

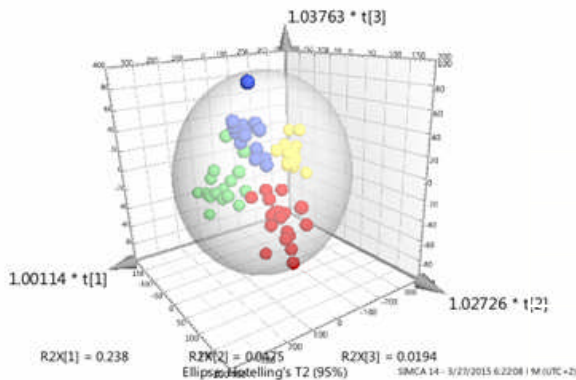
## Ισοτοπική Χαρτογράφηση Ποικιλιών ΑΦ

Το Εργαστήριο NMR του ΓΧΚ για τις ανάγκες της ισοτοπικής χαρτογράφησης, επιτάχυνε τη ζύμωση των γλευκών με ζυμομύκητες (*Cerevisseu Βαγιαους*), ώστε να μετατραπούν όλα τα σάκχαρα σε αλκοόλη με παράλληλη μελέτη της επίδρασης του χρόνου και της θερμοκρασίας ζύμωσης.

Τόσο για την αιθανόλη που παραλήφθηκε από τη ζύμωση του γλεύκους, όσο και για τα εμφιαλωμένα κρασιά, έγινε απόσταξη με το σύστημα ADCS. Σε αυτήν προσδιορίστηκαν οι ισοτοπικοί λόγοι του δευτερίου και του άνθρακα. Ο προσδιορισμός των ισοτοπικών λόγων του δευτερίου στην αιθανόλη έγινε με την τεχνική SNIF-NMR (Ε.Κ. 2729/2000).

Το ισοτοπικό και στοιχειακό αποτύπωμα των δειγμάτων κρασιού, μούστου και οινολάσπης του Έργου, εμπλούτισαν την υφιστάμενη βάση και επέτρεψαν τη διερεύνηση διάκρισης της ποικιλίας προέλευσης.

Η ισοτοπική χαρτογράφηση του κυπριακού αμπελώνα, αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την πιστοποίηση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης των κυπριακών οίνων/οινικών προϊόντων, για προστασία και ανάδειξή τους.



Διάγραμμα ισοτοπικής ταξινόμησης οίνων από ξυνιστέρι (κίτρινο), σουλτανίνα (μπλε), μαραθεϊτικό (κόκκινο) και cabernet sauvignon (πράσινο).

### ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΤΡΑΠΕΖΑ ΙΣΟΤΟΠΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΟΙΝΟΥ

Το Εργαστήριο NMR του ΓΧΚ συμμετέχει στη δημιουργία Κοινής Ευρωπαϊκής Τράπεζας Ισοτοπικών Χαρακτηριστικών των Οίνων, σύμφωνα με τον ΕΚ 555/2008. Ταυτόχρονα, δημιουργεί την Εθνική Βάση στην οποία περιλαμβάνονται οι ισοτοπικοί λόγοι του δευτερίου, του άνθρακα και του οξυγόνου για τοπικούς κ.ά. οίνους καθώς και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε οινοποιητικής περιοχής.

### Στόχος Ερευνητικού Έργου!

Ο στόχος του Έργου ήταν η δημιουργία ενός νέου οινικού προϊόντος για την Ι.Π ΓΑΙΑ ΟΙΝΟΤΕΧΝΙΚΗ ΛΤΔ που ήταν ο Ανάδοχος Φορέας (ΑΦ), με κρασί ταυτοποιημένης ποικιλίας προέλευσης με DNA μεθοδολογία με μοριακούς δείκτες μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP - Single Nucleotide Polymorphism).

Για την ταυτοποίηση της γενετικής καθαρότητας των ποικιλιών αμπέλου του ΑΦ με ισοτοπικές αναλύσεις προσδιορίστηκε ο αλκοολικός βαθμός και οι ισοτοπικοί λόγοι του Δευτερίου (D/H)I, (D/H)II, του Άνθρακα <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C και του Οξυγόνου <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O.

### Καινοτομία Ερευνητικού Έργου!

Η καινοτομία και η πρωτοτυπία του Έργου εστιάζεται στο γεγονός ότι είναι η πρώτη φορά που έχει αναπτυχθεί στην Κύπρο μια DNA μεθοδολογία βασισμένη στους πολυμορφισμούς τύπου SNP για την ανάλυση της αυθεντικότητας και μοναδικότητας των κυπριακών κρασιών και την ταυτοποίηση της ποικιλίας προέλευσης τους.



### Προστιθέμενη Αξία!

Το ερευνητικό Έργο συνεισφέρει στην ανίχνευση της αυθεντικότητας των κυπριακών κρασιών. Επίσης συμβάλλει στην προστασία και καλύτερη προώθηση των ΟΠΑΠ ή ΠΟΠ κρασιών της Κύπρου. Τα αποτελέσματα του Έργου δύναται να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη της Κυπριακής Οινοποιητικής Παραγωγής. Μέσα από την ερευνητική εργασία έχει η πρώτη SNP βάσης δεδομένων του είδους *Vitis vinifera* από Κυπριακές ποικιλίες.

### Προστιθέμενο Όφελος!

Τα δεδομένα του Έργου θα βοηθήσουν την έρευνα σε θέματα μοριακής φυσιολογίας και λειτουργικής γονιδιωματικής, με στόχο τη βελτίωση των ντόπιων ποικιλιών που χρησιμοποιούνται για οινοποίηση κυπριακών κρασιών. Τα αποτελέσματα του Έργου θα ενισχύσουν την εμπιστοσύνη των καταναλωτών οι οποίοι απαιτούν κρασί υψηλής προστιθέμενης αξίας και ακριβή, τίμια και καθαρή πληροφορία στη σήμανση των μπουκαλιών.

## Ερευνητικό Έργο

"ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ/ΠΡΟΪΟΝ/0609/99"

«ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΚΑΙ ΜΟΥΣΤΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ DNA ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ»

### Ομάδα Ερευνητικού Έργου

Ανάδοχος Φορέας (ΑΦ)



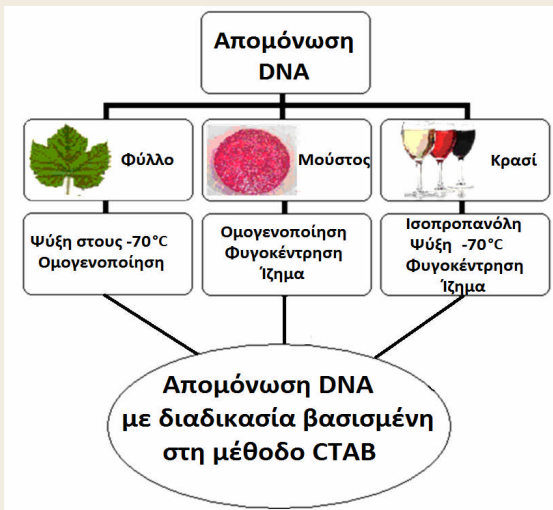
Συνεργαζόμενοι Φορείς (ΣΦ)



Χρηματοδότηση Ερευνητικού Έργου



Το Έργο συγχρηματοδοτείται από την Κυπριακή Δημοκρατία (Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας) και το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Το Εργαστήριο Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών του ΓΧΚ για την εργαστηριακή απομόνωση DNA από φύλλο, μούστο και εμφιαλωμένο κρασί χρησιμοποίησε διαφορετική μεθοδολογία για το κάθε ένα από τα τρία υποστρώματα.

Για τα υποστρώματα μούστου και κρασιού υπήρξε μια σχετική δυσκολία στην απομόνωση λόγω:

(I). Της αποσύνθεσης του φυτικού DNA κατά την διάρκεια της ζύμωσης.

(II). Της παρουσίας πολυσακχαριτών και πεπτιδίων που ενεργούσαν ως ανασταλτικοί παράγοντες.

(III). Της παρουσίας πολυφαινόλων που αναστέλλουν την DNA πολυμεράση κατά την διάρκεια της PCR.

(IV). Της αποδιάταξης του DNA που οφείλεται στην παρουσία ενζύμων και στη διαδικασία οινοποίησης.

Ως αποτέλεσμα των εργασιών ήταν να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα και ποιότητα DNA, από 160 δείγματα αμπελόφυλλων, 160 δείγματα μούστου και 160 δείγματα κρασιού.

Το απομονωμένο DNA στάλθηκε στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (MAIX), για χαρακτηρισμό μέσω SNP μεθοδολογίας.

## Ανάλυσης Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας DNA

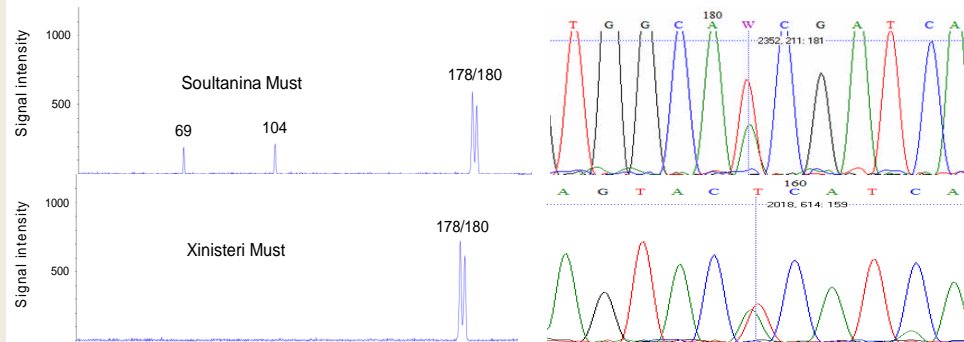
Το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων με την Ανάλυση Νουκλεοτιδικής Αλληλουχίας DNA έχει σχηματίσει ένα μοριακό προφίλ του κρασιού του ΑΦ που θα το ξεχωρίζει από άλλα κρασιά της αγοράς

Για την έρευνα γνησιότητας των κρασιών παραγωγής του Ανάδοχου Φορέα, επιλέχθηκαν τεχνολογικές πλατφόρμες ανάλυσης DNA. Οι πλατφόρμες αυτές είναι αξιόπιστες ενώ και το όριο ανίχνευσης είναι σχετικά χαμηλό. Έγινε προσπάθεια για να προσδιοριστούν SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ως μοριακοί δείκτες βασιζόμενοι σε DNA για τη διάκριση 8 ποικιλιών κρασιού του ΑΦ.

Η τεχνολογική πλατφόρμα που χρησιμοποιήθηκε στο Έργο ήταν η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση PCR-RFLP. Χρησιμοποιήθηκαν δείκτες για τον προσδιορισμό του είδους και της ποικιλία των φυτών, καθώς επίσης και για την ανάπτυξη και για τη εύρεση μοριακών δεικτών για τη χαρτογράφηση του γενετικού υλικού και την εύρεση γονιδίων που επηρεάζουν ποσοτικά χαρακτηριστικά των φυτών παραγωγής οίνου του ΑΦ.

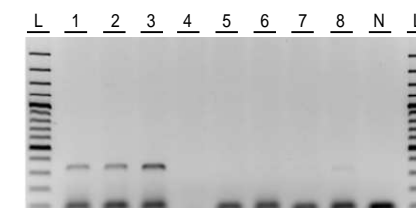
Η χρήση βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων με αναλυτικό στόχο το DNA, μπορούν να βοηθήσουν στην αξιόπιστη εύρεση της ποικιλίας προέλευσης προϊόντων κρασιού. Το DNA δεν επηρεάζεται από παράγοντες περιβαλλοντικούς όπως οι αναλυτικοί στόχοι μεθόδων της αναλυτικής χημείας και αυτό αποτελεί το μεγάλο πλεονέκτημα του. Σε συνδυασμό με τη σημαντική μείωση του κόστους εύρεσης και χρήσης

των μοριακών δεικτών, οι βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις αποτελούν μια σημαντική, μεθοδολογία για τη βεβαίωση της καθαρής αυθεντικότητας επεξεργασμένων τροφίμων και ποτών όπως το κρασί. Επιπρόσθετα, υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας Τράπεζας DNA και RNA η οποία θα μπορεί να αποτελεί τη βάση δεδομένων για τη διευκόλυνση του εντοπισμού της ποικιλίας προέλευσης οινικών προϊόντων άγνωστης προέλευσης.



Παραδείγματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης PCR-RFLP προϊόντων μούστου που εμπεριέχουν πολυμορφικό SNP και πολλαπλασιάστηκαν από DNA

Παραδείγματα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας PCR προϊόντων μούστου τα οποία εμπεριέχουν ετερόζυγα SNPs



L. 100bp DNA Ladder  
1. Soutanina  
2. Lefkada  
3. Cabernet Franc  
4. Shiraz  
5. Dopia Mavro  
6. Grenache Noir  
7. Xinisteri  
8. Cabernet Sauvignon  
N. Negative control

Παραδείγματα πηκτής Αγαρόζης με PCR προϊόντων μούστου με το SNP1 από DNA μούστου διάφορων ποικιλιών

## Μεθοδολογία Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων (RFLP)

Η μεθοδολογία Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLP) βασίζεται σε δύο τεχνικές (I) στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και (II) στη μεταφορά του DNA σε φίλτρα τα οποία υβριδίζουν με ένα σημασμένο τμήμα DNA κατά Southern. Τα ένζυμα περιορισμού κόβουν το πολύπλοκο γονιδίωμα σε διακριτά τμήματα συγκεκριμένου μεγέθους ελατώνοντας την πολυπλοκότητα. Όταν γονιδιωματικό DNA κόβεται με ένα ένζυμο περιορισμού τότε το πρότυπο των τμημάτων στην πηκτική αγαρόζη δεν είναι διακριτό αλλά διάχυτο. Το πρότυπο των πολυμορφικών ζωνών εμφανίζεται μετά από υβριδισμό με τον ανιχνευτή ραδιενεργά σημασμένο ή χημικά τροποποιημένο.