, 2021). Ο εκκινητής έχει μια καθορισμένη σειρά βάσεων αλλά εμφανίζει τυχαία αλληλουχία, έχοντας ως σκοπό να πολλαπλασιάσει ένα τμήμα του DNA. Επομένως, θα πρέπει να βρει μια συμπληρωματική αλληλουχία και στα δύο άκρα του τμήματος αυτού αλλά με αντίθετες διευθύνσεις και μόνο όταν η περιοχή που βρίσκεται ανάμεσα στα σημεία υβριδισμού-πρόσδεσης του εκκινητή είναι από 100 έως 3000 βάσεις παράγονται ενισχυμένα τμήματα DNA, που διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Χατζόπουλος, 2021).

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι τέτοιες ώστε να μπορούν μέχρι 20 ενισχυμένες ζώνες να εμφανίζονται μετά την ηλεκτροφόρηση, η ικανότητα αυτή παραγωγής πολλαπλών ζωνών με τη χρήση ενός μόνο εκκινητή έχει ως αποτέλεσμα την άμεση και ταχεία εξέταση καθώς και εκτίμηση πολλαπλών γενετικών τόπων (Χατζόπουλος, 2021).



Εικόνα 5.3 : Διαχωρισμός σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Πηγή: Vicenta & Fulton, 2003)

5.3.1.1.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου RAPD

Είναι μια τεχνική γρήγορη και απλή, που δεν απαιτεί έμπειρο και εξειδικευμένο προσωπικό, με κόστος όχι ιδιαίτερα υψηλό (Χατζόπουλος, 2021), έχοντας ως αποτέλεσμα την εφαρμογή της στην ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, δίνοντας σημαντική πληροφορία για πολυμορφισμούς χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας των διαφορετικών αλληλόμορφων (Τσαυτάρης et al, 2012). Απαιτεί χαμηλή ποιότητα και πολύ λιγότερη ποσότητα απομονωμένου γονιδιωματικού DNA ανά αντίδραση 5-50ng (Srooner et al, 2005), δεν έχει καλή επαναληψιμότητα ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε διαφορετικά εργαστήρια, καθώς η μεθοδολογία απομόνωσης του DNA, οι συνθήκες κατά την αντίδραση της PCR και τα μηχανήματα που χρησιμοποιούνται δεν είναι τα ίδια (Χατζόπουλος, 2021).

5.3.1.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου RAPD

Η μέθοδος αυτή παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1990 ταυτόχρονα από δυο διαφορετικά εργαστήρια, με τους Williams et al., (1990) να προτείνουν αυτή την ονομασία, σε σχέση με τους Welsh & McClelland (1990) που την αποκάλεσαν απλά AP-PCR (arbitrarily primed PCR). Ενώ από τότε έως τις μέρες μας βρίσκει συνεχώς εφαρμογή.

Το 1993 η μέθοδος εφαρμόστηκε σε έναν αριθμό ποικιλιών όπου τα μοναδικά αποτυπώματα τους διακρίθηκαν εύκολα με τη χρήση είτε μεμονωμένων εκκινητών είτε μιγμάτων δυο εκκινητών. Τα αποτυπώματα αυτά αποτελούν πλέον μέρος μιας τράπεζας δεδομένων, που χρησιμοποιείται για την ταχεία αναγνώριση των ποικιλιών της αμπέλου καθώς και για την ανάπτυξη των φυλογενετικών σχέσεων. Ωστόσο η μέθοδος δεν μπόρεσε να διακρίνει διαφορές μεταξύ 6 κλώνων Pinot Noir και 2 κλώνων Shyraz από τις αντίστοιχες ποικιλίες (Collins & Symons, 1993). Επίσης δημιουργήθηκαν οκτώ τυχαίοι ενισχυμένοι δείκτες

πολυμορφισμού από μια διαλογή 77 εκκινητών μήκους 10 βάσεων, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν μεταξύ εννέα διαφορετικών υποκειμένων της αμπέλου (Bakalinsky et al., 1994). Παράλληλα μελετήθηκε και η γενετική προέλευση της ποικιλίας Muller-Thurgau που καλλιεργείται ευρύτατα στη Γερμανία και στη κεντρική Ευρώπη (Buscher et al., 1994). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης για την μελέτη πολυμορφισμού 31 δειγμάτων αμπέλου μέσω χρήσης 14 δεκαμερών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, οδηγώντας σε επιτυχή διαχωρισμό μεταξύ των ποικιλιών αλλά και κάποιων κλώνων τους (Moreno et al., 1995). Επίσης χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση υποκειμένων της αμπέλου (Xu et al., 1995), καθώς για την διάκριση μεταξύ καλλιεργήσιμων και άγριων φυτών της αμπέλου στην Ιταλία (Mulcahy et al., 1995)

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ φυτών που ανήκουν στα υπογένη *Euvitis* και *Muscadinia* του γένους *Vitis* (Qu et al., 1996), καθώς και για τον προσδιορισμό δεικτών που σχετίζονται με την έλλειψη σπόρων στο σταφύλι (Striem et al., 1996). Επίσης μελετήθηκε ο γενετικός πολυμορφισμός σε φυτά 3 γενών της οικογένειας *Vitaceae*, 11 ειδών του γένους *Vitis*, 10 ποικιλιών *Vitis vinifera* και 4 ποικιλιών υβριδίων (Sivolap et al., 1996). Στην Ιταλία ταυτοποιήθηκαν οι 4 ποικιλίες της αμπέλου με το όνομα Brachetto, αλλά όχι οι κλώνοι τους (Botta et al., 1996), ενώ στην Πορτογαλία ταυτοποιήθηκαν οι γονείς και τα υβρίδια μεταξύ φυτών των *Vitis vinifera* και *Vitis rotundifolia* (Sawazaki et al., 1996) και στη Γαλλία διερευνήθηκαν 30 ποικιλίες υποκειμένων φυτών *Vitis spp* (This et al., 1997).

Προς το τέλος της δεκαετίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για την ανάλυση των σχέσεων μεταξύ των άγριων και καλλιεργήσιμων σταφυλιών στην Ιαπωνία, Κορέα και Κίνα (Goto - Yamamoto et al., 1998). Ωστόσο στην Ισπανία για την Albarino, μια σπουδαία καλλιεργήσιμη ποικιλία, δεν μπόρεσε να διακρίνει κάποιους κλώνους της ποικιλίας, παρά τα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρουσίαζαν τα φύλλα, το σχήμα και την πυκνότητα του τσαμπιού (Loureiro et al., 1998). Στο Μαρόκο την ίδια περίοδο μελετήθηκαν 45 ποικιλίες αυτόχθονες όσο και ξενικές, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι κάποιες από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν ήταν συγγενικές, με κάποιες άλλες να παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα, ενώ αποδείχθηκε και μεγάλη μεταβλητότητα εντός του αυτόχθονου υλικού (Faraj et al., 1998). Επίσης εφαρμόστηκε σε φυτά της αμπέλου για τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ 16 ποικιλιών αμπέλου *Vitis vinifera* και *Vitis labruscana* καθώς και μεταλλάξεων προερχόμενων από τις εν λόγω ποικιλίες, καταλήγοντας στην ταξινόμηση 2 ομάδων στις οποίες ανήκουν ξεκάθαρα τα δυο διαφορετικά είδη αλλά χωρίς να μπορεί να διακρίνει τα

μοτίβα ζωνών μεταξύ γνωστών κλώνων (Ye et al., 1998). Επίσης ταυτοποιήθηκαν 13 είδη από τα 42 δείγματα αμπέλου *Vitis* που χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο RAPD, ενώ ανιχνεύθηκε και η γενετική ποικιλότητα των τσαμπιών της ποικιλίας Florida (Wang et al. 1999). Μελετήθηκε η γενετική σχέση μιας ομάδας αρχαίων ποικιλιών *Vitis vinifera* που καλλιεργείται σε μια περιορισμένη περιοχή στα βορειοδυτικά της Ισπανίας, με άλλες αρχαίες ποικιλίες που καλλιεργούνται σε διάφορες άλλες περιοχές της Ισπανίας, Γαλλίας και Γερμανίας (Vidal et al., 1999). Ενώ στη Γερμανία διαφοροποιήθηκαν 16 ποικιλίες υποκειμένων, μεταξύ των οποίων και οι 7 που χρησιμοποιούνται πιο συχνά, με την εκχύλιση του DNA να προέρχεται από ξυλώδη δείγματα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και πολυσακχαρίτες (Wolf et al., 1999). Επίσης μελετήθηκε η γενετική σχέση που υπάρχει μεταξύ 32 λευκών ποικιλιών αμπέλου *Vitis vinifera* οι οποίες καλλιεργούνται σε διαφορετικές περιοχές της Γαλλίας και Ισπανίας (Vidal et al., 1999).

Με την έναρξη της νέας χιλιετίας οι Siles et al., (2000) παρουσίασαν μια μελέτη σύμφωνα με την οποία συνδύασαν τη μέθοδο RAPD με τη τριχοειδική ηλεκτροφόρηση δυναμικού μεγέθους με ανίχνευση φθορισμού που προκαλείται από λέιζερ DSCE-LIF, όπου διέκριναν επιτυχώς ποικιλίες σταφυλιών καθώς και δυο κλώνους της ποικιλίας Chardonnay. Την ίδια χρονική περίοδο με τη χρήση ενός εκκινητή και την εφαρμογή μιας νέας τεχνικής εκχύλισης του DNA σε ρίζες και κλιματίδες, διακρίθηκαν 36 ποικιλίες υποκειμένων της αμπέλου (Ortlieb et al., 2000). Παρόλα αυτά σε άλλη έρευνα η μέθοδος αυτή δεν κατάφερε να διακρίνει 10 κλώνους της ποικιλίας White Riesling (Regner et al., 2000), ενώ στην Ελλάδα μελετήθηκαν 46 γηγενείς ποικιλίες με σκοπό την ταυτοποίηση και την διάκριση τους (Μπινιάρη, 2000). Στην Κίνα διερευνήθηκε η γενετική ποικιλότητα μέσω της μεθόδου σε 18 άγρια είδη αμπέλου, ένα διαειδικό υβρίδιο, 7 ευρωπαϊκές ποικιλίες *Vitis vinifera*, μία ποικιλία υποκειμένου και ένα στέλεχος *V. Riparia* (Su-Lan et al., 2001). Αναλύθηκαν επίσης με τη μέθοδο 31 ποικιλίες της αμπέλου από την Γαλλία και την βορειοδυτική Ιταλία, που παρουσιάζουν συνώνυμες ονομασίες, με τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνονται και επικουρικά από τη μέθοδο SSR (Schneider et al., 2001) καθώς και 33 γηγενείς ποικιλίες της Τυνησίας (Zoghلامي et al., 2001).

Ερευνήθηκε επίσης η γενετική ομοιότητα 7 ποικιλιών της αμπέλου στην Κορέα, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι ποικιλίες Daebong και Kyoho έχουν πολύ κοντινή σχέση και η ποικιλία Daebong θεωρήθηκε ανθική μετάλλαξη της ποικιλίας Kyoho (Kim et al., 2002). Στη Χιλή πραγματοποιήθηκε έρευνα καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα γαλλικά και χιλιανά αμπέλια που καλλιεργούνται για την παραγωγή Merlot αντιπροσωπεύουν

διαφορετικού γονότυπους (Herrera et al., 2002). Στην Ισπανία η υψηλή διακριτική ικανότητα της μεθόδου επέτρεψε τη διάκριση 39 δειγμάτων παλαιών γηγενών ποικιλιών με επιτυχία (Ulanovsky et al., 2002) καθώς και ποικιλιών, διαειδικών υβριδίων αλλά όχι κλώνων (Bisztray et al., 2002). Ενώ πραγματοποιήθηκε και διάκριση μεταξύ των ποικιλιών Malvasia και Torrontes καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι είναι δυο τεχνητές ομάδες (Borrego et al., 2002). Στην Πορτογαλία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για να ταυτοποιηθούν 24 ποικιλίες που είναι αντιπροσωπευτικές των περιοχών Douro και Vinhos Verdes (Leal et al., 2003) καθώς και 12 ποικιλίες από την βόρεια Πορτογαλία με τις ποικιλίες Aragonez και Borracal να είναι οι πιο διαφορετικές από τις άλλες ποικιλίες (Pinto-Carnide et al., 2003). Στην Τουρκία χρησιμοποιήθηκε για να ταυτοποιήσει 15 υβρίδια της αμπέλου και τους γονείς αυτών (Atak, 2003), καθώς και για ταυτοποίηση 30 ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργήθηκαν στην Βόρεια Ιταλία και Γαλλία, για επαλήθευση 22 περιπτώσεων συνωνύμων που βασίζονταν σε μορφολογικούς χαρακτήρες (Schneider et al., 2003). Στην Ελλάδα έρευνα με την ίδια μέθοδο δεν έδειξε κάποιο διαχωρισμό για 20 διακεκριμένους βιότυπους φυτών της ποικιλίας Ξινόμαυρο (Leventakis et al., 2003). Στην Ουγγαρία η μέθοδος δοκιμάστηκε για τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ ορισμένων αντιπροσωπευτικών ποικιλιών αμπέλου και υβριδίων που δημιουργήθηκαν στο Department of Genetics and Plant Breeding (CUB), καθώς και για τη διάκριση κλώνων και ταυτοποίηση διαφόρων υβριδίων μεταξύ ειδών ή ποικιλιών και των γονέων τους (Halasz et al., 2004). Στη Τσεχία την ίδια περίοδο στη προσπάθεια να διακρίνουν 24 γνωστούς κλώνους και ποικιλίες αμπέλου, κατάφεραν να διαχωρίσουν με επιτυχία μόνο τις ποικιλίες και όχι τους κλώνους (Vlastnikova et al., 2004), καθώς και 51 ακόμη ποικιλίες που καλλιεργούνται στην ίδια χώρα (Moravcova et al., 2004).

Στα μέσα της δεκαετίας του 2000 με τη βοήθεια της μεθόδου μελετήθηκε η γενετική ποικιλότητα 12 γηγενών ποικιλιών στην περιοχή των Καρπαθίων (Kocsis et al., 2005). Στην Κίνα παρόμοια έρευνα έγινε μεταξύ 4 οινοποιήσιμων και 11 επιτραπέζιων ποικιλιών της αμπέλου (Laiqing et al., 2005), ενώ στην Ινδία έγινε προσπάθεια να αξιολογηθεί η γενετική συγγένεια μεταξύ 7 ειδών και 12 γηγενών ποικιλιών της αμπέλου (Ravishankar et al., 2005). Στην Τουρκία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για να αναλύσει την γενετική σχέση που υπάρχει μεταξύ φυτών της ποικιλίας Buzgulu που καλλιεργούνται σε διαφορετικά μέρη της Τουρκίας (Aras et al., 2005), ενώ στην έρευνα των Benjak et al (2005) μελετήθηκε η σχέση μεταξύ 6 Κροατικών, 5 Ελληνικών και 9 Τουρκικών ποικιλιών. Επίσης μελετήθηκε στην Τουρκία η γενετική σχέση μεταξύ 19 τοπικών ποικιλιών αμπέλου *Vitis vinifera* L. που καλλιεργούνται στην περιοχή İskilip-Çorum (Karatas et al., 2006) καθώς επίσης αξιολογήθηκε και η γενετική

ποικιλομορφία 20 καλλιεργήσιμων ποικιλιών, 10 υποκειμένων και 9 άγριων ποικιλιών της αμπέλου που υπάρχουν στην ίδια χώρα (Elidemir & Uzun, 2006). Ενώ στην έρευνα των Castro et al. (2006) ταυτοποιήθηκαν 159 κλώνοι που ανήκουν στις τρεις Πορτογαλικές οινοποιήσιμες ποικιλίες Viosinho, Aragonez και Moscatel Galego Branco.

Προς το τέλος της δεκαετίας του 2000 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για να μελετηθεί η γενετική ποικιλότητα και οι ταξινομικές σχέσεις μεταξύ 6 αυτοφυών ποικιλιών της αμπέλου στην περιοχή του Sistan στο Ιράν (Solouki et al., 2007), καθώς επίσης μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία 46 Τουρκικών τοπικών ποικιλιών (Karatas & Agaoglu, 2008) και 35 γηγενών επιτραπέζιων ποικιλιών που καλλιεργούνται στη κοιλάδα Coruh στη βορειοανατολική Τουρκία (Ercisli et al., 2008). Στη Ρουμανία προσδιορίστηκε η γενετική ποικιλότητα μεταξύ πολλών γηγενών ποικιλιών (Coste et al., 2008) καθώς επίσης στην Κίνα πραγματοποιήθηκε αναγνώριση και αξιολόγηση της γενετικής σχέσης που υπάρχει μεταξύ 47 ποικιλιών *Vitis vinifera* L. (Wu et al., 2008). Στη Ρουμανία μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία 36 τοπικών οινοποιήσιμων ποικιλιών της αμπέλου *Vitis vinifera* L. (Bodea et al., 2009), στη Κορέα 29 οινοποιήσιμων ποικιλιών *Vitis spp* (Yoo et al., 2009), ενώ πραγματοποιήθηκε μοριακή εκτίμηση κλωνικής πιστότητας υποκειμένων προερχόμενα από μικροπολλαπλασιασμό (Alizadeh & Singh, 2009) και έλεγχος της γενετικής σταθερότητας και πιστότητας στα μικροπολλαπλασιασμένα φυτά της οινοποιήσιμης ποικιλίας Feteasca neagra στη Ρουμανία (Gheorghe et al., 2009).

Την επόμενη δεκαετία του 2010 μελετήθηκαν στην Κίνα με την μέθοδο συνολικά 47 γονότυποι που περιλάμβαναν 23 γονότυπους από 12 άγρια γηγενή είδη της Κίνας, 6 διαειδικά υβρίδια *V. vinifera* × *V. labrusca*, 3 κλώνοι του *V. riparia* και 15 *V. vinifera* L. (Hou et al., 2010), 49 τοπικές οινοποιήσιμες ποικιλίες προερχόμενες από την περιοχή Sanliura της Τουρκίας (Karatas & Agaoglu, 2010). Ενώ οι Wang et al (2010) παρουσίασαν έναν βελτιωμένο τρόπο εκχύλισης του DNA για βελτιστοποίηση της μεθόδου. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για την ταυτοποίηση και διάκριση 8 ποικιλιών αμπέλου *Vitis vinifera* L., οι οποίες διέφεραν ως προς το χρώμα των ραγών (El-Sayed et al., 2011). Την ίδια περίοδο στη Κίνα αναπτύχθηκαν τα διαγράμματα αναγνώρισης (cultivar-identification-diagram, CID), μια νέα προσέγγιση με χρήση εντεκαμερών εκκινητών, που διευκολύνει τη χρήση του δείκτη DNA στον διαχωρισμό ατόμων των ποικιλιών με πολύ καλύτερο, αποτελεσματικό, πρακτικό και αξιόπιστο τρόπο και η οποία εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό 69 κινέζικων ποικιλιών (Zhao et al., 2011). Ενώ προσδιορίστηκαν και οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ 46 ελληνικών ποικιλιών (Biniari, 2012). Αναγνωρίστηκαν 8 διαφορετικές

επιτραπέζιες ποικιλίες σταφυλιών, από 16 δείγματα προερχόμενα από διαφορετικά μέρη (Frotscher et al., 2012), ενώ στην κοιλάδα Coruh στην Τουρκία εξετάστηκε η γενετική ποικιλομορφία σε 4 διαφορετικούς πληθυσμούς φυτών *Vitis vinifera* που περιλαμβάνουν την τοπική ποικιλία Kabarcik και καλλιεργούνται σε διαφορετικό υψόμετρο (Agar et al., 2012). Στην Ελλάδα διακρίθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 14 καλλιεργούμενες ποικιλίες της αμπέλου (Καρβουνάκης, 2015). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε εξαγωγή γονιδιωματικού DNA από 22 ποικιλίες αμπέλου και βελτιστοποίηση της τεχνικής RAPD (Wu et al., 2013). Επίσης ερευνήθηκε η γενετική ποικιλομορφία 6 ποικιλιών αμπέλου από την περιοχή Rahovec του Κοσόβου (Bajraktari et al., 2014)

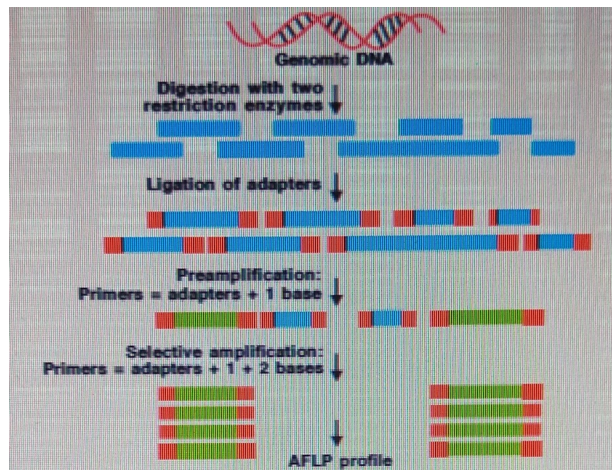
Στα μέσα της δεκαετίας και συγκεκριμένα το 2015 πραγματοποιήθηκε ανάλυση της γενετικής σχέσης μεταξύ των οινοποιήσιμων ποικιλιών Μοσχάτων της περιοχής Apulia της Νοτίου Ιταλίας (Fanizza et al., 2015), καθώς και 6 ποικιλιών και 5 υποκειμένων της αμπέλου *Vitis vinifera* L., στην Αίγυπτο (Saleh et al., 2015). Ενώ στη συνέχεια αναλύθηκε η γενετική ποικιλομορφία από 56 πορτογαλικά δείγματα, αντιπροσωπευτικά των ελεγχόμενων ονομασιών προέλευσης Vinhos Verdes και Douro (Castro et al., 2016) και πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση μεταξύ των 7 ειδών *V. vinifera* L., *V. sylvestris* Fl. Bed., *V. hissarica* Vass., *V. coignetiae* Planch., *V. berlandieri* Pulliatt., περιλαμβάνοντας το υποείδος *V. hissarica* subsp. *rechingeri*, και μίας ποικιλίας της *V. vinifera* var. *sativa* Beck, προερχόμενα από την περιοχή Diyala του Ιράκ (Al -Anbari et al., 2017) καθώς και 10 οινοποιήσιμων ποικιλιών της αμπέλου *Vitis vinifera* L., προερχόμενες από 3 διαφορετικές περιοχές του Ιράκ (Hanan & Al-Janaby, 2017). Στο Ρίο ντε Τζανέιρο μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ 40 γονοτύπων από ποικιλίες, υποκειμένα και είδη διαφορετικών υπογενών (Da Costa et al., 2017).

Ενώ προς το τέλος της δεκαετίας πραγματοποιήθηκε ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας 9 ποικιλιών της αμπέλου, που απαντώνται στην περιοχή Salahaldin του Ιράκ (Al-Yassine, 2018) και μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ 36 τοπικών ποικιλιών της αμπέλου που βρίσκονται στην Δυτική Όχθη της Παλαιστίνης (Mujahed & Basheer-Salimia, 2019). Επίσης με τη βοήθεια της μεθόδου μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ μεταλλαγμένων γονοτύπων που προέκυψαν μετά από επίδραση ακτινοβολίας και των μη ακτινοβολημένων γονοτύπων, προερχόμενα από 4 υποκειμένα αμπέλου (Salama et al., 2020). Ενώ το 2021 στην Ρουμανία πραγματοποιήθηκε έρευνα για την γενετική ποικιλομορφία και τη σχέση που υπάρχει μεταξύ 12 γηγενών ποικιλιών της αμπέλου (Petrea et al., 2021) και στην Ελλάδα χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ταυτοποίηση της Σταφίδας Vostizza, Προϊόν

Προστατευόμενης Ονομασίας Προελεύσεως για την αποφυγή νοθείας (Dimitrakopoulou et al., 2021)

5.3.1.2 Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων – Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Είναι μια τεχνική η οποία παρέχει ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό γενετικής ποικιλομορφίας και βιοποικιλομορφίας (Χατζόπουλος, 2021) καθώς και να διακριθούν στενά συνδεδεμένα άτομα σε επίπεδο υποείδους (Althoff et al., 2007), μέσω του πολυμορφισμού των τμημάτων κοπής του συνολικού DNA με περιοριστικά ένζυμα, όπως οι δείκτες RFLP, μόνο που η αναγνώριση των τμημάτων αυτών δεν γίνεται με υβριδισμό αλλά με PCR (Τσαυτάρης et al., 2012). Το απομονωμένο γονιδιωματικό DNA υφίσταται ταυτόχρονη διπλή πέψη με δύο ένζυμα περιορισμού, όπου το ένα αναγνωρίζει θέσεις 4 βάσεων και το άλλο θέσεις αναγνώρισης 6 βάσεων, τα άκρα των περιορισμένων τμημάτων ενώνονται (με τη χρήση ενζύμου λιγάση) με ειδικά σχεδιασμένους προσαρμοστές, έτσι ώστε να είναι συμβατοί και να συνδέονται στις θέσεις αναγνώρισης των συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πλειονότητα των κομμένων τμημάτων που θα προκύψουν να προέρχονται από την πέψη του ενζύμου που αναγνωρίζει 4 βάσεις. Η ταυτοποίηση των πολυμορφικών μοριακών δεικτών με μικρό γωνιδίωμα πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηχτή πολυακρυλαμίδης, στην περίπτωση όμως αρκετά μεγάλων γονιδιωμάτων το πρότυπο των ζωνών είναι αρκετό πολύπλοκο και δεν επιτρέπεται ο διαχωρισμός των ζωνών σε πηχτή πολυακρυλαμίδης. Η λύση του προβλήματος επιτυγχάνεται μέσω της μείωσης της πολυπλοκότητας του προτύπου των ζωνών με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για PCR που έχουν αλληλουχία ομόλογη με τον προσαρμοστή και επιπλέον ορισμένα “επιλεκτικά νουκλεοτίδια” που προστίθενται στο 3’ άκρο των εκκινητών. Οι ζώνες που προκύπτουν μπορούν να παρατηρηθούν με ραδιενεργά νουκλεοτίδια κατά τον πολυμερισμό ή με ειδικά χρωμοφόρα φθορισμού στις βάσεις ή στους εκκινητές, ακολούθως το πρότυπο αναδεικνύεται είτε με φιλμ ακτίνων X ή ταυτοποιείται με ακτίνες laser (Χατζόπουλος, 2021).



Εικόνα 5.4: Σχηματική περιγραφή της μεθόδου AFLP (Πηγή: Vicenta & Fulton, 2003)

Ο πολυμορφισμός σύμφωνα με τον Χατζόπουλο (2021) πηγάζει από τις διαφορές του μεγέθους των ενισχυμένων τμημάτων καθώς εντοπίζεται από την παρουσία ή απουσία κάποιας ζώνης και οφείλεται:

1. στις διαφορές των θέσεων αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμούς
2. στις αλλαγές των βάσεων μέσω μεταλλάξεων ακριβώς δίπλα στις θέσεις αναγνώρισης και διάκριση από τα “επιλεκτικά νουκλεοτίδια” και
3. στις ενθέσεις ή ελλείψεις μέσα στα τμήματα που ενισχύονται

5.3.1.2.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Οι μοριακοί δείκτες που παράγονται με την τεχνική της AFLP είναι πολύ περισσότεροι από αυτούς που δημιουργούνται σε μια αντίδραση PCR RAPD, αναδεικνύονται με διάφορους συνδυασμούς ενζύμων περιορισμού όπου διασκορπίζονται σε όλο το γονιδίωμα και ο συνδυασμός με άλλες τεχνικές αποδίδει μια καλύτερη σάρωση και χαρτογράφηση του γονιδιώματος. Η μέθοδος παρουσιάζει υψηλή ικανότητα ανάλυσης ταυτόχρονα ενός μεγάλου αριθμού πολυμορφικών τόπων, σε σχέση με άλλες μεθόδους χαρτογράφησης, τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι επαναλήψιμα (Χατζόπουλος, 2021) καθώς είναι λιγότερο ευαίσθητη από τα RAPDs σε διακυμάνσεις των συνθηκών (Τσαυτάρης κ.α., 2012), δημιουργεί αποτυπώματα οποιουδήποτε DNA ανεξάρτητα από την προέλευση του και χωρίς προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του DNA, καθώς και τα περισσότερα ενισχυμένα τμήματα της AFLP αντιστοιχούν σε μοναδικές θέσεις στο γονιδίωμα και ως εκ τούτου

μπορούν να αξιοποιηθούν ως ορόσημα στη γενετική και φυσική χαρτογράφηση όπως και στη χαρτογράφηση των γονιδίων (Agarwal et al, 2008).

Όμως παρόλο που έχει αυτοματοποιηθεί ως τεχνική, απαιτεί μέτρια ποιότητα και μεγάλη ποσότητα DNA 0,3-1,0μg (Karp et al, 1997). Είναι μια τεχνική που παρουσιάζει σε γενικές γραμμές χαμηλότερο επίπεδο πολυμορφισμού που ανιχνεύεται σε σχέση με τις μεθόδους των μικροδορυφόρων και της RFLP, ενώ παρουσιάζει και σχετικά αρκετές δυσκολίες, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και έχει υψηλό κόστος εφαρμογής (Χατζόπουλος, 2021).

5.3.1.2.2 Εφαρμογή της μεθόδου AFLP

Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε αρχικά για τη μελέτη δεικτών κληρονομικότητας σε φυτά και κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1992 από την εταιρεία Keygene N,V, The Netherlands (Fry et al., 2009). Στη συνέχεια της δεκαετίας του 1990 χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό κλώνων μιας ομάδας από 19 φυτά της αμπέλου *Vitis vinifera L.*, που περιλάμβαναν 13 και 6 υποτιθέμενα φυτά αμπέλου που σχετίζονται με την ποικιλία Sugniocese και Colorino αντίστοιχα (Sensi et al., 1996). Επίσης αναλύθηκαν 62 δείγματα DNA, προερχόμενα από ένα σύνολο 132 δειγμάτων από 55 διαφορετικές ποικιλίες, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι διαφοροποίηση μεταξύ των κλώνων δεν μπόρεσε να ανιχνευτεί με τη μέθοδο αυτή (Bowers, 1998), αποτέλεσμα που επαναλαμβάνεται στην έρευνα των Merdinoglu et al (1998). Την ίδια χρονική περίοδο παρόμοια έρευνα σε 67 διαφορετικά δείγματα DNA, προερχόμενα από μια συλλογή της περιοχής D.O.Ca Rioja της Ισπανίας διάκρινε τη γενετική ομοιότητα μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων από τη συλλογή, με αποτέλεσμα να διακρίνει τους διαφορετικού γονότυπους που διατηρούνται κάτω από το ίδιο όνομα όπως και να προσδιορίσει τους ίδιους γονότυπους που βρίσκονται κάτω από διαφορετικά ονόματα, καθώς επίσης μπόρεσε να διαχωρίσει συγκεκριμένους κλώνους της ίδια ποικιλίας που παρουσίαζαν διαφορετικά αγρονομικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Cervera et al., 1998). Ενώ η ανάλυση 500 ενισχυμένων θραυσμάτων επέτρεψε την ταυτοποίηση πολυμορφισμών εντός της καλλιέργειας που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διάκριση συγκεκριμένων κλώνων σε συγκεκριμένες ποικιλίες (Martinez-Zapater et al., 1998). Το 1999 έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την φυλογενετική ανάλυση της ποικιλίας αμπέλου Ansonica, που καλλιεργείται στο νησί Giglio της Τοσκάνης στην Ιταλία, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι παρουσιάζει γενετική ομοιότητα με την ποικιλία Ansonica που καλλιεργείται στην ηπειρωτική περιοχή της Τοσκάνης, με την ποικιλία Inzolia

από την Σικελία, με την ποικιλία Airen από την Ισπανία, την ποικιλία Clairette από τη Γαλλία και την ποικιλία Ροδίτη από την Ελλάδα (Lamprea et al., 1999).

Τη δεκαετία του 2000 συνεχίστηκε η εφαρμογή της μεθόδου, όπου μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μιας συλλογής από 35 επιτραπέζιες ποικιλίες της αμπέλου στην Ισπανία, ενώ υποστηρίζει ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ταυτοποίηση κλώνων (Cervera et al., 2000). Την ίδια χρονική περίοδο στην έρευνα των Scott et al (2000) αναφέρεται ότι πραγματοποιήθηκε η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια της μεθόδου για τη διαφοροποίηση μεταλλάξεων από τη μητρική σειρά αμπέλου. Επίσης οι Bellin et al (2000) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για μελετήσουν την ενδοποικιλιακή γενετική ποικιλομορφία ορισμένων ποικιλιών, με αποτέλεσμα την διάκριση μόνο ορισμένων κλώνων των ποικιλιών Pinot blanc, Pinot noir και Pinot gris και όχι των ποικιλιών Merlot, Sauvignon, Cabernet και Chardonnay. Στη Χιλή προσδιορίστηκαν διαφορές μεταξύ κλώνων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, οι οποίες σχετίζονται με μορφολογικές διαφορές που παρουσιάζουν οι κλώνοι μεταξύ τους (Narvaez et al., 2000). Η μέθοδος επέτρεψε επίσης τη διάκριση μεταξύ στενών συγγενών ποικιλιών Turruntos, Malvasia de El Bierzo και Albillo de Madrid καθώς και της ενδοποικιλιακής ποικιλομορφίας της ποικιλίας Albillo (Cervera et al., 2001). Επίσης επιλέχτηκε για να καθορίσει τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των 33 ποικιλιών αμπέλου που ανήκουν στην ομάδα Scieave, με σκοπό την αποκρυπτογράφηση των ομώνυμων και συνώνυμων ποικιλιών, οι οποίες καλλιεργούνται στις Νότιες και Βόρειες πλαγιές των Ανατολικών Άλπεων (Fossati et al., 2001), ενώ παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε μεταξύ 7 ποικιλιών του Trebbiano και 17 ποικιλιών που παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με την ποικιλία Trebbiano (Labra et al., 2001). Επίσης με τη βοήθεια της μεθόδου πραγματοποιήθηκε η διάκριση 16 κλώνων από το σύνολο των 24 δειγμάτων της ποικιλίας Traminer (Imazio et al., 2002). Στην Αργεντινή πραγματοποιήθηκε έρευνα για να αξιολογήσει τη γενετική ποικιλομορφία που υπάρχει μεταξύ 9 ποικιλιών Criollas, 6 Ευρωπαϊκών και 1 Αμερικάνικης ποικιλίας (Martinez et al., 2003), ενώ η έρευνα που έγινε για να προσδιοριστεί η γενετική σχέση μεταξύ των αρωματικών σταφυλιών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι ποικιλίες Moscato και Malvasia δεν έχουν καμία σχέση μεταξύ τους (Fanizza et al., 2003).

Στα μέσα της δεκαετίας ερευνήθηκαν 39 δείγματα από μια αρχαία ποικιλία θηλυκών λουλουδιών την ποικιλία Picolit από τη βορειοανατολική Ιταλία, όπου διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ ορισμένων δειγμάτων (Zulini et al., 2005). Ενώ έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Τουρκία για τη γενετική σχέση που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι

δύο οικονομικά σημαντικές ποικιλίες της αμπέλου, γνωστές ως *Vitis vinifera* Misket και *Vitis vinifera* Parmak, που καλλιεργούνται στην περιοχή της Ανατολίας κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι δυο ποικιλιακές ομάδες περιέχουν έναν αριθμό συνωνύμων και ομωνύμων ποικιλιών (Ergul et al., 2006). Επίσης με τη βοήθεια της μεθόδου μελετήθηκαν κλώνοι που παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινοτύπους, ανάμεσα σε κλωνική παραλλαγή που εμφανίζεται μεταξύ 70 φυτών της ποικιλίας Pinot noir της αμπέλου *Vitis vinifera* L., (Blanch et al., 2007). Την ίδια χρονική περίοδο η μέθοδος εφαρμόστηκε στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της γενετικής σχέσης που υπάρχει εντός και μεταξύ των υβριδικών ομάδων υποκειμένων της αμπέλου (De Andres et al., 2007), στην γενετική διάκριση 21 υποκειμένων προερχόμενα από μια Ινδική συλλογή φυτών αμπέλου (Upadhyay et al., 2007) και στην αποσαφήνιση των σχέσεων μεταξύ των 54 πιο αντιπροσωπευτικών ποικιλιών αμπέλου στο Ιράν (Doulaty Baneh et al., 2007).

Προς το τέλος της δεκαετίας του 2000, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος για να πραγματοποιηθεί αξιολόγηση της κλωνικής παραλλαγής 14 και 22 κλώνων των ποικιλιών Syrah και Malbec του είδους *Vitis vinifera* L., αντίστοιχα (Stajner et al., 2009). Μελετήθηκε η γενετική παραλλαγή της φυσικής μετάλλαξης της ποικιλίας Pinot Meunier και του γερμανικού κλώνου Samtrot της ποικιλίας Pinot noir (Stenkamp et al., 2009). Ενώ στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε μεταξύ επιλεγμένων κλώνων, προερχόμενων από τις σημαντικότερες 7 γηγενείς ποικιλίες της αμπέλου από τη Galicia περιοχή της βορειοδυτικής Ισπανίας, επιτεύχθηκε ο σαφής διαχωρισμός μεταξύ τους, αλλά δεν προέκυψε καμία διαφοροποίηση μεταξύ των κλώνων της ίδιας ποικιλίας (Lopez et al., 2009).

Τη νέα δεκαετία του 2010 συνεχίστηκε η εφαρμογή της μεθόδου όπου και πραγματοποιήθηκε διάκριση μεταξύ 19 υποκειμένων της αμπέλου τα οποία ταξινομήθηκαν σε 5 ομάδες (Sabir et al., 2010). Στην Τουρκία μελετήθηκε η γενετική σχέση που υπάρχει μεταξύ 20 υποκειμένων της αμπέλου (Ergul et al., 2010), ενώ στη Μαγιόρκα πραγματοποιήθηκε παρόμοια μελέτη για τη διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των γηγενών ποικιλιών Manto Negro, Callet και Moll καθώς και κλώνων τους (Cretazzo et al., 2010). Μελετήθηκαν επίσης οι γενετικές σχέσεις μεταξύ 18 υβριδίων αμπέλου και καθαρών ποικιλιών της αμπέλου *Vitis vinifera* L (Theocharis et al., 2010). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη για να αξιολογήσει τις μεταλλάξεις σε 86 κλώνους της ποικιλίας αμπέλου Riesling, όπου και ανιχνεύθηκαν δύο τύποι μεταλλάξεων (Anhalt et al., 2011), όπως επίσης αναλύθηκαν και 5 κλώνοι της ποικιλίας αμπέλου Kishmish, οι οποίοι διέφεραν σημαντικά στα χαρακτηριστικά των τσαμπιών τους όπως το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των ραγών (Upadhyay et al., 2011). Ενώ

πραγματοποιήθηκε έρευνα για να επαληθευτεί η ποικιλιακή ταυτότητα 53 συνολικά δειγμάτων της ποικιλίας Garnacha, προερχόμενα από Ιταλία, Ισπανία και Γαλλία (Meneghetti et al., 2011) καθώς και μελέτη της ενδοποικιλιακής γενετικής μεταβλητότητας των ποικιλιών Malvasia nera di Brindisi/Lecce, Negroamaro και Primitivo, γνωστές και ως Zinfandel, οι οποίες καλλιεργούνται στην περιοχή Απουλία της Ιταλίας (Meneghetti et al., 2011). Συνεχίστηκε η εφαρμογή της μεθόδου με την αξιολόγηση των γενετικών διαφορών μεταξύ 10 κλώνων αμπέλου της ποικιλίας Bidaneh sefid. όπου διαχωρίστηκαν σε δυο ομάδες, με την πρώτη ομάδα να περιλαμβάνει τους 9 κλώνους με λευκό χρώμα ραγών χωρίς να παρουσιάζουν γενετικές διαφορές μεταξύ τους και η δεύτερη ομάδα να περιλαμβάνει μόνο τον έναν κλώνο με κόκκινο χρώμα ράγας (Doulati Baneh & Mohammadi, 2012). Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης για τον γενετικό χαρακτηρισμό της ποικιλίας αμπέλου Zilanka από τη Βοσνία-Ερζεγοβίνη (Tomic et al., 2012), την αναγνώριση ποικιλιών και κλώνων πορτογαλικής αμπέλου (Castro et al., 2012, για την απόκτηση γνώσεων της βιοποικιλότητας σχετικά με τις απειλούμενες ιστορικές ποικιλίες *Vitis vinifera L.*, που καλλιεργούνται στα βόρεια της περιοχής Adana της νότιας Ανατολίας στην Τουρκία και για τον προσδιορισμό της γενετικής συγγένειας μεταξύ αυτών των τοπικών ποικιλιών με 22 ποικιλίες, προερχόμενες από το National Grapevine Germplasm του Ινστιτούτου Αμπελουργίας της Τουρκίας (Yilancioglu et al., 2013), επίσης για τη διαφοροποίηση του κλώνου Manjari Naveen της ποικιλίας σταφυλιού Centennial Seedless από την μητρική ποικιλία (Shinde et al., 2013).

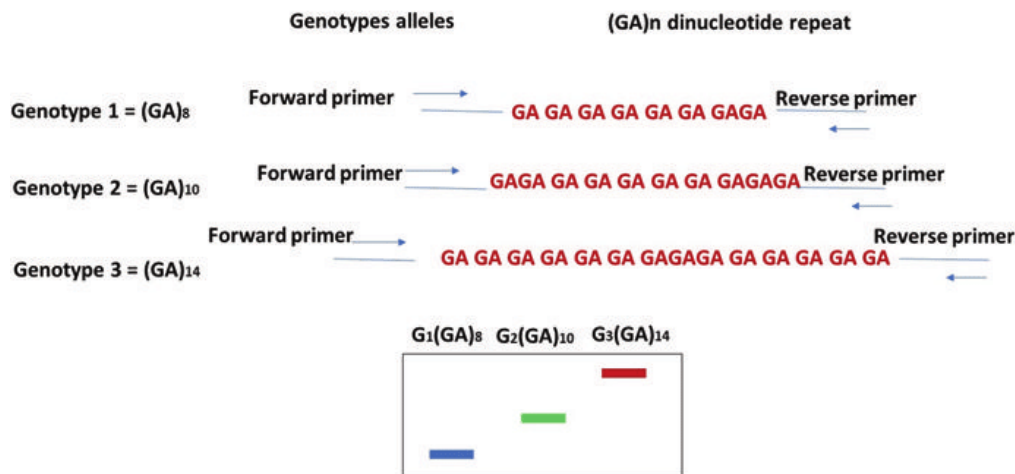
Στα μέσα της ίδιας δεκαετίας μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία της ποικιλίας αμπέλου Refosk που καλλιεργείται στη Σλοβενία, διαχωρίζοντας την σε δυο ομάδες (Hladnik et al., 2015), καθώς και η γενετική ποικιλομορφία 22 δειγμάτων των ποικιλιών της αμπέλου Gaglioppo και Magliocco dolce, οι οποίες καλλιεργούνται στη περιοχή Calabria της νοτίου Ιταλίας (Meneghetti et al., 2015). Ενώ το 2018 πραγματοποιήθηκε μελέτη η οποία κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει στην ποικιλία της αμπέλου Μοσχάτο Αλεξανδρείας ενδοποικιλιακή γενετική μεταβλητότητα (Soler et al., 2018).

5.3.2 Τεχνικές βασισμένες στη PCR με στοχευμένες αλληλουχίες

5.3.2.1 Μικροδορυφόροι ή Απλές Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες - Simple sequence repeats (SSR)

Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στις μικρές συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών 2,3 ή 4 νουκλεοτιδίων που υπάρχουν στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών (Χατζόπουλος,

2021) και οι οποίες εμφανίζονται ως διάσπαρτα επαναλαμβανόμενα στοιχεία σε όλα τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα (Tautz & Renz, 1984). Αυτές οι μικρές επαναλήψεις αλληλουχιών των 2-5 νουκλεοτιδίων που επαναλαμβάνονται 5-100 φορές έχουν ονομαστεί με πολλά διαφορετικά ονόματα όπως μικροδορυφόροι, απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες – Simple Sequence Repeats (SSR), απλές γραμμικές επαναλήψεις – Simple Tandem Repeats (STR), γραμμικές επαναλήψεις ποικίλων νουκλεοτιδίων – Variable Nucleotide Tandem Repeats (VNTR) και αποτελούν πηγή γενετικών δεικτών καθώς παρουσιάζουν υψηλή παραλλακτικότητα ως προς τον αριθμό επαναλήψεων σε πολλούς οργανισμούς (Τσαυτάρης et al., 2012) δηλαδή υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα (Χατζόπουλος, 2021). Παράδειγμα, μια αλληλουχία ενός δινουκλεοτιδίου AG μπορεί να επαναλαμβάνεται 20 φορές σε συγκεκριμένη θέση στο DNA ενός αλληλόμορφου ενώ στο άλλο αλληλόμορφο 30 φορές (Τσαυτάρης et al., 2012). Αυτοί οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση με PCR, γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, οι οποίοι εμφανίζονται σαν ζώνες με διαφορετικό μέγεθος σε ηλεκτροφόρηση σε πηχτή αγαρόζης (Χατζόπουλος, 2021).



Εικόνα 5.5: Σχηματική παράσταση των GA SSR αλληλουχιών τριών διαφορετικών γονότυπων (Πηγή : <https://www.researchgate.net>)

5.3.2.1.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή είναι απλή, έχει χαμηλό κόστος ενώ δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, επιτρέπει την άμεση και εύκολη διάκριση των ετεροζύγωντων ατόμων (Χατζόπουλος, 2021), απαιτεί μέτριας ποιότητας καθώς και μικρή ποσότητα 0,05-0,12μg DNA (Jiang, 2013), δίνει

απλούς συγκυρίαρχους δείκτες, με μεγάλη παραλλακτικότητα και υψηλή επαναληψιμότητα, αλλά απαιτεί προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας της περιοχής για τον σχεδιασμό των εκκινητών (Τσαυτάρης et al., 2012).

5.3.2.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου SSR

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε το 1995 για τον προσδιορισμό των γενετικών σχέσεων που παρουσιάζουν μεταξύ τους τα 1300 ανθεκτικά σε κρύο φυτά αμπέλου της συλλογής USDA/ARS Plant Genetic Resources Unit της Geneva, N.Y και αφορούσε την ταυτοποίηση ειδών, υβριδίων, υποειδών και ποικιλιών (Lamboy et al., 1995). Στη συνέχεια και ως το τέλος της δεκαετίας του 1990 με τη βοήθεια της μεθόδου διακρίθηκαν 77 ποικιλίες της αμπέλου με τη χρήση 4 γενετικών τόπων (Bowers et al., 1996), καθώς αναλύθηκαν και 12 κλώνοι της ποικιλίας της αμπέλου Sangiovese (Vignani et al., 1996). Την ίδια χρονική περίοδο πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από ιστό του καμβίου 8 υποκειμένων της αμπέλου και η μεταξύ τους διάκριση (Lin & Walker, 1997) και διακρίθηκαν μεταξύ τους 110 δείγματα φυτών αμπέλου, από 21 είδη της αμπέλου και 4 υβρίδια, προερχόμενα από τη γενετική συλλογή αμπέλου USDA-ARS GENAVA N,Y και Davis California (Lamboy & Alpha, 1998), ενώ αναγνωρίστηκαν και 58 υποκείμενα αμπέλου από τη γενετική συλλογή του University of California, Davis (Lin & Walker, 1998). Διακρίθηκαν επίσης με τη μέθοδο 21 κλώνοι από 12 ποικιλίες αμπέλου (Merdinoglu et al., 1998) καθώς και 31 ποικιλίες της αμπέλου από την βόρεια περιοχή της Πορτογαλίας και 3 ποικιλίες από την Ισπανία που θα μπορούσαν να είναι ίδιες με τρεις από τις πορτογαλικές, αναγνωρίζοντας ποικιλίες με διαφορετικό όνομα αλλά που θα μπορούσαν να είναι ίδιες (Ferreira Monteiro et al., 1998). Χρησιμοποιήθηκαν 17 μικροδορυφορικοί τόποι για να προσδιοριστεί η άγνωστη γονική σχέση 352 ποικιλιών αμπέλου της βορειοανατολικής Γαλλίας, όπου βρέθηκαν 29 διπλοί γονότυποι άλλων ποικιλιών και από τους υπόλοιπους 323 γονότυπους εντοπίστηκαν 89 πιθανά ζεύγη γονέων για 52 ποικιλίες (Bowers et al., 1998). Ενώ η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τις γονικές αναλύσεις ορισμένων διασταυρώσεων της ποικιλίας Riesling και γονοτύπων των αρχαίων ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στην περιοχή Trentino της Ιταλίας (Grando & Frisingheli, 1998).

Ταυτοποιήθηκε ο γονότυπος 49 ποικιλιών αμπέλων από την Πορτογαλία με χρήση 11 μικροδορυφορικών τόπων, καθώς επίσης επαληθεύτηκαν και αρκετές συνώνυμες ποικιλίες και η καταγωγή της ποικιλίας Boal Ratinho από τη διασταύρωση μεταξύ των ποικιλιών Malvasia Fina και Siria (Lopes et al., 1999), ενώ η ποικιλία της αμπέλου Ansonica που

καλλιεργείται στο νησί Giglio της Τοσκάνης έχει πιθανόν ελληνική προέλευση καθώς παρουσιάζει υψηλή γονιδιωματική ομοιότητα με τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου Σιδερίτη και Ροδίτη (Lamprea et al., 1999). Επίσης αναγνωρίστηκε η ταυτότητα και η καταγωγή της ποικιλίας που είναι γνωστή στην Καλιφόρνια ως Petite Sirah (Meredith et al., 1999).

Τη δεκαετία του 2000 συνεχίστηκε με μεγάλη επιτυχία η εφαρμογή της μεθόδου όπου και πραγματοποιήθηκε μελέτη με σκοπό να διακριθούν οι ομώνυμες και συνώνυμες ποικιλίες από 406 δείγματα των σημαντικότερων καλλιεργούμενων ποικιλιών της Ισπανίας, καταλήγοντας στο διαχωρισμό 116 ποικιλιών (Borrego et al., 2000). Μελετήθηκαν από την κεντρική και βόρεια Ιταλία 53 δείγματα από λευκές και κόκκινες ποικιλίες της αμπέλου, που επιλεγθήκαν λόγω της γεωγραφικής κατανομής ή των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους (Filippetti et al., 2000), καθώς επίσης παρουσιάστηκε και μια μέθοδος που βασίζεται στο μικροδορυφορικό DNA, για τον έλεγχο της ταυτότητας 26 δειγμάτων από γλεύκος σταφυλιών (Faria, 2000). Στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκε μελέτη για τη διάκριση 50 οινοποιήσιμων και επιτραπέζιων ελληνικών ποικιλιών (Lefort & Roubelakis-Angelakis, 2001). Την ίδια περίοδο επιβεβαιώθηκαν 16 από τις 31 υποτιθέμενες συνώνυμες οινοποιήσιμες ποικιλίες της αμπέλου που καλλιεργούνται στη Γαλλία και τη βορειοδυτική Ιταλία (Schneider et al., 2001), καθώς και των συνώνυμων της ομάδας Schiave ποικιλιών που καλλιεργούνται στις νότιες και βόρειες πλαγιές των Ανατολικών Άλπεων (Fossati et al., 2001), των συνώνυμων Μοσχάτων (Crespan & Milani, 2001), ενώ παρουσιάστηκε και η γενετική διαφοροποίηση των 20 πιο συχνά καλλιεργούμενων οινοποιήσιμων ποικιλιών αμπέλου της Χιλής (Narvaez et al., 2001).

Διερευνήθηκε η γενετική μεταβλητότητα της ποικιλίας Picolit, η οποία είναι μια αρχαία γηγενή ποικιλία θηλυκών λουλουδιών με λευκή ράγα, που συναντάται στην περιοχή Friuli Venezia Giulia στη Βορειοανατολική Ιταλία (Zulini et al., 2002). Πραγματοποιήθηκε έρευνα για την διάκριση συνώνυμων ποικιλιών από 38 οινοποιήσιμες και επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην περιοχή Apulia της Νοτίου Ιταλίας (Zulini et al., 2002), καθώς και για τις συνώνυμες και ομώνυμες ποικιλίες από 39 δείγματα προερχόμενα από δυο γενετικές τράπεζες αμπέλου της Ισπανίας (Ulanovsky et al., 2002), ενώ μελετήθηκε και η γενετική σχέση μεταξύ των ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στις περιοχές Piedmont και Liguria στη Βορειοδυτική Ιταλία (Schneider et al., 2002). Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός 62 δειγμάτων από ποικιλίες αμπέλου του Ιράν και των Η.Π.Α με τη βοήθεια μικροδορυφορικών δεικτών (Fatahi et al., 2003), καθώς επίσης αναλύθηκαν οι αρχαίες και στενά συγγενείς ποικιλίες αμπέλου από τις Άλπεις, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι

ποικιλίες Cornalin από την Ελβετία και την Ιταλία είναι διαφορετικές και ότι η ποικιλία Humagne Rouge είναι πανομοιότυπη με την ποικιλία Cornalin από την κοιλάδα της Aosta (Vouillamoz et al., 2003). Μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία των γαλλο-αμερικανικών υβριδίων που καλλιεργούνται στη Βόρεια Αμερική (Pollefeys & Bousquet, 2003), ενώ με τη βοήθεια της μεθόδου πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση καθώς και ο προσδιορισμός της καταγωγής των δύο ποικιλιών της αμπέλου Lafnetscha και Himbertscha που καλλιεργούνται στη Δυτικές Άλπεις της Ελβετίας (Vouillamoz et al., 2004). Ταυτοποιήθηκε το 98,6% από 210 τυφλά δείγματα ποικιλιών αμπέλου προερχόμενα από την περιοχή El Bierzo της Ισπανίας (Nunez et al., 2004), ενώ την ίδια χρονική περίοδο πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό να διερευνηθεί η συγκρισιμότητα του μικροδορυφορικού προφίλ που λαμβάνονται σε διαφορετικά εργαστήρια ανά τον κόσμο, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα μικροδορυφορικά δεδομένα που παράγονται σε διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικά πρωτόκολλα και συνθήκες μπορούν να συγκριθούν και είναι κατάλληλα για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό των ποικιλιών (This et al., 2004).

Στα μέσα της δεκαετίας αναλύθηκαν 101 δείγματα γονοτύπων αμπέλου με τη βοήθεια 6 μικροδορυφορικών τόπων καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα 97 ήταν από γηγενείς ποικιλίες αμπέλου της περιοχής της Λεκάνης των Καρπαθίων και 4 ήταν διεθνείς ποικιλίες αμπέλου (Halasz et al., 2005). Πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση παραδοσιακών ποικιλιών της Ουγγαρίας και ποικιλιών αμπέλου προερχόμενες από την περιοχή της Λεκάνης των Καρπαθίων (Bisztray et al., 2005), ενώ έγινε προσπάθεια να βρεθεί η γενετική καταγωγή της ποικιλίας Cynthiana ή Norton που θεωρείται μια από τις καλύτερες αμερικάνικες ποικιλίες σταφυλιού, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να προέρχεται από το είδος *Vitis aestivalis*, Machaux (Parker et al., 2005). Επίσης έγινε έρευνα για τον εντοπισμό και τον προσδιορισμό της προέλευσης της γενετικής μεταβλητότητας μιας ομάδας επίσημων κλώνων της ποικιλίας Sangiovese καθώς και για τον εντοπισμό διαφορών και πιθανών οικογενειακών σχέσεων μεταξύ 34 βιοτύπων τύπου Sangiovese (Filippetti et al., 2005). Πραγματοποιήθηκε έρευνα που ανέλυσε τη γενετική μεταβλητότητα και τη συγγένεια φυτών της αμπέλου, από μια συλλογή 25 γηγενών ποικιλιών από το Περού και την Αργεντινή (Martinez et al., 2006). Προσδιορίστηκε η γενετική ποικιλομορφία και η σχέση μεταξύ φυτών της ποικιλίας Tintilia προερχόμενα από τη Νότιο Ιταλία και από την Ισπανία και άλλων ποικιλιών με παρόμοιο όνομα ή μορφολογικά χαρακτηριστικά, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι ποικιλίες Tintilia και Bonale grande είναι διαφορετικές, παρόλο που έχουν αναφερθεί στο *Vitis international Variety Catalogue* ως πανομοιότυπες (Reale et al., 2006). Επίσης

πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας της ποικιλίας Nero d' Avola από την Σικελία (Riccardi et al., 2006), καθώς και η γενεαλογική ανάλυση πολλών ποικιλιών της Ουγγαρίας (Kiss et al., 2006) και 51 ποικιλιών της Τσεχικής Δημοκρατίας (Moravcova et al., 2006). Πραγματοποιήθηκε έρευνα για τις ποικιλίες που ονομάστηκαν Lambruschi στην περιοχή Piedmont της Βορειοδυτικής Ιταλίας και τη σχέση τους με τη ποικιλία Lambruschi από την Emilia Romagna (Torello Marinoni et al., 2006) καθώς και για 17 επιτραπέζιες ποικιλίες της Νοτίου Αφρικής (Prins et al., 2006). Ενώ μελετήθηκε και η ενδοποικιλιακή γενετική διαφοροποίηση που σχετίζεται με τη γεωγραφική διασπορά του αγενώς πολλαπλασιαζόμενου είδους της αμπέλου Cabernet Sauvignon, μέσω των 59 κλώνων του που ελήφθησαν από 7 χώρες (Moncada et al., 2006). Επίσης πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό να διευκρινιστούν οι σχέσεις που υπάρχουν μεταξύ ομώνυμων ποικιλιών της αμπέλου και οι οποίες προέρχονται από διάφορες περιοχές της Τουρκίας (Karatas et al., 2007), 21 υποκειμένων αμπέλου από την Ινδία (Upadhyay et al., 2007), ποικιλιών αμπέλου της Σαρδηνίας (De Mattia et al., 2007), ενώ συγκρίθηκαν και ποικιλίες αμπέλου από την περιοχή Urla της Τουρκίας με μαύρες ποικιλίες από την Περιοχή του Αιγαίου (Korkmaz, 2007), καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε έρευνα και για την γενεαλογική προέλευση ποικιλιών οι οποίες προέρχονται από την Λεκάνη των Καρπαθίων (Galbacs et al., 2007).

Προς το τέλος της δεκαετίας πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ 32 φυτών της αμπέλου του είδους *Vitis vinifera* και του *Vitis champiani*, προερχόμενα από διαφορετικές περιοχές της Ινδίας (Lal et al., 2008). Αναλύθηκε η ταυτότητα, η γενεαλογική προέλευση και η γενετική ποικιλομορφία της καλλιεργούμενης ποικιλίας *Muscadinia rotundifolia* Small της Βορείου Αμερικής (Riaz et al., 2008). Πραγματοποιήθηκε η γενετική σύγκριση μεταξύ των ποικιλιών τύπου Bonarda, οι οποίες καλλιεργούνται στην Αργεντινή, την Ιταλία και την Γαλλία (Martinez et al., 2008), ενώ πραγματοποιήθηκε και ανάλυση μικροδορυφορικού DNA για την απόδοση γονιδιωματικής ταυτότητας των τοπικών ποικιλιών της αμπέλου *Vitis vinifera* των Αγίων Τόπων (Klein et al., 2008) και του υποκειμένου της αμπέλου Fercal (Laucou et al., 2008). Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης και για την μελέτη ανίχνευσης της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ 10 κλώνων της επιτραπέζιας ποικιλίας Keshmeshi που καλλιεργείται στο Ιράν (Baneh et al., 2009), του Ουγγρικού αμπελώνα (Jahnke et al., 2009), καθώς και ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στη Βραζιλία (Leao et al., 2009), ενώ προσδιορίστηκε η καταγωγή και η γενετική ποικιλομορφία ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στην Τυνησία (Zoghلامي et al., 2009) και 54

οινοποιήσιμων ποικιλιών από την ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου της Τουρκίας (Tangolar et al., 2009).

Με τη νέα δεκαετία του 2010 πραγματοποιήθηκε έρευνα για τη διάκριση μεταξύ 28 αρχαίων κλώνων της ποικιλίας Tempranillo, μιας από τις πιο ευρέως καλλιεργούμενες ποικιλίες της Ισπανίας (Carcamo et al., 2010), αναλύθηκαν 82 δείγματα αμπέλου από διάφορες περιοχές της Σικελίας στην Ιταλία (Carimi et al., 2010) και της Ρουμανίας (Pamfil et al., 2010), ενώ αναγνωρίστηκαν και διαφοροποιήθηκαν 7 ποικιλίες αμπέλου της Ρουμανίας μέσω δείγματος DNA που προήλθε από φύλλα αλλά και από το μονοποικιλιακό γλέυκος τους (Harta et al., 2010). Στην Πορτογαλία διακρίθηκαν με τη χρήση της μεθόδου 313 ποικιλίες, που είναι επίσημα εγκεκριμένες για παραγωγή κρασιού (Veloso et al., 2010), καθώς επίσης αναλύθηκε η γενετική ποικιλομορφία και προσδιορίστηκε η γενεαλογική καταγωγή 1148 δειγμάτων αμπέλου, προερχόμενα από το εθνικό αποθετήριο του CRA-VIT του Conegliano της Ιταλίας, αποκαλύπτοντας 200 ομάδες συνωνύμων (Ciriani et al., 2010), όπως και τεσσάρων καλλιεργούμενων ποικιλιών της αμπέλου της Ουκρανίας (Goryslavets et al., 2010). Πραγματοποιήθηκε επίσης έρευνα για να προσδιοριστεί η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ 55 ποικιλιών της αμπέλου, προερχόμενες από 6 διαφορετικές περιοχές της Νοτιοανατολικής Ανατολίας στη Τουρκία (Boz et al., 2011), καθώς και άγριων ειδών της αμπέλου *Vitis vinifera* subsp. *Sylvestris* της Ανατολίας (Ergul et al., 2011), ενώ μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία από 293 δείγματα αμπέλου προερχόμενα από την περιοχή Asturias της Βορείου Ισπανίας (Moreno-Sanz et al., 2011), 47 δειγμάτων από επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου, προερχόμενα από τη γενετική τράπεζα Embrapa Semiarido της Βραζιλίας (Leao & Motoike, 2011) και 30 ποικιλιών αμπέλου από την Κορέα (Cho et al., 2011). Αναλύθηκε η γενετική ποικιλομορφία 60 δειγμάτων φυτών της αμπέλου, που αντιπροσώπευαν 4 καλλιεργούμενους πληθυσμούς της ποικιλίας Kabarcik που βρίσκονταν κατά μήκος της κλίσης υψομέτρου της κοιλάδας Coruh, στη Βορειοανατολική Τουρκία (Agar et al., 2012), 23 υβριδίων αμπέλου που δημιουργήθηκαν στο Ataturk Horticultural Central Research Institute ή στο Tekirdag Viticulture Research Institute (Arif et al., 2012) και 25 γηγενών ποικιλιών της Νοτιοανατολικής Ανατολίας της Τουρκίας (Hizarci et al., 2012). Επίσης πραγματοποιήθηκε και μελέτη για ένα σύνολο ποικιλιών της αμπέλου από τη Βοσνία και Ερζεγοβίνη, με σκοπό να εκτιμηθεί η πραγματική ταυτότητα των ποικιλιών, η γενετική ποικιλομορφία και η γενετική σχέση μεταξύ τους (Tomic et al., 2012). Πραγματοποιήθηκε γενετική ιχνηλάτιση γλευκών και κρασιών που προέρχονται από την ποικιλία Moscato bianco της περιοχής Piedmont της Βορειοδυτικής Ιταλίας, όπου χρησιμοποιείται στην παραγωγή των δύο

διάσημων μονοποικιλιακών αφρωδών οίνων Asti Spumante και Moscato d'Asti (Boccacci et al., 2012). Πραγματοποιήθηκε έρευνα για να προσδιορισθεί η γενετική συγγένεια μεταξύ τοπικών ποικιλιών από διάφορες περιοχές της Ανατολίας και 22 ποικιλιών προερχόμενες από το National Grapevine Germplasm του Ινστιτούτου Αμπελουργίας της Τουρκίας (Yilancioglu et al., 2013), ενώ στο Ιράν αναλύθηκε η γενετική δομή και η ποικιλομορφία 31 επιτραπέζιων ποικιλιών αμπέλου, 22 οινοποιήσιμων ποικιλιών, 6 ποικιλιών σταφίδας, 2 ποικιλιών σταφίδας για κρασί και 1 επιτραπέζια ποικιλία αμπέλου για κρασί (Doulati-Baneh et al., 2013). Παρόμοιες μελέτες ολοκληρώθηκαν στην Ινδία σε 27 δείγματα αμπέλου, προερχόμενα από επιτραπέζιες ποικιλίες, ποικιλίες οινοποίησης και υποκειμένων της αμπέλου (Singh et al., 2013), στην Ιταλία σε 2273 δείγματα που περιλάμβαναν εξημερωμένες ποικιλίες της αμπέλου *Vitis vinifera* spp. *sativa*, του άγριου είδους *Vitis sylvestris*, μεσοειδικές υβριδικές ποικιλίες και υποκείμενα (Emanuelli et al., 2013). Αναλύθηκε στη Γερμανία η γενετική ποικιλομορφία 30 ποικιλιών αμπέλου, όπου ανιχνεύτηκε η εσφαλμένη ταυτοποίηση της ποικιλίας Sauvignonasse (Fruilano) ως Sauvignon blanc αλλά η μέθοδος δεν διαφοροποίησε τους μεταλλαγμένους κλώνους: Gutedel, Roter Klon H, Gutedel, Weiber Klon We 1-6, Riesling, Roter και Riesling, Weiber Klon We 158 (Xuan et al., 2014). Την ίδια περίοδο αναλύθηκε η ποικιλομορφία 51 δειγμάτων αμπέλου, προερχόμενα από την Εθνική Συλλογή Γενετικού Υλικού της Σλοβακίας (Dokupilova et al., 2014), καθώς και 16 τοπικών ποικιλιών αμπέλου της Ουγγαρίας και 11 διεθνών υποτιθέμενων ή αποδεδειγμένων μεταλλάξεων (Bodor et al., 2014). Ενώ έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για την ανάδειξη του γενετικού προφίλ της παραδοσιακής γηγενούς ποικιλίας Vernaccia di San Gimignano και του ομώνυμου κρασιού, που καλλιεργείται και παράγεται παράλληλα σε μια μικρή περιοχή της Τοσκάνης μεταξύ της Σιένα, της Πίζας και της Φλωρεντίας (Scali et al., 2014).

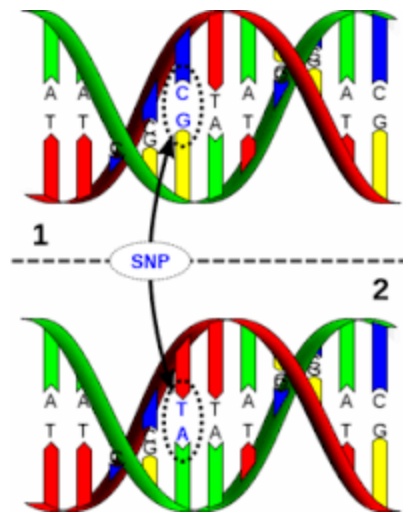
Από τα μέσα της δεκαετίας 2010 έως τις μέρες μας εφαρμόστηκε η μέθοδος όπου αναλύθηκε η γενετική ποικιλομορφία και η γενετική σχέση μεταξύ 36 γηγενών ποικιλιών της αμπέλου από την Τουρκία και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις ποικιλίες αναφοράς Cabernet Sauvignon και Merlot, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν γενετικές διαφορές μεταξύ των γηγενών ποικιλιών και των ποικιλιών αναφοράς, καθώς επίσης ανιχνεύθηκαν ομώνυμες και συνώνυμες γηγενείς ποικιλίες (Isci & Dilli, 2015). Στη Σλοβενία μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία της γηγενούς κόκκινης οινοποιήσιμης ποικιλίας της αμπέλου Refosk (Hlagnik et al., 2015). Από την Λεκάνη των Καρπαθίων αναλύθηκαν 115 δείγματα της αμπέλου, συμπεριλαμβανομένων και 88 αρχαίων ποικιλιών *Vitis vinifera* L., όπου διαπιστώθηκε γενετική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών Leanyka και Leanyszolo, που

θεωρούνταν προηγουμένως ίδιες (Galbacs et al., 2015), ενώ αναλύθηκε και η γενετική ποικιλομορφία 9 κλώνων της ποικιλίας αμπέλου Tannat (Techera et al., 2015). Πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό να αξιολογηθεί η γενετική ποικιλομορφία και η συγγένεια μεταξύ 8 γηγενών ποικιλιών αμπέλου της Ανατολικής Τουρκίας και 2 αναγνωρίσιμων ποικιλιών Cabernet Sauvignon και Merlot (Eyduran et al., 2016). Στην Αίγυπτο πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση 7 ποικιλιών αμπέλου καθώς μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία τους (Ibrahim et al., 2016), όπως ανάλογη έρευνα πραγματοποιήθηκε σε 29 ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ταϊλάνδη (Sripolhaen et al., 2016). Ενώ έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 338 δείγματα φυτών αμπέλου προερχόμενα από 24 χώρες και τα οποία φυτεύτηκαν στο Penedes της Ισπανίας, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι 28 από αυτά παρουσιάζονται για πρώτη φορά και 26 θεωρούνται νέα συνώνυμα (Marsal et al., 2016). Άλλη έρευνα έδειξε ότι η αμερικάνικη ποικιλία της αμπέλου Semillion, είναι ο ένας πρόγονος από τους δύο των ποικιλιών Catawba και Concord (Huber et al., 2016). Πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό να χαρακτηριστούν οι γονότυποι των ποικιλιών της αμπέλου καθώς και των υβριδίων που συνήθως καλλιεργούνται στην Ινδία (Rao et al., 2017). Στην Κίνα μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ 61 γηγενών ποικιλιών της αμπέλου και 33 ξένων ποικιλιών, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι μέρος των κινεζικών τοπικών ποικιλιών έχουν στενή σχέση με τις ξένες ποικιλίες (Li et al., 2017). Μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία σε 125 δείγματα από ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην Νότιο Αφρική, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη συνωνύμων και ομωνύμων ποικιλιών (Van Heerden et al., 2018), καθώς και σε 34 ποικιλίες αμπέλου προερχόμενες από το National Germplasm Resources, Taigu Grape Nursery της Κίνας (Dong et al., 2018), καθώς επίσης και σε 32 δείγματα από 23 ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην επαρχία Tartous της Συρίας (Dauob et al., 2018). Ενώ προσδιορίστηκε η γενετική σχέση μεταξύ των 2 υποκειμένων της αμπέλου, Black Herbemont και Jacquez, που καλλιεργούνται στην Νότιο Αφρική (Rodrigues et al., 2018). Πραγματοποιήθηκε μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας και την ταυτοποίηση μεταξύ των 43 δειγμάτων από ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην επαρχία Diyarbakir της Τουρκίας και των ποικιλιών Cabernet Sauvignon και Merlot (Karatas et al., 2019). Την ίδια περίοδο παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε μεταξύ 34 ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στο Ιράν και τεσσάρων Ιταλικών ποικιλιών (Khadivi et al., 2019) και μεταξύ 29 τοπικών ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στην Τουρκία και τριών ξένων ποικιλιών (Isci, 2019). Επίσης πραγματοποιήθηκε γενεαλογική ανάλυση και προσδιορισμός της γενετικής ποικιλομορφίας 190 δειγμάτων της ποικιλίας Muscadine του είδους *Vitis rotundifolia*, που καλλιεργείται στη Βόρεια Αμερική

(Cao, 2019) και άλλων non-vinifera ποικιλιών και υποκειμένων, που διατηρούνται στο Πανεπιστήμιο του Μιλάνου της Ιταλίας (Migliaro et al., 2019). Μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ ομώνυμων και συνώνυμων ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργούνται στη Νοτιοανατολική Τουρκία (Karatas, 2019), καθώς και 30 δειγμάτων ποικιλιών της αμπέλου προερχόμενα από την περιοχή Rotohar του Πακιστάν (Akram et al., 2019). Πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και αναλύθηκε η γενετική ποικιλομορφία 88 ποικιλιών της αμπέλου, που καλλιεργούνται στην Κεντρική Ανατολία, ανιχνεύοντας συνώνυμες και ομώνυμες ποικιλίες και με τις καλλιεργούμενες ποικιλίες να είναι γενετικά κοντινές αλλά σχετικά διακριτές από τα άγρια και ευρωπαϊκά αμπέλια (Yilmaz et al., 2020). Παρόμοια έρευνα πραγματοποιήθηκε σε 163 δείγματα από 37 οινοποιήσιμες και 7 επιτραπέζιες ποικιλίες αμπέλου, που καλλιεργούνται στο νησί της Κρήτης στην Ελλάδα (Bibi et al., 2020). Την ίδια περίοδο πραγματοποιήθηκε γενετική διάκριση, ταυτοποίηση και γενεαλογική ανάλυση σε 99 δείγματα από την ποικιλία σταφυλιού της Βορείου Αμερικής Muscadine του είδους *Vitis rotundifolia* (Cao et al., 2020), καθώς και σε 212 δείγματα από ποικιλίες του Κροατικού αμπελώνα (Zulj Mihaljevic et al., 2020), και σε 25 τοπικές ποικιλίες που καλλιεργούνται στην περιοχή Qazvin στο Ιράν (Taheri & Darzi Ramandi, 2020). Ερευνήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ τοπικών ποικιλιών αμπέλου της Ελλάδας και της Βουλγαρίας (Paparetrou et al., 2020), 128 δειγμάτων από ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται στην περιοχή της Apulia στη Νοτίου Ιταλίας (Miazzi et al., 2020), ενώ μελετήθηκαν και τοπικές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου, που διατηρούνταν σε αρχαίους αμπελώνες της περιοχής Axarquía στη Μάλαγα της Ισπανίας (Jimenez-Cantizano et al., 2020). Ενώ το 2021 με την έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Νότιο Αφρική προσδιορίστηκε ο δεύτερος γονέας της ποικιλίας της αμπέλου Cabernet labrusco, ο οποίος συμμετείχε στη διασταύρωση με τη γύρη και είναι η ποικιλία Danugue noir, ενώ ο άλλος γνωστός γονέας προέρχεται από σπορόφυτο της ποικιλίας Cabernet sauvignon (Rodrigues, 2021). Την ίδια χρονιά πραγματοποιήθηκε έρευνα σε 23 δείγματα από άγρια αμπέλια *Vitis vinifera* spp. *sylvestris*, προερχόμενα από την περιοχή Yusufeli της Βορειοανατολικής Τουρκίας κοντά στον Καύκασο, με σκοπό να προσδιοριστεί η γενετική ποικιλομορφία και η γενεαλογική σχέση συγγένειας μεταξύ τους (Kupe et al., 2021). Επίσης μελετήθηκαν 100 δείγματα προερχόμενα από την Κίνα, τα οποία περιλάμβαναν 23 ποικιλίες από τα άγρια φυτά αμπέλου *Vitis* της Κίνας, 18 ποικιλίες της αμπέλου *Vitis vinifera* και τα 5 Βορειοαμερικανικά είδη *V. girdiana*, *V. monticola*, *V. acerifolia* και *V. Riparia* (Li et al., 2021). Ενώ μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία και η γενεαλογική προέλευση ποικιλιών της αμπέλου προερχόμενες από τον αμπελώνα της Αρμενίας (Margaryan et al., 2021).

5.3.2.2 Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί – Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Οι παραλλαγές μεμονωμένων νουκλεοτιδίων στην αλληλούχιση του γονιδιώματος ατόμων ενός πληθυσμού είναι γνωστές ως SNP, αποτελούν τους πιο άφθονους μοριακούς δείκτες στο γονιδίωμα και είναι ευρέως κατανεμημένοι σε όλα τα γονιδιώματα, κυρίως στις μη κωδικές περιοχές, με την εμφάνιση και κατανομή τους να ποικίλλει μεταξύ των ειδών (Agarwal et al, 2008). Η ταυτοποίηση ενός τέτοιου πολυμορφισμού σε μια ομάδα ατόμων ενός πληθυσμού υποδηλώνει πως μάλλον θα υπάρχει σε όλα τα άτομα του πληθυσμού, αυτό έχει ως αποτέλεσμα με την ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος του DNA με PCR και ακολούθως αλληλούχιση, να μπορεί να βρεθεί και να καταγραφεί ο πολυμορφισμός (Χατζόπουλος, 2021).



Εικόνα 5.6: Σχηματική παραλλαγή αλληλουχίας DNA με δυο αλληλόμορφα C και T (Πηγή: <https://isogg.org>)

5.3.2.2.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Οι δείκτες αυτοί είναι συγκυρίαρχοι, έχουν τρομακτική διακριτική ικανότητα και δεν απαιτούν τη πλήρη αλληλούχιση ενός οργανισμού, ατόμου, ποικιλίας, ενώ η μέθοδος αυτή θεωρείται πλέον απλή, ταχεία, με χαμηλό κόστος, λόγω της τεχνολογικής προόδου που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια (Χατζόπουλος, 2021). Απαιτεί υψηλής ποιότητας και μικρή ποσότητα DNA μικρότερη από 0,05μg και εξειδικευμένο προσωπικό (Jiang, 2013), ενώ είναι κατάλληλη για αυτοματοποίηση, χρησιμοποιείται για άμεση ταυτοποίηση ποικιλιών και λεπτομερή σχεδιασμό γενετικών χαρτών (Agarwal et al., 2008) και ανιχνεύει τη μικρότερη μονάδα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (Rafalski, 2002).

5.3.2.2.2 Εφαρμογή της μεθόδου SNP

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε το 2003 για να εκτιμηθεί ο γονότυπος και η συχνότητα εμφάνισης μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) στις 6 ποικιλίες της αμπέλου *Vitis vinifera*, Lemberger, Chardonnay, Merlot, Pinot Gris, Pinot Blanc, Sauvignon Blanc και στα 4 Αμερικανικά είδη *V. acerifolia*, *V. cinerea*, *V. labrusca* και *V. riparia*, έχοντας ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του πολυμορφισμού σε κάθε γονίδιο που εξετάστηκε, ενώ παρατηρήθηκε συχνότητα εμφάνισης 1 SNP ανά 34,9bs στις 6 ποικιλίες της αμπέλου (Owens, 2003). Με τη βοήθεια της μεθόδου SNP και της SSR, δημιουργήθηκε ένας ολοκληρωμένος χάρτης γονιδίων μεταξύ των πέντε ποικιλιών αμπέλου Syrah, Pinot Noir, Grenache, Riesling και Cabernet Sauvignon (Vezzuli et al., 2009). Ενώ πραγματοποιήθηκε η γενετική αξιολόγηση 16 επιτραπέζιων ποικιλιών της αμπέλου, προερχόμενες από το Zhengzhou Pomology Institute, Zhengzhou της Κίνας (Dong et al., 2010). Πραγματοποιήθηκε γενετική ταυτοποίηση μέσω της ανάλυσης 1342 δειγμάτων φυτών της αμπέλου, προερχόμενα από 15 ποικιλίες (Cabezas et al., 2011) και εντοπίστηκαν οι γενετικές σχέσεις της ποικιλίας της αμπέλου Cayetana Blanca, που είναι ιδιαίτερος διαδεδομένη στην Ιβηρική Χερσόνησο, με άλλες ιβηρικές και μεσογειακές ποικιλίες (Zinelabidine et al., 2012). Την ίδια περίοδο ταυτοποιήθηκαν οι ποικιλίες της αμπέλου Albillo Mayor και Benedicto με τη βοήθεια της SSR μεθόδου, ως τους γονείς της Ισπανικής ποικιλίας της αμπέλου Tempranillo (Ibanez et al., 2012), ενώ προσδιορίστηκε η γενετική ποικιλομορφία 2273 δειγμάτων, προερχόμενα από εξημερωμένα φυτά της αμπέλου *V. vinifera ssp. sativa*, από άγρια φυτά *V. vinifera spp. sylvestris*, από υποκείμενα και μεσοειδικά υβρίδια της αμπέλου (Emanuelli et al., 2013). Στην Τυνησία μελετήθηκε η γενετική σχέση μεταξύ 25 γηγενών ποικιλιών της αμπέλου *V. vinifera L. subsp. sativa* Hegi και 24 άγριων δειγμάτων *V. vinifera L. subsp. sylvestris* (Gmelin) Hegi (Riahi et al., 2013).

Μελετήθηκε επίσης η γενετική ποικιλομορφία και η καταγωγή 29 άγριων και 28 καλλιεργούμενων ποικιλιών της αμπέλου, που διατηρούνται στο αποθετήριο Arid Land Institute της Medenine, της Τυνησίας (Ghaffari et al., 2014), ενώ παρόμοια έρευνα πραγματοποιήθηκε σε 64 καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπέλου και 14 άγριων δειγμάτων *V. sylvestris* που προέρχονται από την Αρμενία (Dallakyan et al., 2014).

Το 2015 πραγματοποιήθηκε η διάκριση μεταξύ ποικιλιών της αμπέλου μέσω των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ανθοκυανίνης, διακρίνοντας 18 διαφορετικούς γονότυπους από 22 ποικιλίες της αμπέλου (Pereira et al., 2015), ενώ

πραγματοποιήθηκε και διάκριση μεταξύ 42 καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου *V. vinifera sativa* και 26 άγριων δειγμάτων που ανήκουν στο είδος *V. sylvestris*, προερχόμενα από την Γεωργία (De Lorenzis et al., 2015). Ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έρευνα στην Πορτογαλία για την ταυτοποίηση συνωνύμων και ομωνύμων ποικιλιών αμπέλου, από ένα σύνολο 288 δειγμάτων περιλαμβανομένων και 27 άγριων φυτών αμπέλου, προερχόμενα από την Portuguese National Ampelographic Collection (Cunha et al., 2016). Την ίδια χρονιά με τη χρήση της μεθόδου, από 101 κλώνους που ανήκουν σε 21 βιότυπους από τις 10 περισσότερο καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπέλου της Σικελίας, μελετήθηκε η γενετική μεταβλητότητα μεταξύ των ποικιλιών και των βιότυπων της ίδιας ποικιλίας αμπέλου, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί διάκριση μεταξύ των βιοτύπων (Mercati et al., 2016). Επίσης μελετήθηκε στη συνέχεια η γενετική ποικιλομορφία των τεσσάρων ποικιλιών αμπέλου Bonvale sardo, Cannonau, Carignano και Vermentino, οι οποίες καλλιεργούνται ευρέως στη Σαρδηνία (Mercenaro et al., 2017). Την ίδια περίοδο, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η ενδοποικιλιακή ποικιλομορφία σε 15 κλώνους της ποικιλίας Aglianico, προερχόμενοι από τις περιοχές Taburno, Taurasi και Vulture, καθώς και 21 κλώνων της ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας, προερχόμενοι από τη Γαλλία, την Ελλάδα, την Ιταλία και την Ισπανία, χωρίς όμως να αναδείξει έναν πολυμορφισμό επαρκή για τη διάκριση μεταξύ των βιοτύπων της ίδιας ποικιλίας (De Lorenzis et al., 2017). Ταυτοποιήθηκαν ποικιλίες της αμπέλου *V. vinifera* μέσω της ανίχνευσης SNPs στα γονίδια *F3H* και *LDOX*, τα οποία παίρνουν μέρος στο σχηματισμό της ανθοκυανίνης (Gomes et al., 2018). Επίσης με τη βοήθεια της μεθόδου ταξινομήθηκαν 20 μη αναγνωρισμένα δείγματα φυτών αμπέλου και επισημάνθηκαν 28 εσφαλμένες ταυτοποιήσεις φυτών αμπέλου, από 359 δείγματα προερχόμενα από τη συλλογή γενετικού υλικού USDA-ARS της Γενεύης, Νέας Υόρκης και του Davis στη Καλιφόρνια (Klein et al., 2018). Ενώ το 2019 στην εργασία των Barías et al (2019) παρουσιάστηκε ένας βιοαισθητήρας για την διάκριση ποικιλιών *V. vinifera* από δείγματα DNA φύλλων, γλεύκους και κρασιού, με βάση πληροφορίες SNP που παρουσιάζονται στο γονίδιο *F3H* της αμπέλου. Την ίδια χρονιά μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ ποικιλιών της αμπέλου από το Ιράν και ορισμένων ευρωπαϊκών ποικιλιών (Ebadi et al., 2019). Επίσης η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της φυλογένεσης και της πληθυσμιακής δομής 64 δειγμάτων άγριας ευρωπαϊκής *Vitis sylvestris*, 44 δειγμάτων 26 άγριων ειδών της Ανατολικής Ασίας, 35 δειγμάτων προερχόμενα από 21 άγρια είδη της Βορείου Αμερικής, 200 δειγμάτων προερχόμενα από 177 καλλιεργούμενες ποικιλίες *V. Vinifera* καθώς και 109 δειγμάτων από 69 ποικιλίες διαειδικών υβριδίων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποκάλυψαν ότι υπάρχουν διακριτά μονοφυλετικά είδη για τα

άγρια είδη της Βορείου Αμερικής και της Ανατολικής Ασίας, καθώς τα άγρια ευρωπαϊκά είδη και τις καλλιεργούμενες ποικιλίες (Liang et al., 2019). Επίσης με τη χρήση της μεθόδου ταυτοποιήθηκαν δείγματα γλευκών και κρασιών τις ποικιλίας Nebbiolo (Boccacci et al., 2020)), ενώ μελετήθηκε και η γενετική σχέση μεταξύ 231 και 27 δειγμάτων από καλλιεργούμενες ποικιλίες αμπέλου της Πορτογαλίας και από το άγριο είδος *V. sylvestris* αντίστοιχα, τα οποία συλλέχθηκαν από την Εθνική Αμπελογραφική Συλλογή της Πορτογαλίας (PRT051) (Cunha et al., 2020). Την ίδια περίοδο μελετήθηκε η γενετική ποικιλομορφία του αμπελώνα του Μαυροβουνίου, μέσα από την ανάλυση 419 δειγμάτων προερχόμενα από διάφορες περιοχές της χώρας και από 57 τοπικές ποικιλίες που διατηρούνται σε μια συλλογή αμπέλου, καταλήγοντας σε 144 διαφορετικά γενετικά προφίλ (Maras et al., 2020). Ενώ μελετήθηκε και η γενετική ποικιλομορφία κλώνων της ποικιλίας αμπέλου Melbec με τη χρήση μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού, όπου διακρίθηκαν οι κλώνοι μεταξύ τους (Calderon et al., 2021). Πραγματοποιήθηκε επίσης διάκριση μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων της επιτραπέζιας ποικιλίας αμπέλου Munake, η οποία καλλιεργείται στην Κίνα (Zhong et al., 2021). Ενώ την ίδια περίοδο πραγματοποιήθηκε έρευνα όπου μελετήθηκαν 9 ποικιλίες αμπέλου από τη Ρωσία και συγκρίθηκαν με την ευρωπαϊκή ποικιλία Muscat Hamburg, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι 7 από τις ποικιλίες της Ρωσίας, με επικεφαλής την ποικιλία Krasnostop Zolotovskiy δεν σχετίζονται άμεσα με την περιοχή του Καυκάσου και της Ευρώπης (Fedosov et al., 2021).

6 Συμπεράσματα & Συζήτηση

Από την περιγραφή όλων των παραπάνω μπορούμε να καταλήξουμε στα παρακάτω συγκριτικά αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζονται σε μορφή πινάκων. Η κάθε μέθοδος ταυτοποίησης των φυτών της αμπέλου βασίζεται σε κάποια χαρακτηριστικά με τα οποία πραγματοποιείται και η ταξινόμηση τους, έχει διαφορετική ικανότητα διάκρισης μεταξύ φυτών της αμπέλου από: Στενά Συγγενικών Ποικιλιών, Διαφορετικών Ποικιλιών, Ποικιλίας & Κλώνων, Κλώνων της ίδιας Ποικιλίας, Υποκειμένων και Μεταλλάξεων. Ορισμένες από τις μεθόδους μπορούν να διακρίνουν την γονεϊκή σχέση ποικιλιών και υβριδίων, καθώς και να ταυτοποιήσουν ποικιλίες της αμπέλου από το παραγόμενο γλεύκος ή κρασί, καθώς και να διακρίνουν την ετεροζυγωτία.

Οι μοριακοί μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το κόστος, την ποιότητα και ποσότητα του απαιτούμενου DNA, το χρόνο διεξαγωγής της ανάλυσης, το επίπεδο πολυμορφισμού καθώς και τη γνώση της αλληλουχίας

Πίνακας 6.1. Σύγκριση διαφόρων χαρακτηριστικών των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης

Μέθοδος	Χαρακτηριστικά Μοριακών μεθόδων		
	Γνώση Αλληλουχίας	Χρονοβόρα Διαδικασία	Επίπεδο Πολυμορφισμού
Μοριακή Μέθοδος RFLP	ΟΧΙ	ΥΨΗΛΗ	ΜΕΤΡΙΟ
Μοριακή Μέθοδος RAPD	ΟΧΙ	ΜΙΚΡΗ	ΜΕΤΡΙΟ
Μοριακή Μέθοδος AFLP	ΟΧΙ	ΜΕΤΡΙΑ	ΥΨΗΛΟ
Μοριακή Μέθοδος SSR	ΝΑΙ	ΜΕΤΡΙΑ	ΥΨΗΛΟ
Μοριακή Μέθοδος SNP	ΜΕΡΙΚΗ	ΜΙΚΡΗ	ΥΨΗΛΟ

Καθώς επίσης η κάθε μοριακή μέθοδος χαρακτηρίζεται και από την δυνατότητα αυτοματοποίησης, το εξατομικευμένο προσωπικό, την επαναληψιμότητα και του τρόπου εκδήλωσης του κάθε δείκτη.

Πίνακας 6.2 Σύγκριση χαρακτηριστικών δυσκολίας εφαρμογής των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης

Μέθοδος	Εξατομικευμένο προσωπικό	Αυτοματοποίηση	Τύπος κυριαρχίας	Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων
Μοριακή Μέθοδος RFLP	ΝΑΙ	ΜΕΡΙΚΗ	Συγκυρίαρχο	ΥΨΗΛΗ
Μοριακή Μέθοδος RAPD	ΟΧΙ	ΝΑΙ	Κυρίαρχο	ΧΑΛΗΛΗ
Μοριακή Μέθοδος AFLP	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Κυρίαρχο	ΥΨΗΛΗ
Μοριακή Μέθοδος SSR	ΟΧΙ	ΜΕΡΙΚΗ	Συγκυρίαρχο	ΥΨΗΛΗ
Μοριακή Μέθοδος SNP	ΝΑΙ	ΝΑΙ	Συγκυρίαρχο	ΥΨΗΛΗ

Ο τεράστιος αριθμός ποικιλιών της αμπέλου που καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο, ο μεγάλος αριθμός συνωνύμων και ομωνύμων ονομασιών ποικιλιών της αμπέλου που υπάρχει, η έντονη προσπάθεια βελτίωσης των οινικών προϊόντων και η απαίτηση για παραγωγή και εγκατάσταση σε νέους αμπελώνες πιστοποιημένων φυτών αμπέλου, είναι οι κυριότεροι λόγοι που οδήγησαν στην ανάγκη για διάκριση και ταυτοποίηση των φυτών της αμπέλου (Banilas et al., 2009)

Η αμπελογραφική μέθοδος είναι η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε με σκοπό την ταυτοποίηση των φυτών της αμπέλου, αλλά λόγω της επίδρασης που έχει ο ανθρώπινος και περιβαλλοντικός παράγοντας στην έκφραση των αμπελογραφικών χαρακτηριστικών που μελετούνται και η έλλειψη έμπειρων αμπελογράφων καθιστούν τα αποτελέσματα της μεθόδου μη αξιόπιστα. Λόγω του περιορισμού της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, χωρίς όμως την προϋπόθεση να αντικαταστήσουν την αμπελογραφική μέθοδο, κρίθηκε αναγκαίο να δημιουργηθούν νέες μέθοδοι ταξινόμησης.

Η εμφάνιση της βιοχημικής μεθόδου την δεκαετία του 1970 έλυσε έως ένα σημείο τα παραπάνω προβλήματα που είχαν δημιουργηθεί, μέσω της ανίχνευσης του ενζυμικού πολυμορφισμού των πρωτεϊνών και τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους. Γεγονός το οποίο επισημαίνεται στην περίπτωση της ταυτοποίησης φυτών του υποκειμένου Teleki 5C μέσω του ισοενζύμου της ασπαρτικής αμινοτρανφεράσης (AAT), όπου λανθασμένα έως εκείνη τη στιγμή είχαν αποδοθεί στο υποκείμενο SO4 μέσω αμπελογραφικής περιγραφής λόγω κοινών μορφολογικών χαρακτηριστικών (Walker & Boursiquot, 1992). Επιπλέον μπόρεσαν να διακριθούν 60 υποκείμενα αμπέλου προερχόμενα από τη συλλογή του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας (Walker & Liu), γεγονός που δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί μέσω της αμπελογραφικής περιγραφής, εφόσον δεν υπάρχουν ορατά μέρη του φυτού να παρατηρηθούν. Παρόλα αυτά, τα ισοενζυμικά συστήματα δεν είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν σε όλες τις περιπτώσεις ταυτοποίησης, π.χ το ισοενζυμικό σύστημα εστεράσης και κατεχολικής οξειδάσης μπορεί να διαχωρίσει ποικιλίες αλλά όχι κλώνους μεταξύ τους (Royo et al, 1997), σε αντίθεση με το ισοένζυμο της υπεροξειδάσης (PER) όπου ταυτοποίησε 76 κλώνους από 12 άγρια είδη και εγχώριες ποικιλίες της Κίνας (Zhisheng & Puchao, 1998).

Παράλληλα με την εμφάνιση της βιοχημικής μεθόδου αναπτύχθηκε το πρώτο σύστημα μοριακών δεικτών και συγκεκριμένα του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού – RFLP, το οποίο είχε παρόμοια εφαρμογή με τη βιοχημική μέθοδο. Βασίστηκε στις δύο

τεχνικές της μοριακής βιολογίας την πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και τη μεταφορά του σε μεμβράνες όπου το δεσμευμένο DNA υβριδίζεται με ένα συμπληρωματικό τμήμα DNA κατά Southern. Η μέθοδος αυτή δεν είχε ιδιαίτερη απήχηση μετά την δεκαετία του 1990, παρόλα αυτά επειδή χρησιμοποιεί τμήμα DNA δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον και μπορεί να ταυτοποιεί ποικιλίες της αμπέλου. Συγκεκριμένα το 1991 από το συνολικό DNA που εξήχθη από φύλλα, 8 καλλιιεργειών *Vitis vinifera*, από την ποικιλία Concord και από το υποκείμενο F-3309, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το δενδρόγραμμα όπως προκύπτει από τους RFLP δείκτες συμφωνούσε σχετικά καλά με τη μορφολογική ταξινόμηση των φυτών που αναλύθηκαν (Yamamoto et al, 1991). Ενώ με τη χρήση DNA που προερχόταν από το ξύλο της αμπέλου, ταυτοποιήθηκαν 16 υποκείμενα της (Bourquin et al, 1992). Είναι όμως μια μέθοδος που θεωρείται χρονοβόρα, απαιτεί υψηλής ποιότητας και μεγάλη ποσότητα DNA, καθώς επίσης περιλαμβάνει ακριβά, ραδιενεργά και τοξικά αντιδραστήρια.

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν νέες τεχνικές λιγότερο πολύπλοκες, γρήγορες και απλές, χωρίς να απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, με χαμηλό κόστος, οι οποίες όμως βασίζονται στην PCR όπως οι τεχνικές RAPD, AFLP, SSR και SNP.

Η μέθοδος RAPD γνωστή ως τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον διαχωρισμό μεταξύ καλλιεργήσιμων ποικιλιών και άγριων φυτών της αμπέλου στην Ιταλία (Mulcahy et al, 1995), καθώς και υποκειμένων (Xu et al, 1995). Αλλά δεν μπόρεσε να διακρίνει διαφορές μεταξύ κλώνων Pinot Noir και κλώνων Shyraz από τις αντίστοιχες ποικιλίες (Collins & Symons, 1993).

Η ταυτοποίηση των κλώνων επιτεύχθηκε στη συνέχεια με την μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων – AFLP. Όπως στην περίπτωση της Χιλής όπου προσδιορίστηκαν διαφορές μεταξύ κλώνων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, οι οποίες σχετίζονταν με μορφολογικές διαφορές που παρουσίαζαν οι κλώνοι μεταξύ τους (Narvaez et al, 2000). Ενώ με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η διαφοροποίηση μεταλλάξεων από τη μητρική σειρά αμπέλου (Scott et al, 2000).

Η ταυτοποίηση ειδών, υβριδίων, υποειδών και ποικιλιών συνεχίστηκε με τη χρήση της μεθόδου των μικροδορυφόρων - SSR ή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Lamboey et al., 1995), καθώς επίσης και η διαφοροποίηση μεταξύ κλώνων και της ίδιας ποικιλίας Sangiovese (Vignani et al., 1996). Όμως η μέθοδος αυτή δεν μπόρεσε να διαχωρίσει τους μεταλλαγμένους κλώνους Gutedel, Roter Klön H, Gutedel, Weiber Klön We 1-6, Riesling, Roter και Riesling, Weiber Klön We 158 (Xuan et al., 2014).

Στη συνέχεια με τη μέθοδο των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών – SNP, η οποία έχει τρομακτική διακριτική ικανότητα και ανιχνεύει τη μικρότερη μονάδα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους (Rafalski, 2002), επιτεύχθηκε η γενετική αξιολόγηση 16 επιτραπέζιων ποικιλιών της αμπέλου, προερχόμενες από το Zhengzhou Pomology Institute, Zhengzhou της Κίνας (Dong et al., 2010). Επίσης πραγματοποιήθηκε η διάκριση μεταξύ των κλώνων της ποικιλίας αμπέλου Melbec (Calderon et al., 2021), ενώ εντόπισε τους γονείς της Ισπανικής ποικιλίας της αμπέλου Tempranillo (Ibanez et al., 2012).

Για ασφαλέστερα και αξιόπιστα αποτελέσματα των μεθόδων αυτών, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το κόστος, η ποσότητα DNA, η εκδήλωση της συγκυριαρχίας, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού των δεικτών, καθώς επίσης η εύκολη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η ευκολία ανάλυσης της μεθόδου που θα επιλεγεί.

Τέλος για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη και επίλυση προβλημάτων γύρω από την ταυτοποίηση και διάκριση των φυτών της αμπέλου καθώς και καλύτερη επίτευξη ασφαλέστερων αποτελεσμάτων, χρειάζεται ο συνδυασμός των παραπάνω. Γεγονός το οποίο επισημαίνεται και από την πρόταση του O.I.V. (2001) για την ταυτοποίηση των φυτών της αμπέλου τόσο με τη χρήση της αμπελογραφικής μεθόδου, όσο και με τη χρήση των 6 εξαιρετικά πολυμορφικών δεικτών SSR: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 και VrZAG79.

Παράρτημα I

Πίνακας με τα 18 γένη της οικογένειας των Αμπελιδών σύμφωνα με τον Σταύρακα (2010)

Cissus L. emend. Descoings (Cissus, sect. Eucissus Planchon)

Το γένος αυτό περιλαμβάνει φυτά θαμνώδη, αναρριχώμενα, ξυλώδη ή ποώδη, με φύλλα κυρίως απλά ακέραια ή έλλοβα και σπάνια σύνθετα με 3-5 μέρη (Σταύρακας,2010). Στο γένος αυτό υπάγονται 367είδη, εκ των οποίων βρίσκονται τα 157 στην Αφρική, τα 118 στην Αμερική, τα 72 στην Ασία, τα 20 στην Ωκεανία, ενώ τα 18 έχουν βρεθεί απολιθωμένα

Ampelopsis (Michaux) emend. Planch

Στο γένος αυτό περιλαμβάνονται φυτά αναρριχώμενα με ξυλώδες στέλεχος και φύλλα απλά ή σύνθετα αποτελούμενα από περισσότερα μέρη, έχουν αναφερθεί 27 είδη, από τα οποία τα 23 στην Ασία και τα 4 στην Αμερική .

Pterisanthes Bl

Τα φυτά που περιλαμβάνονται σε αυτό το γένος, έχουν θαμνώδη ξυλώδη αναρριχώμενη μορφή, με τα 21 είδη του να τα συναντάμε στην νοτιοανατολική Ασία.

Tetrastigma (Miq.) Planch

Θαμνώδη, αναρριχώμενα ή έρποντα φυτά, με φύλλα αντίθετα, σύνθετα συνήθως, αποτελούμενα από 5 μέρη και σπάνια από 1-3, περιλαμβάνονται σε αυτό το γένος των 132 ειδών, όπου απαντώνται τα 115 στην Ασία, 16 στην Ωκεανία και 1 στην τροπική Αφρική, ενώ τέσσερα είδη από τα παραπάνω έχουν βρεθεί απολιθωμένα.

Ampelocissus Planch

Θαμνώδη, αναρριχώμενα ή έρποντα φυτά, με φύλλα αντίθετα, σύνθετα συνήθως, αποτελούμενα από 5 μέρη και σπάνια από 1-3, περιλαμβάνονται σε αυτό το γένος των 132 ειδών, όπου απαντώνται τα 115 στην Ασία, 16 στην Ωκεανία και 1 στην τροπική Αφρική, ενώ τέσσερα είδη από τα παραπάνω έχουν βρεθεί απολιθωμένα.

Clematicissus Planch

Στο γένος αυτό υπάγεται ένα μόνο είδος το οποίο παρουσιάζει έντονο πολυμορφισμό των φύλλων και το συναντάμε στην Αυστραλία, έχει ποώδεις και πολύ ασθενικούς βλαστούς που ξηραίνονται το φθινόπωρο και εκβλαστάνουν την επόμενη άνοιξη.

Parthenocissus Planch

Το γένος αυτό περιλαμβάνει αναρριχώμενα ξυλώδη φυτά με έλικες απέναντι από τα φύλλα, οι οποίοι όταν εφάπτονται σε τοίχους, το άκρο τους διογκώνεται και παίρνει τη μορφή βεντούζας.

Landukia Planch

Το γένος αυτό μοιάζει με το γένος Parthenocissus και περιλαμβάνει ένα μόνο είδος που το συναντάμε στην Ασία.

Rhoicissus Planch

Φυτά θαμνώδη και αναρριχώμενα, με δισχιδείς μεγάλου μήκους έλικες οι οποίοι βρίσκονται απέναντι από τριμερή ή απλά πλήρη ή έλλοβα φύλλα, περιλαμβάνονται σε αυτό το γένος με τα 11 είδη του να τα συναντάμε στην ανατολική και νότια Αφρική.

Cayratia (A-L. Juss) Gagnep. (Cissus sect. Cayratia Juss.) Planch.

Το γένος αυτό περιλαμβάνει κυρίως θαμνώδη και δευτερευόντως ποώδη φυτά, συνήθως αναρριχώμενα, τα φύλλα τους είναι αντίθετα, σύνθετα με 3-5-7-9 μέρη, ενώ από τα 65 είδη που περιλαμβάνει τα 41 βρίσκονται στην Ασία, τα 16 στην Ωκεανία, τα 8 στην Αφρική, εκ των οποίων το ένα έχει βρεθεί ως απολίθωμα.

Acareosperma Gagnep.

Περιλαμβάνει ένα είδος που έχει εντοπισθεί στο Λάος και έχει φύλλα σύνθετα με τρία μέρη , εκ των οποίων το μεσαίο είναι απλό και τα εκατέρωθεν αυτού είναι επίσης σύνθετα .

Pterocissus Urb. Et Ekm

Περιλαμβάνει μόνο ένα ξυλώδες αναρριχόμενο είδος το οποίο δεν έχει πλήρως περιγραφεί .

Cyphostemma (Planch.) Alston (Cissus sect. Cyphostemma Planch)

Στο γένος αυτό περιλαμβάνονται 257 είδη με φυτά θαμνώδη αναρριχώμενα, ξυλώδη ή ποώδη, με φύλλα αντίθετα, σύνθετα, αποτελούμενα από 3-5 μέρη, εκ των οποίων βρίσκονται τα 256 στην Αφρική και ένα μόνο στην Ασία.

Puria Nair

Το γένος αυτό περιλαμβάνει το είδος *Puria trilobata Nair*, το οποίο προέρχεται από τον διαχωρισμό του είδους *Cissus trilobata Lamk* του γένους *Cissus* (Σταύρακας,2010)

Nothocissus Latiff (Ampelocissus Planch. Sect. Nothocissus). Το γένος αυτό περιλαμβάνει ένα μόνο είδος το *Nothocissus spicigera Latiff*, το οποίο προέρχεται από το γένος *Ampelocissus* .

Cissites Heer

Από το γένος αυτό έχουν βρεθεί μόνο απολιθώματα (Σταύρακας,2010).

Paleovitis Reid et Chandler. Όπως το προηγούμενο γένος, έχουν βρεθεί μόνο απολιθώματα .

Vitis (Tournef.) L.

Υπογένος *Muscadinia*

Υπογένος *Euvitis*

Παράρτημα II

Πίνακες κωδικοποίησης και βαθμολόγησης των απαραίτητων Αμπελογραφικών χαρακτηριστικών σύμφωνα με τον Ο.Ι.Υ

Αυξανόμενης κορυφής

Μορφή ή σχήμα εκβλαστήματος: κωδ. αρ. 001

3 = κλειστό, 5 = ημίκλειστο, 7 = ανοικτό

Κατανομή του ανθοκυανικού χρωματισμού της κορυφής: κωδ. αρ. 002

1 = απουσία, 2 = μόνο στην περιφέρεια, 3 = σε όλη την επιφάνεια

Ένταση ανθοκυανικού χρωματισμού της κορυφής: κωδ. αρ. 003

1 = απουσία ή πολύ ασθενής, 3 = ασθενής, 5 = μέση, 7 = ισχυρή, 9 = πολύ ισχυρή

Πυκνότητα ερπουσών τριχών κορυφής: κωδ. αρ. 004

1 = απουσία ή πολύ αραιές, 3 = αραιές, 5 = μέση, 7 = πυκνές, 9 = πολύ πυκνές

Ποώδης βλαστός

Κατεύθυνση βλαστού: κωδ. αρ. 006

1 = όρθιος, 3 = ημιόρθιος, 5 = οριζόντιος, 7 = μισοπεσμένος, 9 = πεσμένος

Χρώμα της ραχιαίας πλευράς των μεσογονατίων: κωδ. αρ. 007

1 = πράσινο, 2 = πράσινο με κόκκινες ραβδώσεις, 3 = κόκκινο

Χρώμα της ραχιαίας πλευράς των κόμβων: κωδ. αρ. 009

1 = πράσινο, 2 = πράσινο με κόκκινες ραβδώσεις, 3 = κόκκινο

Πυκνότητα όρθιων τριχών στους κόμβους: κωδ. αρ. 011

1 = απουσία ή πολύ αραιές, 3 = αραιές, 5 = μέση, 7 = πυκνές, 9 = πολύ πυκνές

Πυκνότητα όρθιων τριχών των μεσογονατίων: κωδ. αρ. 012

1 = απουσία ή πολύ αραιές, 3 = αραιές, 5 = μέση, 7 = πυκνές, 9 = πολύ πυκνές

Διάταξη ελίκων: κωδ. αρ. 016

1 = ασυνεχής, 2 = συνεχής

Μήκος ελίκων: κωδ. αρ. 017

1 = πολύ κοντές ≤ 10 cm,
cm,
μήκους ≈ 30 cm

3 = κοντές ≈ 15 cm,
7 = μεγάλου μήκους ≈ 25 cm,

5 = μέσου μήκους ≈ 20
9 = πολύ μεγάλου

Έλασμα αναπτυγμένου ή ώριμου φύλλου

Μέγεθος: κωδ. αρ. 065

1 = πολύ μικρό, 2 = μικρό, 5 = μέσο, 7 = μεγάλο, 9 = πολύ μεγάλο

Σχήμα: κωδ. αρ. 067

1 = σφηνοειδές, 2 = καρδιόσχημο, 3 = πενταγωνικό, 4 = κυκλικό, 5 = νεφρόσχημο

Λοβοί: κωδ. αρ. 068

1 = απουσία (ακέραιο), 2 = τρίλοβο, 3 = πεντάλοβο, 4 = επτάλοβο, 5 = άνω των επτά λοβών

Ένταση ανθοκυανικού χρωματισμού των κύριων νευρώσεων στην άνω επιφάνεια: κωδ. αρ. 070

1 = απουσία ή πολύ ασθενής, 3 = ασθενής, 5 = μέση, 7 = ισχυρή, 9 = πολύ ισχυρή

Εξογκώσεις στην περιφέρεια του ελάσματος: κωδ. αρ. 075

1 = απουσία ή πολύ ασθενείς, 3 = ασθενείς, 5 = μέσες, 7 = έντονες, 9 = πολύ έντονες

Σχήμα δοντιών φύλλου: κωδ. αρ. 076

1 = και οι δυο πλευρές κοίλες, 2 = και οι δυο πλευρές ευθείες, 3 = και οι δυο πλευρές κυρτές, 4 = μια πλευρά κοίλη και μια κυρτή

Σχήμα μισχικού κόλπου: κωδ. αρ. 079

1 = πάρα πολύ ανοιχτός, 2 = πολύ ανοιχτός, 3 = ανοιχτός, 4 = ελαφρώς ανοιχτός, 5 = κλειστός, 6 = λοβοί με ελαφριά επικάλυψη, 7 = λοβοί επικαλυπτόμενοι, 8 = λοβοί ισχυρά επικαλυπτόμενοι

Σχήμα της βάσης του μισχικού κόλπου: κωδ. αρ. 080

1 = σχήμα U, 2 = σχήμα V

Ιδιαιτερότητες του μισχικού κόλπου: κωδ. αρ. 081

1 = καμία, 2 = τη βάση του μισχικού κόλπου σχηματίζουν οι νευρώσεις, 3 = συχνή παρουσία δοντιού

Πυκνότητα ερπυσίων τριχών μεταξύ των νευρώσεων της κάτω επιφάνειας: κωδ. αρ. 08

1 = απουσία ή πολύ αραιές, 3 = αραιές, 5 = μέση, 7 = πυκνές, 9 = πολύ πυκνές

Κληματίδα

Περιφέρεια εγκάρσιας τομής στο μέσο μεσογονατίου: κωδ. αρ. 102

1 = ομαλή, 2 = γωνιώδης, 3 = αυλακωτή, 4 = πλευρώδης

Ταξιανθία και σταφυλή

Φύλο - sex του άνθους: κωδ. αρ. 151

1 = άρρεν, 2 = άρρεν προς ερμαφρόδιτο, 3 = ερμαφρόδιτο, 4 = θήλυ, με όρθιους στήμονες, 5 = θήλυ, με στήμονες γυρισμένους προς τα κάτω

Μέγεθος σταφυλής: κωδ. αρ. 202

1 = πολύ μικρό, 3 = μικρό, 5 = μέσο, 7 = μεγάλο, 9 = πολύ μεγάλο

Πυκνότητα σταφυλής: κωδ. αρ. 2

1 = πολύ αραιή, 3 = αραιή, 5 = μέση, 7 = πυκνή, 9 = πολύ πυκνή

Μήκος μίσχου σταφυλής: κωδ. αρ. 206

1 = πολύ κοντό, 3 = κοντό, 5 = μέσο, 7 = μακρύ, 9 = πολύ μακρύ

Ράγα

Μέγεθος: κωδ. αρ. 220

1 = πολύ μικρό, 3 = μικρό, 5 = μέσο, 7 = μεγάλο, 9 = πολύ μεγάλο

Σχήμα: κωδ. αρ. 223

1 = πλατυσμένο, 2 = ελαφρά πλατυσμένο, 3 = σφαιρικό, 4 = κοντό ελλειψοειδές, 5 = ωοειδές, 6 = αμβλύ ωοειδές, 7 = αντωοειδές, 8 = κυλινδρικό, 9 = μακρύ ελλειψοειδές, 10 = τοξοειδές

Χρώμα επιδερμίδας: κωδ. αρ. 225

1 = πρασινοκίτρινο, 2 = ροδόχροο, 3 = κόκκινο, 4 = κοκκινόφαιο, 5 = σκούρο κόκκινο-ιώδες, 6 = μπλε-μέλαν, 7 = κόκκινο-μέλαν, 8 = διαφορετικό

Χρώμα σάρκας: κωδ. αρ. 230

1 = άχρωμη, 2 = χρωματιστή

Ιδιαίτερο άρωμα: κωδ. αρ. 236

1 = κανένα, 2 = μοσχάτο, 3 = κορεώδες ή φράουλας, 4 = διαφορετικό

Γιγάρτα

Ύπαρξη γιγάρτων στη ράγα: κωδ. αρ. 241

1 = απουσία (παρθενοκαρπία), 2 = παρουσία μη αναπτυγμένων (στενοσπερμοκαρπία), 3 = παρουσία αναπτυγμένων

Εγκάρσιες πτυχώσεις στην περιφέρεια: κωδ. αρ. 244

1 = απουσία, 2 = παρουσία

Διάφορα φαινολογικά χαρακτηριστικά

Χρόνος εκβλάστησης: κωδ. αρ 301

1 = πολύ πρώιμη, 3 = πρώιμη, 5 = μέση, 7 = όψιμη, 9 = πολύ όψιμη

Χρόνος πλήρους άνθησης: κωδ. αρ. 302

1 = πολύ πρώιμη, 3 = πρώιμη, 5 = μέση, 7 = όψιμη, 9 = πολύ όψιμη

Έναρξη ωρίμανσης (γυάλισμα ή περκασμός): κωδ. αρ. 303

1 = πολύ πρώιμη, 3 = πρώιμη, 5 = μέση, 7 = όψιμη, 9 = πολύ όψιμη

Φυσιολογική ωρίμανση των ραγών: κωδ. αρ 304

1 = πολύ πρώιμη, 3 = πρώιμη, 5 = μέση, 7 = όψιμη, 9 = πολύ όψιμη

Βάρος σταφυλής: κωδ. αρ. 502

1 = πολύ μικρό <100 g, 3 = μικρό 150-200 g, 5 = μέσο 350-450 g, 7 = μεγάλο 650-950 g,
9 = πολύ μεγάλο >1200 g

Βάρος ράγας: κωδ. αρ. 503

1 = πολύ μικρό <1 g, 3 = μικρό 1,7-2,3 g, 5 = μέσο 3-5 g, 7 = μεγάλο 7-9 g, 9 = πολύ μεγάλο >12 g

Στρεμματική απόδοση: κωδ. αρ. 504

1 = πολύ μικρή, 3 = μικρή, 5 = μέση, 7 = υψηλή, 9 = πολύ υψηλή

Περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα: κωδ. αρ. 505

1 = πολύ χαμηλή < 13%, 3 = χαμηλή 15-16%, 5 = μέση 18-19%, 7 = υψηλή 21-22%,
9 = πολύ υψηλή > 24%

Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε gr Τρυγικού οξέος/ L γλεύκους: κωδ. αρ.
506

1 = πολύ χαμηλή <3, 3 = χαμηλή 6, 5 = μέση 9, 7 = υψηλή 12, 9 = πολύ υψηλή 15

Βιβλιογραφία

Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

- Αρβανιτίδης, Α. (1990). Δενδροκομία Ι, Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων
- Ελληνική Στατιστική Αρχή, (2021). Δελτίο Τύπου, Ετήσια Γεωργική Στατιστική Έρευνα: Έτος 2019 Ανακτήθηκε στις 07/11/2021 από <https://www.statistics.gr/documents/20181/96929c5c-54d8-ccca-22fe-1c7af02f8bf3>
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2011). Βιοχημεία Πρώτος Τόμος. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Καρβουνάκης, Φ. (2015). Ταυτοποίηση και διάκριση ομάδας ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis Vinifera L.*) με μοριακές μεθόδους. Μεταπτυχιακή διατριβή
- Κωνσταντίνου, Χ. (2010). Γενετική Ταυτοποίηση Κυπριακών Ποικιλιών Αμπέλου με τη χρήση Μικροδορυφόρων, Αθήνα. Μεταπτυχιακή Μελέτη
- Λογοθέτης, Β. (1961). Αμπελουργία Α΄ Έκδοση, Θεσσαλονίκη
- Λογοθέτης, Β. (1967). Αμπελουργία Β΄ Έκδοση, Θεσσαλονίκη
- Μπινιάρη, Κ., (2000). Ταυτοποίηση και έλεγχος γνησιότητας των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπέλου με τη χρήση μοριακών μεθόδων RAPD-PCR. Διδακτορική διατριβή.
- Νεραντζής, Η., Ταταρίδης, Π., Λιούνη, Μ., & Βαρελάς, Β. (2015). Μικροβιολογία του Οίνου. Εκδ. Έμβρυο
- Νικολάου, Ν. (2012). Αμπελογραφία. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη
- Νούσης, Ι. (χ.η). Η Νέα Δενδροκομία, Τόμος Β Ειδική, Καλλιεργητής
- Σταύρακας, Δ. (2010). Αμπελογραφία, ΖΗΤΗ
- Σταυρακάκης, Μ. (2010). Αμπελογραφία, Τροπή
- Τσαυτάρης, Α., Νιάνιου-Ομπεινάντ, Ε., & Πολύδωρος, Α. (2012). Βελτίωση φυτών. Σύγχρονη Παιδεία
- Χατζόπουλος, Π. (2021). Αρχές και Εφαρμογές στη Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδότης Έμβρυο Εμπορική Εκδοτική Μον. ΙΚΕ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Agar, G., Yildirim, N., & Ercisli, S. (2012). Genetic and biochemical differentiation in *Vitis vinifera* (Kabarcik) populations grown at different altitudes in Coruh Valley. Genetics and Molecular Research, Vol 11, Issue 1, p: 211-220.

- Agar, G., Yildirim, N., Ercisli, S., Ergul, A., & Yuksel, C. (2012). Determination of genetic diversity of *Vitis vinifera* cv. Kabarcik populations from the Coruh Valley using SSR markers. *Biochemical genetics*, Vol 50, Issue 5, p: 476-483.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, Vol 27, p: 617-631
- Akram, M. T., Khan Qadri, R. W., Jaskani, M. J., & Awan, F. S. (2019). Ampelographic and genetic characterization of grapes genotypes collected from Potohar region of Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, Vol 56, Issue 3, p: 595-605.
- Al - Anbari, A. K., Zubaidy, M. W. A., Al-Zubaidy, N. A., Sultan, A. A., & Mahmood, S. M. (2017). Phylogenetic Relationships Among (Grapivine) *Vitis* Taxa Based on Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) Markers. *Diyala Journal of Agricultural Sciences*, Vol 9, special Issue, p: 82-90
- Al-Yassine, M. H. (2018). Molecular characterization of nine grapevine varieties cultivated in Salahaldin, Iraq by using RAPD-PCR marker. *Tikrit Journal of Pure Science*, Vol 22, Issue 2, p: 13-18.
- Alizadeh, M., & Singh, S. K. (2009). Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis spp.*) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol 7, Issue 1, p: 37-44
- Althoff, D., Gitzendanner, M., & Segraves, K. (2007). The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst Biol*, Vol 56, Issue 3, p:477–484
- Altube., H., Cabello., F., & Ortiz, M. (1991). Caracterización de variedades y portainjertos de vid mediante isoenzimas de los sarmientos. *Vitis*, Vol 30, Issue 3, p: 203-212
- Anhult, U. C., Martínez, S. C., Rühl, E., & Forneck, A. (2011). Dynamic grapevine clones—an AFLP-marker study of the *Vitis vinifera* cultivar Riesling comprising 86 clones. *Tree Genetics & Genomes*, Vol 7, Issue 4, p: 739-746.
- Aradhya, M. K., Dangl, G. S., Prins, B.H., Boursiquot, J. M., Walker, A. M., Meredith, C. P., Simon, C. J. (2002) Genetic structure and differentiation in cultivated grape *Vitis vinifera* L. *Genet Res (Camb)*, Vol 81, p: 179–192
- Aras, S., Polat, J. B., Cansaran, D., & Soylemezoglu, G. (2005). RAPD analysis of genetic relations between Büzgülü grape cultivars (*Vitis vinifera*) grown in different parts of Turkey. *Acta Biol. Cracov*, Vol 47, p: 77-82.
- Arif, A. T. A. K., Altindisli, A., & Gouml, A. F. (2012). Molecular and ampelographic characterization of some grape hybrids (*Vitis vinifera* L.). *African Journal of Agricultural Research*, Vol 7, Issue 33, p: 4596-4606.
- Atak, A. (2003). Identification of some grape cultivars, hybrids and their parents by RAPD technique. *Agris*, p:10

Bachmann, O., & Blaich R. (1988): Isoelectric focusing of grapevine peroxidases as a tool for ampelography. *Vitis*, Vol 27, p: 147-155.

Bachmann, O. (1994): Peroxidase isoenzyme patterns in *Vitaceae*. *Vitis*, Vol 33, Issue 3, p: 151-153.

Banilas, G., Korkas, E., Kaldis, P., & Hatzopoulos, P. (2009). Olive and grapevine biodiversity in Greece and Cyprus- a review. In Lichtfouse E (ed) *Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*. Springer, Berlin, pp: 401-428

Bajraktari, Y., Cadri, N., Papa, S., & Bacu, A. (2014). Ampelographic and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDS) Based Analysis of Six Grapevine Varieties of Rahovec, Kosovo. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, Vol 7, p: 180-185.

Bakalinsky, A. T., Xu, H., Wilson, D. J., & Arulsekar, S. (1994). 666 PB 110 Random Amplified Polymorphic DNA Markers are Inadequate for Fingerprinting Grape Rootstocks. *HortScience*, Vol 29, issue 5, p: 528c-528

Baneh, H. D., Mohammadi, S. A., Mahmoudzadeh, H., De Mattia, F., & Labra, M. (2009). Analysis of SSR and AFLP markers to detect genetic diversity among selected clones of grapevine (*Vitis vinifera L.*) cv. Keshmeshi. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Vol 30, Issue 1, p: 38-42.

Barrias, S., Fernandes, J. R., Eiras-Dias, J. E., Brazão, J., & Martins-Lopes, P. (2019). Label free DNA-based optical biosensor as a potential system for wine authenticity. *Food chemistry*, Vol 270, p: 299-304.

Bellin, D., Velasco, R., & Grando, M. S. (2000, March). Intravarietal DNA polymorphisms in grapevine (*Vitis vinifera L.*). In *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture* , Vol 546, p: 343-349

Benjak, A., Ercisli, S., Vokurka, A., Maletic, E., & Pejic, I. (2005). Genetic relationships among grapevine cultivars native to Croatia, Greece and Turkey. *Vitis*, Vol 44, Issue 2, p: 73-77.

Bibi, A. C., Gonias, E. D., & Doulis, A. G. (2020). Genetic diversity and structure analysis assessed by SSR markers in a large collection of *Vitis* cultivars from the island of Crete, Greece. *Biochemical genetics*, Vol 58, Issue 2, p: 294-321.

Biniari, K. (2012). Genetic study of 46 Greek grape cultivars by random amplified polymorphic DNA markers (RAPD-PCR). *Laboratory of Viticulture, Agricultural University of Athens, Greece*

Bisztray, G. D., Deák, T., Eisenheld, C., Pedryc, A., Balogh, I., & Regner, F. (2005). Microsatellite based identification of grapevine cultivars traditional in Hungary and in the Carpathian Basin. *International Journal of Horticultural Science*, Vol 11, Issue 4, p: 71-73.

Bisztray, G. D., Korbuly, J., Halász, J., Oláh, R., Ruthner, S., Deák, T., & Pedryc, A. (2002, August). Characterization of grape varieties and species by RAPD markers. In *VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding*, Vol 603, p: 601-604.

- Blaich, R. (1989). The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grapevine cultivars. *Riv. Vitic. Enol.*, Vol 42, p: 33-35.
- Blaich, R., Konradi, J., Rühl, E., & Forneck, A. (2007). Assessing genetic variation among Pinot noir (*Vitis vinifera L.*) clones with AFLP markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 58, Issue 4, p: 526-529.
- Boccacci, P., Akkak, A., Marinoni, D. T., Gerbi, V., & Schneider, A. (2012). Genetic traceability of Asti Spumante and Moscato d'Asti musts and wines using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Food Research and Technology*, Vol 235, Issue 3, p: 439-446.
- Boccacci, P., Chitarra, W., Schneider, A., Rolle, L., & Gambino, G. (2020). Single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assays for the varietal authentication of 'Nebbiolo' musts and wines. *Food chemistry*, Vol 312, Article 126100.
- Bodea, M., Pamfil, D., Pop, R., & POP, I. F. (2009). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to study genetic diversity among Romanian local vine (*Vitis vinifera L.*) cultivars. *Bulletin UASVM Horticulture*, Vol 66, Issue 1, p:17-22.
- Bodor, P., Szoke, A., Toth-Lencses, K., Veres, A., Deak, T., Kozma, P., ... & Kiss, E. (2014). Differentiation of grapevine (*Vitis vinifera L.*) conculta members based on molecular tools. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 28, Issue 1, p: 14-20.
- Borrego, J., De Andrés, M. T., Gómez, J. L., & Ibañez, J. (2002). Genetic study of Malvasia and Torrontes groups through molecular markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 53, Issue 2, p: 125-130.
- Borrego, J., Rodriguez, M. T., Martin, J., Chavez, J., Cabello, F., & Ibañez, J. (2000, March). Characterisation of the most important Spanish grape varieties through isozyme and microsatellite analysis. In *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture*, Vol 546, p: 371-375).
- Botta , R., Vallania, R., Akkak, A., Miaja, M. L., Vergano, G., Thomas, M. R., & Scott, N. S. (1996). Characterization of the Brachetto Grapevine Cultivars Using Molecular Markers. In *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, Vol 484, p: 347-354.
- Botta, R., Vallania R., Miaja M. L., Vergano G., Me G. (1990): Isozyme pattern comparison between tissue-cultured grapevines and mother plants. *Vitis Special Issue*, p: 88-92.
- Bourquin, J. C., Tournier, P., Otten, L., & Walter, B. (1992). Identification of sixteen grapevine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. *Vitis*. Vol 31, p: 157-162
- Bourquin, J. C., Sonko, A., Otten, L., & Walter, B. (1993). Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera L.* *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 87, p: 431-438
- Bowers, J. E. (1998). The use of simple sequence repeat (SSR) and amplification fragment length polymorphism (AFLP) markers for analysis of interrelationships and origins of wine grape cultivars. University of California, Davis.

- Bowers, J. E., Dangl, G. S., Vignani, R., & Meredith, C. P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, Vol 39, Issue 4, p: 628-633.
- Bowers, J., & Meredith, C. (1996). Genetic Similarities among Wine Grape Cultivars Revealed by Restriction Fragment-length Polymorphism (RFLP) Analysis. *Amer. Soc. Hort. Sci.* Vol 121, Issue 4, p: 620-624
- Boz, Y., Bakir, M. E. L. İ. K. E., Çelikkol, B. P., Kazan, K., Yilmaz, F., Cakir, B. İ. R. S. E. N., ... & Ergül, A. (2011). Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm from Southeast Anatolia by SSR markers. *Vitis*, Vol 50, Issue 3, p: 99-106.
- Bruce, I., Reisch, B., Goodman, R., Martens, M-H., & Weeden, N. (1993). The Relationship Between Norton and Cynthiana, Red. Wine Cultivars Derived from *Vitis aestivalis*. *American Society for Enology and Viticulture*. Vol 4, Issue 4, p: 441-444
- Buscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O., & Blaich, R. (1994). On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis*, Vol 33, Issue 1, p: 15-17.
- Cabezas, J. A., Ibáñez, J., Lijavetzky, D., Vélez, D., Bravo, G., Rodríguez, V., ... & Martínez-Zapater, J. M. (2011). A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC plant biology*, Vol 11, Issue 1, p: 1-12.
- Calderon, L., Mauri, N., Muñoz, C., Carbonell-Bejerano, P., Bree, L., Bergamin, D., ... & Lijavetzky, D. (2021). Whole genome resequencing and custom genotyping unveil clonal lineages in 'Malbec' grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientific reports*, Vol 11, Issue 1, p: 1-11.
- Calo, A., Costacurta, R., Di Stefano, R., Calo, G., & Paludetti, G. (1989). Suggestion of employment of isoenzymatic markers as cultivar discriminants in *Vitis vinifera* L. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, Vol 42, Issue 4, p: 3-8
- Calo, A., Costacurta, R., Di Stefano, R., Calo, G., & Paludetti, G. (1990). Research on the meaning of the enzymatic systems (GPI and PGM) as parameters for the definition of varieties (*Vitis* sp.): The Italian case of Cabernet franc. *Vitis*, Vol 29, Issue special, p: 5-23.
- Cao, S. (2019). Genetic Diversity and Pedigree Analysis of Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*) Using SSR Markers and Genetic Dissection of Scab (*Venturia effusa*) Resistance in Pecan (Doctoral dissertation, University of Georgia)
- Cao, S., Stringer, S., Gunawan, G., McGregor, C., & Conner, P. J. (2020). Genetic diversity and pedigree analysis of muscadine grape using SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol 145, Issue 3, p: 143-151.
- Carcamo, C., Provedo, I., & Arroyo, G. R. (2010). Detection of polymorphism in ancient Tempranillo clones (*Vitis vinifera* L.) using microsatellite and retrotransposon markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol 8, Issue 1, p: 1-6.

- Carimi, F., Mercati, F., Abbate, L., & Sunseri, F. (2010). Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among Sicilian grapevine cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Vol 57, Issue 5, p: 703-719.
- Castro, I., D'Onofrio, C., Martín, J. P., Ortiz, J. M., De Lorenzis, G., Ferreira, V., & Pinto-Carnide, O. (2012). Effectiveness of AFLPs and retrotransposon-based markers for the identification of Portuguese grapevine cultivars and clones. *Molecular biotechnology*, Vol 52, Issue 1, p: 26-39.
- Castro, I., Leal, F., Guedes-Pinto, H., Eiras Dias, J., Veloso, M., & Pinto-Carnide, O. (2006). Genomic variability in grapevine cultivars assessed by molecular markers. In IX International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vol 827, p: 187-192.
- Castro, I., Pinto-Carnide, O., Marcide, J. M. O., Ferreira, V., & Clemente, J. P. M. (2016). A comparative analysis of genetic diversity in portuguese grape germplasm from ampelographic collections fit for quality wine production. *Spanish journal of agricultural research*, Vol 14, Issue 4, p: 13
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Sancha, J. C., De Toda, F. M., & Martínez-Zapater, J. M. (1998). Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 97, Issue 1-2, p: 51-59.
- Cervera, M. T., Cabezas, J. A., Sanchez-Escribano, E., Cenis, J. L., & Martínez-Zapater, J. M. (2000). Characterization of genetic variation within table grape varieties (*Vitis vinifera* L.) based on AFLP markers. *Vitis*, Vol 39, Issue 3, p: 109-114
- Cervera, M. T., Rodriguez, I., Cabezas, J. A., Chavez, J., Martínez-Zapater, J. M., & Cabello, F. (2001). Morphological and molecular characterization of grapevine accessions known as Albillo. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 52, Issue 2, p: 127-135.
- Chaparro, J.X., Goldy, R. G., Mowrey, B.D., & Werner, D. J. (1989). Identification of *Vitis vinifera* L. × *Muscadinia rotundifolia* small hybrids by starch gel electrophoresis. *HortScience*, Vol 24, Issue 1, p: 128-130
- Cho, K. H., Bae, K. M., Noh, J. H., Shin, I. S., Kim, S. H., Kim, J. H., ... & Hwang, H. S. (2011). Genetic Diversity and Identification of Korean Grapevine Cultivars using SSR Markers. *Korean Journal of Breeding Science*, Vol 43, Issue 5, p: 422-429 .
- Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., ... & Testolin, R. (2010). The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 121, Issue 8, p: 1569-1585.
- Collet, S.A. de O., Collet, M.A., & Machado, M. de F. P.S. (2005). Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). *Biochemical systematics and ecology*. Vol 33, Issue 7, p : 691-703

- Collins, G. G., & Symons, R. H. (1993). Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant molecular Biology reporter*, Vol 11, Issue 2, p:105-112.
- Coste, A., Butiuc-Keul, A. L., & Şeiculescu, M. (2008). Idetificarea Variabilitatii Genetice Cu Ajutorul Markerilor Moleculari RAPD La Cateva Soiuride de Vita de Vie Au Tohtone. *Analele Societatii Nationale de Biologie Celulara*, Vol 13.
- Crespan, M., Botta, R., & Milani, N. (1999). Molecular characterisation of twenty seedless table grape cultivars (*Vitis vinifera L.*). *Vitis*, Vol 38, Issue 3, p : 87-92.
- Crespan, M., & Milani, N. (2001). The Muscats: A molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. *Vitis*, Vol 40, Issue 1, p : 23-30
- Cretazzo, E., Meneghetti, S., De Andrés, M. T., Gaforio, L., Frare, E., & Cifre, J. (2010). Clone differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAMPL and M-AFLP in order to assess the clonal selection of grapevine: the case study of Manto Negro, Callet and Moll, autochthonous cultivars of Majorca. *Annals of applied biology*, Vol 157, Issue 2, p: 213-227.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Fevereiro, P., Martínez-Zapater, J. M., & Eiras-Dias, J. E. (2016). Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Australian journal of grape and wine research*, Vol 22, Issue 3, p: 504-516.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Fevereiro, P., Martínez-Zapater, J. M., & Eiras-Dias, J. E. (2020). Genetic relationships among Portuguese cultivated and wild *Vitis vinifera L.* germplasm. *Frontiers in plant science*, Vol 11, Article 127.
- Da Costa, A. F., Teodoro, P. E., Bhering, L. L., Tardin, F. D., Daher, R. F., Campos, W. F., ... & Pereira, M. G. (2017). Molecular analysis of genetic diversity among vine accessions using DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, Vol 16, Issue 2.
- Dallakyan, M. V., Yesayan, A. H., & Hovhannisyan, N. A. (2014). Armenian aborigene grape varieties identification and genetic diversity assessment by 48 SNP markers set for grapevine. *Biological Journal of Armenia*, Vol 66, Issue 2, p: 84-86.
- Dauob, R., Makhoul, G., & Mahfoud, H. (2018). Genetic Diversity among Grapevine (*Vitis Vinifera L.*) Cultivars of Tartous Province (Syria) using Microsatellite Markers. *International Journal of Agriculture & Environmental Science*, Vol 5, p: 54-58.
- De Andres, M. T., Cabezas, J. A., Cervera, M. T., Borrego, J., Martínez-Zapater, J. M., & Jouve, N. (2007). Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 58, Issue 1, p: 75-86.
- De Lattin, G. (1939). Uber den Ursprung und die Verbreitung der Raben, *Zuchter* Vol 11, p: 217-225

De Lorenzis, G., Chipashvili, R., Failla, O., & Maghradze, D. (2015). Study of genetic variability in *Vitis vinifera* L. germplasm by high-throughput Vitis18kSNP array: the case of Georgian genetic resources. *BMC plant biology*, Vol 15, Issue 1, p: 1-14.

De Lorenzis, G., Squadrito, M., Rossoni, M., Di Lorenzo, G. S., Brancadoro, L., & Scienza, A. (2017). Study of intra-varietal diversity in biotypes of Aglianico and Muscat of Alexandria (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Australian journal of grape and wine research*, Vol 23, Issue 1, p: 132-142

De Mattia, F., Imazio, S., Grassi, F., Lovicu, G., Tardáguila, J., Failla, O., ... & Labra, M. (2007). Genetic characterization of Sardinia grapevine cultivars by SSR markers analysis. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, Vol 41, Issue 4, p: 175-184.

Dimitrakopoulou, M. E., Kotsalou, C., Koudouna, M., Katechaki, E., & Vantarakis, A. (2021). Potential biological markers by DNA-based tools for determination of Greek PDO geographical origin and authenticity: "Avgotaracho Mesolonghiou" and "Vostizza currant". *JSFA Reports*, Vol 1, Issue 1, p: 26-34.

Dokupilová, I., Migliaro, D., Mihálik, D., Crespan, M., & Kraic, J. (2014). Genotyping of *Vitis vinifera* L. within the Slovak national collection of genetic resources. *Central European Journal of Biology*, Vol 9, Issue 8, p: 761-767.

Dong, Q. H., Cao, X., Yang, G., Yu, H. P., Nicholas, K. K., Wang, C., & Fang, J. G. (2010). Discovery and characterization of SNPs in *Vitis vinifera* and genetic assessment of some grapevine cultivars. *Scientia horticulturae*, Vol 125, Issue 3, p: 233-238.

Dong, Z., Liu, W., Li, X., Tan, W., Zhao, Q., Wang, M., ... & Tang, X. (2018). Genetic relationships of 34 grapevine varieties and construction of molecular fingerprints by SSR markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 32, Issue 4, p: 942-950.

Doulaty Baneh, H., Grassi, F., Mohammadi, A., Nazemieh, A., De Mattia, F., Imazio, S., & Labra, M. (2007). The use of AFLP and morphological markers to study Iranian grapevine germplasm to avoid genetic erosion. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol 82, Issue 5, p: 745-752.

Doulati Baneh, H., & Mohammadi, S. A. (2012). Study of Genetic Differences of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Bidaneh Sefid Clones Using SSR and AFLP Markers. *Agricultural Biotechnology*, Vol 3, Issue 1, p: 1-8

Doulati-Baneh, H., Mohammadi, S. A., & Labra, M. (2013). Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers. *Scientia horticulturae*, Vol 160, p: 29-36.

Ebadi, A., Ghaderi, N., & Vafae, Y. (2019). Genetic diversity of Iranian and some European grapes as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite and SNP molecular markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol 94, Issue 5, p: 599-610.

Eiras-Dias J. E. J., Sousa B., Cabral F., Carcalho I. (1989): Isozymatic characterisation of portuguese vine varieties of *Vitis vinifera* L. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* Vol 42, Issue 1, p: 23-26.

- El-Sayed, N. E., Hashad, M. M., & Shaaban, M. M. (2011). Molecular characterization and discrimination among grapevine cultivars by RAPD markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol 5, Issue 2, p: 230-235.
- Elidemir, A. Y., & Uzun, I. (2006, July). Assessment of genetic diversity of some important grape cultivars, rootstocks, and wild grapes in Turkey using RAPD markers. In IX International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vol 827, p: 275-278.
- Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troglio, M., ... & Grando, M. S. (2013). Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. *BMC plant biology*, Vol 13, Issue 1, p: 1-17.
- Ercisli, S., Orhan, E., Hizarci, Y., Yildirim, N., & Agar, G. (2008). Genetic diversity in grapevine germplasm resources in the Coruh valley revealed by RAPD markers. *Biochemical genetics*, Vol 46, Issue 9-10, p: 590-597.
- Ergul, A., Aras, S., & Söylemezoğlu, G. (2010). Amplified fragment length polymorphism analysis of grapevine rootstock genotypes in Turkey. *Genetics and Molecular Research*, Vol 9, Issue 2, p: 811-819.
- Ergul, A., Kazan, K., Aras, S., Çevik, V., Çelik, H., & Söylemezoğlu, G. (2006). AFLP analysis of genetic variation within the two economically important Anatolian grapevine (*Vitis vinifera* L.) varietal groups. *Genome*, Vol 49, Issue 5, p: 467-475.
- Ergul, A., Perez-Rivera, G., Söylemezoğlu, G., Kazan, K., & Arroyo-Garcia, R. (2011). Genetic diversity in Anatolian wild grapes (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) estimated by SSR markers. *Plant Genetic Resources*, Vol 9, Issue 3, p: 375-383.
- Eyduran, S. P., Ercisli, S., Akin, M., & Eyduran, E. (2016). Genetic characterization of autochthonous grapevine cultivars from Eastern Turkey by simple sequence repeats (SSRs). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 30, Issue 1, p: 26-31.
- Fanizza, G., Chaabane, R., Lamaj, F., Ricciardi, L., & Resta, P. (2003). AFLP analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (*Vitis vinifera*). *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 107, Issue 6, p: 1043-1047.
- Fanizza, G., Corona, M. G., & Resta, P. (2015). Analysis of genetic relationships among Muscat grapevines in Apulia (South Italy) by RAPD markers. *Vitis-Journal of Grapevine Research*, Vol 39, Issue 4, p: 159.
- Faraj, S., Cenis, J. L., Sánchez-Escribano, E., & Ortiz, J. M. (1998, July). Evaluation of genetic diversity of grapevine cultivars grown in Morocco with RAPD-PCR. In VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Vol 528, p: 171-178
- Faria, M. A., Magalhaes, R., Ferreira, M. A., Meredith, C. P., & Monteiro, F. F. (2000). *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol 48, Issue 4, p: 1096-1100.

- Fatahi, R., Ebadi, A., Bassil, N., Mehlenbacher, S. A., & Zamani, Z. (2003). Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. *Vitis –Geilweilerhof*, Vol 42, Issue 4, p: 185-192.
- Fedosov, D. Y., Korzhenkov, A. A., Petrova, K. O., Sapsay, A. O., Sharko, F. S., Toshchakov, S. V., ... & Patrushev, M. V. (2021). SNP-Based Analysis Reveals Authenticity and Genetic Similarity of Russian Indigenous *V. vinifera* Grape Cultivars. *Plants*, Vol 10, Issue 12, p: 2696.
- Ferreira Monteiro, F., Nunes, E., Magalhaes, R., Faria, M. A., Bowers, J. E., Meredith, C. P., & Martins, A. (1998, July). Fingerprinting of the main *Vitis vinifera* varieties grown in the northern region of Portugal. In VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Vol 528, p: 121-128.
- Filippetti, I., Intrieri, C., Centinari, M., Bucchetti, B., & Pastore, C. (2005). Molecular characterization of officially registered Sangiovese clones and of other Sangiovese-like biotypes in Tuscany, Corsica and Emilia-Romagna. *Vitis*, Vol 44, Issue 4, p: 167-172.
- Filippetti, I., Silvestroni, O., Thomas, M. R., & Intrieri, C. (2000, March). Genetic characterisation of Italian wine grape cultivars by microsatellite DNA analysis. In International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture, Vol 546, p: 395-399.
- Fossati, T., Labra, M., Castiglione, S., Failla, O., Scienza, A., & Sala, F. (2001). The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 102, Issue 2, p: 200-205.
- Frotscher, J., Nocentini, M., Ruehl, E., & Bitz, O. (2012, March). Quality control: identification of table grape cultivars using RAPD markers. In II International Symposium on Biotechnology of Fruit Species Vol 1048, p: 193-196.
- Fry, N. K., Savelkoul, P. H. M., & Visca, P. (2009). Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Molecular Epidemiology of Microorganisms*, p: 89–104
- Galbacs, Z., Molnár, S., Halász, G., Hoffmann, S., Veres, A., Galli, Z., ... & Heszky, L. (2007). Application of microsatellite fingerprints for pedigree analysis of Hungarian grapevine varieties. *Acta Agraria Debreceniensis*, Vol 27, p: 71-77
- Galbacs, Z., Molnar, S., Halasz, G., Kozma, P., Hoffmann, S., Kovács, L., ... & Kiss, E. (2015). Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, Vol 48, Issue 1, p: 17-24.
- Ghaffari, S., Hasnaoui, N., Zinelabidine, L. H., Ferchichi, A., Martínez-Zapater, J. M., & Ibáñez, J. (2014). Genetic diversity and parentage of Tunisian wild and cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) as revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Tree genetics & genomes*, Vol 10, Issue 4, p: 1103-1112.

- Gheorghe, R. N., Visoiu, E., Popescu, C. F., & Pamfil, D. (2009). Assessment of Genetic Stability and Fidelity of Some Micropropagated *Vitis Vinifera* L. "Feteasca neagra" Clones by Ampelometric and RAPD Markers. *Bulletin UASVM Horticulture*, Vol 66, Issue 1, p: 51-57.
- Gomes, S., Castro, C., Barrias, S., Pereira, L., Jorge, P., Fernandes, J. R., & Martins-Lopes, P. (2018). Alternative SNP detection platforms, HRM and biosensors, for varietal identification in *Vitis vinifera* L. using F3H and LDOX genes. *Scientific reports*, Vol 8, Issue 1, p: 1-12.
- Goryslavets, S., Risovanna, V., Bacilieri, R., Hausman, J. F., & Heuertz, M. (2010). A parentage study of closely related Ukrainian wine grape varieties using microsatellite markers. *Cytology and genetics*, Vol 44, Issue 2, p: 95-102.
- Goto-Yamamoto, N., Mochioka, R., Lin, B., Hashizume, K., Umeda, N., & Horiuchi, S. (1998). RFLP and RAPD analysis of wild and cultivated grapes (*Vitis* spp.). *Journal – Japanese Society for Horticultural Science*, Vol 67, Issue 4, p:483-490
- Grando, M. S., & Frisinghelli, C. (1998). Grape microsatellite markers: Sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. *Vitis*, Vol 37, Issue 2, p: 79-82.
- Guerra, B., & Meredith, C. (1995). Comparison of *Vitis Berlandieri* x *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis*, Vol 34, Issue 2, p: 109-112
- Hajos-Novak, M., & Hajdu, E. (2003). Isozyme and DNA Fingerprinting Characterization of two Hungarian Wine Grape Hybrids and their Parents. *Acta Horticulturae*, Vol 603, p: 211–216.
- Halasz, G., Veres, A., Kozma, P., Kiss, E., Balogh, A., Galli, Z., ... & Heszky, L. (2005). Microsatellite fingerprinting of grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties of the Carpathian Basin. *Vitis*, Vol 44, Issue 4, p: 173-180.
- Halasz, J., Korbuly, J., Deák, T., & Bisztray, G. D. (2004). RAPD analysis of grapevine hybrids and cultivars. *International Journal of Horticultural Science*, Vol 10, Issue 4, p: 63-66.
- Hanan, A. K., & Al-Janaby, A. S. A. (2017). Molecular Characterization Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for Ten Grape Cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Euphrates Journal of Agriculture Science*, Vol 9, Issue 1, p: 1-11.
- Harta, M., Pamfil, D., Pop, R., & Pop, I. F. (2010). Identification of Romanian *Vitis vinifera* L. Cultivars in Must Using Nuclear Microsatellite Markers. *Bulletin UASVM Horticulture*, Vol 67, Issue 1, p: 198-203.
- Herrera, R., Cares, V., Wilkinson, M. J., & Caligari, P. D. S. (2002). Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers. *Euphytica*, Vol 124, Issue 1, p: 139-145.
- Hizarci, Y., Ercisli, S., Yuksel, C., & Ergul, A. (2012). Genetic characterization and relatedness among autochthonous grapevine cultivars from Northeast Turkey by Simple Sequence Repeats (SSR). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, Vol 85, Issue 2, p: 224-228.

- Hladnik, M., Jakše, J., Bandelj, D., & Irma, V. U. K. (2015). The characterisation of *Vitis vinifera* 'Refošk' with AFLP and SSR molecular markers and ampelographic traits. *Acta Agriculturae Slovenica*, Vol 103, Issue 1, p: 55-64.
- Hou, H., Li, H., Xiao, H., & Wang, X. (2010). Genetic Diversity Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in *Vitis* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, Vol 3.
- Huber, F., Röckel, F., Schwander, F., Maul, E., Eibach, R., Cousins, P., & Töpfer, R. (2016). A view into American grapevine history: *Vitis vinifera* cv.'Sémillon' is an ancestor of 'Catawba' and 'Concord'. *Vitis*, Vol 55, Issue 2, p: 53-56.
- Ibáñez, J., Muñoz-Organero, G., Zinelabidine, L. H., de Andrés, M. T., Cabello, F., & Martínez-Zapater, J. M. (2012). Genetic origin of the grapevine cultivar Tempranillo. *American journal of enology and viticulture*, Vol 63, Issue 4, p: 549-553.
- Ibrahim, S. D., Adawy, S. S., Atia, M. A. M., Alsamman, A. M., & Mokhtar, M. M. (2016). Genetic diversity, variety identification and gene detection in some Egyptian grape varieties by SSR and SCoT markers. *Plant Omics. Plant Omics Journal*, Vol 9, Issue 5, p: 311-318.
- Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Winfield, M., Bardini, M., & Scienza, A. (2002). Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*, Vol 121, Issue 6, p: 531-535.
- Işçi, B. (2019). Genetic relationships of some local and introduced grapes (*Vitis vinifera* L.) by microsatellite markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 33, Issue 1, p: 1303-1310.
- Isci, B., & Dilli, Y. (2015). Characterization of autochthonous grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) from the Aegean Region of Turkey using simple sequence repeats (SSRs). *Journal of Agricultural Sciences*, Vol 21, Issue 4, p: 538-545.
- Jahnke, G. (2006). Distinguishing of the Grapevine Cultivars 'Picolit' and 'Kéknyelű' with the Help of Isoenzyme Analyses. *Acta Horti*, Vol 725, p: 703-708
- Jahnke, G., Májer, J., Lakatos, A., Györffy-Molnár, J., Deak, E., Stefanovits-Banyai, E., & Varga, P. (2009). Isoenzyme and microsatellite analysis of *Vitis vinifera* L. varieties from the Hungarian grape germplasm. *Scientia horticultrae*, Vol 120, Issue 2, p: 213-221
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Cassagrande, A., ... & Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, Vol 449, Issue 7161, p: 463-7.
- Jiang, G-L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: Andersen SB (ed) *Plant breeding from laboratory to fields*. InTech, Rijeka, pp 45–83
- Jimenez-Cantizano, A., Muñoz-Martín, A., Amores-Arrocha, A., Sancho-Galán, P., & Palacios, V. (2020). Identification of red grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) preserved in ancient vineyards in Axarquía (Andalusia, Spain). *Plants*, Vol 9, Issue 11, p: 1572-1582.

- Karatas, H. (2019). SSR analysis of some synonyms and homonyms of grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) growing in southeastern Turkey. *Ecology and Environmental Research*, Vol 17, Issue 4, p: 9785-9793
- Karatas, H., & Ağaoğlu, Y. S. (2008). Genetic diversity among Turkish local grape accessions (*Vitis vinifera* L.) using RAPD markers. *Hereditas*, Vol 145, Issue 2, p: 58-63.
- Karatas, H., & Ağaoğlu, Y. S. (2010). RAPD analysis of selected local Turkish grape cultivars (*Vitis vinifera*). *Genetics and Molecular Research*, Vol 9, Issue 4, p: 1980-1986.
- Karataş, H., Değirmenci, D., & Ağaoğlu, Y. S. (2006, July). Molecular characterization of some local (İskilip-Çorum) anatolian grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). In IX International Conference on Grape Genetics and Breeding 827 (pp. 207-210).
- Karatas, H., Değirmenci, D., Velasco, R., Vezzulli, S., Bodur, Ç., & Ağaoğlu, Y. S. (2007). Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. *Scientia Horticulturae*, Vol 114, Issue 3, p: 164-169.
- Karatas, H., Karaağaç, E., Değirmenci, D. K., & Ağaoğlu, S. (2019). Molecular analysis of grapevine germplasm by SSR (simple sequence repeats) in diyarbakir province, Turkey. *Ecology and Environmental Research*, Vol 17, Issue 2, p: 3927-3939.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G., & Hodgson, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Keller, M. (2015). Chapter 2 - Phenology and Growth Cycle. In: *The Science of Grapevines (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp 59-99.
- Khadivi, A., Gismondi, A., & Canini, A. (2019). Genetic characterization of Iranian grapes (*Vitis vinifera* L.) and their relationships with Italian ecotypes. *Agroforestry systems*, Vol 93, Issue 2, p: 435-447.
- Kim, S. H., Jeong, J. H., Kim, S. K., & Paek, K. Y. (2002). Parentage identification of 'Daebong' Grape (*Vitis spp.*) using RAPD analysis. *Journal of Plant Biotechnology*, Vol 4, Issue 2, p: 67-70.
- Kiss, E., Kozma, P., Halász, G., Molnár, S., Galbács, Z. S., Hoffmann, S., ... & Heszky, L. (2006, July). Pedigree of Carpathian basin and Hungarian grapevine cultivars based on microsatellite analysis. In IX International Conference on Grape Genetics and Breeding Vol 827, p: 221-224.
- Klein, B. Y., Ben-Yair, C., Bar-Gal, G. K., & Greenblatt, C. L. (2008). Microsatellite genotyping of cultivars of the Holy Land grapevine, *Vitis vinifera ssp. sativa* (Vitaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, Vol 156, Issue 4, p: 513-521.
- Klein, L. L., Miller, A. J., Ciotir, C., Hyma, K., Uribe-Convers, S., & Londo, J. (2018). High-throughput sequencing data clarify evolutionary relationships among North American *Vitis*

species and improve identification in USDA *Vitis* germplasm collections. *American journal of botany*, Vol 105, Issue 2, p: 215-226.

Kocsis, M., Jaromi, L., Putnoky, P., Kozma, P., & Borhidi, A. (2005). Genetic diversity among twelve grape cultivars indigenous to the Carpathian Basin revealed by RAPD markers. *Vitis*, Vol 44, Issue 2, p: 87-91.

Korkmaz, G. (2007). Molecular analysis of historical wine grape variety candidates found in Urla (Doctoral dissertation).

Lampra, M., Failla, O., Fossati, T., Castiglione, S., Scienza, A., & Sala, F. (1999). Phylogenetic analysis of grapevine cv. Ansonica growing on the island of Giglio, Italy, by AFLP and SSR markers. *Vitis*, Vol 38, Issue 4, p: 161-166

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

Laiqing, S., Kelin, Y., Heng, Z., Lingling, Z., & Yuxin, Y. (2005). Phylogenetic analysis of grapevine cultivar 'cabernet gernerischet' by RAPD. *Zhongguo Nong xue Tong bao= Chinese Agricultural Science Bulletin*, Vol 21, Issue 7, p: 87-90.

Lal, S., Singh, A. K., Srivastav, M., Dubey, A. K., & Singh, N. K. (2008). Genetic diversity assessment in Indian grape by Simple Sequence Repeats (SSR) markers. *Indian Journal of Horticulture*, Vol 65, Issue 4, p: 383-388.

Lamboy, W. F., & Alpha, C. (1998). Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis L.*) species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol 123, Issue 2, p: 182-188.

Lamboy, W., Szewc-McFadden, A., & Bleik, S. (1995). Progress in the Characterization of Cold-hardy Grapes using Simple Sequence Repeat DNAs (SSRs). *HortScience*, Vol 30, Issue 4, p: 783C-783.

Laucou, V., Boursiquot, J. M., Lacombe, T., Bordenave, L., Decroocq, S., & Ollat, N. (2008). Parentage of grapevine rootstock 'Fercal' finally elucidated. *Vitis*, Vol 47, Issue 3, p: 163-167.

Leal, F., Castro, I., Guedes-Pinto, H., Pinto-Carnide, O., Ortiz, J. M., & Martão, J. P. (2003, June). Characterization of Portuguese grapevine cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. In I International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research, Vol 652, p: 401-405.

Leao, P. C., & Motoike, S. Y. (2011). Genetic diversity in table grapes based on RAPD and microsatellite markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Vol 46, p: 1035-1044.

Leao, P. C., Riaz, S., Graziani, R., Dangl, G. S., Motoike, S. Y., & Walker, M. A. (2009). Characterization of a Brazilian grape germplasm collection using microsatellite markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 60, Issue 4, p: 517-524.

- Lefort, F., & Roubelakis-Angelakis, K. K. (2001). Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 52, Issue 2, p: 101-108.
- Leventakis, N. A., Stavrakakis, M. N., Biniari, A. F., Goulioti, A. G., Marinos, B. A., Dovas, C. I., ... & Spinthiropoulou, H. C. (2003, June). Clonal Selection of the Greek grape wine cultivar “Xinomavro”. In I International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research Vol 652, p: 45-49.
- Li, B., Fan, X., Zhang, Y., Liu, C., & Jiang, J. (2021). Genetic Diversity and Population Structure Analysis of Chinese Wild Grape Using Simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol 146, Issue 3, p: 1-11.
- Li, B., Jiang, J., Fan, X., Zhang, Y., Sun, H., Zhang, G., & Liu, C. (2017). Molecular characterization of Chinese grape landraces (*Vitis L.*) using microsatellite DNA markers. *HortScience*, Vol 52, Issue 4, p: 533-540.
- Liang, Z., Duan, S., Sheng, J., Zhu, S., Ni, X., Shao, J., ... & Dong, Y. (2019). Whole-genome resequencing of 472 *Vitis* accessions for grapevine diversity and demographic history analyses. *Nature communications*, Vol 10, Issue 1, p: 1-12.
- Lin, H., & Walker, M. A. (1997). Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *HortScience*, Vol 32, Issue 7, p: 1264-1266
- Lin, H., & Walker, M. A. (1998). Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 49, Issue 4, p: 403-407.
- Lopez, M., Cid, N., González, M. V., Cuenca, B., Prado, M. J., & Rey, M. (2009). Microsatellite and AFLP analysis of autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *American journal of enology and viticulture*, Vol 60, Issue 2, p: 215-222.
- Lopes, M. S., Sefc, K. M., Dias, E. E., Steinkellner, H., Machado, M. L. C., & Machado, A. C. (1999). The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 99, Issue 3, p: 733-739.
- Loureiro, M. D., Martínez, M. C., Boursiquot, J. M., & This, P. (1998). Molecular Marker Analysis of *Vitis vinifera* Albariño and some Similar Grapevine Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol 123, Issue 5, p: 842-848.
- Kupe, M., Ercisli, S., Jovanović-Cvetković, T., Eydurán, S. P., & Ayed, R. B. (2021). Molecular characterization of wild grapes from northeastern part of Turkey. *Genetika*, Vol 53, Issue 1, p: 93-102.
- Magdeldin, S. (2012). *Gel Electrophoresis – Advanced Techniques*. Published by InTech, Croatia
- Maras, V., Tello, J., Gazivoda, A., Mugoša, M., Perišić, M., Raičević, J., ... & Ibáñez, J. (2020). Population genetic analysis in old Montenegrin vineyards reveals ancient ways currently active to generate diversity in *Vitis vinifera*. *Scientific reports*, Vol 10, Issue 1, p: 1-13.

- Margaryan, K., Melyan, G., Röckel, F., Töpfer, R., & Maul, E. (2021). Genetic Diversity of Armenian Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm: Molecular Characterization and Parentage Analysis. *Biology*, Vol 10, Issue 12, p: 1279- 1301.
- Marsal, G., Mateo-Sanz, J. M., Canals, J. M., Zamora, F., & Fort, F. (2016). SSR analysis of 338 accessions planted in Penedès (Spain) reveals 28 unreported molecular profiles of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 67, Issue 4, p: 466-470.
- Martínez, L., Cavagnaro, P., Boursiquot, J. M., & Agüero, C. (2008). Molecular characterization of Bonarda-type grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Argentina, Italy, and France. *American journal of enology and viticulture*, Vol 59, Issue 3, p: 287-291.
- Martínez, L., Cavagnaro, P., Masuelli, R., & Rodríguez, J. (2003). Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol 6, Issue 3, p: 244-253.
- Martínez, L., Cavagnaro, P., Masuelli, R. W., & Zuniga, M. (2006). SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Science*, Vol 170, Issue 6, p: 1036-1044.
- Martinez-Zapater, J. M., Cabezas, J. A., & Cervera, M. T. (1998, July). AFLPs in genetic identification and genome analysis of grapevines. In VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Vol 528, p: 105-110.
- Mauro, M., Strefeler, M., Weeden, N., & Beisch, B. (1992). Genetic Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Vitis*. *Journal of Heredity*, Vol 83, Issue 1, p: 18-21
- Meneghetti, S., Costacurta, A., Frare, E., Da Rold, G., Migliaro, D., Morreale, G., ... & Calò, A. (2011). Clones identification and genetic characterization of Garnacha grapevine by means of different PCR-derived marker systems. *Molecular biotechnology*, Vol 48, Issue 3, p: 244-254.
- Meneghetti, S., Costacurta, A., Morreale, G., & Calò, A. (2011). Study of intra-varietal genetic variability in grapevine cultivars by PCR-derived molecular markers and correlations with the geographic origins. *Molecular biotechnology*, Vol 50, Issue 1, p: 72-85.
- Meneghetti, S., Gaiotti, F., Giust, M., Belfiore, N., & Tomasi, D. (2015). Valorization of genetic variability for the qualitative improvement of autochthonous grape cultivars of Cirò's terroir through the self-fertilization. *Molecular biotechnology*, Vol 57, Issue 3, p: 275-286.
- Mercati, F., De Lorenzis, G., Brancadoro, L., Lupini, A., Abenavoli, M. R., Barbagallo, M. G., ... & Sunseri, F. (2016). High-throughput 18K SNP array to assess genetic variability of the main grapevine cultivars from Sicily. *Tree Genetics & Genomes*, Vol 12, Issue 3, p: 1-15.
- Mercenaro, L., Nieddu, G., Porceddu, A., Pezzotti, M., & Camiolo, S. (2017). Sequence polymorphisms and structural variations among four grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars representing Sardinian agriculture. *Frontiers in plant science*, Vol 8, p: 1279.

- Merdinoglu, D., Butterlin, G., Baur, C., & Balthazard, J. (1998). Comparison of RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for genetic diversity analysis in *Vitis vinifera* L. In VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding, Vol 528, p: 195-200.
- Meredith, C. P., Bowers, J. E., Riaz, S., Handley, V., Bandman, E. B., & Dangl, G. S. (1999). The identity and parentage of the variety known in California as Petite Sirah. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 50, Issue 3, p: 236-242.
- Miazzi, M. M., D'Agostino, N., di Rienzo, V., Venerito, P., Savino, V. N., Fucilli, V., ... & Taranto, F. (2020). Marginal grapevine germplasm from Apulia (Southern Italy) represents an unexplored source of genetic diversity. *Agronomy*, Vol 10, Issue 4, p: 563-581.
- Migliaro, D., De Lorenzis, G., Di Lorenzo, G. S., De Nardi, B., Gardiman, M., Failla, O., ... & Crespan, M. (2019). Grapevine non-vinifera genetic diversity assessed by simple sequence repeat markers as a starting point for new rootstock breeding programs. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 70, Issue 4, p: 390-397.
- Moncada, X., Pelsy, F., Merdinoglu, D., & Hinrichsen, P. (2006). Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. *Genome*, Vol 49, Issue 11, p: 1459-1472.
- Moravcova, K., Baranek, M., & Pidra, M. (2004). The use of RAPD markers for differentiation of grapevine varieties registered in the Czech Republic. *Zahradnictvi Horticultural Science*, Vol 31, p: 96-101.
- Moravcova, K., Baranek, M., & Pidra, M. (2006). Use of SSR markers to identify grapevine cultivars registered in the Czech Republic. *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, Vol 40, Issue 2, p: 71-80.
- Moreno, S., Gogorcena, Y., & Ortiz, J. M. (1995). The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia horticultrae*, Vol 62, Issue 4, p:237-243.
- Moreno-Sanz, P., Loureiro, M. D., & Suárez, B. (2011). Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). *Scientia horticultrae*, Vol 129, Issue 3, p: 433-440.
- Mujahed, A., & Basheer-Salimia, R. (2019). Molecular analysis of genetic diversity among different grape accessions using DNA markers. *Journal of Biotech Research*, Vol 10, p: 190-198.
- Mulcahy, D. L., Cresti, M., Linskens, H. F., Pancaldi, M., Silvestroni, O., Vignani, R., & Intrieri, C. (1995). DNA fingerprinting of Italian grape varieties: a test of reliability in RAPDs. *DNA Fingerprinting of Italian Grape Varieties, Advances in Horticultural Science*, p: 185-187.
- Narvaez, C., Valenzuela, J., & Hinrichsen, P. R. (2001). Fingerprinting of wine grape cultivars most commonly grown in Chile based on microsatellite markers. *Agricultura Tecnica*, Vol 61, Issue 3, p: 249-261

- Narvaez R, C., Valenzuela B, J., Muñoz, S., & Hinrichsen R, P. (2000). Comparison of RAPD and AFLP as methods for genetic identification of *Vitis* based on the analysis of anonymous genomic sequences. *Agricultura Técnica*, Vol 60, Issue 4, p: 320-340.
- Negrout, A. (1946). *Evropejskij I aziatskij from vinograd Vitis vinifera L.* Ampelografia S.S.R.R. Moscou
- Nunez, Y., Fresno, J., Torres, V., Ponz, F., & Gallego, F. J. (2004). Practical use of microsatellite markers to manage *Vitis vinifera* germplasm: Molecular identification of grapevine samples collected blindly in DO “El Bierzo”(Spain). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol 79, Issue 3, p: 437-440.
- Ohmi, C., Wakana, A., & Shiraishi, S. (1992). Study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isozymes. *Euphytica*, Vol 65, p: 195-202
- OIV. (2001). 2nd Edition of the OIV Descriptor list for Grape Varieties and *Vitis* Species
- Orasmo, Gleice Riberio., Collet, Sandra A de Oliveira, Machado, Maria de Fatima P.S. (2010). Diversidade Genetica Em *Vitis lambrusca* e Híbridos Interespecificos Usando Padroes de Isoesterase. VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. <http://rdu.unicesumar.edu.br/handle/123456789/6316>
- Ortiz, M. J., Martín, P. J., Borrego, J., Chávez, J., Rodríguez, I., Muñoz, G., & Cabello, F. (2004). Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Vol 51, Issue 4, p: 403–409.
- Ortlieb, C., Eimert, K., Ries, R., & Wolf, T. (2000). Routine Extraction of DNA from Grapevine (*Vitis spp.*) Canes and Roots for Variety Identification by RAPD-PCR. In *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture* , Vol 546, p: 527-533
- Owens, C. (2002, August). SNP detection and genotyping in *Vitis*. In *VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding*, Vol 603, p: 139-140.
- Paludetti, G., Crespan, M., Zago, S., Calo, A., Costacurta, A., & Delledonne, M. (1996). Characterization of *Vitis vinifera L.* cultivars by RFLP [restriction fragment length polymorphism] markers. *Agris*, Vol 49, Issue 1, p : 59-63
- Pamfil, D. (2010). Genetic diversity of some Romanian grapevine cultivars as revealed by microsatellite markers. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol 15, Issue 2, p: 26-31.
- Papapetrou, M., Loukovitis, D., Papadopoulos, O., Kazlari, Z., Peristeraki, A., Arsenova, S., ... & Chatziplis, D. (2020). Genetic Diversity of Local Greek and Bulgarian Grapevine (*Vitis Vinifera L.*) Varieties. *Diversity*, Vol 12, Issue 7, p: 273-282.
- Parfitt, D., & Arulsekar, S. (1989). Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among grape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*. Vol 114, Issue 3, p: 486- 491

Parker, L., Bordallo, P., & Colova, V. (2005, December). Tracing the pedigree of Cynthiana grape by DNA microsatellite markers. In Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Vol. 118, p: 200-204.

Pereira, L., & Martins-Lopes, P. (2015). *Vitis vinifera* L. Single-Nucleotide polymorphism detection with high-resolution melting analysis based on the UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase gene. Journal of agricultural and food chemistry, Vol 63, Issue 41, p: 9165-9174.

Petrea, G., Tardea, C., Rotaru, L., & Pop, R. (2021). Use of the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique for revealing the DNA Molecular Polymorphism in some Autochthonous Grapevine Varieties. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Romania

Pinto-Carnide, O., Martín, J. P., Leal, F., Castro, I., Guedes-Pinto, H., & Oriz, J. M. (2003). Characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from northern Portugal using RAPD and microsatellite markers. CGB-Centro de Genética e Biotecnologia.

Pollefeys, P., & Bousquet, J. (2003). Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America. Genome, Vol 46, Issue 6, p: 1037-1048.

Prins, R., Van Heerden, C. J., Burger, A. L., Burger, P., & Smit, W. A. (2006, July). DNA fingerprinting of table grape cultivars. In IX International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vol 827, p: 269-274.

Qu, X., Lu, J., & Lamikanra, O. (1996). Genetic diversity in Muscadine and American bunch grapes based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science, Vol 121, Issue 6, p: 1020-1023.

Rafalski, A. (2002). Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics Curr. Opin. Plant Biol., Vol 5, p: 94-100.

Rao, V., & BN, N. P. S. M. (2017). Role of SSR markers in characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) genotypes and hybrids. Inter. J. Agr. Innov. Res, Vol 5, Issue 5, ISSN 2319-1473.

Ravishankar, K. V., Anand, L., Murthy, B. N. S., & Prakash, G. S. (2005). Genetic diversity analysis among few grape species and cultivars using RAPD markers. Indian Journal of Horticulture, Vol 62, Issue 3, p: 219-222.

Reale, S., Pilla, F., & Angiolillo, A. (2006). Genetic analysis of the Italian *Vitis vinifera* cultivar 'Tintilia' and related cultivars using SSR markers. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, Vol 81, Issue 6, p: 989-994.

Regner, F., Wiedeck, E., & Stadlbauer, A. (2000). Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. Vitis, Vol 39, Issue 3, p:103-107.

Reisch, B. (1998). Molecular markers - the foundation for grapevine genetic mapping, DNA fingerprinting and genomics. Proc. 7th Intern. Symp. Grapevine Genetics and Breeding. Montpellier, France.

Riahi, L., Zoghalmi, N., Fournier-Level, A., Dereeper, A., Le Cunff, L., Laucou, V., ... & This, P. (2013). Characterization of single nucleotide polymorphism in Tunisian grapevine genome and their potential for population genetics and evolutionary studies. *Genetic resources and crop evolution*, Vol 60, Issue 3, p: 1139-1151.

Riaz, S., Tenschler, A. C., Smith, B. P., Ng, D. A., & Walker, M. A. (2008). Use of SSR markers to assess identity, pedigree, and diversity of cultivated muscadine grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol 133, Issue 4, p: 559-568.

Riccardi, P., Lauria, G., Grillo, R., Fiore, M. C., Cifarelli, R., & Sunseri, F. (2006). Assessing genetic diversity of Nero d'Avola grapevine cultivar by using SSR markers. In *Proceedings of the 50th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress*, Ischia, Italy

Rodrigues, J. A. (2021). Microsatellite DNA fingerprinting of a new vinifera red grapevine cultivar, Cabernet labrusco, indigenous to South Africa. University Cape Town

Rodrigues, J., & Nel, A. (2018). The ancient origins of Black Herbemont and Jacquez in South Africa. University of Cape Town

Royo B., Gonzalez J., Laquidain M. J., Larumbe M. P. (1989): Caracterization mediante analisis isoenzimatico de clones de la vinifera "Garnacha" (*Vitis vinifera L.*). *Investigacion agraria. Produccion y proteccion vegetales*. Vol 4, Issue 3, p: 343-354.

Royo, J., Cabello, F., Miranda, S., Gogorcena, Y., Gonzales, J., Moreno, S., Itoiz, R., & Ortiz, J. (1997). The use of isoenzymes in characterization of grapevines (*Vitis vinifera, L.*). Influence of the environment and time of sampling. *Scientia Horticulturae*, Vol 69, Issue 3, p: 145-155

Sabir, A., Dogan, Y., Tangolar, S., & Kafkas, S. (2010). Analysis of genetic relatedness among grapevine rootstocks by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. *J. Food Agric. Environ*, Vol 8, Issue 1, p: 210-213.

Salama, A. M., Zayan, M., Shereif, A., & Gaser, A. (2020). Genetic Diversity and Relationships Among Grapevine Rootstock Motants Through RAPD Technique. *Journal of Productivity and Development*, Vol 25, Issue 1, p: 79-99.

Saleh, O., El, Shony, A.H., Fahmy, E.M., Mansour, N.M., & Abdel-Tawab, F. M. (2015). Marker-assisted selection for yield and quality traits in some grape cultivars (*Vitis vinifera L.*). *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, Vol 44, Issue 1, p: 165-188

Samaan, L.G., & Wallace, D. H. (1981). Taxonomic affinities of 5 cultivars of *Vitis vinifera L.* as aided by serological analysis of pollen proteins. *J. Amer. Soc.Hort. Sci.*, Vol 106, p: 804-809.

Sanchez-Escribano, E., Ortiz, J., & Cenis, J. (1998). Identification of table grape cultivars (*Vitis vinifera L.*) by the isoenzymes from the woody stems. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Vol 45, p: 173-179

- Sawazaki, H. E., Pommer, C. V., Passos, I. R. D. S., Terra, M. M., & Pires, E. J. P. (1996). Identificação de parentais e híbridos entre *Vitis vinifera* e *Vitis rotundifolia* utilizando polimorfismo enzimático e marcador RAPD. *Bragantia*, Vol 55, p: 221-230.
- Scali, M., Elisa, P., Jacopo, B., Mauro, C., & Vignani, R. (2014). Vineyards genetic monitoring and Vernaccia di San Gimignano wine molecular fingerprinting. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol 5, Issue 2, p: 142-154.
- Schneider, A., Boccacci, P., & Botta, R. (2002). Genetic relationships among grape cultivars from North-Western Italy. In VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding 603, p: 229-235.
- Schneider, A., Carra, A., Akkak, A., Boccacci, P., & Botta, R. (2003). [Ampelographic descriptions and molecular marker analyses aimed at verifying synonymies among local grape cultivars [*Vitis vinifera* L.-France-Lombardy-Piedmont]]. *Vignevisini (Italy)*.
- Schneider, A., Carra, A., Akkak, A., This, P., Laucou, V., & Botta, R. (2001). Verifying synonymies between grape cultivars from France and Northwestern Italy using molecular markers. *Vitis-Geilweilerhof*, Vol 40, Issue 4, p: 197-204.
- Schwennesen, C. (1981). Gel electrophoresis for determining isozyme differences in 'superior seedless' grapes. Publisher: University of Arizona
- Schwennesen J., Mielke, E. A., Wolfe, W. H. (1982). Identification of Seedless Table Grape Cultivars and Bud Sport with Berry Isozymes. *Hort Science* Vol 17, p: 366-368.
- Scott, K. D., Ablett, E. M., Lee, L. S., & Henry, R. J. (2000). AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica*, Vol 113, Issue 3, p: 243-247.
- Sefc, K. M., Lefort F, Grando, M. S., Scott, K., Steinkellner, H., Thomas, M. (2001) Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. In: *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Roubelakis-Angelakis KA (ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p: 433-466
- Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W., & Biricolti, S. (1996). Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis-Geilweilerhof*, Vol 35, p: 183-188.
- Shinde, M. P., Upadhyay, A., Aher, L. B., & Karibasappa, G. S. (2013). Molecular marker analysis to differentiate a clonal selection of Centennial Seedless grapevine. *African Journal of Biotechnology*, Vol 12, Issue 14, p: 1594-1597.
- Shiraishi, S., Ohmia Wakama, C., Hiramatsu, M. (1994): Variation of Glucosephosphate Isomerase and Phosphoglucosmutase Isozymes in *Vitis* and Their use in Grape Breeding. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, Vol 38, Issue 3, p: 255-272.
- Siles, B. A., O'Neil, K. A., Fox, M. A., Anderson, D. E., Kuntz, A. F., Ranganath, S. C., & Morris, A. C. (2000). Genetic fingerprinting of grape plant (*Vitis vinifera*) using random

amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and dynamic size-sieving capillary electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol 48, Issue 12, p : 5903-5912.

Singh, A., Kumar, K., Gill, M. I. S., Chhuneja, P., Arora, N. K., & Singh, K. (2013). Genotype identification and inference of genetic relatedness among different purpose grape varieties and rootstocks using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, Vol 12, Issue 2, p: 135-141.

Sivolap, I. M., Balashova, I. A., & Troshin, L. P. (1996). The genetic polymorphism of the grape studied by RAPD analysis. *Tsitologiya i genetika*, Vol 30, Issue 6, p:33-37.

Soler, J. X., Martínez-Gil, F., Ruiz, J. J., Picó, B., Gisbert, C., Esteras, C., & Peiró, R. (2018). Genetic variability in grapevine clones of 'Muscat of Alexandria'. In XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Vol 1248, p: 77-80.

Solouki, M., Nazhad, N. R., Vignani, R., Siahisar, B. A., Kamaladini, H., & Emamjomeh, A. (2007). Polymorphism of some native Sistan grapes assessed by long and short primers for RAPD markers. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, Vol 10, Issue 12, p: 1996-2001.

Soylemezoglu, G., Weeden, N., Lamboy, W., Pool, R., & Reisch, B. (1998). Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting *Vitis* 37, Issue 1, p: 33-38

Soylemezoglu, G., Agaoglu, Y., & Uzun, H. (2014). Ampelographic Characteristics and Isozymic Analysis of *Vitis Vinifera* Spp. *Sylvestris* Gmel. in Southwestern Turkey . *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 15, Issue 2, p : 106-113

Spooner, D.M., van Treuren, R., de Vicente, M.C. (2005). Molecular markers for genebank management. International Plant Genetic Resources Institute, Rome

Sripholtaen, A., Charoenchai, C., & Urairong, H. (2016). Application of microsatellite markers for identification of wine grape varieties in Thailand. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, Vol 21, Issue 1, p: 97-110.

Stajner, N., Jakse, J., Javornik, B., Masuelli, R. W., & Martínez, L. E. (2009). Highly variable AFLP and S-SAP markers for the identification of " Malbec" and " Syrah" clones. *Vitis*, Vol 48, Issue 3, p: 145-150

Stefanovits-Bányai, É., Lakatos, S., Hajós-Novák, M., Hajdu, E., & Balogh, I. (2002). Recent developments in biochemical characterization of *Vitis vinifera* L. varieties in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, Vol 8, Issue 2, p: 57–61.

Stenkamp, S. H., Becker, M. S., Hill, B. H., Blauch, R., & Forneck, A. (2009). Clonal variation and stability assay of chimeric Pinot Meunier (*Vitis vinifera* L.) and descending sports. *Euphytica*, Vol 165, Issue 1, p: 197-209.

Striem, M. J., Ben-Hayyim, G., & Spiegel-Roy, P. (1996). Identifying molecular genetic markers associated with seedlessness in grape. *American Society for Horticultural Science (USA)*, Vol 121, Issue 5, p: 758-763.

- Su-Lan, L. U. O., Pu-Chao, H. E., Xue-Qin, Z. H. E. N. G., & Peng, Z. H. O. U. (2001). Genetic diversity in wild grapes native to China based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol 43, Issue 2, p: 158.
- Subden, E., Carey, K., Krizus., & Meiering, G. (1992). Genetic stability in the *Vitis vinifera* L. cv. "Chardonnay", wild accessions of *Vitis riparia* Michx. and the Hybrid cv. "Seyval Blanc". *Canadian Journal of Plant Science* . Vol 72, No 3, p: 875-882
- Subden, R. E., Krizus A., Loughheed S. C., Carey K. (1987): Isozyme Characterisation of *Vitis* Species and Some Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 38, p: 176-181.
- Taheri, F., & Darzi Ramandi, H. (2020). Microsatellite Markers Analysis for the Genetic Characterization and Relationships among Some of Iranian Local Grapevine Accessions (*Vitis Vinifera* L.). *International Journal of Fruit Science*, Vol 20, Issue 2, p:387-404.
- Tangolar, S. G., Soydam, S., Bakir, M., Karaagac, E., & Ergul, A. (2009). Genetic analysis of grapevine cultivars from the eastern Mediterranean region of Turkey based on SSR Markers. *Tarim Bilim Derg*, Vol 15, Issue 1, p: 1-8.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, Vol 12, Issue 10, p:4127–4138
- Techera, A. G., Jubany, S., De León, I. P., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F. M., ... & Gaggero, C. (2015). Molecular diversity within clones of cv. Tannat (*Vitis vinifera*). *Vitis-Journal of Grapevine Research*, Vol 43, Issue 4, p: 179-185.
- Theocharis, A., Hand, P., Pole, J., Cevik, V., Fisarakis, I., & Henderson, J. (2010). Study of genetic diversity among inter-intraspecific hybrids and original grapevine varieties using AFLP molecular markers. *Australian Journal of Crop Science*, Vol 4, Issue 1, p: 1-8.
- This, P., Cuisset, C., & Boursiquot, J. M. (1997). Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 48, Issue 4, p: 492-501.
- This. P., Jung,A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., ... Maul,E. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars *Theor Appl Genet*, Vol 109, p: 1448-1458
- Tomic, L., Stajner, N., Cvetkovic, M., & Javornik, B. (2012). Collection and genetic characterization of *Vitis vinifera*'Zilavka'by microsatellites and AFLP markers. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol 99, Issue 2, p: 143.
- Tomić, L., Štajner, N., Jovanović-Cvetković, T., Cvetković, M., & Javornik, B. (2012). Identity and genetic relatedness of Bosnia and Herzegovina grapevine germplasm. *Scientia horticultrae*, Vol 143, p: 122-126.
- Torello Marinoni, D., Raimondi, S., Boccacci, P., & Schneider, A. (2006). Lambruschi from Piedmont: historical investigations, fingerprinting and genetic relationships with other

- autochthonous Italian grapes [*Vitis vinifera* L.]. *Italus Hortus* (Italy), Vol 13, Issue 2, p: 158-161
- Ulanovsky, S., Gogorcena, Y., de Toda, F. M., & Ortiz, J. M. (2002). Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, Vol 92, Issue 3-4, p: 241-254.
- Upadhyay, A., Lalitkumar, B. A., & Gaudar Shivshankar, K. (2011). Detection of variation among clonal selections of grapevine (*Vitis vinifera* L.) 'Kishmish Chernyi' by AFLP analysis. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol 86, Issue 3, p: 230-234.
- Upadhyay, A., Saboji, M. D., Reddy, S., Deokar, K., & Karibasappa, G. S. (2007). AFLP and SSR marker analysis of grape rootstocks in Indian grape germplasm. *Scientia horticulturae*, Vol 112, Issue 2, p: 176-183.
- Van Heerden, C. J., Burger, P., & Prins, R. (2018). Microsatellite-based DNA fingerprinting of selected grapevine cultivars. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Vol 39, Issue 1, p: 58-66.
- Veloso, M.M., Almandanim, M.C., Baleiras-Couto, M., Pereira, H.S., Carneiro, L.C., Feveiro, P., & Eiras-Dias, J. (2010). Microsatellite database of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars used for wine production in Portugal. *Ciência Téc. Vitiv*, 25, Issue 2, p: 53-61.
- Vezzulli, S., Troglio, M., Coppola, G., Jermakow, A., Malacarne, G., Facci, M., ... Velasco, R. (2009). Physical Anchoring and Integrated Genetic Mapping Among Five Elite Cultivars of *Vitis vinifera*. *Acta Horticulturae*, Vol 827, p: 35-40
- Vidal, J. R., Coarer, M., & Defontaine, A. (1999). Genetic relationships among grapevine varieties grown in different French and Spanish regions based on RAPD markers. *Euphytica*, Vol 109, Issue 3, p: 161-172.
- Vidal, J. R., Moreno, S., Gogorcena, Y., Masa, A., & Ortiz, J. M. (1999). On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *American journal of enology and viticulture*, Vol 50, Issue 1, p: 69-75.
- Vidal, J., Moreno, S., Masa, A., & Ortiz, J. (1998). Study of the genetic homogeneity of Albarino (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isozyme and RAPD markers. *Vitis*, Vol 37, Issue 3, p: 145-146
- Vignani, R., Bowers, J. E., & Meredith, C. P. (1996). Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* 'Sangiovese'. *Scientia horticulturae*, Vol 65, Issue 2-3, p: 163-169.
- Vlastnikova, H., Moravcová, K., & Pidra, M. (2004). The RAPD analysis of several cultivars of grapevine (*Vitis vinifera* L.) and their clones. *Hort. Sci (Prague)*, Vol 31, Issue 4, p: 136-139.

- Vouillamoz, J., Maigre, D., & Meredith, C. P. (2003). Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L.'Cornalin du Valais'. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 107, Issue 3, p: 448-454.
- Vouillamoz, J. F., Maigre, D., & Meredith, C. P. (2004). Identity and parentage of two alpine grape cultivars from Switzerland (*Vitis vinifera* L. Lafnetscha and Himbertscha). *Vitis-Geilweilerhof*, Vol 43, p: 81-88.
- Walker, A., & Liu, L. (1995). The Use of Isozymes to Identify 60 Grapevine Rootstocks (*Vitis* spp.). *American Society for Enology and Viticulture*, Vol 46, Issue 3, p: 299-305
- Walker, M., & Boursiquot, M. (1992). Ampelographic and Isozyme Data Correcting the Misnaming of the Grape Rootstock SO4 at the University of California, Davis. *American Society for Enology and Viticulture*, Vol 43, 3, p: 261-265
- Walters, T., Posluszny, U., & Kevan, P. (1989). Isozyme analysis of the grape (*Vitis*). I. A practical solution. *Canadian Journal of Botany*, Vol 67, Issue 10, p: 2894-2899
- Wang, J., Wu, S., Zhang, F., & Gao, J. (2010). Grape genomic DNA extraction and optimization of RAPD reaction system. *Xinjiang Agricultural Sciences*, Vol 47, Issue 6, p: 1066-1070.
- Wang, Y., Chen, J., Lu, J., & Lamikanra, O. (1999). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. *Scientia horticultrae*, Vol 82, Issue 1-2, p: 85-94.
- Weeden, N. F., Reisch B. I., & Martens, M. H. E. (1988): Genetic Analysis of Isozyme Polimorohism in Grape. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, Vol 113, Issue 5, p: 765-769.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, Vol 18, Issue 24, p: 7213-7218.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, Vol 18, Issue 22, p: 6531-6535.
- Wolf, T., Eimert, K., & Ries, R. (1999). Reliable identification of grapevine rootstock varieties using RAPD PCR on woody samples. *Australian Journal of grape and wine Research*, Vol 5, Issue 2, p: 34-38.
- Wolfe, W. (1976). Identification of Grape Varieties by Isozyme Banding Patterns. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 27, p: 68-73
- Wu, H., Chang, Y.Y., Hao, Y., & Wu, Y.X. (2008). Identifying grape cultivars and evaluating their genetic relationship by RAPD markers. *Journal of Fruit Science*, 06.
- Wu, H., Gao, K., Qyu, L., & Chang, Y. (2013). Genomic DNA extraction and RAPD system optimization of grape. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, Vol 25, Issue 3, p: 498-502.

- Xu, H., Wilson, D. J., Arulsekar, S., & Bakalinsky, A. T. (1995). Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol 120, Issue 5, p: 714-720.
- Xuan, H., Horny, J., & Sturm, J. (2014, August). Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist the identification of grape (*Vitis vinifera*) cultivars. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): Vol 1110, p: 133-140.
- Yamamoto, N., Ono, G., Takashima, K., & Yotsuka, A. (1991). Restriction Fragment Length Polymorphisms of Grapevine DNA with Phenylalanine Ammonia-Lyase cDNA. *Japanese Journal of Breeding*, Vol 41, Issue 2, p: 365-368
- Ye, G. N., Söylemezoğlu, G., Weeden, N. F., Lamboy, W. F., Pool, R. M., & Reisch, B. I. (1998). Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis*, Vol 37, Issue 1, p: 33-38
- Yilancioglu, K., & Cetiner, S. (2013). Rediscovery of historical *Vitis vinifera* varieties from the South Anatolia region by using amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat DNA fingerprinting methods. *Genome*, Vol 56, Issue 5, p: 295-302.
- Yılmaz, F., Shidfar, M., Hazrati, N., Kazan, K., Özmen, C. Y., Uysal, T., ... & Ergül, A. (2020). Genetic analysis of central Anatolian grapevine (*Vitis vinifera* L.) germplasm by simple sequence repeats. *Tree Genetics & Genomes*, Vol 16, Issue 4, p: 1-11.
- Yoo, K. Y., Cho, K. H., Shin, I. S., Kim, J. H., Heo, S., Noh, J. H., & Kim, H. R. (2009). Analysis of Genetic Relationships of Grapevine Cultivars (*Vitis* spp.) in Korea Using RAPD Markers. *Korean Journal of Breeding Science*, Vol 41, Issue 4, p: 437-443.
- Young-Sik Park, In-Jong Kim, Jae-Yun Heo, Byeong-Chan Jeon, In-Myung Choi, Sung-Min Park. (2007). Identification of Gaeryangmeoru (*Vitis* sp.)'s Origin Using Isozyme Analysis. *Horticulture Environment and Biotechnology*, Vol 48, Issue 6, p: 404-407
- Zhao, M. Z., Zhang, Y. P., Wu, W. M., Wang, C., Qian, Y. M., Yang, G., & Fang, J. G. (2011). A new strategy for complete identification of 69 grapevine cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr. J. Plant Sci*, Vol 5, Issue 4, p: 273-280.
- Zhisheng, M., Puchao, H. (1998). A study on the taxonomy and relationship of wild vitis native to China with POD isozyme. *Acta Agriculturae Boreali-sinica*, Vol 13, Issue 2, p: 122-126.
- Zhong, H., Zhang, F., Zhou, X., Pan, M., Xu, J., Hao, J., ... & Wu, X. (2021). Genome-wide identification of sequence variations and SSR marker development in the Munake grape cultivar. *Frontiers in Ecology and Evolution*, Vol 9, p: 190.
- Zinelabidine, L. H., Haddioui, A., Rodríguez, V., Cabello, F., Eiras-Dias, J. E., Zapater, J. M. M., & Ibáñez, J. (2012). Identification by SNP analysis of a major role for Cayetana Blanca in the genetic network of Iberian Peninsula grapevine varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 63, Issue 1, p: 121-126.

Zoghلامي, N., Mliki, A., & Ghorbel, A. (2001). Evaluation of genetic diversity among Tunisian grapevines by RAPD markers. *Vitis-Geilweilerhof*, Vol 40, Issue 1, p: 31-38.

Zoghلامي, N., Riahi, L., Laucou, V., Lacombe, T., Mliki, A., Ghorbel, A., & This, P. (2009). Origin and genetic diversity of Tunisian grapes as revealed by microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, Vol 120, Issue 4, p: 479-486.

Zulini, L., Fabro, E., & Peterlunger, E. (2005). Characterisation of the grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers. *Vitis* Vol 44, Issue 1, p: 35-38

Zulini, L., Peterlunger, E., & Fabro, E. (2002). Genetic stability within the grapevine cultivar Picolit revealed by microsatellite and AFLP markers [*Vitis vinifera* L.-Friuli-Venezia Giulia]. *Atti VI Giornate Scientifiche SOI (Italy)*.

Zulini, L., Russo, M., & Peterlunger, E. (2002). Genotyping wine and table grape cultivars from Apulia (Southern Italy) using microsatellite markers. *Vitis-Geilweilerhof*, Vol 41, Issue 4, p: 183-188.

Žulj Mihaljević, M., Maletić, E., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Zyprian, E., & Pejić, I. (2020). Genetic diversity, population structure, and parentage analysis of Croatian grapevine germplasm. *Genes*, Vol 11, Issue 7, p: 737-772.