

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της εφαρμογής σκευασμάτων αμπισσικού οξέος και άνυδρου καολίνη στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας Ξινόμαυρο (*Vitis vinifera* L.) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

Δημήτρης Μ. Μαρούγκας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Αικατερίνη Μπινιάρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αθήνα
2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΜΠΕΛΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της εφαρμογής αμπισισικού οξέος και άνυδρου καολίνη στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας Ξινόμαυρο (*Vitis vinifera* L.) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

“Effect of abscisic acid and kaolin application on qualitative and quantitative characters of red grape cultivar Xinomavro (*Vitis vinifera* L.) during maturation”

Δημήτρης Μ. Μαρούγκας

Εξεταστική επιτροπή:

Αικατερίνη Μπινιάρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Ιωάννης Παπαδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Επίδραση της εφαρμογής αμπισιικού οξέος και άνυδρου καολίνη στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας Ξινόμαυρο (*Vitis vinifera* L.) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

ΔΠΜΣ Αμπελουργία – Οινολογία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Αμπελολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν οι ποιοτικοί και ποσοτικοί χαρακτήρες της ερυθρής οινοποιήσιμης ποικιλίας 'Ξινόμαυρο' (*Vitis vinifera* L.) εξετάζοντας την επίδραση της εφαρμογής εξωγενούς αμπισιικού οξέος απευθείας στις σταφυλές των πρέμων καθώς και των διαφυλλικών ψεκασμών με την αντιδιαπνευστική ουσία καολίνη για την καλλιεργητική περίοδο 2017-2018. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μηχανικές αναλύσεις στη σταφυλή και στη ράγα κατά την τεχνολογική ωριμότητα ενώ ακόμη προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά. Επιπλέον, μελετήθηκε η περιεκτικότητα των φλοιών σε μεμονωμένες ανθοκυάνες ενώ ακόμη πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των μεμονωμένων οξέων του γλεύκους με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Τέλος, μελετήθηκε και το αντιοξειδωτικό δυναμικό των ραγών με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι σε αντίθεση με την επέμβαση με καολίνη, η εφαρμογή εξωγενούς αμπισιικού οξέος δεν είχε σημαντική επίδραση στους περισσότερους μορφομετρικούς χαρακτήρες καθώς και στο βάρος των ραγών και των σταφυλών ενώ όσον αφορά τα γλευκογραφικά χαρακτηριστικά, διαπιστώθηκε ότι αυτά επηρεάστηκαν ανεξάρτητα από το είδος της επέμβασης. Σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες παρατηρήθηκαν και στις συγκεντρώσεις των κυριότερων μεμονωμένων οξέων. Σχετικά με τα φαινολικά συστατικά, φαίνεται ότι η πλειοψηφία αυτών δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα τόσο από τις επεμβάσεις με αμπισιικό οξύ όσο και από αυτή με καολίνη. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή εξωγενούς αμπισιικού οξέος επηρέασε αρνητικά τη συγκέντρωση των συμπυκνωμένων ταννινών ενώ ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών μετά από την επέμβαση με καολίνη.

Επιστημονική περιοχή: Αμπελουργία, Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: *Vitis vinifera* L., Ποικιλία Ξινόμαυρο, Αμπισιικό οξύ, Καολίνης, Μορφομετρικοί χαρακτήρες, Γλευκογραφικά χαρακτηριστικά, Φαινολικά συστατικά, Ολικές ανθοκυάνες, Συμπυκνωμένες ταννίνες

Effects of abscisic acid and kaolin application on quantitative and qualitative characters of red grape cultivar Xinomavro (*Vitis vinifera* L.) during maturation

MSc Viticulture – Oenology
Department of Food Science and Human Nutrition
Faculty of Crop Science
Laboratory of Viticulture

ABSTRACT

The present study examines the effects of exogenous abscisic acid (ABA) application on clusters and kaolin foliar application on specific quantitative and qualitative characters of red wine grape cultivar Xinomavro (*Vitis vinifera* L.) during the cultivation period of 2017-2018. For this purpose, grape and berries mechanical properties were measured during technological maturity, while characters of the must (total soluble solids, total titratable acidity, pH) were determined. In addition, the content of grape skin in individual anthocyanins and the content of grape must in individual acids by the reverse phase HPLC method was studied. Finally, the antioxidant potential of grapes was studied by the spectrophotometry method. The results showed that in contrast with the kaolin treatment, the application of exogenous abscisic acid had no significant effect on most morphometric characters as well as the weight of grapes and berries while with regard to the characters of the must these were found to be affected regardless of the type of treatment. Significant differences were also observed in the concentration of the main individual acids in relation to control treatment. Regarding phenolic compounds, it seems that the majority of them was not particularly affected by both types of treatments. Nevertheless, the results showed that the exogenous abscisic acid application negatively affected the concentration of condensed tannins while similar results were observed in the concentration of total anthocyanins after kaolin treatment.

Scientific area: Viticulture, Oenology

Keywords: *Vitis vinifera* L., Xinomavro cultivar, Abscisic acid, Kaolin, Morphometric characters, Must characters, Phenolic compounds, Anthocyanins, Condensed tannins

Πίνακας περιεχομένων

ΜΕΡΟΣ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. Η ράγα της σταφυλής.....	7
1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Χημική σύσταση.....	7
1.2 Μέγεθος ράγας.....	9
1.3 Ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών.....	10
2. Τα κυριότερα οξέα των ραγών.....	12
2.1 Τρυγικό οξύ.....	12
2.2 Μηλικό οξύ.....	13
3. Τα φαινολικά συστατικά της ράγας.....	13
3.1 Δομή και κατηγοριοποίηση των φαινολικών συστατικών της ράγας.....	13
3.1.1 Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις.....	13
3.1.2 Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις.....	14
3.1.3 Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών φαινολών.....	18
3.1.4 Παράγοντες που επιδρούν στη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών της ράγας.....	20
4. Η καλλιέργεια του Ξινόμαυρου.....	23
4.1 Εισαγωγικά για το Ξινόμαυρο.....	23
4.2 Αμπελογραφική περιγραφή.....	23
4.3 Ιδιότητες.....	24
4.4 Παραγόμενοι οίνοι.....	24
5. Η χρήση σκευασμάτων καολίνη και αμπισισικού οξέος στην αμπελουργία.....	25
5.1 Καολίνης.....	25
5.2 Αμπισισικό οξύ (ABA).....	26
ΜΕΡΟΣ Β (Πειραματικό μέρος): Υλικά και Μέθοδοι.....	28
1. Σχεδίαση του πειράματος.....	28
2. Συλλογή των δειγμάτων-Μετρήσεις.....	28
3. Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας.....	29
3.1 Βάρος, μήκος και πλάτος σταφυλής.....	29
3.2 Μέσο βάρος, μήκος και πλάτος ράγας.....	29
3.3 Δύναμη πρόσφυσης ράγας.....	29
4. Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών.....	29
4.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (Brix) με χρήση διαθλασιμέτρου.....	29
4.2 Μέτρηση ενεργούς οξύτητας-pH.....	30
4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής οξύτητας.....	30
5. Προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στους φλοιούς και στα γίγαρτα με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας	31
5.1 Μέτρηση ολικών ανθοκυανών και φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο Hand.....	33
5.2 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη).....	35
5.3 Μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου (AlCl ₃).....	37
5.4 Μέτρηση των ολικών φλαβονολών με τη μέθοδο της 4-διμεθυλ-αμμινοκινναμωμική αλδεύδη (4-DMACA) (Arnous A. et al., 2002).....	39
5.5 Μέτρηση ολικών φλαβονών και φλαβονολών με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου (AlCl ₃).....	40
5.6 Μέτρηση των ολικών αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο FRAP.....	41
5.7 Μέτρηση των ο-διφαινολών στο εκχύλισμα.....	43

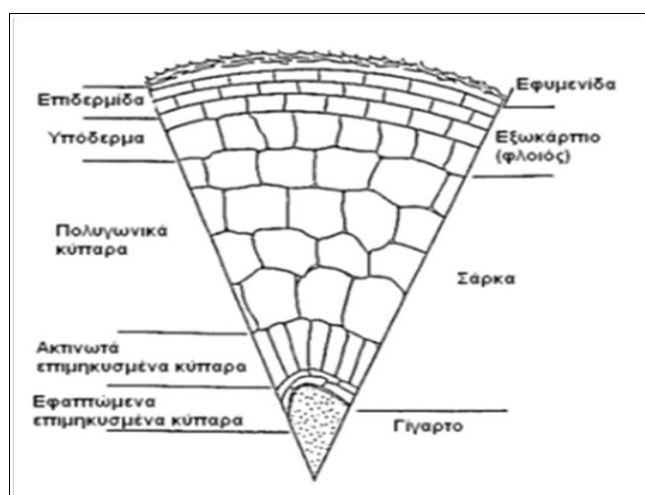
5.8 Προσδιορισμός μεμονωμένων ανθοκυανών και οξέων με HPLC αντίστροφης φάσης.....	44
5.8.1 Μέτρηση μεμονωμένων ανθοκυανών.....	45
5.8.2 Μέτρηση μεμονωμένων οξέων.....	46
5.9 Στατιστική ανάλυση.....	48
ΜΕΡΟΣ Γ: Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	49
1.1 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας.....	49
1.2 Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών.....	50
1.3 Μετρήσεις μεμονωμένων οξέων.....	51
1.4 Μετρήσεις ολικών και μεμονωμένων ανθοκυανών.....	52
1.5 Μετρήσεις ολικών φαινολικών.....	53
1.6 Μετρήσεις ολικών φλαβονοειδών.....	54
1.7 Μετρήσεις ολικών φλαβονών και φλαβονολών.....	55
1.8 Μετρήσεις συμπυκνωμένων ταννινών.....	55
1.9 Μετρήσεις ολικών φλαβανολών.....	56
1.10 Μετρήσεις ολικών αντιοξειδωτικών.....	56
1.11 Μετρήσεις ολικών ο-διφαινολών.....	57
ΜΕΡΟΣ Δ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΜΕΡΟΣ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ράγα της σταφυλής

1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Χημική σύσταση

Ο καρπός της αμπέλου είναι πραγματική ράγα δεδομένου ότι στη διαμόρφωσή της συμμετέχουν μόνο οι ιστοί της ωθήκης. Πρόκειται για σαρκώδη καρπό ο οποίος μορφολογικά διακρίνεται στα εξής μέρη: το φλοιό που ουσιαστικά αποτελεί το περικάρπιο, τη σάρκα που αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο, και τα γίγαρτα που βρίσκονται εντός του ενδοκαρπίου. (Σταυρακάκης Μ., 2014).



Εικόνα 1: Οι διάφοροι ιστοί της ράγας στην ωρίμανση (Ribereau-Gayon P. et al., 1998)

Ο φλοιός καταλαμβάνει σχεδόν το 15% του συνολικού βάρους της ράγας και σε αυτόν απαντώνται οι κύριες και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις που έχουν ιδιαίτερη οργανοληπτική σημασία. Εξωτερικά προς το εσωτερικό της ράγας αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και την υποδερμίδα ενώ διαθέτει στομάτια των οποίων η δραστηριότητα βαίνει μειούμενη κατά την πορεία ωρίμανσης των ραγών (Κουράκου Σ., 1998).

Η εφυμενίδα συνιστά το εξωτερικό τοίχωμα των κυττάρων της επιδερμίδας του φλοιού και καλύπτεται από κηρώδεις ουσίες οι οποίες εκτελούν ένα πλήθος λειτουργιών. Συγκεκριμένα, εμποδίζουν την απώλεια αλλά και την είσοδο ύδατος, συντελούν στην έγκαιρη απομάκρυνση της βροχής, προφυλάσσουν σε έναν βαθμό τις ράγες από προσβολές των εντόμων και μυκητολογικών ασθενειών, παρέχουν προστασία από τις μηχανικές ζημιές και τα εγκαύματα από τον ήλιο, συγκερατούν τους ζυμομύκητες και περιέχουν συστατικά με ιδιαίτερη θρεπτική αξία για αυτούς (Σταυρακάκης Μ., 2013).

Η επιδερμίδα αποτελείται από μία ή δύο στιβάδες κυττάρων που εφάπτονται μεταξύ τους και είναι το στρώμα του φλοιού στο οποίο απαντώνται οι αρωματικές και οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, χαρακτηριστικές για κάθε ποικιλία σταφυλιού.

Η υποδερμίδα βρίσκεται εσωτερικά της επιδερμίδας και αποτελείται από στιβάδες κυττάρων (6-10), από τις οποίες οι 2-3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες και τις φλαβόνες, χρωστικές που είναι υπεύθυνες για το χρώμα των ερυθρών και των λευκών σταφυλιών αντίστοιχα. Εξάιρεση αποτελούν ορισμένες βαφικές ποικιλίες (Βάψα, Alicante Bouschet κ.ά.) στις οποίες οι χρωστικές εντοπίζονται και στη σάρκα. Το υπόδερμα χωρίζεται σε δύο ευδιάκριτες περιοχές: την εξωτερική, η οποία αποτελείται από ορθογώνια κύτταρα και την εσωτερική η οποία αποτελείται από πολυγωνικά κύτταρα.

Το μεσοκάρπιο ή αλλιώς σάρκα αποτελείται από 20-30 στιβάδες κυττάρων, μεγάλα χυμοτόπια που περιέχουν τον κυτταρικό χυμό και αποτελεί το 64-90% του βάρους των ραγών. Η σάρκα περιέχει νερό (65-80%), σάκχαρα (10-30%), οργανικά οξέα, αζωτούχες ουσίες, ανόργανα συστατικά (κυρίως K^+), ταννίνες, πηκτινικές ύλες (δομικές ύλες των κυτταρικών τοιχωμάτων) και αρωματικές ουσίες (πιν. 2).

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα (% κ.β) των συστατικών των φλοιών (Σουφλερός Ε., 2000)

Συστατικά φλοιών	Περιεκτικότητα (% κ.β)
Νερό	75-80
Ταννίνες	1 – 2
Όξινες ενώσεις	1 – 1.5
Ανόργανες ενώσεις	1.5 – 2
Αζωτούχες ενώσεις	1.5 – 2
Λοιπές ουσίες	10 – 15

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα (% κ.β) των συστατικών της σάρκας (Σουφλερός Ε., 2000)

Συστατικά σάρκας	Περιεκτικότητα (% κ.β)
Νερό	65 – 80
Σάκχαρα	10 – 30
Οργανικά οξέα Ανόργανες ενώσεις Αζωτούχες ενώσεις Πηκτινικές ύλες Αρωματικές ουσίες Ταννίνες κλπ.	5 – 6

Τα γίγαρτα συνιστούν τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου και αποτελούν το 3-6% του βάρους της ράγας. Μορφολογικά, τα γίγαρτα αποτελούνται από το οξύ μέρος (ράμφος) και το υπόλοιπο σώμα το οποίο διαιρείται σε δύο λοβούς. Η σάρκα του σώματος προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος και εμπεριέχει το έμβρυο. Κάθε ράγα δύναται να περικλείει έως τέσσερα γίγαρτα αλλά συνήθως απαντώνται 1-3. Επιπλέον, υπάρχουν και ράγες που δεν περικλείουν γίγαρτα. Ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα επηρεάζεται από την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν κατά την ανθοφορία. Σύμφωνα με τον Σταυρακάκη Μ., (2013), οι περιπτώσεις στις οποίες έχουμε ανάπτυξη αγίγαρτων ραγών ή ραγών με γίγαρτα που στερούνται εμβρύων, οφείλονται στο φαινόμενο της εξ ερεθισμού παρθενοκαρπίας και στο φαινόμενο της στενοσπερμοκαρπίας αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη χημική τους σύσταση, τα γίγαρτα περιέχουν κατά κύριο λόγο νερό (24-45%), υδατάνθρακες (34-36%) και ελαιώδεις ουσίες (10-15%) ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις περιέχουν ταννίνες (5-8%), αζωτούχες ενώσεις (4-6,5%), ανόργανες ουσίες (2-4%) και λιπαρά οξέα (1%) (πιν.3). Επιπλέον, τα γίγαρτα περιέχουν μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά, και κυρίως ταννίνες. Σύμφωνα με τους Σουφλερός Ε., (2000) και Watson B. et al., (2003), τα συστατικά αυτά αποτελούν το 60% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών.

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα (% κ.β) των συστατικών των γιγάρτων (Σουφλερός Ε., 2000)

Συστατικά	Περιεκτικότητα (% κ.β)
Νερό	25 – 45
Υδρογονάνθρακες	34 – 36
Ελαιώδεις ουσίες	10 – 15
Ταννίνες	5 – 8
Αζωτούχες ενώσεις	4 – 6.5
Ανόργανες ουσίες	2 – 4
Λιπαρά οξέα	1

Γενικά, η παρουσία των γιγάρτων επηρεάζει σημαντικά το μέγεθος και τη σύνθεση των ραγών. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των γιγάρτων τόσο μεγαλύτερος είναι και ο όγκος της ράγας με συγκριτικά μικρότερες συγκεντρώσεις σε σάκχαρα και νιτρώδη συστατικά αλλά με μεγαλύτερα επίπεδα οξύτητας (Σταυρακάκης Μ., 2013).

1.2 Μέγεθος ράγας

Το μέγεθος των ραγών μιας ποικιλίας αμπέλου καταγράφεται στο στάδιο της τεχνολογικής ωρίμανσης και εκφράζεται συμβατικά με το μέσο όρο της διαμέτρου της ράγας. Χαρακτηρίζεται ως:

- Πολύ μεγάλη, όταν είναι μεγαλύτερη από 24 mm
- Μεγάλη, όταν είναι μεγαλύτερη από 18 mm
- Μέτρια, όταν είναι μεγαλύτερη από 12 mm
- Μικρή, όταν είναι μεγαλύτερη από 8mm
- Πολύ μικρή, όταν είναι μικρότερη από 8 mm

Οι περισσότερες ελληνικές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από μετρίου μεγέθους ράγες. Το μέγεθος αυτό όμως είναι συμβατικό και εξαρτάται από μία πλειάδα παραγόντων στους οποίους εκτός από την ποικιλία συμπεριλαμβάνονται ο κλώνος, το έδαφος, οι κλιματολογικές συνθήκες, η ηλικία των πρέμων, ο χρόνος του τρυγητού, η άρδευση και άλλες αμπελοκομικές τεχνικές. Συνεπώς, από αμπελο-οινολογικής πλευράς, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το βάρος των 50 ραγών ή εγκυρότερα των 100 ραγών.

Οι «ευγενέστερες» - με τον όρο της ποιότητας - ποικιλίες παγκοσμίως έχουν μέσο βάρος ράγας 1.00 – 1.5 gr (Κουράκου Σ., 1998). Ωστόσο, το μικρό μέγεθος ραγών έχει νόημα ιδιαίτερος στις ερυθρές ποικιλίες καθώς έτσι η σταφυλομάζα κατά το στάδιο της εκχύλισης περιέχει υψηλότερη ποσότητα φλοιών στους οποίους περιέχονται οι χρωστικές, τα φαινολικά παράγωγα και οι αρωματικές ενώσεις. Κατά μία έννοια, οι ερυθρές ποικιλίες ποιότητας είναι μικρόρραγες, χωρίς αυτό να σημαίνει πως όλες οι μικρόρραγες ποικιλίες μπορούν να δώσουν οίνους πλούσιους σε φαινολικά συστατικά.

1.3 Ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών

Στις εγγίγαρτες ποικιλίες, ο ρυθμός ανάπτυξης των ραγών ακολουθεί μία διπλή σιγμοειδή καμπύλη (εικ. 2), δηλαδή χωρίζεται σε τρεις φάσεις οι οποίες καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας ως κριτήρια τον όγκο ή βάρος, τη διάμετρο και το μήκος των ραγών (Ribereau-Gayon P. et al., 1998). Οι τρεις φάσεις που παρατηρούνται είναι οι εξής:

- Φάση I ή περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης η οποία χαρακτηρίζεται από έντονη κυτταροδιαίρεση
- Φάση II ή περίοδος επίσχεσης του ρυθμού ανάπτυξης (lag phase) κατά την οποία μειώνεται ο ρυθμός αύξησης και ανάπτυξης των ραγών και αυξάνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των γιγάρτων
- Φάση III ή περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης όπου ο ρυθμός αύξησης των ραγών ακολουθεί ανοδική πορεία μέχρι την ωρίμανση αυτών

Αναλυτικότερα στα τρία στάδια συμβαίνουν οι εξής διαδικασίες:

Φάση I

Κατά τη φάση αυτή παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις ορμονών αύξησης, όπως η αυξίνη, και χαμηλές συγκεντρώσεις παρεμποδιστών της αύξησης ουσιών. Η φάση αυτή ξεκινάει αμέσως μετά την άνθιση, διαρκεί 6-8 εβδομάδες και χαρακτηρίζεται από μία περίοδο 2-3 εβδομάδων έντονης κυτταρικής διαίρεσης η οποία συνοδεύεται από μία αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων. Επιπλέον, οι ράγες είναι σφιχτές ενώ το χρώμα τους είναι πράσινο καθώς κατά τη διάρκεια της φάσης η χλωροφύλλη είναι η επικρατέστερη χρωστική. Παρά το γεγονός ότι οι ράγες

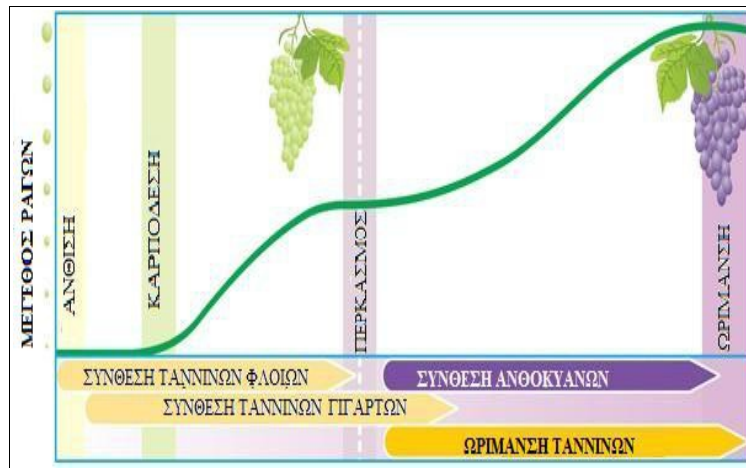
παρουσιάζουν φωτοσυνθετική δραστηριότητα, τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης αυτής δεν επαρκούν για τη θρέψη τους. Στη φάση αυτή παρατηρείται συσσώρευση του τρυγικού και του μηλικού οξέος, σε αντίθεση με τα σάκχαρα των οποίων η συγκέντρωση είναι ακόμα χαμηλή (Keller M., 2010). Εκτός των οργανικών οξέων, συσσωρεύονται τα υδροξυκινναμμωμικά οξέα καθώς και μικροστοιχεία, κατιόντα και αρωματικά συστατικά τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της ποιότητας των ραγών και του οίνου (Conde C. et al, 2007).

Φάση II

Η περίοδος της επίσχεσης της ανάπτυξης (lag phase) αρχίζει 35-80 ημέρες μετά την άνθιση και διαρκεί 7-40 ημέρες. Η διάρκεια της εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία (πρώιμη ή οψιμη, εγγύαρτη ή αγίαρτη), τον ανταγωνισμό μεταξύ των οργάνων του πρέμνου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που καθορίζουν το μικροκλίμα σε επίπεδο αμπελώνα και πρέμνου. Κατά τη διάρκειά της περιόδου, η συγκέντρωση των αυξινών φθάνει σε υψηλά επίπεδα και ακολούθως μειώνεται αισθητά προς το τέλος της ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του αμπισισικού οξέος (ABA). Επιπλέον, στη διάρκεια της περιόδου μειώνεται ο ρυθμός αύξησης και ανάπτυξης των ραγών και αυξάνεται αυτός των γιγάρτων, τα οποία αποκτούν το τελικό τους μέγεθος πριν τον περκασμό. Καθώς ολοκληρώνεται η περίοδος, οι ράγες γίνονται πιο μαλακές ενώ οι χλωροπλάστες σταδιακά αποδιοργανώνονται σε πλαστίδια. Παράλληλα, η συγκέντρωση των οργανικών οξέων φθάνει στο μέγιστο (Mullins G.M. et al., 1990) ενώ τέλος μειώνεται σημαντικά η ένταση της φωτοσύνθεσης και της διαπνευστικής δραστηριότητας.

Φάση III

Η φάση III διαρκεί 35-55 ημέρες διάστημα κατά το οποίο ο ρυθμός αύξησης των ραγών ακολουθεί ανοδική πορεία μέχρι την ωρίμανση αυτών. Η τρίτη φάση αρχίζει με τον περκασμό (γυάλισμα) κατά τον οποίο οι ράγες σταδιακά καθίστανται πιο μαλακές ενώ παράλληλα αρχίζει η βιοσύνθεση των ανθοκυανών στις έγχρωμες ποικιλίες και των πτητικών συστατικών όπως τα τερπενοειδή στις λευκές. Κατά τη διάρκεια της φάσης μειώνεται η αναπνευστική δραστηριότητα και παρατηρείται συσσώρευση και αποθήκευση των σακχάρων στις ράγες, με κυρίαρχα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, και ταυτόχρονα μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων (κυρίως του μηλικού).



Εικόνα 2: Η πορεία ανάπτυξης της ράγας (Enrique Luis Silva de Noronha, 2008)

2. Τα κυριότερα οξέα των ραγών

Το τρυγικό και το μηλικό οξύ αποτελούν το 90% ή και περισσότερο της ολικής οξύτητας του γλεύκους ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις απαντούν και άλλα οργανικά οξέα όπως το κιτρικό (5-10% της ολικής οξύτητας), το φουμαρικό, το οξικό κ.ά. Το τρυγικό και το μηλικό οξύ συντίθενται στις ράγες από πρόδρομες υδροκαρβονικές ενώσεις και η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεών τους ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης. Η περιεκτικότητα των ραγών στα δύο βασικά οργανικά οξέα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ηλιακή ακτινοβολία, η θερμοκρασία και οι καλλιεργητικές επεμβάσεις. Συγκεκριμένα, η έκθεση των σταφυλών στο ηλιακό φως προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του τρυγικού οξέος σε σχέση με τις σταφυλές που βρίσκονται στη σκιά και παράλληλα μειώνει τη συγκέντρωση του μηλικού οξέος καθώς η άνοδος της θερμοκρασίας εντείνει τη δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου. Από την άλλη, οι καλλιεργητικές επεμβάσεις που ευνοούν τη ζωηρότητα των πρέμνων δημιουργούν συνθήκες σκίασης και ανατρέπουν την ισορροπία βλάστησης προς καρποφορία, προκαλούν μείωση της ογκομετρούμενης οξύτητας και αύξηση του pH (Σταυρακάκης Μ., 2013).

2.1 Τρυγικό οξύ

Το τρυγικό οξύ αποτελεί ένα ακόμη χαρακτηριστικό γνώρισμα της αμπέλου, καθώς οι καλλιεργούμενες ευρωπαϊκές ποικιλίες είναι οι μόνες που συνθέτουν το οξύ αυτό και μάλιστα σε σημαντικές ποσότητες. Το τρυγικό οξύ συντίθεται στα νεαρά φύλλα και στις πράσινες ράγες ενώ από τα δύο ισομερή που παρουσιάζει, στις ποικιλίες αμπέλου απαντά η L-ισομερής μορφή.

Η συγκέντρωσή του τρυγικού οξέος στις ράγες αυξάνει σημαντικά κατά τις πρώτες εβδομάδες της φάσης I της ανάπτυξης και ωρίμανσης των ραγών. Ακολουθεί περίοδος μείωσης της συγκέντρωσης, ενώ κατά το τέλος των φάσεων I και II, λόγω της έντονης κυτταροδιαίρεσης, αυξάνει εκ νέου μέχρι που λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της πριν τον περκασμό. Τέλος, κατά τη φάση III (περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης) παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του τρυγικού οξέος επειδή υπολογίζεται σε σχέση με τη σημαντική αύξηση του όγκου και του βάρους της ράγας. Ωστόσο, η περιεκτικότητα των ραγών δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα καθώς στη φάση αυτή ο μεταβολισμός του τρυγικού οξέος είναι βραδύς (Σταυρακάκης Μ., 2013).

2.2 Μηλικό οξύ

Το μηλικό οξύ είναι ασθενέστερο του τρυγικού, απαντάται στις ράγες ως L-(-)-στερεοϊσομερές και συντίθεται στα ώριμα φύλλα και στις πράσινες ράγες ως αποτέλεσμα μίας δευτερογενούς αντίδρασης της φωτοσύνθεσης. Κατά τη φάση I της ανάπτυξης των ραγών συσσωρεύεται με έντονους ρυθμούς και φθάνει το μέγιστο της συγκέντρωσής του λίγο πριν από τον περκασμό. Ακολούθως, κατά τη φάση III, παρατηρείται δραστική μείωση που οφείλεται είτε στη μετατροπή του σε γλυκόζη και φρουκτόζη είτε στη χρησιμοποίησή του ως πηγή ενέργειας και υδατανθράκων για την αναπνοή (Conde C. et al., 2007).

3. Τα φαινολικά συστατικά της ράγας

Τα φαινολικά συστατικά είναι δευτερεύοντα προϊόντα του καταβολισμού των σακχάρων και αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές ενώσεις των σταφυλιών και κατ'επέκταση των οίνων. Η κύρια προέλευση των φαινολικών είναι τα στερεά μέρη της ράγας και εντοπίζονται κυρίως στο φλοιό και στα γύγαρτα ενώ σε μικρότερη αναλογία εντοπίζονται και στη σάρκα. Η περιεκτικότητά τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία, το στάδιο ωριμότητας, το περιβάλλον ανάπτυξης των πρέμνων αλλά και οι καλλιεργητικές τεχνικές (Jackson R.S, 1998; Conde C. et al., 2007).

Αν και αποτελούν μικρό ποσοστό του βάρους των ραγών, οι φαινολικές ενώσεις χρίζουν ιδιαίτερης σημασίας καθώς συνεισφέρουν σημαντικά στο χρώμα, στη γεύση και στο άρωμα των ραγών και των παραγόμενων οίνων. Επιπλέον, κατά την οινοποίηση εκχυλίζονται στο γλεύκος και είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση του χρώματος και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων όπως είναι η στυπτικότητα και η πικράδα αυτών (Kallithraka S. et al., 1998; Ribereau-Gayon P. et al., 1999; Chira K. et al., 2009; Sun B. et al., 2013). Τέλος, λόγω της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής τους δράσης λειτουργούν ως φυσικά συντηρητικά ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την παλαίωση και τις διάφορες τεχνολογικές κατεργασίες των οίνων (Σουφλερός E., 2000; Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

3.1 Δομή και κατηγοριοποίηση των φαινολικών συστατικών της ράγας

Το κοινό χαρακτηριστικό των φαινολικών ενώσεων είναι η παρουσία ενός βενζολικού δακτυλίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Οι φαινολικές ενώσεις της ράγας χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις φλαβονοειδείς φαινόλες (διφαινυλπροπανοειδή) και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες (φαινυλπροπανοειδή) (Ribereau-Gayon P., et al., 2006).

3.1.1 Μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

Τα μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά αποτελούνται από έναν C6-C3 σκελετό, και άρα είναι δομικά απλούστερα, αλλά η προέλευσή τους είναι πιο πολύπλοκη. Σε αυτή την κατηγορία φαινολικών περιλαμβάνονται τα στυλβένια (φυτοαλεξίνες) και τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ατόμων άνθρακα του

δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυομάδες και μεθοξυομάδες (Ribereau-Gayon P. et al., 1999; Cheynier V. 2005).

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, με κυριότερο το γαλλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται και υπό τη μορφή εστέρων των φλαβαν-3-ολών (κατεχίνες) βρίσκονται σε όλα τα μέρη τη ράγας (Adams D. et al., 2006; Teixeira A. et al., 2013). Από την άλλη, τα υδροξυκινναμμοϊκά οξέα, τα οποία είναι τα επικρατέστερα φαινολικά οξέα της σταφυλής, απαντώνται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας υπό μορφή εστέρων με το τρυγικό οξύ. Τέλος, το σπουδαιότερο από τα στιλβένια της αμπέλου είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία απαντά αποκλειστικά στα κύτταρα του φλοιού. Παρά το γεγονός ότι δεν συμμετέχει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντικείμενο μελέτης καθώς θεωρείται ότι έχει αντιθρομβωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

3.1.2 Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

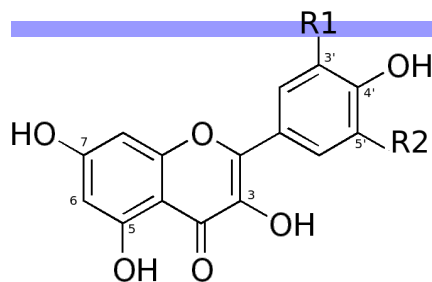
Οι φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από έναν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα με βασικό τύπο C6-C3-C6 που συνθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) οι οποίοι ενώνονται σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο C από 3 άτομα άνθρακα (Garrido et al., 2013). Οι διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών προκύπτουν ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης και υποκατάστασης του δακτυλίου C ενώ οι ενώσεις της κάθε κατηγορίας διαφοροποιούνται από το βαθμό υποκατάστασης των δακτυλίων A και B (Pietta P.G, 2000). Στις φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνονται οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι ανθοκυάνες καθώς και οι φλαβανόνες και οι φλαβανονόλες (Ribereau-Gayon P. et al., 1999; Teixeira A. et al., 2013). Ωστόσο, οι φλαβανόνες και τα παράγωγά τους απαντώνται μόνο σε παλαιωμένους οίνους ενώ οι φλαβανονόλες εντοπίζονται σε οίνους και γλεύκη λευκών ποικιλιών ή σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στους βοστρύχους λευκών και ερυθρών ποικιλιών (Trousdale E.K. and Singleton V.L., 1983; Κουράκου Σ., 1998; Souquet J.M. et al., 2000; Vitrac X. et al., 2001).

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες αποτελούν μια μεγάλη υποκατηγορία των φαινολικών συστατικών που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός διπλού δεσμού ανάμεσα στα C2 και C3 άτομα και μιας υδροξυλικής ομάδας στη θέση 3. Οι ενώσεις αυτές είναι κίτρινες χρωστικές και βρίσκονται στο υπόδημα του φλοιού τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών. Ανάλογα με τη διαφοροποίηση των υποκαταστατών του δακτυλίου C, οι φλαβονόλες χωρίζονται σε καμπερόλη, κερκετίνη και μυρικετίνη. Και οι τρεις μορφές φλαβονολών βρίσκονται στις ερυθρές ποικιλίες ενώ μόνο η καμπερόλη και η κερκετίνη βρίσκονται στις αντίστοιχες λευκές (Ribereau-Gayon P., 2006). Μία ακόμη φλαβονόλη που συναντάται συχνά στις ράγες είναι η ρουτίνη η οποία προκύπτει από την ένωση της κερκετίνης με τον δισακχαρίτη ρουτινόζη (Kallithraka S. et al., 2006; Iacopini P. et al., 2008). Ποικιλίες αμπέλου με χονδρό φλοιό ή μικρόρραγες (μεγάλο ποσοστό φλοιών έναντι σάρκας), περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση φλαβονολών που συμβάλλουν στη σταθερότητα του

χρώματος των παραγόμενων οίνων (Braidot E. et al., 2008).

Οι φλαβονόλες δρουν προστατεύοντας τις σταφυλές από την υπεριώδη ακτινοβολία και τις ελεύθερες ρίζες (Downey M. et al., 2003). Η βιοσύνθεσή τους πραγματοποιείται στο στάδιο της άνθισης αλλά και κατά την ωρίμανση όπου παρατηρείται απότομη αύξηση της περιεκτικότητας των φλαβονολών ανά ράγα. Αντίθετα, στο στάδιο που η ράγα είναι ακόμα πράσινη, η περιεκτικότητα που έχει εντοπιστεί είναι πολύ μικρή (Downey M. et al., 2003).



Εικόνα 3: Χημική δομή της φλαβονόλης

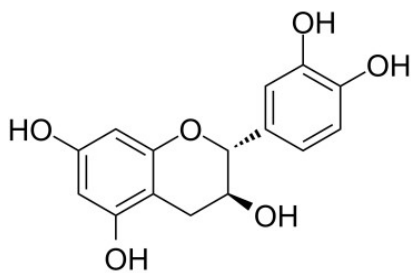
Πίνακας 4: Οι κυριότερες φλαβονόλες της ράγας

R1	R2	Φλαβονόλη
H	H	Καμπφερόλη
OH	H	Κερκετίνη
OH	OH	Μυρικετίνη

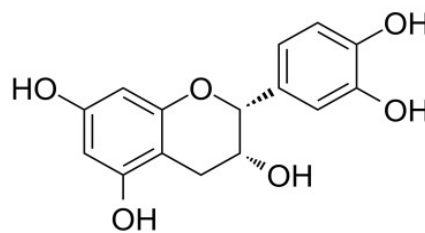
Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες (ορθότερα φλαβαν-3-όλες καθώς έχουν υδροξυλιωθεί στη θέση 3 του δακτυλίου C) αποτελούν την κατηγορία των φαινολικών ενώσεων που υπάρχει σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη ράγα. Βρίσκονται κυρίως στα γίγαρτα, δευτερευόντως στους φλοιούς και σε ακόμα μικρότερες συγκεντρώσεις στη σάρκα (Priour C. et al., 1994; Κουράκου Σ., 1998; Sun B. et al., 2001; Chira K. et al., 2009). Οι φλαβανόλες παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων και απαντώνται ως μονομερή, ολιγομερή αλλά και πολυμερή (Su C. and Singleton V.L, 1969; Priour C. et al., 1994; Κουράκου Σ., 1998; Monagas M. et al., 2003).

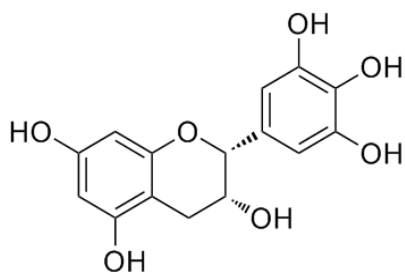
Η πιο διαδεδομένη φλαβανόλη στη σταφυλή είναι η κατεχίνη που έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα με αποτέλεσμα να δίνει τέσσερα ισομερή: την (+) και (-) κατεχίνη και την (+) και (-) επικατεχίνη, καθώς και δύο ρακεμικά. Στις σταφυλές και στους οίνους τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν τα μονομερή όπως η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις βρίσκονται ο γαλλικός εστέρας της (-) επικατεχίνης και η (-) επιγαλλοκατεχίνη (Κουράκου Σ., 1998; Monagas M. et al., 2003; Chira K. et al., 2009; Curko N. et al., 2014). Κατά την ωρίμανση, οι μονομερείς φλαβανόλες αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό ποσοστό καθώς το μεγαλύτερο μέρος απαντάται σε ολιγομερή και πολυμερή μορφή (Priour C. et al., 1994; Kennedy J.A. et al., 2001; Monagas M. et al., 2003; Obreque-Slier E. et al., 2010).



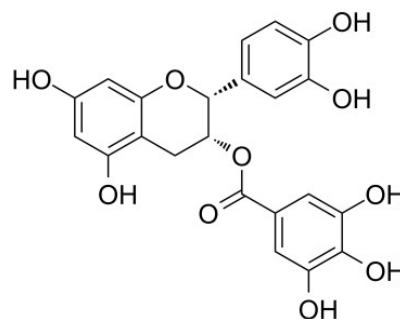
Εικόνα 4: Χημική δομή της (+)-κατεχίνης



Εικόνα 5: Χημική δομή της (-)-επικατεχίνης



Εικόνα 6: Χημική δομή της (-)-επιγαλλοκατεχίνης



Εικόνα 7: Χημική δομή του γαλλικού εστέρα της (-)-επικατεχίνης

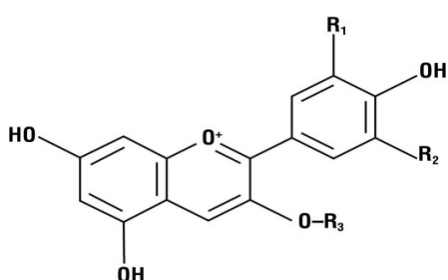
Οι oligομερείς και πολυμερείς φλαβανόλες είναι γνωστές ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες και αποτελούνται από τερματικές και επεκτατικές υπομονάδες όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης και η επιγαλλοκατεχίνη (Kennedy & Jones 2001; Downey M. et al., 2003). Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή κατεχίνης, επικατεχίνης και γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης σε αντίθεση με τις ταννίνες των φλοιών που αποτελούνται κυρίως από επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη (Downey M. et al., 2003; Braidot E. et al., 2008). Επιπλέον, τα γίγαρτα συγκεντρώνουν μεγαλύτερο ποσοστό ταννινών αλλά με μικρότερο βαθμό πολυμερισμού σε σχέση με τους φλοιούς. Οι ταννίνες είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση του χρώματος, έπειτα από ενώσεις με ανθοκυάνες μέσω φαινομένων συγχρωματισμού και συμπύκνωσης, ενώ ακόμη συμβάλλουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων καθώς συμμετέχουν στη στυπτικότητα και την πικράδα αυτών (Kallithraka S. et al., 1998; Labarbe B. et al., 1999; Chira K. et al., 2009; Lorrain B. et al., 2011; Sun B. et al., 2013).

Η έκφραση των γονιδίων που επάγουν τη βιοσύνθεση των ταννινών των γιγάρτων γίνεται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση ενώ ο σχηματισμός τους ολοκληρώνεται λίγο

μετά τον περκασμό και ακολούθως μειώνεται. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των γιγάρτων αυξάνει ο βαθμός πολυμερισμού και η οξείδωση των προκυανιδινών (πρόδρομες ενώσεις των ταννινών), οι ταννίνες καθίστανται λιγότερο στυφές και προσδίδουν στα γιγάρτα το κίτρινο-καστανό χρώμα (Kennedy J.A et al., 2000). Από την άλλη πλευρά, η σύνθεση των φλαβονολών των φλοιών πραγματοποιείται μερικές εβδομάδες μετά την άνθιση (Kennedy J.A et al., 2000; Downey M., et al., 2003). Κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών, η συσσώρευση των ταννινών των φλοιών φαίνεται ότι ολοκληρώνεται πριν το γυάλισμα και ακολούθως μειώνεται μέχρι την ωρίμανση (Downey M., et al 2003).

Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές των σταφυλιών και απαντούν αποκλειστικά στα κύτταρα του φλοιού της ράγας των ποικιλιών της ευρωπαϊκής αμπέλου, με εξαίρεση τις βαφικές ποικιλίες (Βάψα, Alicante Bouschet κ.ά) στις οποίες απαντούν και στη σάρκα (Κοτσερίδης Γ., 2006; Σταυρακάκης Μ., 2013). Επιπλέον, οι ανθοκυάνες εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα ιδίως κατά το τέλος της περιόδου ανάπτυξης (Ribereau-Gayon P. et al., 2006). Στις ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου, οι ανθοκυάνες απαντούν ως 3-μονογλυκοζίτες, στους οποίους το άγλυκο μέρος (ανθοκυανιδίνη) είναι ενωμένο με ένα μόριο γλυκόζης. Αντιθέτως, στις ποικιλίες που ανήκουν στη *V. labruska* και *V. rotundifolia*, έχουν ανιχνευτεί και διγλυκοζίτες των ανθοκυανών.



Εικόνα 8: Χημική δομή των ανθοκυανών

Πίνακας 5: Οι κυριότερες ανθοκυάνες της σταφυλής και του οίνου

R1	R2	Ανθοκυανιδίνη
OH	H	Κυανιδίνη
OH	OH	Δελφινιδίνη
OCH ₃	H	Παιονιδίνη
OH	OCH ₃	Πετουνιδίνη
OCH ₃	OCH ₃	Μαλβιδίνη

Η βασική δομή των ανθοκυανών είναι οι ανθοκυανιδίνες οι οποίες έχουν στο μόριό τους δύο βενζολικούς δακτυλίους που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυριλίου. Όταν οι ανθοκυανιδίνες είναι στη γλυκοζυλιωμένη μορφή (σύνδεση με ένα μόριο σακχάρου) τότε ονομάζονται ανθοκυάνες και είναι πιο σταθερές μεταβολικά σε σχέση με τα άγλυκα μόρια. Τα σάκχαρα που απαντούν στις ανθοκυάνες είναι πάντα αλδόζες, με συνηθέστερη τη γλυκόζη, υπό την ετεροκυκλική μορφή του πυρανόιου (Κουράκου Σ., 1998). Τα πιο κοινά παράγωγα που απαντώνται στις ποικιλίες *V. vinifera* είναι οι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών και συγκεκριμένα της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της δελφινιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης με επικρατέστερη την τελευταία (Ribereau-Gayon P., et al., 1999; Kallithraka S. et al., 2005; Castaneda-Ovando et al., 2009). Οι διαφορές μεταξύ τους περιορίζονται στον αριθμό των -OH και -OCH₃ των θέσεων R1 και R2 ο οποίος

επηρεάζει τη σταθερότητα και το χρώμα της ανθοκυάνης (Κουράκου Σ., 1998). Συγκεκριμένα, με την αύξηση των ελεύθερων υδροξυλομάδων αυξάνεται το μπλε χρώμα ενώ το κόκκινο ενισχύεται όσο αυξάνεται ο βαθμός μεθυλίωσης (Jackson R.S, 1998). Από την άλλη πλευρά, περισσότερες μεθοξυ-ομάδες (-CH₃) αυξάνουν τη σταθερότητα των ανθοκυανών ενώ περισσότερες υδροξυλο-ομάδες (-OH) τη μειώνουν (Keller 2010a; Κουράκου Σ., 1998).

Ο σχηματισμός και η συσσώρευση των ανθοκυανών σηματοδοτούν την έναρξη της ωρίμανσης των ραγών με την εμφάνιση του χρώματος στο φλοιό τους, χρονικό σημείο κατά το οποίο η ράγα αποκτά μαλακή υφή και ο σχηματισμός των ταννινών διακόπτεται. Ο χρόνος και ο ρυθμός σύνθεσης και συσσώρευσης των ανθοκυανών εξαρτάται από την ποικιλία, την ποσότητα των διαθέσιμων σακχάρων, τους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία, την υδατική κατάσταση των πρέμνων κ.ά. Παρά το γεγονός ότι οι ακριβείς συνθήκες έναρξης σχηματισμού των ανθοκυανών δεν είναι εντελώς γνωστές, φαίνεται ότι όταν η συγκέντρωση των σακχάρων στα κύτταρα του φλοιού ανέλθει στα 9 έως 10 Brix, ενεργοποιούνται τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών (Keller M. and Hrazdina G., 1998). Υποστηρίζεται ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών εντείνεται από την παρουσία του ABA, η συγκέντρωση του οποίου ενισχύεται από την παρουσία των σακχάρων (Jeong S.T. et al., 2004; Σταυρακάκης Μ., 2013). Η συγκέντρωση των ανθοκυανών αυξάνει καθ'όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, παρουσιάζει μέγιστη τιμή κοντά στην περίοδο συγκομιδής και ακολούθως μειώνεται (Cacho J. et al., 1992; Esteban M.A. et al., 2001; Ojeda H. et al., 2002; Harbertson J.F. et al., 2003; Castellarin S.D. et al., 2007; Zarrouk O. et al., 2012).

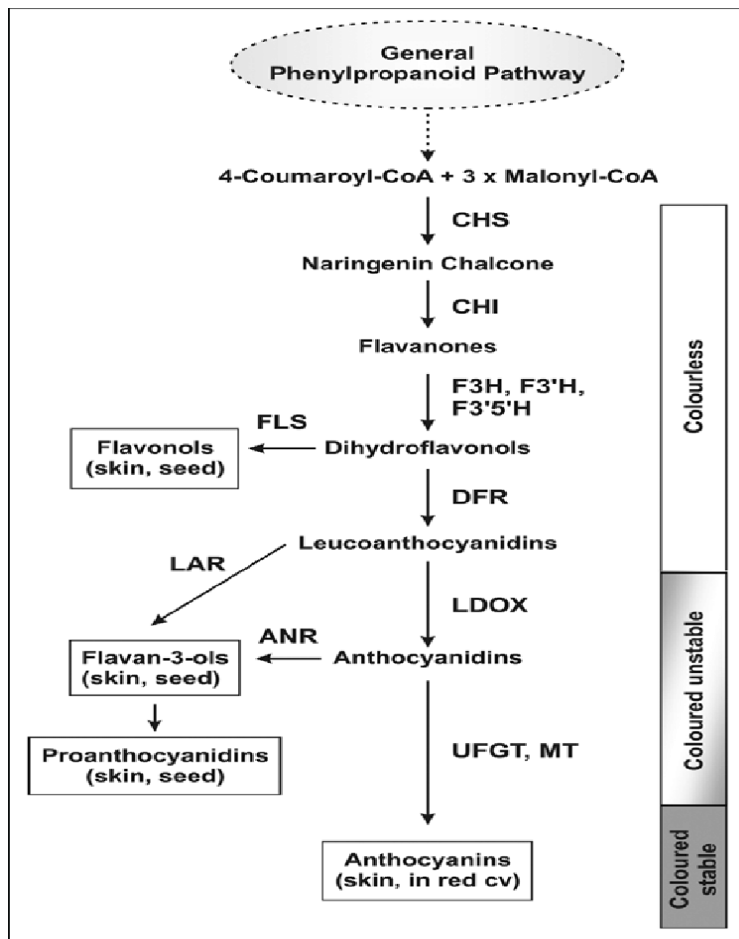
Η σύνθεση των ανθοκυανών εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η συσσώρευσή τους στο χυμοτόπιο των κυττάρων του φλοιού των ερυθρών ποικιλιών. Η πρώτη ανθοκυάνη που σχηματίζεται στους φλοιούς των ραγών των ερυθρών ποικιλιών είναι η κυανιδίνη, κατά την έναρξη της ωρίμανσης (περκασμός). Στην αρχή αυξάνεται η συγκέντρωσή της και στη συνέχεια, λόγω της ασταθούς δομής της, μετασχηματίζεται στην ανθοκυάνη της παιονιδίνης (δίδει το ερυθρό χρώμα) μέσω μεθοξυλίωσης. Από την άλλη πλευρά, η δελφινιδίνη είναι προϊόν διαφορετικής αντίδρασης από την περίπτωση της κυανιδίνης και σχηματίζεται μέσω διαφορετικών ενζυμικών αντιδράσεων. Η δελφινιδίνη, μέσω μεθοξυλίωσης, μετατρέπεται σε πετουνιδίνη και η μεγαλύτερη ποσότητα της τελευταίας σε μαλβιδίνη (δίδει το ιώδες χρώμα). Συνεπώς, οι ανθοκυάνες της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης κυριαρχούν μεταξύ των έγχρωμων ποικιλιών αμπέλου αλλά και των παραγόμενων από αυτές οίνων. Ωστόσο, η μαλβιδίνη έχει την πιο σταθερή δομή από όλες τις υπόλοιπες ανθοκυάνες και απαντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε όλες τις ερυθρές ποικιλίες της *V. vinifera*.

3.1.3 Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών φαινολών

Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών φαινολικών χωρίζεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο σχηματίζονται οι πρόδρομες ενώσεις του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φαινύλ-προπανοειδών. Σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι αυτό έχει το ένζυμο λυάση της αμμωνιακής φαινυλαλανίνης (PAL) το οποίο μετασχηματίζοντας τη φαινυλαλανίνη (προϊόν της οδού του σικιμικού οξέος) σε

κινναμωμικό οξύ την απομακρύνει από τη σύνθεση των πρωτεϊνών (βασικός μεταβολισμός) και την οδηγεί προς της σύνθεση των φλαβονοειδών συστατικών και ανθοκυανών (Roubelakis-Angelakis and Kliewer, 1986). Πριν από αυτό όμως, το κινναμωμικό οξύ, μέσω του ενζύμου υδροξυλάση του 4-κινναμωμικού εστέρα (C4H), μετατρέπεται σε π-κουμαρικό οξύ και αυτό με τη σειρά του σε 4-κουμαρύλ-CoA με τη συμμετοχή του ενζύμου λιγκάση (ή συνθάση) του 4-κουμαρύλ-CoA (4CL). Το 4-κουμαρύλ-CoA αποτελεί πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό των φλαβονοειδών φαιολικών συστατικών (Adams D., 2006; Delgado-Vargas F., 2000).

Στο δεύτερο στάδιο (εικ. 9), η συνθετάση της χαλκόνης (CHS), η οποία θεωρείται το σημαντικότερο ένζυμο της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης τριών μορίων μαλονυλ-CoA και ενός μορίου 4-κουμαρυλ-CoA σχηματίζοντας τη χαλκόνη. Από τη χαλκόνη προκύπτουν οι φλαβανόνες μέσω της δράσης του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Ακολούθως, οι φλαβανόνες οδηγούνται στη σύνθεση των διυδροφλαβονολών με τη συμμετοχή του ενζύμου υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης (F3H). Οι διυδροφλαβονόλες, με τη συμμετοχή του ενζύμου συνθάση των φλαβονολών (FLS), οδηγούν στο σχηματισμό των φλαβονολών. Στη συνέχεια, η μετατροπή των διυδροφλαβονολών σε λευκοανθοκυανιδίνες καταλύεται από το ένζυμο αναγωγή της 4-διυδροξυφλαβονόλης (DFR). Από τη δράση των ενζύμων αναγωγή της λευκοανθοκυανιδίνης (LAR) και αναγωγή της ανθοκυανιδίνης (ANR) παράγονται τα μονομερή των φλαβαν-3-ολών τα οποία είναι απαραίτητα για το σχηματισμό των προανθοκυανιδινών. Επιπλέον, οι λευκοανθοκυανιδίνες οδηγούν στο σχηματισμό των έγχρωμων ανθοκυανιδινών μέσω του ενζύμου συνθάση της λευκοανθοκυανιδίνης (LDOX) (Braidot E. et al., 2008). Τέλος, οι ανθοκυανιδίνες μετασχηματίζονται σε ανθοκυάνες μέσω μιας αντίδρασης γλυκοζυλίωσης, η οποία καταλύεται από το ένζυμο UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UFGT) (Boss P.K. et al., 1996; Delgado-Vargas F., 2000; Xie D.Y. et al., 2003).



Εικόνα 9: Βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών φαινολικών (Braidot E. et al., 2008)

3.1.4 Παράγοντες που επιδρούν στη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών της ράγας

Καλλιεργούμενη ποικιλία

Σε γενικές γραμμές, οι ερυθρές ποικιλίες περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε σχέση με τις λευκές ποικιλίες. Ωστόσο, μεταξύ των ερυθρών ποικιλιών αμπέλου παρατηρούνται σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ποσότητα και την κατανομή των ανθοκυανών και οφείλονται στις παραλλαγές του μονοπατιού της βιοσύνθεσης (Boss P.K. et al., 1996). Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση των κατεχινών και η πορεία συσσώρευσής τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τους χαρακτήρες της ποικιλίας. Συγκεκριμένα, ποικιλίες που έχουν πολύ μικρές σφαιρικές ράγες (π.χ. Pinot noir, Ξινόμαυρο) και επομένως μεγάλο ποσοστό γιγάρτων ή ποικιλίες με μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ράγα χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη περιεκτικότητα σε κατεχίνες και προκυανιδίνες (Bourzeix M. et al., 1986; Κουράκου Σ., 1998).

Απο τις ενδογενείς ιδιότητες της ποικιλίας, η ζωηρότητα επιδρά στη σύνθεση των φαινολικών συστατικών. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι οι ράγες που προέρχονται από πρέμνα μέτριας ή χαμηλής ζωηρότητας παρουσιάζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε προανθοκυανιδίνες καθώς και αυξημένα ποσοστά σε επιγαλλοκατεχίνες και ανθοκυανιδίνες. Επίσης διαπιστώθηκε ότι

οι οίνοι που προέρχονται από σταφυλές πρέμων χαμηλής ζωηρότητας, στα οποία η αραιή βλάστηση επιτρέπει την καλύτερη έκθεση των σταφυλών στον ήλιο, παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε ταννίνες σε σχέση με εκείνους που προέρχονται από σταφυλές πρέμων μεγάλης ζωηρότητας (Cortell J.M. et al., 2005).

Υποκείμενο

Η κατάλληλη επιλογή υποκειμένου θα καθορίσει σε σημαντικό βαθμό την παραγωγική διαδικασία και την βλαστική ανάπτυξη της ποικιλίας – εμβολίου (Paranychianakis N.V. et al., 2004; Tandonnet J.-P. et al., 2008). Για παράδειγμα, ένα πολύ ζωηρό υποκείμενο, μπορεί να επιμηκύνει την περίοδο βλάστησης και να καθυστερήσει την ωρίμανση με όλες τις επιπτώσεις στη σύνθεση των ραγών (Coombe B.G. and Dry P.R., 1992). Επιπλέον, οι Satisha J. et al., (2008) διαπίστωσαν ότι οι ράγες που προήλθαν από πρέμνα που ήταν εμβολιασμένα σε ζωηρότερα υποκείμενα είχαν υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε σχέση με τις ράγες των πρέμων που είχαν εμβολιαστεί σε υποκείμενα χαμηλότερης ζωηρότητας.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η ένταση του φωτός και η θερμοκρασία επηρεάζουν τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών ποσοτικά και ποιοτικά. Ωστόσο, οι επιδράσεις των δύο περιβαλλοντικών παραγόντων στη σύνθεση και το σχηματισμό των φαινολικών συστατικών θα πρέπει να συνεκτιμώνται με το σύστημα μόρφωσης και υποστύλωσης των πρέμων καθώς και με τις καλλιεργητικές τεχνικές που επηρεάζουν τη διάταξη του φυλλώματος (χειμερινό κλάδεμα καποφορίας, διαχείριση βλάστησης με την εφαρμογή χλωρών κλαδεμάτων κ.ά.)

Σχετικά με τις ανθοκυάνες, τα αποτελέσματα πολλών ερευνητικών εργασιών επιβεβαιώνουν ότι η ένταση φωτεινής ακτινοβολίας των $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ στη ζώνη καρποφορίας είναι αρκετή για την έναρξη της βιοσύνθεσης τους, ενώ για τις φλαβανόλες είναι απαραίτητη η έκθεση των σταφυλών απευθείας στην ηλιακή ακτινοβολία. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Berli F.J. et al. (2008), η υπερβολική έκθεση των ραγών στην υπεριώδη ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα είτε την ανάσχεση του σχηματισμού των ανθοκυανών είτε την διάσπασή τους λόγω οξειδωτικής καταπόνησης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται σε συνθήκες σκίασης, όπως αυτές διαμορφώνονται σε ζωηρά πρέμνα με πλούσια βλάστηση, όπου ο ρυθμός σχηματισμού των ανθοκυανών είναι αργός, με αποτέλεσμα τη χαμηλή συγκέντρωση των χρωστικών στο φλοιό των ραγών. Από την άλλη πλευρά, η σκίαση των σταφυλών ορισμένων ποικιλιών (Syrah, Petit Verdot κ.ά) δεν φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα των ραγών σε ανθοκυάνες (Σταυρακάκης Μ., 2013).

Η θερμοκρασία του αέρα επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα των ενζυμικών συστημάτων αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας όσο βέβαια αυτή παραμένει σε επίπεδα λίγο χαμηλότερα από την άριστη θερμοκρασία ωρίμανσης των σταφυλών. Αντίθετα, σε θερμοκρασίες υψηλότερες της άριστης τα ένζυμα αδρανοποιούνται ή και

αποδομούνται. Σε αυτή την περίπτωση, η φαινολική ωριμότητα δεν επιτυγχάνεται παρά μόνο σε πολύ χαμηλή οξύτητα και πολύ υψηλό pH. Από την άλλη πλευρά, η επικράτηση πολύ χαμηλών θερμοκρασιών κατά την ωρίμανση παρεμποδίζει τη δραστηριότητα των ενζύμων σε τέτοιο βαθμό που δεν ολοκληρώνεται η φαινολική ωριμότητα, ανεξαρτήτως της διαθεσιμότητας των σακχάρων (Σταυρακάκης Μ., 2013). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Crippen D.D. and Morrison J.C. (1986), ακραίες θερμοκρασίες και μεγάλες διαφορές θερμοκρασιών ημέρας/νύχτας επιδρούν αρνητικά στο σχηματισμό και τη συσσώρευση των ανθοκυανών στις ράγες. Αναφορικά με τις προανθοκυανιδίνες, διαπιστώθηκε ότι η επικράτηση υψηλών θερμοκρασιών κατά τον περκασμό αύξησαν τη συγκέντρωση τους ενώ η χαμηλή θερμοκρασία και η μικρή διαφορά θερμοκρασίας ημέρας/νύχτας επέφεραν μείωση (Cohen S.D. et al., 2008).

Άρδευση

Η διαχείριση της άρδευσης κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου είναι κρίσιμη για τον έλεγχο της ζωηρότητας των πρέμνων καθώς και για το μέγεθος και την ποιότητα των ραγών. Από τη μία πλευρά, η υπερβολική άρδευση μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερης ποιότητας σταφυλές και να δημιουργήσει ευνοϊκές συνθήκες για την εμφάνιση μυκητολογικών ανθενειών (Crippen D.D. and Morrison J.C., 1986) ενώ από την άλλη πλευρά η ξηρασία θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση και χαμηλής ποιότητας τελικό προϊόν (Dos Santos et al., 2007). Αντίθετα, έχει αναφερθεί ότι οι επεμβάσεις ελλειμματικής άρδευσης επηρεάζουν θετικά τη συσσώρευση των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση και μπορούν να έχουν θετική επίδραση στην ποιότητα των σταφυλών και κατ' επέκταση των παραγόμενων οίνων (Esteban M.A. et al., 2001; Ojeda H. et al., 2002; Koundouras et al., 2006; Olle et al., 2011).

Σύμφωνα με τους Ojeda H. et al. (2002), η εφαρμογή διαφόρων βαθμών υδατικής καταπόνησης είχε άλλοτε θετική και άλλοτε αρνητική επίδραση στη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών, ανάλογα με το είδος του φαινολικού συστατικού και το χρόνο εφαρμογής του υδατικού ελλείμματος. Από την άλλη πλευρά, εφαρμογή ήπιας ή μέτριας υδατικής καταπόνησης μετά τον περκασμό είχε θετική επίδραση με την αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών λόγω της μείωσης του μεγέθους των ραγών και επομένως της αύξησης της αναλογίας των ιστών του φλοιού και των γιγάρτων ως προς τη σάρκα (Freeman B.M., 1983; Kennedy J.A. et al., 2000,2002; Roby G. et al., 2004).

Λίπανση

Ανεξάρτητα από το είδος των λιπασμάτων και τη μεθοδολογία εφαρμογής, στόχος της λίπανσης είναι η αντικατάσταση των θρεπτικών στοιχείων που απορροφήθηκαν από τα πρέμνα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και παράλληλα η εξασφάλιση και η διάθεση στα πρέμνα όλης της ποσότητας των θρεπτικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή υψηλής ποιότητας αμπελουργικών προϊόντων. Ωστόσο, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά το σχεδιασμό ενός προγράμματος λίπανσης των πρέμνων καθώς η υπερβολική λίπανση με

άζωτο και κάλιο μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη συγκέντρωση ανθοκυανών στις ράγες, καθώς θα αυξηθεί η ζωηρότητα, θα επηρεαστεί η ισορροπία βλάστησης προς καρποφορίας και έμμεσα το μικροκλίμα εξαιτίας των ζωηρών βλαστών (Jackson R.S 1998). Επιπλέον, η αυξημένη βλαστική ανάπτυξη των πρέμων, όπως αυτή προκύπτει σε συνθήκες αυξημένης λίπανσης με άζωτο, δεν επιτρέπει την επαρκή έκθεση των σταφυλών στο ηλιακό φως με άμεσο αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η βιοσύνθεση των ταννινών (Downey M. et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, η έλλειψη ή η ανεπάρκεια του εδάφους σε θρεπτικά στοιχεία δημιουργεί προβλήματα στην ομαλή ανάπτυξη του πρέμνου.

Κλάδεμα

Με κριτήριο την εποχή που εκτελείται και την ηλικία των οργάνων που δέχονται τις επεμβάσεις, το κλάδεμα διακρίνεται σε χειμερινό, που εφαρμόζεται σε ξυλοποιημένα όργανα, και σε θερινό (χλωρό) που αφορά τους βλαστούς και τα όργανα τα οποία φέρουν. Με το ετήσιο χειμερινό κλάδεμα καθορίζεται το φορτίο του πρέμνου και προσδιορίζεται η σχέση βλάστησης προς καρποφορία. Από την άλλη πλευρά, τα χλωρά κλαδέματα αποτελούν συμπληρωματικές επεμβάσεις του χειμερινού κλαδέματος καρποφορίας με στόχο την τροποποίηση ή/και βελτίωση της ισορροπίας βλάστησης προς καρποφορία, όπως αυτή προσδιορίστηκε με το χειμερινό κλάδεμα (Σταυρακάκης Μ., 2013). Παράλληλα με τα χλωρά κλαδέματα επιδιώκεται η βελτιστοποίηση της παραγωγής ποιοτικά. Για παράδειγμα, το ξεφύλλισμα αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση των χαρακτήρων ποιότητας των ραγών και ιδιαιτέρως του χρώματός τους, καθώς η εφαρμογή του συμβάλλει στη καλύτερη έκθεση των ραγών στο ηλιακό φως (Ribereau-Gayon P. et al., 2006).

4. Η καλλιέργεια του Ξινόμαυρου

4.1 Εισαγωγικά για το Ξινόμαυρο

Το Ξινόμαυρο αποτελεί μία ξεχωριστή ελληνική ποικιλία που διακρίνεται για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και τον έντονο χαρακτήρα προέλευσης στους παραγόμενους από αυτή οίνους. Μαζί με το Αγιωργίτικο Νεμέας αποτελούν τις δυναμικότερες ερυθρές εγχώριες ποικιλίες. Η ποικιλία αυτή συναντάται και με άλλες ονομασίες, όχι τόσο γνωστές, όπως είναι το Μαύρο Ναούσσης, Μαύρο Ναουστιανό, Νιουστινό, Μαύρο Γουμένισσας, Ξινόμαυρο Κοζάνης, Ξυνόγκαλτσο και Πόπολα. Καλλιεργείται σε έκταση που ξεπερνά τα 18.000 στρέμματα σε πολλές περιοχές του βορειοελλαδικού χώρου με κυριότερες τη Νάουσσα, το Αμύνταιο, τη Γουμένισσα, τη Ραψάνη, το Τρίκωμο, τη Σιάτιστα και το Βελβεντό. Σε μικρότερο ποσοστό συναντάται στο Άγιο Όρος, την Όσσα, τα Ιωάννινα, τη Μαγνησία, την Καστοριά και τα Τρίκαλα (Σπινθηροπούλου Χ., 2000, Σταυρακάκης Μ., 2004).

4.2 Αμπελογραφική περιγραφή

Περιγραφή φύλλου: Το μέγεθος φύλλου είναι μέτριο προς μεγάλο. Έχει σχήμα στρόγγυλο προς σφηνοειδές και είναι ολόκληρο, το έλασμά του παρουσιάζει ελαφρά πομφολυγώδη. Οι οδόντες του

είναι μεσαίου μεγέθους. Είναι τρίλοβο και ο μισχικός του κόλπος είναι U κλειστός, με αναδιπλωμένα χείλη. Παρουσιάζει χνοασμό αραχνοειδή προς χνοώδη και η πάνω επιφάνειά του είναι σκούρα πράσινη.

Περιγραφή κορυφής: Μέση προς ανοιχτή βαμβακοειδής κορυφή χωρίς ανθοκυάνες

Περιγραφή σταφυλής: Σταφυλή μικρή έως μέτρια, κυλινδρική και πυκνή. Η ράγα έχει μέτριο μέγεθος, είναι σφαιρική και με παχύ φλοιό και έχει 1-3 γίγαρτα. Ο φλοιός έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε χρωστικές και ταννίνες ενώ η σάρκα είναι άχρωμη, χυμώδης και υπόξινη (Σταυρακάκης Μ. 2004).

4.3 Ιδιότητες

Η έναρξη βλάστησης της ποικιλίας τοποθετείται το πρώτο δεκαπενθήμερο του Απριλίου και η έναρξη της ωρίμανσης από το τρίτο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου και έπειτα. Το Ξινόμαυρο είναι μία ερυθρή ποικιλία μέτριας έως μεγάλης ζωηρότητας με ικανοποιητική παραγωγή, όπου ο κάθε καρποφόρος βλαστός φέρει συνήθως δύο σταφυλές. Επιπλέον, η ποικιλία έχει γόνιμο τον τυφλό ή τσίμπλα. Έχει ορθόκλαδη βλάστηση, δέχεται κλάδεμα βραχύ στα δύο μάτια και μπορεί να διαμορφωθεί σε κύπελλο και πιο συχνά σε γραμμικό αμφίπλευρο κορδόνι Royat. Παρουσιάζει ευαισθησία στο ωίδιο, το βοτρυτή, το μολυσματικό εκφυλισμό, τη ξηρασία ενώ ορισμένες χρονιές εμφανίζει φυλλοξηρικές κηλίδες στα φύλλα (Σπινθηροπούλου Χ., 2000; Σταυρακάκης Μ., 2004; Νικολάου Ν.Α., 2012).

Σε γενικές γραμμές συμβιώνει αρμονικά με τα περισσότερα υποκείμενα που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα. Το Ξινόμαυρο είναι ποικιλία που προτιμάει εδάφη ελαφρά έως μέσης σύστασης και προσαρμόζεται κυρίως σε εδάφη με καλή στράγγιση, ασβεστώδη, ουδέτερα έως αλκαλικά και μέσης γονιμότητας. Οι παραγωγές ανά στρέμμα στα κυπελλωτά σχήματα μπορεί να φθάνουν μέχρι τα 600 kg ενώ στα αμφίπλευρα γραμμωτά μπορεί να ξεπερνούν τα 1500 kg. Προτεινόμενη πυκνότητα φύτευσης είναι 400-500 φυτά/στρέμμα (Σπινθηροπούλου Χ., 2000, Σταυρακάκης Μ., 2004, Νικολάου Ν.Α., 2012).

Παρουσιάζει έντονα την έλλειψη καλίου, ενώ σε υπερβολική αζωτούχο λίπανση και άρδευση οδηγεί σε αυξημένη ζωηρότητα. Αυστηρό κορυφολόγημα και εκτεταμένο ξεφύλλισμα έχουν αρνητική επίδραση στην ποιότητα των σταφυλιών ενώ οι λανθασμένες καλλιεργητικές τεχνικές οδηγούν αμέσως στην εμφάνιση των αδύνατων σημείων της ποικιλίας όπως είναι το φτωχό χρώμα και ο επιθετικός χαρακτήρας της γεύσης (Σπινθηροπούλου Χ., 2000, Γεωργίου Δ., 2007). Η βλάστησή του ξεκινάει το πρώτο δεκαπενθήμερο του Απριλίου και ωριμάζει από το 3ο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου και μετά (Σπινθηροπούλου Χ., 2000, Σταυρακάκης Μ., 2004).

4.4 Παραγόμενοι οίνοι

Το Ξινόμαυρο είναι μία πολυδυναμική ποικιλία και μπορεί να δώσει διαφορετικούς τύπους οίνου ανάλογα με την περιοχή, το υψόμετρο που καλλιεργείται και τον τρόπο οινοποίησης. Συγκεκριμένα

σε περιοχές με μικρό υψόμετρο, σε κατάλληλα εδάφη και με μικρές αποδόσεις ανά πρέμνο δίνει κρασιά ερυθρά ξηρά, υψηλόβαθμα, καλής οξύτητας, αρωματικά, με ικανοποιητική ένταση χρώματος και πλούσια σε ταννίνες. Σε αυξημένο υψόμετρο παράγονται κυρίως ροζέ, αφρώδη ροζέ και αφρώδη λευκά κρασιά. Επιπλέον, οι παραγόμενοι οίνοι είναι ιδιαίτερα δυναμικοί και στιβαροί. Ως γνωστόν, το Ξινόμαυρο, με την υψηλή οξύτητα και τις αυστηρές ταννίνες στη νεότητά του είναι τεταμένο, άγουρο, άγριο και επιθετικό και επιδέχεται παλαίωση αφού τα χαρακτηριστικά του βελτιώνονται με την πάροδο του χρόνου (Βαλιάτζα Ε., 2018). Τέλος, στην κατηγορία Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) από το 1971 ανήκουν οι ερυθροί ξηροί οίνοι που έχουν παραχθεί σε καθορισμένη γεωγραφικά περιοχή, αποκλειστικά από την ποικιλία Ξινόμαυρο ενώ απαιτείται παλαίωση σε δρύινα βαρέλια για ένα χρόνο (Βαλιάτζα Ε., 2018).

5. Η χρήση σκευασμάτων καολίνη και αμπισιικού οξέος στην αμπελουργία

5.1 Καολίνης

Ο καολίνης αποτελεί μία από τις τρεις κατηγορίες των αργιλικών ορυκτών και συγκεκριμένα ανήκει στα φυλοπυριτικά ορυκτά, με μέγεθος μικρότερο από 2μm. Παρουσιάζει χαμηλή ιοντοανταλλακτική χωρητικότητα ενώ διαθέτει μικρή ικανότητα προσρόφησης ύδατος καθότι αναπτύσσονται ισχυροί δεσμοί μεταξύ των στρωμάτων του (Στυλιανού Μ., 2012). Ο καολίνης είναι ένας από τους έξι εμπορικούς τύπους αργίλων ο οποίος περιλαμβάνει κυρίως καολινίτη και αποτελεί μία οικολογική και ταυτόχρονα οικονομική πρόταση η οποία έχει εφαρμοστεί σε αρκετές καλλιέργειες δίνοντας θετικά αποτελέσματα.

Ο καολίνης χρησιμοποιείται ευρέως ως οικολογικό φυτοπροστατευτικό καθότι η κολλοειδής σκόνη του ψεκαζόμενη στη φυτική επιφάνεια δημιουργεί μία λεπτή λευκή υδροφοβική μεμβράνη που δρα απωθητικά τόσο στη σίτιση όσο και στην ωτοκία των επικείμενων εχθρών του φυτού. Για παράδειγμα, ο ψεκασμός με σκόνη καολίνη, συμβάλλει στην καταπολέμηση του ωιδίου της αμπέλου, μετά από ανάμειξη με μίγμα θείου καθότι διευκολύνεται η διαλυτοποίηση της σκόνης του θείου και μειώνεται η φυτοτοξικότητα του σε υψηλές θερμοκρασίες (Constant N., 2007). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι περιορίζει την ανάπτυξη του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*, που προκαλεί την ασθένεια Pierce στο αμπέλι (Tubajica K.M. et al., 2007).

Τα αποτελέσματα διάφορων ερευνητικών εργασιών δείχνουν ότι το λευκό στρώμα από καολίνη που σχηματίζεται στη φυλλική επιφάνεια του φυτού της αμπέλου μετά την εφαρμογή του, παρέχει προστασία από αβιοτικές καταπονήσεις όπως είναι το θερμικό στρες και τα ηλιοεγκαύματα μέσω της μείωσης της θερμοκρασίας των φύλλων και της αντανάκλασης των IR και UV ακτινοβολιών χωρίς να επηρεάζεται παράλληλα η φωτοσύνθεση και η ανταλλαγή αερίων (Glenn, D.M., 2001, 2009). Σημαντική είναι και η επίδραση του προστατευτικού φιλμ στη μεταβολή της στοματικής αγωγιμότητας και στην αύξηση της αποδοτικότητας χρήσης νερού (WUE), παρόλο που φαίνεται ότι αυτή διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία, το σύστημα άρδευσης και τον τύπο του εδάφους.

Οι επιδράσεις του καολίνη στα γλυκογραφικά χαρακτηριστικά (ολικά σάκχαρα, ογκομετρούμενη οξύτητα και pH), ποικίλλουν μεταξύ των καλλιεργούμενων ποικιλιών. Για παράδειγμα, η επέμβαση με καολίνη δείχνει να καθυστερεί την ωρίμανση στην ποικιλία Cabernet sauvignon ενώ σε άλλες όπως οι ποικιλίες Merlot και Vioignier φαίνεται να μην ασκεί καμία επίδραση (Glenn D.M. et al., 2010). Σημαντική είναι και η επίδραση του καολίνη στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της ράγας καθώς σύμφωνα με τους Shellie and Glenn (2008) η εφαρμογή του συνδυάζεται με σημαντική αύξηση στο μέγεθος της ράγας στην ποικιλία Merlot. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η επέμβαση με καολίνη οδηγεί σε μία σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας της ράγας σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή, κυρίως μέσω του ελέγχου των γονιδίων που κωδικοποιούν τα κύρια ένζυμα του δευτερογενούς μεταβολισμού (Dinis L.-T. et al., 2016; Conde A. et al., 2016).

5.2 Αμπισισικό οξύ (ABA)

Το αμπισισικό οξύ (ABA) είναι μία φυτοορμόνη η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση των φυτών έναντι των καταπονήσεων (ξηρασία, χαμηλή θερμοκρασία, και αλατότητα), στον λήθαργο των οφθαλμών καθώς και στον έλεγχο της βλάστησης και της ανάπτυξης των φυτών. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι το αμπισισικό οξύ αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα στη βιοσύνθεση των πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών κατά την ωρίμανση των ραγών των σταφυλών (Cawthon D.L. and Morris J.R. 1982; Davies C. et al., 1997; Antolin M.C. et al., 2003) ενώ σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προάγει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την ινβερτάση και ελέγχουν τη βιοσύνθεση των φαινολών και των ανθοκυανών (Gagne et al., 2006; Gambetta et al., 2010; Koyama et al., 2010).

Το αμπισισικό οξύ συντίθεται στη ρίζα και τα φύλλα και μεταφέρεται στις σταφυλές μέσω των αγγείων του ξύλου (Shiozaki S. et al 1999). Η συγκέντρωσή του παρουσιάζει ένα μέγιστο στα άνθη κατά την πλήρη άνθιση, ακολούθως μειώνεται σημαντικά κατά το στάδιο I της ταχείας ανάπτυξης των ραγών, ενώ κατά την έναρξη ωρίμανσης επανέρχεται στα αρχικά, υψηλά, επίπεδα. Φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του ABA συνδέεται χρονικά με την προοδευτική απόκτηση της μαλακής υφής της ράγας και την εμφάνιση του χρώματος στο φλοιό. Σε αντίθετη περίπτωση, η μείωση της συγκέντρωσης του, ανεξάρτητα από το αίτιο που την προκαλεί, εντείνει την ανομοιομορφία του χρώματος και καθυστερεί την ωρίμανση (Σταυρακάκης M.N., 2013).

Τα δεδομένα ερευνητικών εργασιών επιβεβαιώνουν ότι η εφαρμογή εξωγενούς αμπισισικού οξέος προάγει την ωρίμανση καθώς επιδρά θετικά στο χρωματισμό των ραγών και στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών (Hiratsuka S. et al 2001; Ban T. et al 2003; Jeong S.T. et al 2004). Επιπλέον, η εφαρμογή αμπισισικού οξέος κατά τον περκασμό φαίνεται ότι προάγει τη συσσώρευση των σακχάρων και των ανθοκυανών και παράλληλα μειώνει τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων (Coombe B.G. and Hale C.R., 1973; Yamane T. et al., 2006; Gambetta G.A. et al 2010). Στην ποικιλία Cabernet Sauvignon, η εφαρμογή αμπισισικού οξέος στις σταφυλές των πρέμων οδήγησε στην ταχεία συσσώρευση των ανθοκυανών και των φλαβονολών

και ενίσχυσε την δραστηριότητα των γονιδίων που εμπλέκονται στα βιοσυνθετικά μονοπάτια των φαινυλπροπανοειδών και των φλαβονοειδών (Koyama K. et al 2010).

ΜΕΡΟΣ Β (Πειραματικό μέρος): Υλικά και Μέθοδοι

1. Σχεδίαση του πειράματος

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του 2018 σε δύο αμπελώνες της περιοχής του Γιαννακοχωρίου Ημαθίας σε υψόμετρο 400-500 μ. Επιπλέον, οι αμπελώνες ήταν φυτεμένοι με προσανατολισμό Βορρά-Νότο, τα πρέμνα ήταν εμβολιασμένα στο υποκείμενο 1103 Paulsen και μορφωμένα σε σχήμα αμφίπλευρο Royat. Οι καλλιεργητικές φροντίδες που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι συνήθειες που εφαρμόζονται στην ευρύτερη περιοχή για τη συγκεκριμένη ποικιλία.

Στον πρώτο αμπελώνα και για το πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις σειρές από τις οποίες η μία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (επέμβαση MABA) και οι υπόλοιπες για τις επεμβάσεις με σκεύασμα εξωγενούς αμψισικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων για την κάθε σειρά (πιν. 1). Συγκεκριμένα, στην πρώτη επέμβαση εφαρμόστηκαν 400 ppm (επέμβαση ABA1), στη δεύτερη 400 ppm με επιπλέον εφαρμογή 800 ppm (επέμβαση ABA2) μετά από λίγες ημέρες και τέλος στην τρίτη επέμβαση εφαρμόστηκαν 800 ppm (επέμβαση ABA3). Όλες οι επεμβάσεις εφαρμόστηκαν απευθείας στις σταφυλές των πρέμνων και πραγματοποιήθηκαν λίγο μετά τον περκασμό.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις αμψισικού οξέος ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	ppm
MABA	0
ABA1	400
ABA2	400 + 800
ABA3	800

Στον δεύτερο αμπελώνα, και για το άλλο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές από τις οποίες η μία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (επέμβαση ΜΚΛΝ) και η άλλη για την επέμβαση με σκεύασμα άνυδρου καολίνη (επέμβαση ΚΛΝ). Επιπλέον, σκοπός της επέμβασης με καολίνη ήταν να παραμείνει η φυλλική επιφάνεια καλυμμένη σε όλα τα στάδια μέχρι την ωρίμανση. Οι ψεκασμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ψεκαστικού τις πρωινές ώρες και σε συνθήκες άπνοιας. Χρησιμοποιήθηκε η συνιστώμενη δόση καολίνη 5kg/100 lt νερού και προσθήκη προσκολλητικού. Τέλος, το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Surround WP CROP PROTECTANT (Aluminium silicate 95% β/β).

2. Συλλογή των δειγμάτων-Μετρήσεις

Η δειγματοληψία αντιπροσωπευτικού δείγματος ραγών και σταφυλών πραγματοποιήθηκε κατά την τεχνολογική ωρίμανση. Συνολικά έγιναν 6 δειγματοληψίες, 4 για τις επεμβάσεις με αμψισικό οξύ και 2 για την επέμβαση με καολίνη. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκαν 5

σταφυλές από κύριους βλαστούς που βρίσκονταν σε διαφορετικές θέσεις (σκιασμένες ή μη σκιασμένες) και από διαφορετικές θέσεις της κάθε σταφυλής. Ακολούθησαν οι μηχανικές αναλύσεις των ραγών και των σταφυλών όπως περιγράφονται παρακάτω και μετρήθηκαν η σακχαροπεριεκτικότητα καθώς και η ολική και ενεργός οξύτητα των γλευκών. Ακολούθησε ο διαχωρισμός των ραγών σε φλοιούς, γίγαρτα και σάρκα, για κάθε επανάληψη. Οι φλοιοί και τα γίγαρτα αποξηράνθηκαν με τη διαδικασία της λυοφυλίωσης και στη συνέχεια κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο. Η σάρκα κάθε επανάληψης πολτοποιήθηκε ξεχωριστά. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα (φλοιοί, γίγαρτα, γλεύκος) διατηρήθηκαν υπό βαθιά κατάψυξη στους -80°C .

3. Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

3.1 Βάρος, μήκος και πλάτος σταφυλής

Το βάρος κάθε σταφυλής μετρήθηκε με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Μετρήθηκε το συνολικό βάρος των σταφυλών κάθε επέμβασης και υπολογίστηκε το μέσο βάρος. Όσον αφορά το μήκος και πλάτος σταφυλής, η μέτρηση έγινε με ακρίβεια χιλιοστού του μέτρου. Για κάθε επέμβαση υπολογίστηκε το μήκος και πλάτος των σταφυλών και εξήχθη το μέσο μήκος και πλάτος.

3.2 Μέσο βάρος, μήκος και πλάτος ράγας

Για τη μέτρηση του βάρους των ραγών χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας. Για τον υπολογισμό του μέσου βάρους των ραγών κάθε επέμβασης έγιναν τρεις επαναλήψεις. Συλλέχθηκαν και ζυγίστηκαν 30 ράγες για κάθε επανάληψη και υπολογίστηκε σε μέσο βάρος εκατό ραγών κάθε επανάληψης. Στη συνέχεια εξήχθη το μέσο βάρος των 100 ραγών της κάθε επέμβασης. Όσον αφορά το μήκος και πλάτος της ράγας, η μέτρηση έγινε με βερνιέρο και η ένδειξη ελήφθη με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων. Συνολικά συλλέχθηκαν 30 ράγες από κάθε επέμβαση και εξήχθη το μέσο μήκος και πλάτος των ραγών κάθε επέμβασης.

3.3 Δύναμη πρόσφυσης ράγας

Για κάθε επέμβαση, λήφθηκαν 5 ομάδες των 10 ραγών από τις παραπάνω σταφυλές και μετρήθηκε η δύναμη πρόσφυσης της κάθε ομάδας με δυναμόμετρο.

4. Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών

4.1 Μέτρηση σακχαροπεριεκτικότητας (Brix) με χρήση διαθλασιμέτρου

Ο δείκτης διάθλασης του γλεύκους μετριέται με τη βοήθεια διαθλασιμέτρου και εάν η θερμοκρασία μέτρησης είναι διαφορετική των 20°C η τιμή διορθώνεται μέσω πίνακα. Αρχικά το διαθλασίμετρο μηδενίζεται. Το μηδέν του οργάνου ρυθμίζεται με απεσταγμένο νερό και το όριο του διαχωρισμού των δύο ζωνών διαφορετικής φωτεινότητας πρέπει να βρίσκεται στο μηδέν της κλίμακας. Στη συνέχεια τοποθετούνται δύο σταγόνες του προς εξέταση γλεύκους στην επιφάνεια του σταθερού πρίσματος, κατεβαίνει το κινητό πρίσμα και κατευθύνεται το όργανο προς μία πηγή

φωτός. Επίσης, στην εν λόγω κλίμακα διακρίνεται μια διαχωριστική γραμμή μεταξύ μίας φωτεινής και μίας σκοτεινής ζώνης. Γίνεται ανάγνωση της ένδειξης εκεί όπου βρίσκεται η διαχωριστική γραμμή. Οι επιφάνειες του πρίσματος, μετά από κάθε μέτρηση, σκουπίζονται με ένα καθαρό πανί. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις (επαναλήψεις) και εξήχθη ο μέσος όρος για κάθε επέμβαση.

4.2 Μέτρηση ενεργούς οξύτητας-pH

Ως ενεργός οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν H^+ . Σε αντίθεση με την ολική οξύτητα, η ενεργός οξύτητα εξαρτάται και από το είδος των οργανικών οξέων διότι π.χ ο οίνος που περιέχει μία ορισμένη ποσότητα τρυγικού οξέος είναι πιο όξινος από τον οίνο που περιέχει ισόποσο ηλεκτρικό οξύ λόγω του διαφορετικού βαθμού διάστασης των ελεύθερων καρβοξυλομάδων. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η διακύμανση των τιμών του pH εξαρτάται από τη συγκέντρωση των οργανικών οξέων. Το pH του χυμού και του γλεύκους εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του τρυγικού οξέος σε ελεύθερη κατάσταση (είναι το πλέον ισχυρό μεταξύ των οργανικών οξέων της ράγας) και από την παρουσία K^+ , που είναι το κύριο κατιόν του γλεύκους (Σταυρακάκης Μ., 2013). Βαθμονομείται το όργανο (pH-μετρο) με διαλύματα γνωστού pH. Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα, που πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία 20 C, σε ποτήρι ζέσεως και εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο. Λαμβάνεται η ένδειξη του οργάνου με δύο δεκαδικά ψηφία. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και εξήχθη ο μέσος όρος για κάθε επέμβαση.

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής οξύτητας

Αρχή της μεθόδου

Η ολική οξύτητα καθορίζεται από το σύνολο των καρβοξυλομάδων και εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα και ανόργανα ανιόντα και κατιόντα. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ογκομέτρηση αλκαλικού διαλύματος (συνήθως $NaOH$ 0.1 N) που καταναλώνεται από τα οξέα του γλεύκους μέχρι το pH του δείγματος να φτάσει στη τιμή 7 της κλίμακας του pH. Ως δείκτης για τον καθορισμό του σημείου εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται η φαινολοφθαλεΐνη. Η φαινολοφθαλεΐνη αποτελεί το δείκτη που σηματοδοτεί το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του διαλύματος από το $NaOH$, αλλάζοντας χρώμα σε pH 8.3-10.5. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και εξήχθη ο μέσος όρος για κάθε επέμβαση.

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου $NaOH$ κανονικότητας 0.1 N
- Αλκοολικό διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης 10gr/lit (1%). Για την παρασκευή του διαλύματος διαλύονται 10 gr φαινολοφθαλεΐνη σε 1000 ml αλκοόλη 95% vol

Διαδικασία μέτρησης

Για τη διαδικασία της ογκομέτρησης χρησιμοποιείται κωνική φιάλη των 250 ml, στην οποία γίνεται:

- Μεταφορά 10 ml γλεύκους
- Προσθήκη 10 ml απεσταγμένου νερού
- Προσθήκη 4-5 ml σταγόνων διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης
- Σταδιακή τιτλοδότηση με προσθήκη NaOH 0.1N μέχρι να αλλάξει χρώμα ο δείκτης φαινολοφθαλεΐνης (στις ερυθρές ποικιλίες που ενδιαφέρει για το εν λόγω πείραμα από ερυθρό σε κεραμμίδι)
- Σημειώνεται ο όγκος NaOH 0.1 N που χρειάστηκε για την πλήρη εξουδετέρωση των οξέων του δείγματος

Έκφραση αποτελεσμάτων

Έστω n τα καταναλωθέντα ml NaOH 0.1 N. Η ολική οξύτητα εκφρασμένη σε meq/lit γλεύκους δίνεται από τον τύπο:

$$A=10*n(\text{meq/lit γλεύκους})$$

Ενώ εκφρασμένη σε gr τρυγικού οξέος/lit γλεύκους, δίνεται από τον τύπο:

$$A'=0.075*A(\text{gr τρυγικού οξέος/lit γλεύκους})$$

5. Προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στους φλοιούς και στα γίγαρτα με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας

Προετοιμασία δειγμάτων

A) Εκχύλιση φλοιών

Για την εκχύλιση των φλοιών παρασκευάστηκε διάλυμα ακετόνης, μεθανόλης και νερού (σε αναλογία 40:40:19), οξιτισμένο με πυκνό διάλυμα HCL 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Τα διαλύματα και των τριών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια:

- Ζυγίστηκαν 0.4 gr φλοιού από κάθε επανάληψη σε ζυγό ακριβείας και αναμείχθηκαν σε 4ml διαλύματος (αναλογία 1:10)
- Ανάδευση του διαλύματος σε συσκευή Turax στις 8.000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα
- Το ομογενοποιημένο διάλυμα εκχυλίστηκε υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 C
- Φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές
- Λήψη του υπερκειμένου (4ml)
- Επανάληψη της διαδικασίας -2η φορά- για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 4 ml διαλύματος εκχύλισης

- Εκ νέου λήψη του υπερκειμένου μετά τη φυγοκέντρωση
- Προσθήκη του υπερκειμένου στο προηγούμενο (4ml+4ml=8ml)
- Επανάληψη της διαδικασίας -3η φορά- για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκειμένου μετά τη φυγοκέντρωση
- Προσθήκη του υπερκειμένου στο προηγούμενο (8ml+4ml=12ml)
- Απόρριψη του ιζήματος
- Τελικός όγκος του εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους – εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε επέμβαση τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

B) Εκχύλιση γιγάρτων

Τα γίγαρτα περιέχουν γιγαρτέλαιο (Ristic R. and Pland P.G., 2005; Rockenbach I.I. et al., 2011) το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 280 nm. Στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και οι μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μη καθίσταται δυνατό να διαχωριστούν ικανοποιητικά οι ενώσεις στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Για αυτό το λόγο πριν τη διαδικασία της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων, έγινε αφαίρεση του γιγαρτέλαιου από τα κονιορτοποιημένα γίγαρτα με χρήση διαλύματος εξανίου καθαρότητας HPLC, για κάθε επανάληψη, ακολουθώντας την παρακάτω μέθοδο:

- Ζύγισμα 0.4 gr λυοφιλωμένων και κονιορτοποιημένων γιγάρτων
- Προσθήκη 2 ml εξανίου και ανάδευση
- Φυγοκέντρωση και απόρριψη υπερκειμένου
- Επανάληψη της διαδικασίας -2η φορά- για το ίζημα

Για την εκχύλιση των γιγάρτων παρασκευάστηκε διάλυμα μεθανόλης – νερού αναλογίας 80:19. Το διάλυμα αυτό οξινίστηκε με πυκνό διάλυμα HCL 12M, κατά 1% επί του τελικού όγκου του διαλύματος εκχύλισης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων από το παραπάνω ίζημα, κάθε επανάληψης:

- Προσθήκη 4ml διαλύματος εκχύλισης
- Ανάδευση σε συσκευή Turax στις 8.000 στροφές για μερικά δευτερόλεπτα
- Εκχύλιση του ομογενοποιημένου διαλύματος υπό ανάδευση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία 25 C
- Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές
- Λήψη του υπερκειμένου (4ml)

- Επανάληψη της διαδικασίας -2η φορά- για το ίζημα από την αρχή, δηλαδή από την προσθήκη 4 ml διαλύματος εκχύλισης
- Εκ νέου λήψη του υπερκειμένου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκειμένου στο προηγούμενο ($4\text{ml}+4\text{ml}=8\text{ml}$)
- Επανάληψη της διαδικασίας -3η φορά- για το ίζημα από την αρχή
- Εκ νέου λήψη του υπερκειμένου μετά τη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη του υπερκειμένου στο προηγούμενο ($8\text{ml}+4\text{ml}=12\text{ml}$)
- Απόρριψη του ιζήματος
- Τελικός όγκος εκχυλίσματος 12 ml (αναλογία ξηρού βάρους – εκχυλίσματος 1:30)

Ο σκοπός που η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά είναι για να εξασφαλίσουμε ότι στο τελικό διάλυμα θα έχει εκχυλιστεί όλη η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων. Στο τέλος της διαδικασίας υπήρχαν για κάθε επέμβαση τρία διαφορετικά εκχυλίσματα (επανάληψη).

Γ) Αραιώση

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στους φλοιούς και στα γίγαρτα, αποφασίστηκε, κατόπιν δοκιμών, να πραγματοποιηθεί αραιώση των αρχικών εκχυλισμάτων. Η αραιώση που έγινε ήταν 1:30 σε τελικό όγκο διαλύματος 10 ml. Κατά συνέπεια, για την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος αραιώθηκαν 0.3 ml εκχυλίσματος σε 9.70 ml διαλύτη (μεθανόλη) για κάθε εκχύλιση κάθε επέμβασης. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη καθαρότητας HPLC. Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τα προαναφερθέντα αραιωμένα εκχυλίσματα σε όλες τις μεθόδους εκτός από την μέθοδο προσδιορισμού των ολικών φλαβονών και φλαβονολών και των ο-διφαινολών. Για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τα αρχικά πυκνά εκχυλίσματα ενώ για τον προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών έγινε αραιώση 1:5 και 1:120 για τις ολικές φλαβανόλες των γιγάρτων.

5.1 Μέτρηση ολικών ανθοκυανών και φαινολικών ενώσεων με την μέθοδο Πand

A) Αρχή της μεθόδου

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών στους φλοιούς και των ολικών φαινολικών ενώσεων στους φλοιούς και στα γίγαρτα αρχικά πρέπει να γίνει εκχύλιση. Με την εκχύλιση, η μέτρηση των ανθοκυανών γίνεται φασματοφωτομετρικά με μέγιστη απορρόφηση στα 520 nm. Όταν στα 700 nm η τιμή είναι μεγαλύτερη του 0.01 ($700\text{nm}>0.01$), τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο. Εάν μετρηθεί επίσης η απορρόφηση στα 280 nm, μετράται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών. Η μέτρηση αυτή μπορεί να μην έχει άμεση συσχέτιση με τις τιμές που προκύπτουν κατά την οινοποίηση αλλά μας παρέχει πληροφορίες για το σύνολο των ολικών

φαινολικών στη ράγα (φλοιός, γίγαρτα, σάρκα).

B) Αντιδραστήρια

- Διάλυμα HCL 1M. Για την παρασκευή του διαλύματος αραιώθηκε 1:12 πυκνό HCL 12M σε απιονισμένο νερό

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων – Διαδικασία μέτρησης

Για τη μέτρηση των ολικών ανθοκυανών έγινε αραιώση στα πυκνά εκχυλίσματα με μεθανόλη καθαρότητας HPLC, σε αναλογία 1:5. Αντίθετα, για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών στους φλοιούς και στα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:30) που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τα δύο μέρη της ράγας (φλοιοί, γίγαρτα):

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4.000 στροφές για 10 λεπτά
- Μεταφορά 0.5 ml από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικούς σωλήνες
- Προσθήκη 10 ml HCL 1M
- Ανάδευση με vortex
- Παραμονή σε ηρεμία στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες
- Φωτομέτρηση στα 520 nm (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου) και στα 280 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου)

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκαν 0.5 ml πρότυπου αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Για τις ολικές ανθοκυάνες χρησιμοποιήθηκε μη αραιωμένο πρότυπο εκχύλισμα φλοιών. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου αντίστοιχα. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520 nm για τις ανθοκυάνες (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου) και στα 280 nm για τις ολικές φαινολικές ενώσεις (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου) σε φλοιούς και γίγαρτα. Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν τρεις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η μαλβιδίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (6.25-200 ppm). Αντίθετα, για τις ολικές φαινολικές ενώσεις κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη με πρότυπη ένωση το γαλλικό οξύ σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (71.87-1150 ppm).

Δ) Υπολογισμοί ολικών ανθοκυανών και ολικών φαινολικών ενώσεων

Ολικές ανθοκυάνες

Ο υπολογισμός αυτός για τους φλοιούς γίνεται σε δύο βήματα με τελική έκφραση σε mg

μαλβιδίνης/ gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg μαλβιδίνης/gr ξηρού ιστού
$$(A520*5*12*0.001)/(0.001*0.4)$$
- (B) Υπολογισμός mg μαλβιδίνης/gr νωπού ιστού
$$(A)-[\%H*(A)]$$

όπου %H=ποσοστό υγρασίας

Ολικές φαινολικές ενώσεις

Ο υπολογισμός αυτός για τους φλοιούς γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφράζεται σε γαλλικό οξύ

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος/gr ξηρού ιστού:
$$(A280*30*12*0.001)/(0.0023*0.4)$$
- (B) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος/gr νωπού ιστού
$$(A)-[\%H*(A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα γίγαρτα γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφράζεται σε γαλλικό οξύ

Έκφραση σε mg γαλλικού οξέος/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός σε mg γαλλικού οξέος/gr ξηρού ιστού
$$(A280*30*12*0.001)/(0.0023*0.4)$$
- (B) Υπολογισμός mg γαλλικού οξέος/gr νωπού ιστού
$$(A)-[\%H*(A)]$$

5.2 Μέτρηση συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose (μεθυλική κυτταρίνη)

A) Αρχή της μεθόδου

Η μέτρηση συγκέντρωσης των συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose είναι ένα μέσο μέτρησης της συγκέντρωσης ταννινών μετά από ομογενοποίηση και εκχύλιση στο κρασί και τα σταφύλια, αλλά και σε άλλα υδατικά διαλύματα (Mercurio M. et al., 2006; Smith P.A., 2005; Sarneckis C. et al., 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η methyl cellulose και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Το πολυμερές που χρησιμοποιείται είναι η methyl cellulose και ως εκ τούτου, η δοκιμασία μετρά τις ταννίνες που καθιζάνουν με τη methyl cellulose, δηλαδή, μετρά την MCP-ταννίνη. Η δοκιμασία βασίζεται στην αφαίρεση των τιμών απορρόφησης στα 280 nm των διαλυμάτων με και χωρίς καθίζηση που μετρήθηκαν με φασφατοφωτόμετρο. Η methyl cellulose δεν απορροφά στα 280 nm

και συνεπώς δεν εμποδίζει τις μετρήσεις.

B) Αντιδραστήρια

- Κορεσμένο διάλυμα ammonium sulfate. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με προσθήκη 300 ml απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως των 500 ml και προστίθενται κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να μην μπορεί να διαλυθεί άλλο. Συνεχίζεται η προσθήκη των κρυστάλλων μέχρι να υπάρχουν στον πάτο κρύσταλλοι θειικού αμμωνίου πάχους 1.5 cm περίπου
- Διάλυμα methyl cellulose 0.04%. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται με θέρμανση περίπου 300 ml απιονισμένου νερού στους 80 C και ψύξη περίπου 700 ml απιονισμένου νερού στους 0-5 C. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται τα 300 ml απιονισμένου νερού στους 80 C και προστίθενται 0.4 gr methyl cellulose μέχρι να διαλυθεί τελείως με συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο 0-5 C και προστίθεται σιγά σιγά το κρύο νερό αναδεύοντάς το για 20-40 λεπτά. Βγαίνει από το υδατόλουτρο και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 ώρες

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:30) που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η παρακάτω διαδικασία είναι κοινή και για τα δύο μέρη της ράγας (φλοιός, γίγαρτα):

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4.000 στροφές για 10 λεπτά
- Παίρνουμε δύο πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (control and treatment):
 - α) control: 1ml αραιωμένου εκχυλίσματος + 2ml ammonium sulfate + H₂O (τελ. V=10ml). Ανάδευση με vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
 - β) treatment: 1ml αραιωμένου εκχυλίσματος + 3ml methyl cellulose (ανάδευση με vortex και παραμονή για 2-3 λεπτά) + 2ml ammonium sulfate + H₂O (Vτελ=10 ml). Ανάδευση με vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 min
- Φωτομέτρηση στα 280 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου)

Σε άλλους δύο πλαστικούς σωλήνες αντί για δείγμα προστέθηκε 1 ml πρότυπου αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης για φλοιούς και γίγαρτα, αντίστοιχα (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μηδενισμό του φωτόμετρου, αντίστοιχα. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου). Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν τρεις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για τα control sample και για τα treatment sample. Υπολογίστηκε η διαφορά των μέσων όρων για κάθε επανάληψη ($A_{280} = A_{cs} - A_{ts}$) και χρησιμοποιώντας την

πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των συμπυκνωμένων ταννινών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125-500 ppm).

A) Υπολογισμός συμπυκνωμένων ταννινών με methyl cellulose

Ο υπολογισμός αυτός για τους φλοιούς γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών εκφράζεται σε mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr ξηρού ιστού
 $(A280*30*12*0,001)/(0,011*0,4)$
- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού
 $(A)-[\%H*(A)]$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα γίγαρτα γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών εκφράζεται σε mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr ξηρού ιστού
 $(A280*30*12*0,001)/(0,011*0,4)$
- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού
 $(A)-[\%H*(A)]$

5.3 Μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου (AlCl₃)

A) Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών με το χλωριούχο αργίλιο βασίζεται στο ότι το AlCl₃ σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με την κετονομάδα στη θέση C4 και την υδροξυλική ομάδα είτε της θέσης C3 είτε της θέσης C5 των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπρόσθετα, σχηματίζει όξινα, ασταθή σύμπλοκα με τις ορθο-υδροξυλομάδες των δακτυλίων A και B των φλαβονοειδών (Bhaigyabati Th. et al., 2014).

B) Αντιδραστήρια

- Υδατικό διάλυμα NaNO₂ 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr NaNO₂ και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού
- Υδατικό διάλυμα AlCl₃ 10% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 10 gr AlCl₃ και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml απιονισμένου νερού, κάτω από απαγωγό
- Διάλυμα NaOH 0,1 N

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:30) που

αναφέρθηκαν παραπάνω. Η παρακάτω διαδικασία είναι κοινή για τους φλοιούς και τα γίγαρτα. Σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Προσθήκη 2 ml απεσταγμένου νερού
- Προσθήκη 0,5 ml αραιωμένου εκχυλίσματος
- Ανάδευση με vortex και προσθήκη 0,15 ml NaNO₂ 5% w/v
- Ανάδευση με vortex και μετά από 5 λεπτά προσθήκη 0,15 ml AlCl₃ 10% w/v
- Ανάδευση με vortex και μετά από 6 λεπτά προσθήκη 1 ml NaOH 1 N
- Ανάδευση με vortex και μετά προσθήκη 1,2 ml απεσταγμένο νερό
- Ανάδευση με vortex και μέτρηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 510 nm (πλαστική κυψελίδα, λάμπα αλογόνου)

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για τα αραιωμένα εκχυλίσματα προστέθηκαν 0,5 ml αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα (1:30 σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για το μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125-1000 ppm).

Δ) Υπολογισμός ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονοειδών εκφράζεται σε mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr ξηρού ιστού:
$$(A510*30*12*0,001)/(0,0024*0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού:
$$(A)-[\%H-(A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονοειδών εκφράζεται σε mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr ξηρού ιστού:
$$(A510*30*12*0,001)/(0,0024*0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού:
$$(A)-[\%H-(A)]$$

5.4 Μέτρηση των ολικών φλαβονολών με τη μέθοδο της 4-διμεθυλ-αμμινοκινναμωμική αλδεΐδη (4-DMACA) (Arnous A. et al., 2002)

A) Αρχή της μεθόδου

Οι αλδεΐδες αντιδρούν με τις μ-διφαινόλες προς σχηματισμό ενός έγχρωμου (βαθύ μπλε) ιόντος υπό όξινες συνθήκες. Η αντίδραση έχει αξιοποιηθεί για την εκτίμηση των φλαβονολών καθώς ο δακτύλιος A έχει λειτουργικότητα μ-διφαινόλης (Scalbert A., 1992). Οι Theis και Fischer (1971) πρώτη φορά ανέφεραν το βαθύ μπλε χρωματισμό της 4-DMACA μετά από αντίδρασή της με τις κατεχίνες. Μία άλλη ευρύτερα διαδεδομένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των φλαβονολών είναι αυτή που ως αλδεΐδη χρησιμοποιείται η αρωματική ένωση βανιλίνη. Όμως, η μέθοδος 4-DMACA έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της βανιλίνης καθώς παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια και δεν υπάρχει καμία παρεμβολή από τις ανθοκυάνες (Li Y.G et al., 1996).

B) Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Σκόνη 4-DMACA 100 mg
- Διάλυμα 25% v/v HCL 1N
- Μεθανόλη καθαρότητας HPLC
- Παρασκευή διαλύματος 4-DMACA 0,1% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού, αναμείχθηκαν 8,5 ml HCL με 91,65 ml μεθανόλης και στη συνέχεια διαλύθηκαν τα 100 mg 4-DMACA υπό συνεχή ανάδευση

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων

Για τους φλοιούς χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα (1:30) που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Όμως, επειδή στα γίγαρτα η συγκέντρωση των φλαβονολών είναι αρκετά μεγαλύτερη από τους φλοιούς έγινε μια επιπλέον αραιώση στο ήδη αραιωμένο εκχύλισμα των γιγάρτων, με μεθανόλη καθαρότητας HPLC, σε αναλογία 1:4. Επομένως, η τελική αραιώση των γιγάρτων που χρησιμοποιήθηκε στη μέτρηση ήταν 1:120.

Δ) Διαδικασία μέτρησης

Η διαδικασία αυτή είναι κοινή και για τους φλοιούς και για τα γίγαρτα. Σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Μεταφορά 1 ml διαλύματος 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde
- Προσθήκη 200 μl αραιωμένου εκχυλίσματος και ύστερα ανάδευση με vortex
- Παραμονή των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 640 nm

Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν 200 μl πρότυπου αραιωμένου διαλύματος εκχύλισης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα (1:30 για πρότυπο εκχύλισμα

φλοιών και 1:120 για πρότυπο εκχύλισμα γιγάρτων σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC) και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για το μηδενισμό του φωτόμετρου. Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν τρεις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η κατεχίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (7,8125-62,5 ppm).

E) Υπολογισμοί ολικών φλαβονολών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονολών εκφράζεται σε mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr ξηρού ιστού
$$(A640 \cdot 30 \cdot 12 \cdot 0,001) / (0,045 \cdot 0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού
$$(A) - [\%H \cdot (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονολών εκφράζεται σε mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr ξηρού ιστού
$$(A640 \cdot 30 \cdot 12 \cdot 4 \cdot 0,001) / (0,045 \cdot 0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού
$$(A) - [\%H \cdot (A)]$$

5.5 Μέτρηση ολικών φλαβονών και φλαβονολών με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου (AlCl₃)

A) Αρχή της μεθόδου – Αντιδραστήρια

Η αρχή της μεθόδου αναφέρεται παραπάνω στη μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Μεθανόλη καθαρότητας HPLC
- Διάλυμα AlCl₃ 5% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 5 gr AlCl₃ και διαλύονται σε τελικό όγκο 100 ml μεθανόλης καθαρότητας HPLC, κάτω από απαγωγό

B) Προετοιμασία δειγμάτων – Διαδικασία μέτρησης

Στη μέτρηση αυτή δε χρησιμοποιήθηκε το αραιωμένο εκχύλισμα όπως στις προηγούμενες μετρήσεις, καθώς η συγκέντρωση των φλαβονολών θα ήταν δύσκολα ανιχνεύσιμη. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε κατευθείαν το πυκνό εκχύλισμα. Σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου:

- Μεταφέρθηκαν 0,2 ml εκχυλίσματος
- Προσθήκη 2 ml μεθανόλης και ανάμιξη
- Προσθήκη 0,1 ml διαλύματος $AlCl_3$ και ανάμιξη
- Προσθήκη 2,7 ml μεθανόλη και ανάμιξη
- Παραμονή του δείγματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ηρεμία
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 420 nm

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για πυκνό εκχύλισμα προστέθηκαν 0,2 ml μη αραιωμένου πρότυπου εκχυλίσματος φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου. Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν τρεις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ολικών φλαβονών και φλαβονολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η ρουτίνη σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (31,25 – 500 ppm).

Γ) Υπολογισμοί ολικών φλαβονών και φλαβονολών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg ρουτίνης/gr νωπού ιστού:

- (A) Υπολογισμός mg ρουτίνης/gr ξηρού ιστού

$$(A_{425} * 12 * 0,001) / (0,0013 * 0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg ρουτίνης/gr νωπού ιστού

$$(A) - [\%H * A]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg ρουτίνης/gr νωπού ιστού:

- (A) Υπολογισμός mg ρουτίνης/gr ξηρού ιστού

$$(A_{425} * 12 * 0,001) / (0,0013 * 0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg ρουτίνης/gr νωπού ιστού

$$(A) - [\%H * A]$$

5.6 Μέτρηση των ολικών αντιοξειδωτικών με τη μέθοδο FRAP

A) Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος FRAP αναπτύχθηκε από τους Benzie F.F. και Strain J.J. το 1996 και στηρίζεται στο γεγονός ότι σε χαμηλό pH παρακολουθείται η μείωση ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου (με έντονο κυανό χρώμα) με μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 593 nm. Η αλλαγή στην απορρόφηση σχετίζεται με την αναγωγική ισχύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν στο μίγμα αντίδρασης και δίνουν ηλεκτρόνια.

B) Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος συγκέντρωσης 0,3 M και pH=3,6
- Διάλυμα TPTZ 10mM/lit σε διάλυμα HCL 40mM/lit.
- Διάλυμα FeCl₃ 6H₂O 20mM/lit.
- HCL 40mM. Προετοιμάζεται διαλύοντας 0,033 ml HCL 37% σε 10 ml νερό

Γ) Προετοιμασία δειγμάτων – Διαδικασία μέτρησης

Το διάλυμα εργασίας FRAP παρασκευάζεται με ανάμιξη:

- 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος
- 2,5 ml διαλύματος TPTZ
- 2,5 ml διαλύματος FeCl₃ 6H₂O

Το διάλυμα εργασίας FRAP θερμαίνεται στους 37 C και λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 593 nm ως τυφλό.

Για τους φλοιούς και τα γύγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα αραιωμένα εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρου:

- Μεταφέρθηκαν 0,1 ml αραιωμένου εκχυλίσματος
- Προσθήκη 1,1 ml διαλύματος FRAP και ακολουθεί ανάμιξη με vortex
- Παραμονή του δείγματος για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 37 C
- Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 593 nm

Σε άλλους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες αντί για αραιωμένο εκχύλισμα προστέθηκαν από 0,1 ml διαλύματος εκχύλισης και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτόμετρου.

Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν τρεις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των αντιοξειωτικών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το trolox σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων.

Δ) Υπολογισμοί ολικών αντιοξειδωτικών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών αντιοξειδωτικών εκφράζεται σε mg trolox/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg trolox/gr ξηρού ιστού
$$(A_{593} \cdot 30 \cdot 12 \cdot 0,001) / (0,0124 \cdot 0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg trolox/gr νωπού ιστού
$$(A) - [\%H \cdot (A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γύγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών

αντιοξειδωτικών εκφράζεται σε mg trolox/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg trolox/gr ξηρού ιστού
 $(A593*30*12*0,001)/(0,0124*0,4)$
- (B) Υπολογισμός mg trolox/gr νωπού ιστού
 $(A)-[\%H*(A)]$

5.7 Μέτρηση των ο-διφαινολών στο εκχύλισμα

A) Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των ολικών ο-διφαινολών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Roussos και Pontikis (2001). Η μέθοδος βασίζεται στη ξεχωριστή μέτρηση απορροφήσεων στα 370 nm των διαλυμάτων με και χωρίς προσθήκη $\text{NaMoO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

B) Προετοιμασία δειγμάτων-Διαδικασία μέτρησης

Για τους φλοιούς και τα γίγαρτα χρησιμοποιήθηκαν τα πυκνά εκχυλίσματα που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Επομένως δεν πραγματοποιήθηκε καμία αραιώση.

- Παίρνουμε 2 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου (control and treatment):
 - a) control: Σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου:
 - Σε 900 ml απεσταγμένο νερό προστίθενται 100 ml εκχυλίσματος του δείγματος και ακολουθεί καλή ανάδευση
 - Προστίθεται 1 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M pH=5,8
 - Ακολουθεί ανάδευση και μετά προστίθενται 2 ml απεσταγμένου νερού
 - b) treatment: Σε έναν πλαστικό σωλήνα φυγόκεντρο:
 - Σε 900 ml απεσταγμένου νερού προστίθενται 100 ml εκχυλίσματος του δείγματος και ακολουθεί καλή ανάδευση
 - Προστίθεται 1 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M pH=5,8
 - Ακολουθεί ανάδευση και μετά προστίθενται 2 ml 5% w/v $\text{NaMoO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - Ακολουθεί ανάδευση και παραμονή των δειγμάτων σε ηρεμία για 15 min πριν τη μέτρηση
 - Μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 370 nm

Σε άλλους δύο πλαστικούς σωλήνες αντί για πυκνό εκχύλισμα προστέθηκε μη αραιωμένο πρότυπο εκχύλισμα φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φωτομέτρου. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 370 nm (κυψελίδα χαλαζία, λάμπα δευτερίου). Για κάθε επανάληψη πάρθηκαν 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο από τις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους για τα control sample και για τα treatment sample. Υπολογίστηκε η διαφορά των μέσων όρων για κάθε επανάληψη ($A_{370}=\text{ACS}-$

ATS) και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ο-διφαινολών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση το καφεϊκό οξύ σε διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (31,25-250 ppm).

Γ) Υπολογισμοί ο-διφαινολών

Ο υπολογισμός αυτός για τους **φλοιούς** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος/gr ξηρού ιστού:

$$(A370*12*1*0,001)/(0,0099*0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος/gr νωπού ιστού

$$(A)-[\%H*(A)]$$

Ο υπολογισμός αυτός και για τα **γίγαρτα** γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των ολικών φλαβονών και φλαβονολών εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος/gr νωπού ιστού

- (A) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος/gr ξηρού ιστού:

$$(A370*12*1*0,001)/(0,0099*0,4)$$

- (B) Υπολογισμός mg καφεϊκού οξέος/gr νωπού ιστού

$$(A)-[\%H*(A)]$$

5.8 Προσδιορισμός μεμονωμένων ανθοκυανών και οξέων με HPLC αντίστροφης φάσης

Αρχή λειτουργίας του οργάνου

Ο όρος χρωματογραφία (chromatography) περιλαμβάνει πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται κοινώς στον διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών. Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος – μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις. Η αλληλεπίδραση αυτή οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του μίγματος σε ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως π.χ. Διαφορές στο μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα και τη διαλυτότητα. Στην υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography ή LC) η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή (Καρκαλούσος Π. et al, 2015).

Στη χρωματογραφία HPLC η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας μέσω χρωματογραφικής στήλης. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Κατά συνέπεια επιτρέπει τη χρήση στηλών που το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει, είναι μεγαλύτερο γιατί χρησιμοποιείται υλικό πλήρωσης με μικρό μέγεθος σωματιδίων. Ως αποτέλεσμα, βελτιώνεται ο

διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων. Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή (Καρκαλούσος Π. et al, 2015).

Η HPLC έχει δύο μορφές, την HPLC κανονικής φάσης και την HPLC αντίστροφης φάσης που είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή. Σε αυτή, ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων (μη πολικά) σε υδρόφοβη (μη πολική) στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Το γεγονός ότι η στατική φάση δεν είναι πολική οφείλεται, στις μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα που είναι προσδεμένες στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Τα μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκλύονται νωρίτερα (Καρκαλούσος Π. et al, 2015). Παρακάτω συνοψίζονται τα στάδια της HPLC:

- Καθορισμένη ποσότητα δείγματος «εμβολιάζεται» στην κινητή φάση στην αρχή της στήλης
- Το δείγμα μετακινείται στη στήλη υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης
- Τα επιμέρους συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης
- Το κλάσμα κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης
- Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων κάθε συστατικού εξαρτάται από το κλάσμα του χρόνου παραμονής τους στην κινητή φάση ως προς το χρόνο παραμονής τους στη στατική φάση και είναι ανάλογη του συντελεστή κατανομής του συστατικού στις δύο φάσεις
- Τα επιμέρους συστατικά, με την προϋπόθεση ότι έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, μετακινούνται με διαφορετική μέση ταχύτητα μέσα στη στήλη, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες
- Τα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη και ανιχνεύονται από κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο της στήλης (Καρκαλούσος Π. et al, 2015)

5.8.1 Μέτρηση μεμονωμένων ανθοκυανών

A) Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC

Για την παρούσα μελέτη ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC αποτελείται από:

- αντλία gradient, shimadzu Nexera X2
- στήλη xselect της WatersC18, διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 4,6 μm
- ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)

Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη A (υδατικό διάλυμα 8% v/v μυρμηγκικού οξέος) και τον διαλύτη B (μεθανόλη). Ο ρυθμός ροής είναι 1ml/min με όγκο δείγματος 10μL (αυτόματη έγχυση), ανίχνευση στα 520 nm και το πρόγραμμα έκλουσης είναι το εξής:

- 95% διαλύτης A αρχικά (0 min)

- 50% διαλύτης A στο 25 min
- 5% διαλύτη B στο 30 min
- 95% διαλύτη A στο 35 min όπου διατηρήθηκε ισοκρατικά για επιπλέον 5 min

B) Αντιδραστήρια – Διαδικασία μέτρησης

- Λήψη 0,1 ml αρχικού πυκνού εκχυλίσματος φλοιών σε πλαστικό σωλήνα
- Προσθήκη 0,9 ml νερού καθαρότητας HPLC και ανάδευση (τελικός όγκος 1ml/αραίωση 1:5)
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,2 μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη πάρθηκε μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων σε κάθε ανθοκυάνη ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών της κάθε ανθοκυάνης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα νερού καθαρότητας HPLC (όπως και για τα δείγματα) στα οποία προστέθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των μονογλυκοζιτών-3 της κάθε ανθοκυάνης. Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των ανθοκυανών στα δείγματα βάσει των πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (tR) και το φάσμα απορρόφησης. Οι ανθοκυάνες που ταυτοποιήθηκαν είναι η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη, η μαλβιδίνη, η πεονιδίνη, η πετουνιδίνη, ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης.

Γ) Υπολογισμός μεμονωμένων ανθοκυανών

Για τον υπολογισμό των ανθοκυανών καταγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε το ύψος της καμπύλης της κάθε ανθοκυάνης, καθώς η συγκέντρωσή της είναι συνάρτηση του ύψους. Κατά συνέπεια, από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το ύψος της κορυφής της άγνωστης ουσίας βρίσκεται η ποσότητά της στο δείγμα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η κλίση της πρότυπης καμπύλης της κάθε ανθοκυάνης. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται σε δύο βήματα και η περιεκτικότητα των μεμονωμένων ανθοκυανών εκφράζεται σε mg ανθοκυάνης/gr νωπού ιστού:

- (A) Υπολογισμός mg ανθοκυάνης/gr ξηρού ιστού:

$$(Υψος*5*1*12*0,001)/(κλίση\ πρότυπης\ καμπύλης*0,4)$$
- (B) Υπολογισμός mg ανθοκυάνης/gr νωπού ιστού:

$$(A) - [\%H*(A)]$$

5.8.2 Μέτρηση μεμονωμένων οξέων

A) Αντιδραστήρια κι εξοπλισμός για την HPLC

Στην περίπτωση της μέτρησης των μεμονωμένων οξέων, ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC

αποτελείται από:

- Αντλία gradient, shimadzu Nexera X2
- Στήλη xselect της WatersC₁₈ διαστάσεων 250 x 4,6 mm και διαμέτρου 5 μm, που λειτουργεί στους 20 ° C, υπό συνθήκες ισοκρατικής (ταχύτητα ροής κινητής φάσης 0,8 ml/min)
- Ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων UV-Vis (PDA)
- Η κινητή φάση αποτελείται από το υδατικό διάλυμα μυρμηγκικού οξέος (0,1%). Ο ρυθμός ροής είναι 0,8 ml/min με όγκο δείγματος 10μL (αυτόματη έγχυση)
- Ανίχνευση στα 210nm

B) Αντιδραστήρια-Διαδικασία μέτρησης

Για τον διαχωρισμό των οργανικών οξέων (τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό και φουμαρικό) χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα γλευκών των ραγών τα οποία αραιώθηκαν 1:5 σε 5% μεταφωσφορικό οξύ. Συγκεκριμένα:

- Λήψη 0,2 mL εκχυλίσματος σε πλαστικό σωλήνα
- Προσθήκη 0,8 mL μεταφωσφορικού οξέος και ανάδευση (τελικός όγκος 1 mL/αραίωση 1:5)
- Φιλτράρισμα του τελικού διαλύματος με φίλτρο 0,22 μm και ταυτόχρονη μεταφορά του σε κατάλληλους περιέκτες για αυτόματο δειγματολήπτη
- Τοποθέτηση του περιέκτη στο όργανο της HPLC

Για κάθε επανάληψη πάρθηκε μία μέτρηση στην HPLC, καθώς το όργανο παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες, βρέθηκαν οι περιεκτικότητες των δειγμάτων για κάθε οξύ ξεχωριστά. Για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών του κάθε οξέος, παρασκευάστηκαν διαλύματα (όπως και για τα δείγματα) μεταφωσφορικού οξέος, στα οποία προστέθηκαν κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των μεμονωμένων οξέων. Στη συνέχεια ακολούθησε ταυτοποίηση των οργανικών οξέων στα δείγματα βάσει των πρότυπων ουσιών των οξέων, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (t_R). Τα οξέα που ταυτοποιήθηκαν είναι το τρυγικό, το μηλικό, το ηλεκτρικό, το φουμαρικό και το ηλεκτρικό.

Γ) Υπολογισμός μεμονωμένων οξέων

Για τον υπολογισμό των οργανικών οξέων καταγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε το ύψος της καμπύλης του κάθε οξέος, καθώς η συγκέντρωσή του είναι συνάρτηση του ύψους. Κατά συνέπεια, από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το ύψος της κορυφής της άγνωστης ουσίας, βρίσκεται η ποσότητά της στο δείγμα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η κλίση της πρότυπης καμπύλης κάθε οργανικού οξέος. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται σε ένα βήμα και η περιεκτικότητα των μεμονωμένων

οξέων εκφράζεται σε μg οργανικού οξέος/ml γλεύκους:

$$\frac{\text{Υπολογισμός μg οργανικού οξέος/ml γλεύκους}}{(\text{Υψος} \cdot 5) / (\text{κλίση πρότυπης καμπύλης})}$$

5.9 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος έγινε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Jump **8.0 (Sas Institute Inc.)** Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance). Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Turkey's Test, σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,5$. Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι όροι ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου υποδηλώνοντας την ύπαρξη ή μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς και από το στατιστικό σφάλμα του μέσου. Τα διαγράμματα και οι πίνακες έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος Excel Microsoft.

ΜΕΡΟΣ Γ: Αποτελέσματα – Συζήτηση

1.1 Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής και ράγας

Πίνακας 1α: Μηχανικές αναλύσεις ράγας

Επεμβάσεις	Μήκος ραγών (mm)	Πλάτος ραγών (mm)	Βάρος 30 ραγών (gr)	Δύναμη πρόσφυσης (N)
MABA	14,91 ± 0,33ab	14,23 ± 0,32a	64,67 ± 4,18a	0,90 ± 0,11b
ABA1	14,17 ± 0,12b	14,13 ± 0,17a	72,67 ± 6,36a	1,72 ± 0,08a
ABA2	15,76 ± 0,15a	14,72 ± 0,23a	81 ± 1,53a	1,48 ± 0,09a
ABA3	15,10 ± 0,14a	14,55 ± 0,20a	75,67 ± 2,03a	1,90 ± 0,12a
ΜΚΛΝ	15,47 ± 0,18a	15,36 ± 0,25a	86,67 ± 1,76a	1,43 ± 0,15a
ΚΛΝ	14,8 ± 0,12b	13,47 ± 0,10b	69,33 ± 1,45b	0,65 ± 0,12b

Πίνακας 1β: Μηχανικές αναλύσεις σταφυλής

Επεμβάσεις	Μήκος σταφυλής (cm)	Πλάτος σταφυλής (cm)	Βάρος σταφυλής (gr)
MABA	16,67 ± 0,33a	10,33 ± 1,09a	224 ± 2,65a
ABA1	17,17 ± 1,42a	10,67 ± 1,09a	324 ± 48,21a
ABA2	16 ± 0,29a	8,5 ± 0,58a	280,67 ± 49,40a
ABA3	17,67 ± 0,33a	10,17 ± 0,73a	264,67 ± 13,91a
ΜΚΛΝ	18,33 ± 0,3a	12,67 ± 0,17a	357 ± 5,03a
ΚΛΝ	16,67 ± 0,73a	10 ± 0,00b	399 ± 14,73a

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 1α), διαπιστώνεται ότι η επέμβαση ABA1 σημείωσε χαμηλότερες τιμές μήκους και πλάτους των ραγών ενώ οι επεμβάσεις ABA2 και ABA3 σημείωσαν τις υψηλότερες. Ωστόσο, και οι τρεις επεμβάσεις δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα. Επιπλέον, όλες οι επεμβάσεις με αμπισικικό οξύ κατέγραψαν υψηλότερη τιμή βάρους των 30 ραγών χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα. Ακόμη, όλες οι επεμβάσεις αύξησαν τη δύναμη πρόσφυσης ενώ παράλληλα διέφεραν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, οι τιμές που σημείωσε η επέμβαση με καολίνη ήταν χαμηλότερες σε σχέση με αυτές του μάρτυρα σε όλες τις μετρήσεις και παράλληλα διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Ταυτόχρονα, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 1β), φαίνεται ότι οι επεμβάσεις ABA1 και ABA3 σημείωσαν τις υψηλότερες τιμές μήκους των σταφυλών ενώ η επέμβαση ABA2 σημείωσε τη χαμηλότερη. Ωστόσο, και οι τρεις επεμβάσεις δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα. Όσον αφορά το πλάτος της σταφυλής, από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 1β) φαίνεται ότι η επέμβαση ABA1 κατέγραψε την υψηλότερη τιμή ενώ οι επεμβάσεις ABA2 και ABA

3 σημείωσαν τις χαμηλότερες. Εντούτοις, καμία από τις επεμβάσεις δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε γενικά χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στο πλάτος των σταφυλών. Ταυτόχρονα, στις μετρήσεις τους βάρους της σταφυλής, όλες οι επεμβάσεις σημείωσαν μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με αυτούς.

Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνονται από τους Quiroga A.M. et al., (2009), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή εξωγενούς αμψισικού οξέος στο διάστημα μεταξύ της έκπτυξης των οφθαλμών και της συγκομιδής, αύξησε το βάρος των σταφυλών της ποικιλίας Cabernet Sauvignon. Οι ίδιοι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της απόδοσης οφείλεται στη δράση του αμψισικού οξέος το οποίο φαίνεται να ευνοεί την καρπόδεση και περιορίζει την καρπόπτωση. Αντιθέτως, τα αποτελέσματά μας διαφέρουν από αυτά των Balint G. et al., (2012) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή αμψισικού οξέος λίγο πριν τον περκασμό μειώνει το βάρος των ραγών καθώς επηρεάζει την πρόσληψη του νερού από τις ράγες (Gambetta G.A. et al., 2010).

Σχετικά με την επέμβαση με καολίνη, τα αποτελέσματά της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τους Moutinho – Ferreira J. et al., (2014), οι οποίοι αναφέρουν ότι η εφαρμογή καολίνη μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη απόδοση ανά πρέμνο, ιδιαίτερα σε καλλιεργητικές περιόδους χαμηλότερης παραγωγής. Επίσης, τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την άποψη ότι η βελτίωση της φυσιολογικής δραστηριότητας των φυτών που έχουν υποστεί κατεργασία με καολίνη έχει θετική επίδραση στην απόδοση, λόγω μεγαλύτερου βάρους των σταφυλών (Correia C.M. and Dinis L.-T., 2014). Όσον αφορά τα υπόλοιπα αποτελέσματα των μηχανικών αναλύσεων, τα αποτελέσματα μας διαφέρουν από αυτά των Terkaew T. et al. (2014), οι οποίοι αναφέρουν ότι ο ψεκασμός με καολίνη έδωσε σημαντικά υψηλότερες τιμές του βάρους και των διαμέτρων των ραγών. Αυτά τα αποτελέσματα αποδόθηκαν στο γεγονός ότι η προσπίπτουσα ηλιακή ακτινοβολία στην ηλιαζόμενη πλευρά ήταν μεγαλύτερη, με θετικά αποτελέσματα λόγω μεγαλύτερης φωτοσύνθεσης και παραγωγής υδατανθράκων.

1.2 Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών

Πίνακας 2: Μετρήσεις γλευκογραφικών χαρακτηριστικών ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικά διαλυτά στερεά συστατικά (^o Brix)	Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα (g τρυγικού/l)	Ενεργός οξύτητα (pH)
MABA	23,4 ± 0,00a	7,6 ± 0,1b	3,47 ± 0,006b
ABA1	21,06 ± 0,06b	7,11 ± 0,22b	3,45 ± 0,003b
ABA2	23,46 ± 0,06a	8,71 ± 0,31a	3,4 ± 0,00c
ABA3	20,66 ± 0,06c	7,12 ± 0,22b	3,45 ± 0,008a
MKAN	21,8 ± 0,00a	7,12 ± 0,22a	3,41 ± 0,00a
KAN	24,5 ± 0,1b	7,1 ± 0,00a	3,56 ± 0,005b

Από τις μετρήσεις των ολικών διαλυτών στερεών (πιν. 2), διαπιστώνεται ότι οι επεμβάσεις ABA1 και ABA3 κατέγραψαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τον μάρτυρα, με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ των τριών επεμβάσεων. Αντίθετα, η επέμβαση ABA2 σημείωσε περίπου ίδια τιμή με τον μάρτυρα χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Όσον αφορά την ενεργό οξύτητα, η επέμβαση ABA3 σημείωσε υψηλότερη τιμή από τον μάρτυρα με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ενώ οι επεμβάσεις ABA1 και ABA2 κατέγραψαν χαμηλότερες τιμές αλλά μόνο η πρώτη παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα.

Στις μετρήσεις της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, φαίνεται ότι η τιμή που σημείωσε η επέμβαση ABA2 ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα ενώ οι επεμβάσεις ABA1 και ABA3 σημείωσαν χαμηλότερη τιμή. Ωστόσο, μόνο η ABA2 διέφερε στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα.

Τέλος, η επέμβαση με καολίνη κατέγραψε υψηλότερες τιμές ολικών διαλυτών στερεών και ενεργούς οξύτητας σε σύγκριση με τον μάρτυρα παρουσιάζοντας παράλληλα στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Τα αποτελέσματα μας διαφέρουν από αρκετές ερευνητικές εργασίες που αναφέρουν ότι ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση και τον χρόνο πραγματοποίησης της, η εφαρμογή αμπισιτικού οξέος αύξησε τα ολικά διαλυτά στερεά συστατικά των ραγών (Balint G. et al., 2012; Sun Y. et al., 2019). Ωστόσο, όσον αφορά την ολική οξύτητα και το pH, τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τις παραπάνω εργασίες όπου διαπιστώθηκε ότι τα συγκεκριμένα γλυκογραφικά χαρακτηριστικά δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή διαφόρων συγκεντρώσεων αμπισιτικού οξέος.

Τα αποτελέσματα της επέμβασης με καολίνη επιβεβαιώνονται εν μέρει από τους Conde A. et al. (2018) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή καολίνη αύξησε τα ολικά διαλυτά στερεά συστατικά στην ποικιλία Perlette. Ωστόσο στην ίδια εργασία διαπιστώθηκε ότι η ολική και η ενεργός οξύτητα δεν επηρεάστηκαν από την επέμβαση με καολίνη, αποτελέσματα που έρχονται σε αντίθεση με αυτά της παρούσας εργασίας.

1.3 Μετρήσεις μεμονωμένων οξέων

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις μεμονωμένων οξέων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Τρυγικό (μg/ml γλεύκους)	Μηλικό (μg/ml γλεύκους)	Ηλεκτρικό (μg/ml γλεύκους)	Φουμαρικό (μg/ml γλεύκους)
MABA	6808,33 ± 176,5bc	2772 ± 155,02a	351,84 ± 11,18a	81 ± 5,32a
ABA1	7589,2 ± 64,7ab	2563,48 ± 55,66a	395,43 ± 36,64a	77,29 ± 7,36a
ABA2	8367 ± 204,9a	2645,06 ± 60,78a	398,83 ± 24,61a	69 ± 0,85a
ABA3	5885 ± 361,1c	1824,17 ± 175,79b	209,05 ± 14,74b	52,58 ± 1,77a
ΜΚΑΝ	7709,55 ± 151a	2853,59 ± 87,83a	311,92 ± 5,87a	102,12 ± 2,44a

ΚΑΝ	7951,21 ± 10,5a	2380,36 ± 142,78b	255 ± 11,87b	67,33 ± 11,05a
------------	-----------------	-------------------	--------------	----------------

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματά (πιν. 3), φαίνεται ότι η επέμβαση ΑΒΑ2 σημείωσε υψηλότερη συγκέντρωση τρυγικού οξέος σε σχέση με τον μάρτυρα και παράλληλα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επιπλέον, η επέμβαση ΑΒΑ3 κατέγραψε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μηλικού και ηλεκτρικού οξέος σε σύγκριση με τον μάρτυρα με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Παράλληλα, όλες οι επεμβάσεις σημείωσαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξέων σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά οι δύο επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μόνο στις μετρήσεις του μηλικού και του φουμαρικού οξέος.

1.4 Μετρήσεις ολικών και μεμονωμένων ανθοκυανών

Πίνακας 4: Συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικές ανθοκυάνες (mg μαλβιδίνης/gr νωπού ιστού)
ΜΑΒΑ	4,03 ± 0,28a
ΑΒΑ1	4,11 ± 0,25a
ΑΒΑ2	3,37 ± 0,19a
ΑΒΑ3	3,88 ± 0,14a
ΜΚΑΝ	4,9 ± 0,11a
ΚΑΝ	3,42 ± 0,47b

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 4), φαίνεται ότι οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ σημείωσαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ανθοκυανών χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον μάρτυρα με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 5a: Συγκεντρώσεις μεμονωμένων ανθοκυανών ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	mg δελφινιδίνης/gr νωπού ιστού	mg κυανιδίνης/gr νωπού ιστού	mg πετουνιδίνης/gr νωπού ιστού
ΜΑΒΑ	0,039 ± 0,0167a	0,03 ± 0,0165a	0,045 ± 0,0167a
ΑΒΑ1	0,006 ± 0,00033a	0,002 ± 0,0003a	0,010 ± 0,0003ab
ΑΒΑ2	0,003 ± 0,00058a	0,001 ± 0,0003a	0,005 ± 0,001b
ΑΒΑ3	0,008 ± 0,00033a	0,002 ± 0,0003a	0,013 ± 0,0013ab
ΜΚΑΝ	0,010 ± 0,00033a	0,003 ± 0,0003a	0,016 ± 0,00058a

ΚΑΝ	0,1 ± 0,00088a	0,003 ± 0,0003a	0,014 ± 0,0008a
------------	----------------	-----------------	-----------------

Πίνακας 5b: Συγκεντρώσεις μεμονωμένων ανθοκυανών ανά επέμβαση

mg παιονιδίνης/gr νωπού ιστού	mg μαλβιδίνης/gr νωπού ιστού	mg κουμαρικού εστέρα μαλβιδίνης/gr νωπού ιστού	mg οξικού εστέρα μαλβιδίνης/gr νωπού ιστού
0,039 ± 0,016a	0,231 ± 0,027a	0,03 ± 0,002a	0,13 ± 0,008a
0,007 ± 0,0003a	0,101 ± 0,002b	0,013 ± 0,0003b	0,102 ± 0,0023b
0,005 ± 0,0006a	0,063 ± 0,005b	0,001 ± 0,0006b	0,067 ± 0,0058c
0,0086 ± 0,0003a	0,117 ± 0,007b	0,014 ± 0,0001b	0,1 ± 0,0073bc
0,01 ± 0,0007a	0,161 ± 0,011a	0,023 ± 0,0024a	0,164 ± 0,00225a
0,01 ± 0,0007a	0,14 ± 0,015a	0,018 ± 0,0026a	0,146 ± 0,003a

Από τα αποτελέσματα των μεμονωμένων ανθοκυανών (πιν. 5a και 5b), φαίνεται ότι σε γενικές γραμμές οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ σημείωσαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουνιδίνης και παιονιδίνης χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα. Παράλληλα, όλες οι επεμβάσεις κατέγραψαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις μαλβιδίνης και εστέρων της μαλβιδίνης και ταυτόχρονα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε όλες τις περιπτώσεις των μεμονωμένων ανθοκυανών.

1.5 Μετρήσεις ολικών φαινολικών

Πίνακας 6a: Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικά φαινολικά φλοιού (mg γαλλικού οξέος/gr νωπού ιστού)	Ολικά φαινολικά γιγάρτων (mg γαλλικού οξέος/gr νωπού ιστού)
MABA	4,79 ± 0,23a	29,92 ± 2,29a
ABA1	4,93 ± 0,39a	29,86 ± 0,24a
ABA2	4,27 ± 0,31a	29,10 ± 3,91a
ABA3	4,89 ± 0,20a	31,87 ± 2,15a
ΜΚΑΝ	5,47 ± 0,13a	34,45 ± 2,33a
ΚΑΝ	4,63 ± 1,14a	37,04 ± 0,99a

Πίνακας 6b: Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικά φαινολικά φλοιού (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)	Ολικά φαινολικά γιγάρτων (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)
MABA	22,02 ± 1,04a	137,62 ± 10,52a
ABA1	22,68 ± 1,77a	137,34 ± 1,11a
ABA2	19,62 ± 1,44a	133,84 ± 18a
ABA3	22,50 ± 0,90a	146,58 ± 9,87a
ΜΚΛΝ	25,14 ± 0,59a	154,48 ± 10,73a
ΚΛΝ	21,30 ± 5,26a	170,38 ± 4,55a

Σχετικά με τα ολικά φαινολικά των φλοιών και των γιγάρτων, από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 6a και 6b) διαπιστώνεται ότι σε αμφότερες τις περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις των ενώσεων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ανεξάρτητα από το είδος της επέμβασης και τον τρόπο έκφρασης των συγκεντρώσεων.

1.6 Μετρήσεις ολικών φλαβονοειδών

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις ολικών φλαβονοειδών φλοιού και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικά φλαβονοειδή φλοιού (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)	Ολικά φλαβονοειδή γιγάρτων (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)
MABA	3,75 ± 0,19b	84,93 ± 2,94a
ABA1	4,55 ± 0,68b	74,81 ± 1,25a
ABA2	8,75 ± 0,5a	74,17 ± 7,83a
ABA3	8,01 ± 1,12a	69,74 ± 1,71a
ΜΚΛΝ	8,99 ± 0,29a	77,18 ± 1,71a
ΚΛΝ	5,28 ± 0,73b	78,69 ± 3,95a

Αναφερόμενοι στην περιεκτικότητα των φλοιών σε ολικά φλαβονοειδή, από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 7) φαίνεται ότι όλες οι επεμβάσεις με αμπισσικό οξύ σημείωσαν υψηλότερες τιμές αλλά μόνο οι ABA2 και ABA3 διέφεραν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών φλαβονοειδών σε σχέση με τον μάρτυρα, με τις δύο επεμβάσεις να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Σχετικά με τα ολικά φλαβονοειδή των γιγάρτων, φαίνεται ότι η συγκέντρωσή τους δεν επηρεάστηκε τόσο από την επέμβαση με αμπισσικό οξύ όσο και από αυτή με καολίνη.

1.7 Μετρήσεις ολικών φλαβονών και φλαβονολών

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις ολικών φλαβονών – φλαβονολών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικές φλαβόνες – φλαβονόλες φλοιού (mg ρουτίνης/gr νωπού ιστού)	Ολικές φλαβόνες – φλαβονόλες γιγάρτων (mg ρουτίνης/gr νωπού ιστού)
MABA	0,99 ± 0,05a	0,49 ± 0,04b
ABA1	0,89 ± 0,05ab	0,68 ± 0,03b
ABA2	0,72 ± 0,05b	1,03 ± 0,03b
ABA3	0,96 ± 0,04a	1,06 ± 0,08a
ΜΚΑΝ	0,97 ± 0,01a	1,22 ± 0,02a
ΚΑΝ	0,81 ± 0,01a	1,01 ± 0,04b

Από τις μετρήσεις των ολικών φλαβονών – φλαβονολών (πιν. 8), φαίνεται ότι όλες οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ σημείωσαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά μόνο η επέμβαση ABA2 διέφερε στατιστικά σημαντικά με τον τελευταίο. Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση από τον μάρτυρα χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Όσον αφορά τα γίγαρτα, φαίνεται ότι όλες οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ κατέγραψαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τον μάρτυρα αλλά μόνο η επέμβαση ABA3 παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές με αυτόν.

Τέλος, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση από τον μάρτυρα και παράλληλα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

1.8 Μετρήσεις συμπυκνωμένων ταννινών

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις ταννινών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ταννίνες φλοιού (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)	Ταννίνες γιγάρτων (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)
MABA	2,96 ± 0,15a	145,66 ± 2,65a
ABA1	0,7 ± 0,22b	121,1 ± 9,45ab
ABA2	0,8 ± 0,06b	95 ± 2,44b
ABA3	1,2 ± 0,07b	99,97 ± 4,07b
ΜΚΑΝ	1,2 ± 0,17a	101,7 ± 1,84a
ΚΑΝ	0,67 ± 0,23a	114,87 ± 1,83a

Όσον αφορά τις ταννίνες των φλοιών, από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 9) φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις που σημείωσαν οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ ήταν χαμηλότερες από αυτή του μάρτυρα με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Σχετικά με τις ταννίνες των γιγάρτων, παρατηρήθηκε ότι όλες οι επεμβάσεις σημείωσαν χαμηλότερες τιμές αλλά μόνο οι ABA2 και ABA3 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση ταννινών των φλοιών και υψηλότερη σε αυτές των γιγάρτων σε σχέση με τον μάρτυρα χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

1.9 Μετρήσεις ολικών φλαβονολών

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις ολικών φλαβονολών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικές φλαβανόλες φλοιών (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)	Ολικές φλαβανόλες γιγάρτων (mg κατεχίνης/gr νωπού ιστού)
MABA	3,22 ± 0,07a	57,68 ± 1,5a
ABA1	3,71 ± 0,03a	59,14 ± 2,33a
ABA2	2,9 ± 0,09a	60,47 ± 4,72a
ABA3	3,58 ± 0,14a	55,65 ± 1,69a
ΜΚΛΝ	3,35 ± 0,09a	57 ± 0,847a
ΚΛΝ	2,40 ± 0,23b	56,08 ± 3,55a

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 10) φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονολών των φλοιών και των γιγάρτων δεν επηρεάστηκαν ιδιαίτερα από την εφαρμογή αμπισσικού οξέος. Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση στους φλοιούς και στα γίγαρτα σε σχέση με τον μάρτυρα, με τις δύο επεμβάσεις να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους μόνο στη συγκέντρωση των φλοιών.

1.10 Μετρήσεις ολικών αντιοξειδωτικών

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις ολικών αντιοξειδωτικών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ολικά αντιοξειδωτικά φλοιών (mg trolox/gr νωπού ιστού)	Ολικά αντιοξειδωτικά γιγάρτων (mg trolox/gr νωπού ιστού)
MABA	60,1 ± 4,44a	14,33 ± 1,84a
ABA1	52,35 ± 0,26a	17,24 ± 3,61a
ABA2	44,5 ± 4,51a	16,29 ± 3,25a
ABA3	49,64 ± 1,75a	14,2 ± 2,6a
ΜΚΛΝ	47,48 ± 2,49a	22,37 ± 1,95a
ΚΛΝ	51,75 ± 2,75b	13,32 ± 0,57a

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (πιν. 11) φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των ολικών αντιοξειδωτικών που σημείωσαν οι διάφορες επεμβάσεις με αμπισσικό οξύ ήταν χαμηλότερες από αυτή του μάρτυρα χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση των ολικών αντιοξειδωτικών των φλοιών δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την εφαρμογή του καολίνη. Σχετικά με τα ολικά αντιοξειδωτικά των γιγάρτων, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων με αμπισσικό οξύ συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα. Τέλος, η εφαρμογή καολίνη σημείωσε χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης σε σχέση με τον μάρτυρα χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

1.11 Μετρήσεις ολικών ο-διφαινολών

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις ολικών ο-διφαινολών φλοιών και γιγάρτων ανά επέμβαση

Επεμβάσεις	Ο-διφαινόλες φλοιών (mg καφεΐνης/gr νωπού ιστού)	Ο-διφαινόλες γιγάρτων (mg καφεΐνης/gr νωπού ιστού)
MABA	0,134 ± 0,001a	1,98 ± 0,05a
ABA1	0,094 ± 0,001b	1,92 ± 0,05a
ABA2	0,095 ± 0,004b	1,98 ± 0,05a
ABA3	0,112 ± 0,004ab	1,96 ± 0,1a
MKAN	0,132 ± 0,002a	1,9 ± 0,02a
KAN	0,094 ± 0,003b	1,8 ± 0,1a

Από τις μετρήσεις των ολικών ο-διφαινολών των φλοιών (πιν. 12) διαπιστώθηκε ότι οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ σημείωσαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ο-διφαινολών των φλοιών σε σχέση με τον μάρτυρα με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μεταξύ της επέμβασης με καολίνη και του αντίστοιχου μάρτυρα. Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση των ο-διφαινολών των γιγάρτων δεν επηρεάστηκε από τις διάφορες επεμβάσεις με αμπισικό οξύ αλλά και από την αντίστοιχη με καολίνη.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα των ραγών σε φαινολικά συστατικά, τα αποτελέσματά μας διαφέρουν με πλήθος εργασιών. Συγκεκριμένα, οι Zhu L. et al., (2016) διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή εξωγενούς αμπισικού οξέος κατά τον περκασμό αύξησε τις συγκεντρώσεις των ολικών ανθοκυανών και των φλαβονολών καθώς και των ολικών αντιοξειδωτικών των φλοιών στις ποικιλίες Merlot και Cabernet Sauvignon. Ωστόσο, στην ίδια εργασία διαπιστώθηκε ότι τα ολικά φαινολικά και τα αντιοξειδωτικά των γιγάρτων δεν επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις. Παράλληλα, οι μεμονωμένες ανθοκυάνες μειώθηκαν ως ένα βαθμό από την εφαρμογή αμπισικού οξέος, αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά της παρούσας εργασίας.

Τέλος, τα αποτελέσματά μας διαφέρουν από τους Balint G. et al., (2012) και Sun Y. et al., (2019), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ αύξησαν τις συγκεντρώσεις των ολικών και των μεμονωμένων ανθοκυανών. Σε άλλες εργασίες διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή συγκεκριμένων συγκεντρώσεων αμπισικού οξέος ευνόησε την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των ολικών φαινολικών και των ανθοκυανών (Gagne S. et al., 2006; Gambetta G.A. et al., 2010; Koyama K. et al., 2006). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Anderson M. et al., (2008) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή αμπισικού οξέος κατά τον περκασμό οδήγησε στην αύξηση των συγκεντρώσεων αρκετών φαινολικών συμπεριλαμβανομένων των φλαβονολών και των φλαβονών στην ποικιλία Cabernet Sauvignon.

Από την άλλη πλευρά, και όσον αφορά την επέμβαση με καολίνη, τα αποτελέσματά μας διαφωνούν εν μέρει με τους Song J. et al (2012) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή καολίνη στα πρέμνα

κατά την καλλιεργητική περίοδο συνέβαλε στην αύξηση των ολικών ανθοκυανών των ραγών της ποικιλίας Merlot, σε αντίθεση με τα πτητικά συστατικά και τα ολικά φαινολικά που φαίνεται να μην επηρεάζονται, με τα τελευταία αποτελέσματα μάλιστα να έρχονται σε συμφωνία με αυτά της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας διαφέρουν από τα αντίστοιχα παρόμοιων εργασιών όπου επιβεβαίωσαν ότι η εφαρμογή καολίνη συντέλεσε στη συνολική αύξηση των ολικών φαινολικών και των ολικών φλαβονοειδών μέσω του ελέγχου των γονιδίων που κωδικοποιούν τα κύρια ένζυμα του δευτερογενούς μεταβολισμού (Dinis L.-T. et al., 2016, Conde A. et al., 2016). Τα αποτελέσματά μας διαφέρουν και από τους Dinis L.-T. et al., 2016a, Dinis L.-T. et al., 2016), οι οποίοι αναφέρουν ότι η εφαρμογή καολίνη είχε θετική επίδραση στα αντιοξειδωτικά των ραγών μέσω της μείωσης του ποσοστού ROS και των υδροξυλίων στις ράγες και τα φύλλα.

ΜΕΡΟΣ Δ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά τις μηχανικές αναλύσεις των σταφυλών, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι διαστάσεις των ραγών και των σταφυλών δεν επηρεάστηκαν από τις διάφορες επεμβάσεις με αμπισικό οξύ, σε αντίθεση με τα βάρη τους τα οποία αυξήθηκαν χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων και του μάρτυρα.

Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε ότι η επέμβαση με καολίνη μείωσε τις διαστάσεις των ραγών και των σταφυλών αποτέλεσμα που μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερο λόγο φλοιού/σάρκας. Είναι ευρέως γνωστό ότι ο φλοιός αποτελεί την κύρια πηγή προέλευσης των χρωστικών, των φαινολικών παραγώγων καθώς και του μεγαλύτερου μέρους των αρωματικών συστατικών που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων ποιότητας. Επιπλέον, η επέμβαση με καολίνη μείωσε το βάρος των ραγών και παράλληλα αύξησε αυτό των σταφυλών, αποτέλεσμα που μπορεί να οδηγήσει στην επίτευξη υψηλότερης απόδοσης των πρέμων.

Όσον αφορά τα γλυκογραφικά χαρακτηριστικά, φαίνεται ότι οι περισσότερες επεμβάσεις με αμπισικό οξύ λειτούργησαν ανασταλτικά στη συσσώρευση των σακχάρων και κατ'επέκταση στην ωρίμανση των ραγών καθώς οι τιμές τους παρουσιάζονται χαμηλότερες στις επεμβάσεις σε σχέση με τον μάρτυρα. Στο προηγούμενο συμπέρασμα μπορεί να αποδοθεί το γεγονός ότι οι ράγες των σταφυλών των πρέμων που δέχτηκαν τις επεμβάσεις με αμπισικό οξύ παρουσίασαν μεγαλύτερη δύναμη πρόσφυσης σε σχέση με εκείνες του μάρτυρα καθιστώντας με αυτό τον τρόπο δυσκολότερη την απόσπαση του ποδίσκου. Τα υπόλοιπα γλυκογραφικά χαρακτηριστικά φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή εξωγενούς αμπισικού οξέος.

Αντιθέτως, φαίνεται ότι ο καολίνης προσφέρεται για πρωίμιση της παραγωγής καθώς οι τιμές των ολικών διαλυτών στερεών συστατικών και της ενεργούς οξύτητας ήταν υψηλότερες σε σχέση με αυτές του μάρτυρα με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επιπλέον, η ταχύτερη ωρίμανση των ραγών των σταφυλών των πρέμων που δέχθηκαν την εφαρμογή καολίνη αιτιολογεί και την χαμηλότερη δύναμη πρόσφυσής τους σε σχέση με τις ράγες του μάρτυρα.

Σχετικά με τις συγκεντρώσεις των μεμονωμένων οξέων, τα αποτελέσματα ποικίλλουν μεταξύ των επεμβάσεων με αμπισικό οξύ χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα στις περισσότερες περιπτώσεις. Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη σημείωσε υψηλότερη τιμή στη συγκέντρωση του τρυγικού οξέος σε σχέση με τον μάρτυρα χωρίς ωστόσο να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Αντίθετα, η επέμβαση με καολίνη κατέγραψε χαμηλότερη συγκέντρωση μηλικού οξέος σε σύγκριση με τον μάρτυρα και παράλληλα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Όσον αφορά τις ολικές ανθοκυάνες, διαπιστώθηκε ότι οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ δεν επηρέασαν ιδιαίτερα τις συγκεντρώσεις τους ενώ η επέμβαση με καολίνη σημείωσε χαμηλότερη τιμή σε σχέση με τον μάρτυρα και παράλληλα διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι οι επεμβάσεις με αμπισικό οξύ σημείωσαν χαμηλότερες

συγκεντρώσεις μαλβιδίνης σε σχέση με τον μάρτυρα και παράλληλα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον τελευταίο.

Επιπλέον, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η εφαρμογή αμπισσικού οξέος δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών αλλά επηρέασε θετικά τις συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονοειδών των φλοιών. Παράλληλα, οι συγκεντρώσεις των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων καθώς και των ορθοδιφαινολών των φλοιών εμφανίστηκαν χαμηλότερες σε σχέση με τον μάρτυρα και παράλληλα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις επεμβάσεις.

Από την άλλη πλευρά, η επέμβαση με καολίνη δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών αλλά είχε αρνητική επίδραση στη συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών, αποτέλεσμα που δεν θεωρείται θετικό καθώς το Ξινόμαυρο είναι μια ποικιλία που χαρακτηρίζεται από τη χαμηλή περιεκτικότητα των φλοιών σε χρωστικές. Επιπλέον, φαίνεται ότι η εφαρμογή καολίνη επηρέασε αρνητικά τις συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονοειδών, των φλαβανολών και των ορθοδιφαινολών των φλοιών ενώ δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

Adams D. (2006), Phenolics and ripening in grape berries, *American Journal of Enology and Viticulture* 3:249-256.

Anderson M., Fidelibus M., Kaye O., Kupina S., Waterhouse A. (2008), Effects of abscisic acid on phenolic composition of Cabernet Sauvignon and Merlot wine grapes, *Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference, July 9-11 2008*, University of California, Davis

Antolin M.C., Baigorri H., De Luis I., Aguirrezabal F., Geny L., Broquedis M., Sanchez-Diaz M. (2003), ABA during reproductive development in non-irrigated grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo), *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1(1): 19-24

Arnous A., Makris D.P., Kefalas P. (2002), Correlation of pigment and flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece, *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 655-665

Balint G. and Reynolds A.G. (2013), Impact of exogenous abscisic acid on vine physiology and grape composition of Cabernet Sauvignon, *American Journal of Enology and Viticulture* 64(1): 73-87

Ban T., Ishimura M., Kobayashi S., Shiozaki S., Goto-Yamamoto N., Horiuchi S. (2003), Abscisic acid and 2,4-dichlorohexonyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries, *J. Hort. Sci. Biotechnol* 78: 586-589

Benzie F.F. and Strain J.J. (1999), Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Methods in enzymology* vol. 299: 15-23

Berli F., D'Angelo J., Cavagnaro B., Bottini R., Wuilloud R., Silva M.F (2008), Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by Capillary Zone electrophoresis, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56(9): 2892-2898

Bhaigyabati T., Grihanjali D.P., Bag G.C. (2014), Total flavonoid content and antioxidant activity of aqueous rhizome extract of three hedychium species of Manipur Valley, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5(5): 970-976

Boss P.K., Davies C., Robinson S.R. (1996), Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry color skin colour, *Australian Journal of Grape and Wine* 2: 163-170

Boss P.K., Davies C., Robinson S.R. (1996), Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation, *Plant Physiology* 111: 1059-1066

Bourzeix M., Weyland D., Heredia N. (1986), Etude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne, *Bulletin de l'OIV* 59: 1171-1254

Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S. and Vianello A. (2008): Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera*. L.), *Plant signaling and behavior* 3(9), 626-632.

Cacho J., Fernandez P., Ferreira V., Castell J.E. (1992), Evolution of five anthocyanidin-3-glucosides in the skin of Tempranillo, Moristel and Garnacha grape varieties and influence of

climatological variables, *American Journal of Enology and Viticulture* 43:244-248

Cahurel J.-Y. (1999), Effect du millerandage sur la qualite des raisins: cas du Gamay noir a jus blanc, *Progr. Agric. Vitic.* 7: 161-162

Castellarin S.D., Matthews M.A., Di Gaspero G., Gambetta G.A. (2007a), Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries, *Planta* 227: 101-112

Castellarin S.D., Pfeiffer A., Sivillotti P., Degan M., Peterlunger E., Di Gaspero G. (2007b), Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit, *Plant, Cell and Environment* 30: 1381-1399

Cawthon D.L. and Morris J.R. (1982), Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes, and uneven ripening of 'Concord' (*Vitis labrusca* L.) grapes, *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 107: 1097-1104

Cheyrier V. (2005), Polyphenols in food are more complex than often thought, *The American Journal of Clinical Nutrition* 222S-229S

Chira K., Schmauch G., Saucier C., Fabre S., Teissedre P.-L. (2009), Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007), *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57 (2), 545-553

Cohen S.D., Tarara J.M., Kennedy J.A. (2008), Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism, *Anal. Chim. Acta.* 621: 57-67

Conde A., Neves A., Breia R., Pimentel D., Dinis L.-T., Bernardo S., Correia C.M., Cunha A., Geros H., Moutinho-Pereira J. (2018), Kaolin particle film application stimulates photoassimilate synthesis and modifies the primary metabolome of grape leaves, *Journal of Plant Physiology* 223: 47-56

Conde A., Pimentel D., Neves A., Dinis L.-T., Bernardo S., Correia C.M., Moutinho-Pereira J. (2016), Kaolin foliar application has a stimulatory effect on phenylpropanoid and flavonoid pathways in grape berries, *Frontiers in Plant Science* 7: 1150

Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A.C.P., Tavares R.M., Sousa M.J., Agasse A., Derlot S. and Geros H. (2007), Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality, *Global Science Books, Food* 1(1): 1-22

Constant N. (2007), Amelioration des methodes de lutte contre l'oidium en viticulture biologique, *Synthese bibliographique-document AIVB Languedoc-Roussillon* 18p

Coombe B.G. and Dry P.R. (1992), *Viticulture, Vol. 2, Practices*, Winetitles, Adelaide

Coombe B.G., Hale C.R. (1973), The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments, *Plant Physiology* 51: 629-634

Correia C.M. and Dinis L.-T. (2014), Climate change and adaptation strategies for viticulture, *Journal of International Scientific Publications: Agriculture and Food*, Vol. 2 424-429

Cortell J.M., Harbleib M., Gallagher A.V., Righetti T.L., Kennedy J.A. (2005), Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(14): 5798-5808

Crippen D.D. and Morrison J.C (1986), The effects of sun exposure on the compositional development of Cabernet Sauvignon berries, *American Journal of Enology and Viticulture* 37:235-242

- Curko N., Kovacevic Ganic K., Gracin L., Dapic M., Jourde M. and Teissedre P.L. (2014)**, Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium, *Food Chemistry* 145: 15-22.
- Davies C., Boss P.K., Robinson S.P. (1997)**, Treatment of grape berries, a non climacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes, *Plant Physiology* 115: 1155-1161
- Delgado-Vargas F., Jimerez A.R., Paredes-Lopez O. (2000)**, Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains. Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. Critical Review, *Food Science and Nutrition* 40(3): 173-289
- Dinis L.-T., Bernardo S., Conde A., Pimentel D., Ferreira H., Felix L., Moutinho-Pereira J. (2016b)**, Kaolin exogenous application boosts antioxidant capacity and phenolic content in berries and leaves of grapevine under summer stress, *Journal of Plant Physiology* 191: 45-53
- Dinis L.-T., Ferreira H., Pinto G., Bernardo S., Correia C.M., Moutinho-Pereira J. (2016a)**, Kaolin-based, foliar reflective film protects photosystem II structure and function in grapevine leaves exposed to heat and high solar radiation, *Photosynthetica* 54(1): 47-55
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. (2003)**, Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9(1): 15-27.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. (2003)**, Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.), *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9(2): 110-121.
- Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P. (2006)**, Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research, *American Journal of Enology and Viticulture* 57(3): 257-268
- Enrique Luis Silva de Noronha, (2008)**, The effect of high temperature on sugar transport in grape cells, Universidade do Minho
- Esteban M.A., Villanueva M.J., Lisarrague J.R. (2001)**, Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 409-420
- Freeman B.M. (1983)**, Effects of irrigation and pruning of Shiraz grapevines on subsequent red wine pigments, *American Journal of Enology and Viticulture* 34: 23-26
- Gagne S., Esteve K., Deytieux C., Sauvier C., Geny L. (2006)**, Influence of abscisic acid in triggering veraison in grape berry skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon, *Vitis* 40: 7-14
- Gambetta G.A., Matthews M.A., Shagasi T.H., McElrone A.J., Castellarin S.D. (2010)**, Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape, *Planta* 232: 219-234
- Garrido J. and Borges F., (2013)**, Wine and Grape Polyhenols – A chemical perspective, *Food research international* 54 (2), 1844-1858
- Glenn D.M, Puterka G.J., Drake S.R., Unruh T.R., Baherele P., Prado E., Baugher T. (2001)**, Particle film application influences apple leaf physiology, fruit yield and fruit quality, *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 126: 175-181
- Glenn D.M. (2009)**, Particle film mechanisms of action that reduce the effect of environmental stress in 'Empire' apple, *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 134: 314-321
- Glenn D.M., Cooley N., Walker R., Clingeleffer P., Shellie K. (2010)**, Impact of kaolin particle film and water deficit on wine grape water use efficiency and plant water relations, *HortScience*

Harbertson J.F., Picciotto E.A., Adams D.O. (2003), Measurement of polymeric pigments in grape berry extract and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching, *American Journal of Enology and Viticulture* 54: 301-306

Hiratsuka S., Onodera H., Kawai Y., Kubot T., Itoh H., Wada R. (2001), Enzyme activity changes during anthocyanin synthesis in 'Olympia' grape berries, *Scientia Horticulturae* 90: 255-264

Iacopini P., Baldi M., Storchi P. and Sebastiani L. (2008): Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grapes: Content, In Vitro Antioxidant Activity and Interactions, *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 589-598.

Jackson D.I. and Lombard P.B. (1993), Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review, *American Journal of Enology and Viticulture* 44: 409-430

Jackson R.S. (2008), Wine Science: Principles and Applications, pp 27,28

Jeong S.T., Goto-Yamamoto N., Kobayashi S., Esaka M. (2004), Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins, *Plant Science* 167(2): 247-252

Jogaiah Satisha, Pooja Doshi, Pandurang Gundappa (2007), Influence of rootstocks on changing the pattern of phenolic compounds in Thompson Seedless grapes and its relationship to the incidence of powdery mildew NRC for grapes, PB. No 3, Manjri Farm, Solapur Road, Pune – 412 307, Maharashtra – INDIA

Kallithraka S., Bakker J., Clifford M.N. (1998), Evidence that salivary proteins are involved in astringency, *Journal of Sensory Studies* 13: 29-43

Kallithraka S., Mohdalya A.A.A., Makris D.P, Kefalas P. (2005), Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity, *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 375-386

Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P. (2006), Principal Phenolic Compounds in Greek Red Wines, *Food Chemistry* 99: 784-793

Keller M. and Hrazdina G. (1998), Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening, *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 341-349

Keller M., (2010a), *The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology*, Burlington MA: Elsevier, Academic Press

Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L. (2000), Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening, *Phytochemistry* 55: 77-85

Kennedy J.A. and Jones G.P., (2001), Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1740-1746

Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L. (2002), Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids, *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 268-274

Koyama K., Sadamatsu K., Goto-Yamamoto N. (2010), Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape, *Funct. Integr. Genom.* 10: 367-381

Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.M., Moutounet M., (1999), Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization, *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 47: 2719-2723

Li Y.G., Tanner G., Larkin P. (1996), The Dmaca-Hcl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70(1): 89-101

Lorrain B., Chira K., Teissedre P.L., (2011), Phenolic composition of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009 vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages, *Food Chemistry* 126: 1991-1999

Mercurio M. and Smith P.A. (2006), New formats for the methyl cellulose precipitable (MCP) tannin assay allow high throughput measurement of grape and wine tannin by industry. *Technical Review* 164: 1-10

Monagas M., Gomez-Cordoves C., Bartolome B., Laureano O., Ricardo da Silva J.M. (2003), Monomeric, Oligomeric and Polymeric Flavan-3-ols Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6475-6481

Moutinho-Pereira J., Dinis L.-T., Fraga H., Pinheiro R. (2014), Physiological and yield responses of grapevines to kaolin under summer stress, *Conference: Xth International Terroir Congress at Tokaj, Hungria* Vol 2 202-206 (Proceedings)

Mullins G.M., Bouquet Al., Williams E.L., (1990): *Biology of Grapevine*, Cambridge University Press, USA

Obreque-Slier E., Pena-Neira A., Lopez-Solis R., Zamora-Marin F., Ricardo da Silva M.A., Laureano O. (2010), Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3591-3599

Ojeda H., Andary C., Kraeva E., Carbonneau A., Deloire A. (2002), Effects of pre and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz, *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 261-267

Paranychianakis N.V., Aggelides S., Angelakis A.N. (2004), Influence of rootstock, irrigation level and recycled water on growth and yield of Soultanina grapevines, *Agricultural Water Management* 69: 13-27

Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M. (1994), Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds, *Phytochemistry* 36: 781-784

Quiroga A.M., Berli F.J., Moreno D., Cavagnaro J.B, Bottini R. (2009), Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine, *J. Plant. Growth. Regul* 28: 28-35

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud Al. (1998): *Handbook of Enology, Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (1999), *Handbook of Enology, Volume 2*, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, pp 141-203

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2006), *Handbook of Enology, Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments. Ed 2nd* John Wiley & Sons, Ltd, 141, 142

Ristic R. and Illand P.G. (2005), Relationships between seed and berry development of *Vitis vinifera* L., cv. Shiraz: Development changes in seed morphology and phenolic composition,

Roby G., Harbertson J.F., Adams D.A., Matthews M.A. (2004), Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10(2): 100-107

Rockenbach I.I., Gonzaga L.V., Rizelio V.M., De Souza Schmidt Goncalves A.E., Genovese M.I., Fett R. (2011), Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian wine making, *Food Research International* 44: 897-901

Roussos P.A., Pontikis C.A. (2001), Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage in vitro, *Gartenbauwissenschaft* 66(6). S. 298-303

Sarneckis C., Dambergs R.G., Jones P., Mercurio M., Herderich M.J., Smith P. (2006), Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12(1): 39-49

Scalbert A. (1992), Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. Plant Polyphenols (Basic Life Sciences). Ed: Hemingway RW & Laks P.E., 59: 259-280

Shellie K., Glenn D.M. (2008), Wine grape response to foliar particle film under differing levels of preveraison water status, *HortScience* 43(5): 1392-1397

Shiozaki S., Kamata Y., Ogata S., Horiuchi S., Kawase K. (1999), Localisation of abscisic acid in grape berry by immunohistochemical techniques, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 1-9

Smith P.A. (2006), Precipitation of tannin with methyl cellulose allows tannin quantification in grape and wine samples, Technical Review, *The Australian Wine Research Institute*, Adelaide, Australia 158: 3-7

Song J., Shellie K.C., Wang H., Qian M.C. (2012), Influence of deficit irrigation and kaolin particle film on grape composition and volatile compounds in Merlot grapes (*Vitis vinifera* L.), *Food Chemistry* 134(2): 841-50

Souquet J.M., Labarbe B., Le Guerneve C., Cheynier V., Moutounet M. (2000), Phenolic composition of grape stems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1076-1080

Su C. and Singleton V.L. (1969), Identification of three flavan-3-ols from grapes, *Phytochemistry* 8:1553-1558

Sun B., Ricardo da Silva, J.M, Spranger M.I. (2001), Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines, *Ciencia e Tecnica Vitivinicola* 16: 23-34

Sun B., De Sa M., Leonardo M., Caldeira I., Duarte F.L., Spranger I. (2013), Reactivity of polymeric proanthocyanidins toward salivary proteins and their contribution to young red wine astringency, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 939-926

Sun Y., Liu Q., Xi B., Dai H. (2019), Study on the regulation of anthocyanin biosynthesis by exogenous abscisic acid in grapevine, *Scientia Horticulturae* 250:294-301

Taiz L. and Zeiger E. (2012), Φυσιολογία φυτών, εκδ. Utopia, Αθήνα

Tandonnet J.-P., Soyer J.-P., Gaudillere J.-P., Decroocq S., Bordenave L., Ollat N. (2008), Long term effects of nitrogen and water supply on conferred vigor and yield by SO4 and Riparia Gloire de Montpellier rootstocks, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 42(2): 89-98

Tepkaew T., Duangsrirai S., Vaithanomsat P., Jutamanee K. (2014), Photosynthetic

performance, carbohydrate contents and yield affected by kaolin particle film application in grape, *International Bioscience Conference and the 5th International PSU-UNS Bioscience Conference*, T1-P6, pp 61-65

Teixeira A., Eiras-Dias J., Castellarin S.D., Geros H. (2013), Berry Phenolics and Grapevine under Challenging Environments, *International Journal of Molecular Sciences* 14: 18711-18739

Thies M., Fischer R. (1971), A new colour reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamadelhyde. Στο *J. Chromatogr.*, 467: 185-193

Trousdale E.K. and Singleton V.L. (1983), Astilbin and engletin in grapes and wine, *Phytochemistry* 22: 619-620

Tubajica K.M., Civerolo E.L., Puterka G.J., Hashim J.M., Luvishi D.A. (2007), The effects of kaolin, harpin and imidacloprid on development of Pierce's disease in grape, *Crop Protection* 26(2): 92-99

Vitrac X., Castagnino C., Waffo-Teguo P., Delauney J.C, Vercauteren J., Monti J.-P., Deffieux G. and Merillon J.M. (2001), Polyphenols newly extracted in red wine from Southwestern France by centrifugal partition chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5934-5938

Xie D.Y., Sharma S.B., Paiva N.L., Ferreira D., Dixon R.A. (2003), Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis, *Science* 299: 396-399

Yamane T., Jeong S.T., Goto-Yamamoto N., Koshita Y., Kobayashi S. (2006), Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins, *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 54-59

Zarrouk O., Francisco R., Pinto-Marijuan M., Brossa R., Santos R.R., Pinheiro C., Costa J.M., **Lopes C., Chaves M.M. (2012)**, Impact of irrigation regime on berry development and flavonoids composition in Aragonez (Syn. Tempranillo) grapevine, *Agricultural Water Management* 114: 18-29

Zhu L., Zhang Y., Zhang W., Lu J. (2016), Effects of exogenous abscisic acid on phenolic characteristics of red *Vitis vinifera* grapes and wines, *Food Science and Biotechnology* 25: 361-370

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βαλιάτζα Ε. (2018), Επίδραση της άρδευσης στο φαινολικό περιεχόμενο των φλοιών και των γιγάρτων σταφυλής της ποικιλίας Ξινόμαυρο, Μεταπτυχιακή μελέτη του ΔΠΜΣ "Αμπελουργία - Οινολογία" του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, σελ 24-26

Γεωργιάδου Α. (2010), Μελέτη των φαινολικών συστατικών σε φλοιούς σταφυλής των ποικιλιών Merlot, Cabernet Sauvignon και Sangiovese. Επίδραση του ξεφυλλίσματος στη σύνθεση και στην περιεκτικότητα αυτών, Μεταπτυχιακή Μελέτη του ΔΠΜΣ "Αμπελουργία-Οινολογία" του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, σελ 13

Καραμολέγκου Μ. (2007), Μορφολογικές, βιοχημικές και ανατομικές διεργασίες κατά την πορεία ανάπτυξης και ωρίμανσης των ραγών. Παράγοντες που τις επηρεάζουν. Εργασία πρώτου εξαμήνου του ΔΠΜΣ "Αμπελουργία – Οινολογία" του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, σελ 8,9

Καρκαλούσος Π., Γεωργίου Ζ., Κρούπης Χ., Παπαϊωάννου Α., Πλαγέρας Π., Σπυρόπουλος Β., Τσότσου Γ., Φουντζούλα Χ. (2015), Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην Κλινική Χημεία, Βασικές Αρχές και Παραδείγματα, Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 8: 219-257

- Κουράκου-Δραγώνα Σ. (1998)**, Θέματα Οινολογίας, εκδ. Τροχαλία, Αθήνα
- Κοτσερίδης Γ. (2006)**, Σημειώσεις Οινολογίας II, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα
- Νικολάου Ν.Α. (2012)**, Αμπελογραφία, εκδ. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη
- Σουφλέρης Ε. (2000)**, Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία, εκδ. Θεσσαλονίκη, Θεσσαλονίκη
- Σπινθηροπούλου Χ. (2000)**, Οινοποιήσιμες Ποικιλίες του Ελληνικού Αμπελώνα, Olive Press, Αθήνα
- Σταυρακάκης Μ.Ν. (2004)**, Ειδική Αμπελουργία III, Θέματα Αμπελογραφίας, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Αθήνα
- Σταυρακάκης Μ.Ν. (2013)**, Αμπελουργία, εκδ. ΤΡΟΠΗ, Αθήνα
- Στυλιανού Μ.Α. (2012)**, Απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από υδατικά διαλύματα με χρήση φυτικών ορυκτών, Διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

www.medchemexpress.com/_-_-Epicatechin-gallate.html

www.medchemexpress.com/catechin.html

www.medchemexpress.com/_-_-epicatechin.html

www.chemsrc.com/en/cas/970-74-1_749633.html