



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ**

***Ταυτοποίηση, ποσοτικός
προσδιορισμός & εποχικές μεταβολές
φαινολικών ενώσεων μεταξύ & εντός
ποικιλιών ελιάς & μοριακή
ταυτοποίηση-ιχνηλασία των
προϊόντων ελιάς***

**ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ &
ΕΠΟΧΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΜΕΤΑΞΥ & ΕΝΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗ
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΙΧΝΗΛΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΕΛΙΑΣ**

**ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπουσα

Μαριάννα Χατζηδημητρίου - Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μέλη

Μανόλης Σταυρακάκης - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σταύρος Βέμμος - Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαριάννα Χατζηδημητρίου - Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μανόλης Σταυρακάκης - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σταύρος Βέμμος - Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μιχαήλ Κωμαΐτης - Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ανδρέας Κατσιώτης - Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Βασιλική Ευαγγελίου - Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Χρυσούλα Τζουτζούκου - Λέκτορας Γ.Π.Α.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Δενδροκομίας του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής και στο εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαρίας Χατζηδημητρίου. Ευχαριστώ θερμά την κ. Χατζηδημητρίου για την ανάθεση της μελέτης, το αμείωτο ενδιαφέρον, την πολύτιμη καθοδήγηση, το χρόνο που αφιέρωσε καθώς και για τις ουσιαστικές κατευθύνσεις που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα, τον Καθηγητή κ. Μανόλη Σταυρακάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταύρο Βέμμο που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μιχάλη Κωμαΐτη, Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων για την παραχώρηση των εγκαταστάσεων του εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, στο οποίο διεξήχθη μέρος του πειράματός μου.

Η καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Κατσιώτη του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής και της Επίκουρου Καθηγήτριας κ. Βασιλικής Ευαγγελίου του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κατά την διεξαγωγή του πειράματος ήταν πολύτιμη. Τους ευχαριστώ για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και πολύ περισσότερο για την αμεσότητα της συνεργασίας τις συμβουλές και τον χρόνο που αφιέρωσαν κατά την διεξαγωγή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη Δ.Ε.Π. του εργαστηρίου Δενδροκομίας για την συμπαράσταση, τις συμβουλές, και την φιλική διάθεση στο πρόσωπό μου.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τους διδάκτορες Αθανάσιο Λίνο, Νικόλαο Νικολουδάκη, Βασιλική Παπαγεωργίου, Χρυσανγή Γαρδέλη και Αναστάσιο Κατσιλέρο για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά τους κατά τη διάρκεια της έρευνάς μου και την προθυμία τους να απαντήσουν σε κάθε μου ερώτηση.

Οι αμέτρητες ώρες στο εργαστήριο δεν θα μπορούσαν να είναι τόσο ευχάριστες χωρίς την παρουσία των μεταπτυχιακών και προπτυχιακών συναδέλφων του εργαστηρίου Δενδροκομίας με τους οποίους μας έδεσαν όχι μόνο η αγωνία για

την επιτυχή έκβαση των ερευνών μας, αλλά και μια βαθιά φιλία που ελπίζω να κρατήσει για πολλά χρόνια ακόμη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου Στέλιο και Βασιλική, του αδελφό μου Νίκου και την οικογένεια του, τον Θείο μου Γρηγόρη και τη θεία μου Σοφία, οι οποίοι στέκονται στο πλευρό μου και με στηρίζουν σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	xiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	xv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xxiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xxiv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xxv
ABSTRACT	xxviii
ΠΡΟΟΙΜΙΟ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι ΕΛΙΑ	3
I.1. Καταγωγή & Εξάπλωση της Ελιάς	3
I.2. Η Ελαιοκαλλιέργεια και η Σημασία της	4
I.3. Βοτανική Ταξινόμηση	7
I.4. Ποικιλίες ελιάς	7
I.4.1. Arbequina	8
I.4.2. Κορωνέικη	9
I.4.3. Λιανολιά Κερκύρας	10
I.4.4. Μαστοειδής	11
I.4.5. Αδραμυττινή	11
I.4.6. Μεγάρων	12
I.4.7. Γαϊδουρελιά	12
I.4.8. Καλαμών	13
I.4.9. Κονσερβολιά	13
I.4.10. Χαλκιδικής	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΙΧΝΗΛΑΣΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΙΑΣ	
II.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
II.2. Μορφολογικοί Δείκτες	16
II.3. Καρυστυπικοί Δείκτες	16
II.4. Βιοχημικοί Δείκτες	18
II.5. Μοριακοί Δείκτες	19
	v

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά:
Όχι Πλάγια

Π.5.1. Δείκτες RFLP	20
Π.5.2. Δείκτες που χρησιμοποιούν τεχνολογία PCR	21
Π.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)	22
Π.7. Μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.	26
Π.7.1. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA): Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα DNA.	26
Π.7.2. SSRs (Simple Sequence Repeats): Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες ή Μικροδορυφορικό DNA.	29
Π.8. Μελέτη της Γενετικής Παραλλακτικότητας στην Ελιά	31
Π.9. Σκοποί του πειράματος	35
Π.10. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	36
Π.10.1. Φυτικό υλικό	37
Π.10.2. Συλλογή υλικού	38
Π.10.3. Απομόνωση DNA	39
Π.10.4. Καθαρισμός DNA	40
Π.10.5. Ποσοτικός Προσδιορισμός του DNA	40
Π.10.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR	42
Π.10.7. Αντιδράσεις Τυχαίας Ενίσχυσης Πολυμορφικού DNA (RAPD)	42
Π.10.8. Αντιδράσεις Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (SSR)	44
Π.10.9. Ηλεκτροφόρηση	45
Π.10.10. Αριθμητική Ανάλυση των Δεδομένων	46
Π.11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
Π.12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ & ΕΠΟΧΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ & ΕΝΤΟΣ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ**

ΙΙΙ.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	64
------------------------	----

III.2.	Φαινολικές Ενώσεις ως Αποτέλεσμα Δευτερογενούς Μεταβολισμού	64
III.3.	Ορισμός Φαινολικών Ενώσεων	65
III.4.	Βιοσύνθεση Φαινολικών Ενώσεων	66
III.5.	Κατηγοριοποίηση Φαινολικών Ενώσεων	69
III.6.	Κύριες Κατηγορίες Φαινολικών Συστατικών	71
III.6.1.	Απλές Φαινόλες C ₆	71
III.6.2.	Φαινολικά Οξέα (C ₆ -C ₁ & C ₆ -C ₃)	71
III.6.3.	Σύνθετες φαινόλες βασισμένες στο σκελετό C ₆ -C ₃	74
III.6.4.	Φλαβονοειδή C ₆ C ₃ C ₆	74
III.6.5.	Ταννίνες	77
III.6.6.	Σεκοϊριδοειδείς Ενώσεις	77
III.7.	Κύριες Φαινολικές Ενώσεις της Ελιάς - Φαινολικές Ενώσεις στον Ελαιόκαρπο	79
III.8.	Φαινολικές Ενώσεις στο Φύλλο της Ελιάς	81
III.9.	Παράγοντες που Επηρεάζουν την Βιοσύνθεση των Φαινολικών Ουσιών	82
III.10.	Ο Ρόλος των Φαινολικών Ενώσεων στα Ανώτερα Φυτά	84
III.11.	Ο Ρόλος των Φαινολικών Ενώσεων στην Ανθρώπινη Υγεία	87
III.12.	Ο Ρόλος των Φαινολικών Ενώσεων ως Συντηρητικά Τροφίμων	88
III.13.	Ελεύθερες Ρίζες	90
III.14.	Οξειδωτικό Στρες	93
III.15.	Μηχανισμός Δράσης Ελευθέρων ριζών.	94
III.16.	Αντιοξειδωτικά	95
III.17.	Κατάταξη Αντιοξειδωτικών Ουσιών	98
III.17.1.	Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά	98
III.17.2.	Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά	99
III.18.	Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων	100
III.19.	Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών	101
III.20.	Προοξειδωτική & συνεργός δράση των Φαινολικών Ενώσεων	102
III.21.	Ανάλυση και Μελέτη Φαινολικών Ενώσεων	103
III.21.1.	Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Συνολικών Φαινολικών Συστατικών: Μέθοδος FOLIN- CIOCALTEU	103
III.21.2.	Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας: Μέθοδος DPPH	104

III.21.3. Ταυτοποίηση και Ποσοτικός Προσδιορισμός των Φαινολικών Ουσιών: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)	106
III.21.3.1. Μηχανισμοί στη Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης	107
III.21.3.2. Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης	109
III.22. Σκοποί του πειράματος	113
III.23. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	114
III.23.1. Συλλογή – Αποθήκευση Φυτικού Υλικού	114
III.23.2. Παραλαβή Φαινολικών Συστατικών – Εκχύλιση	115
III.23.3. Φασματοφωτομετρικές Αναλύσεις	116
III.23.4. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu	117
III.23.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH [•] (Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)	118
III.23.6. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Φαινολικών Συστατικών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης (HPLC)	120
III.23.7. Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών	122
III.23.8. Παρασκευή πρότυπων φαινολικών διαλυμάτων	122
III.23.9. Στατιστική Ανάλυση	123
III.24. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	124
III.24.1. Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και αντιοξειδωτική ικανότητα	124
III.24.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC	149
III.25. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	172
III.26. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	183
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	187
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	200
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	221

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΙΧΝΗΛΑΣΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΙΑΣ

Πίνακας II-1	Ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός ελαιόδεντρων, χώρα καταγωγής, μέγεθος και χρήση καρπού.	38
Πίνακας II-2	Μείγματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τα RAPDs και για τα SSRs.	42
Πίνακας II-3	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις των RAPDs και αλληλουχία των βάσεων.	43
Πίνακας II-4	10 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις των SSRs και αλληλουχία των βάσεων.	44
Πίνακας II-5	Δείγματα φύλλων ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις ποικιλίες στις Εικόνες II-4 και II-5 .	49
Πίνακας II-6	Ο συντελεστής ομοιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψε με τη χρήση του συντελεστή του <i>Jaccard</i> για τα SSR.	50
Πίνακας II-7	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις των RAPDs και SSRs και ο αριθμός των πολυμορφικών τμημάτων ανά εκκινητή RAPD και αλληλομόρφων ανά SSR εκκινητή.	57
Πίνακας II-8	Δείγματα φύλλων και καρπών ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο ηλεκτρογράφημα της Εικόνας II-8 .	58
Πίνακας II-9	Δείγματα φύλλων και καρπών ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα ηλεκτρογραφήματα των Εικόνων II-9 και II-10 .	59
Πίνακας II-10	Δείγματα φύλλων και καρπών ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα ηλεκτρογραφήματα των Εικόνων II-11 και II-12 .	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ & ΕΠΟΧΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ & ΕΝΤΟΣ
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ**

Πίνακας III-1	Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο τους.	70
Πίνακας III-2	Τα κυριότερα φαινολικά οξέα.	72
Πίνακας III-3	Ταξινομήση Φλαβονοειδών.	76
Πίνακας III-4	Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου.	92
Πίνακας III-5	Δεδομένα συλλογής των υπό μελέτη φυτικών δειγμάτων	114
Πίνακας III-6	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	155
Πίνακας III-7	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	157
Πίνακας III-8	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε ετήσια φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	159
Πίνακας III-9	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε ετήσια φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	161
Πίνακας III-10	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε πράσινους καρπούς του 2008. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	163

Πίνακας III-11	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε πράσινους καρπούς του 2009. M.O.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	165
Πίνακας III-12	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε μαύρους καρπούς του 2008. M.O.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	167
Πίνακας III-13	Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε μαύρους καρπούς του 2009. M.O.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.	169
Πίνακας III-14	Διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στους διάφορους ιστούς ανάλογα το έτος και την εποχή σε mg/g ν.φ.ι. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται η διακύμανση της συγκέντρωσης των κυριότερων φαινολικών συστατικών στους διάφορους ιστούς ανάλογα το έτος και την εποχή.	171

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: 14 pt

Μορφοποιήθηκε: Στοιχισμένο στο κέντρο

	Σελίδα
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Π ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΙΧΝΗΛΑΣΙΑ	
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΙΑΣ	
Σχήμα Π-1	Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις RAPD. 43
Σχήμα Π-2	Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις SSR. 45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ	
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ & ΕΠΟΧΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ	
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ & ΕΝΤΟΣ	
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ	
Σχήμα ΠΙ-1	Βιοσυνθετική οδός σικιμικού οξέος. 66
Σχήμα ΠΙ-2	Βιοσυνθετική οδός φαινυλαλανίνης και φαινυλοπροπανοειδών. 67
Σχήμα ΠΙ-3	Αντίδραση σχηματισμού του φαινοξειδίου ArO [•] 68
Σχήμα ΠΙ-4	Φαινολική οξειδωτική σύζευξη. 68
Σχήμα ΠΙ-5	Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων. 70
Σχήμα ΠΙ-6	Απλές Φαινόλες (δι-υδροξύ ενώσεις): κατεχόλη, ρεσορκινόλη και υδροκινόνη. 71
Σχήμα ΠΙ-7	Υδροξυβενζοϊκά παράγωγα: γαλλικό οξύ, σαλικυλικό οξύ και βανιλλικό οξύ. 72
Σχήμα ΠΙ-8	Υδροξυκτιναμμωμικά παράγωγα: καφεϊκό και η εστεροποιημένη του μορφή χλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό, φερουλικό οξύ. 73
Σχήμα ΠΙ-9	Βασική δομή των φλαβονοειδών. 75
Σχήμα ΠΙ-10	Χημική δομή της ελευρωπαΐνης και των παραγωγών της: (1) ελευρωπαΐνη (2) άγλυκο της ελευρωπαΐνης και (3) υδροξυτυροσόλη. 77
Σχήμα ΠΙ-11	Βιοσύνθεση ελευρωπαΐνης. 78
Σχήμα ΠΙ-12	Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. 79

Σχήμα III-13	Χημική δομή ρουτίνης και 7-Ο-γλυκοζίτη της λουτεολίνης.	80
Σχήμα III-14	Χημική δομή βερμπασκοζίτη.	80
Σχήμα III-15	Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών.	98
Σχήμα III-16	Ελεύθερη (I) και Δεσμευμένη (II) ρίζα DPPH.	105
Σχήμα III-17	Ανιχνευτής με συστοιχία διοδίων (DAD).	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

	Σελίδα
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι ΕΛΙΑ	
Γράφημα Ι-1. Εξέλιξη παραγωγής ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών στην Ελλάδα (σε χιλιάδες τόνους).	5
Γράφημα Ι-2. Αριθμός ελαιόδεντρων επιτραπέζιων και ελαιοποιήσιμων ελιών στην Ελλάδα ανά έτος (σε εκατομμύρια).	5
Γράφημα Ι-3. Εξέλιξη καλλιεργούμενης έκτασης ελαιόδεντρων στην Ελλάδα (σε εκτάρια)	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ & ΕΠΟΧΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ & ΕΝΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ	
Γράφημα ΙΙΙ-1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος	118
Γράφημα ΙΙΙ-2 Υπολογισμός IC ₅₀ δείγματος με τη βοήθεια γραφικής παράστασης	119
Γράφημα ΙΙΙ-3 Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου, πράσινους και μαύρους καρπούς έτους 2008 ανά ποικιλία.. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	125
Γράφημα ΙΙΙ-4 Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2008 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	126
Γράφημα ΙΙΙ-5 Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (p < 0,05).	127

Γράφημα III-6	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).	127
Γράφημα III-7	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008 ($p < 0,01$).	128
Γράφημα III-8	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).	129
Γράφημα III-9	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε πράσινους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).	129
Γράφημα III-10	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2008 ($p < 0,01$).	130
Γράφημα III-11	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).	131
Γράφημα III-12	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε μαύρους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).	131

Γράφημα III-13	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2008 ($p<0,01$).	132
Γράφημα III-14	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου, φύλλα Σεπτεμβρίου, φύλλα Δεκεμβρίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p<0,05$).	133
Γράφημα III-15	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου, φύλλα Σεπτεμβρίου, φύλλα Δεκεμβρίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p<0,05$).	134
Γράφημα III-16	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	135
Γράφημα III-17	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	135
Γράφημα III-18	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009 ($p<0,01$).	136

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (H.B.)

Γράφημα III-19	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	137
Γράφημα III-20	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	137
Γράφημα III-21	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 ($p<0,01$).	138
Γράφημα III-22	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	139
Γράφημα III-23	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	139
Γράφημα III-24	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 ($p<0,01$).	140
Γράφημα III-25	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p<0,05$).	141

Γράφημα III-26	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε πράσινους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (p<0,05).	141
Γράφημα III-27	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2009 (p<0,01).	142
Γράφημα III-28	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (p<0,05).	143
Γράφημα III-29	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε μαύρους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (p<0,05).	143
Γράφημα III-30	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2009 (p<0,01).	144
Γράφημα III-31	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου, των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	145
Γράφημα III-32	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου των ετών 2008 – 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	145

Γράφημα III-33	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	146
Γράφημα III-34	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε πράσινους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	147
Γράφημα III-35	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	148
Γράφημα III-36	Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC ₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε μαύρους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).	148
Γράφημα III-37	HPLC χρωματογράφημα σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008 ποικιλίας «Μεγάρων». Κορυφή: 1. χλωρογενικό οξύ, 2. μ-κουμαρικό οξύ, 3. άγνωστη ουσία (I) 4. ελευρωπαΐνη, 5. 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 6. ρουτίνη, 7. 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 8. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 9. λουτεολίνη.	156
Γράφημα III-38	HPLC χρωματογράφημα σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009 ποικιλίας «Γαϊδουρελιά». Κορυφή: 1. υδροξυτυροσόλη, 2. χλωρογενικό οξύ, 3. μ-κουμαρικό οξύ, 4. άγνωστη ουσία (I), 5. ελευρωπαΐνη, 6. 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7. ρουτίνη, 8. 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 9. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 10. λουτεολίνη.	158

Γράφημα III-39	HPLC χρωματογράφημα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 ποικιλίας «Μαστοειδής». Κορυφή: 1. χλωρογενικό οξύ, 2. φερουλικό οξύ, 3. ο-κουμαρικό οξύ, 4. ελευρωπαΐνη, 5. 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 6. ρουτίνη, 7. 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 8. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 9. λουτεολίνη	160
Γράφημα III-40	HPLC χρωματογράφημα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 ποικιλίας «Arbequina». Κορυφή: 1. χλωρογενικό οξύ, 2. π-κουμαρικό οξύ, 3. φερουλικό οξύ, 4. ο-κουμαρικό οξύ, 5. ελευρωπαΐνη, 6. 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7. ρουτίνη, 8. 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 9. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 10. λουτεολίνη.	162
Γράφημα III-41	HPLC χρωματογράφημα πράσινων καρπών του 2008 ποικιλίας «Λ. Κερκύρας». Κορυφή: 1. χλωρογενικό οξύ, 2. π-κουμαρικό οξύ, 3. βερμπασκοζίτης, 4. άγνωστη ουσία (I), 5. ελευρωπαΐνη, 6. ρουτίνη.	164
Γράφημα III-42	HPLC χρωματογράφημα πράσινων καρπών του 2009 ποικιλίας «Λ. Κερκύρας». Κορυφή: 1. υδροξυτυροσόλη, 2. βερμπασκοζίτης, 3. ελευρωπαΐνη, 4. ρουτίνη, 5. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης.	166
Γράφημα III-43	HPLC χρωματογράφημα μαύρων καρπών του 2008 ποικιλίας «Μαστοειδής». Κορυφή: 1. άγνωστη ουσία (II), 2. βερμπασκοζίτης, 3. ελευρωπαΐνη, 4. 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 5. ρουτίνη, 6. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7. λουτεολίνη.	168
Γράφημα III-44	HPLC χρωματογράφημα μαύρων καρπών του 2009 ποικιλίας «Κορωνέικη». Κορυφή: 1. άγνωστη ουσία (II), 2. βερμπασκοζίτης, 3. ελευρωπαΐνη, 4. ρουτίνη, 5. 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης.	170

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: 14 pt

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΙΧΝΗΛΑΣΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΙΑΣ

Εικόνα II-1	Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου.	24
Εικόνα II-2	Τα τρία στάδια ενός κύκλου της PCR: (1) Αποδιάταξη, (2) Υβριδισμός ή Αναδιάταξη και (3) Επιμήκυνση ή Πολυμερισμός.	25
Εικόνα II-3	Απεικόνιση γνωστών και άγνωστων συγκεντρώσεων DNA σε ηλεκτροφορηγράφημα πηκτής αгарόζης.	41
Εικόνα II-4	Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων των εκκινητών GAPU 101, GAPU 103, GAPU 59 και GAPU 89. (Αριθμοί όπως στον <i>Πίνακα II-5</i>).	48
Εικόνα II-5	Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων των εκκινητών GAPU 47, GAPU 71B, GAPU 12 και GAPU 71A. (Αριθμοί όπως στον <i>Πίνακα II-5</i>)	49
Εικόνα II-6	Δενδρόγραμμα SSR με τη μέθοδο UPGMA	51
Εικόνα II-7	Ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα τεσσάρων ποικιλιών ελιάς χρησιμοποιώντας τους SSR εκκινητές GAPU 47 και GAPU 89.	54
Εικόνα II-8	Ηλεκτρογράφημα RAPD προϊόντων των εκκινητών RAPD14 και OPA9. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον <i>Πίνακα II-8</i>	58
Εικόνα II-9	Ηλεκτρογράφημα RAPD προϊόντων του εκκινητή RAPD14. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον <i>Πίνακα II-9</i> .	59
Εικόνα II-10	Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων του εκκινητή GAPU 103. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον <i>Πίνακα II-9</i> .	59
Εικόνα II-11	Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων του εκκινητή GAPU 103. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον <i>Πίνακα II-10</i> .	60

Εικόνα Π-12	Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων του εκκινητή GAPU 101. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον <i>Πίνακα Π-10</i> .	60
Εικόνα Π-13	Δενδρόγραμμα με την μέθοδο UPGMA για τους RAPD δείκτες	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: 14 pt

Διάγραμμα ΠΙ-1	Συσχέτιση πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών	65
-----------------------	--	-----------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για πολλούς αιώνες η ιστορία της ελιάς και των προϊόντων της είναι άρρηκτα δεμένη με την ιστορία της Ελλάδας. Τα προϊόντα της ελιάς, επιτραπέζιες ελιές και ελαιόλαδο, παίζουν σημαντικό κοινωνικοοικονομικό ρόλο στη χώρα μας. Η συνεχής απαίτηση του αγοραστικού κοινού τόσο για βελτίωση και διασφάλιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων της ελιάς όσο και για πιστοποίηση της προέλευσής τους, ειδικά όταν πρόκειται για προϊόντα ονομασίας προέλευσης (π.χ ελιές Καλαμών), έχει οδηγήσει στην ανάγκη ταυτοποίησης των διαφόρων ποικιλιών και ιχνηλασίας των προϊόντων τους. Επίσης, τα προϊόντα της ελιάς, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διαίτας, μιας διαίτας με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοενεργές ουσίες όπως βιταμίνες, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες. Είναι γνωστό ότι οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν συστατικά πολλών φυτών και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς προάγουν την υγεία των καταναλωτών κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας εργασίας, ήταν ο διαχωρισμός δέκα ποικιλιών («Κορωνέικη», «Λιανολιά Κερκύρας», «Μαστοειδής», «Arbequina», «Αδραμυττινή», «Μεγαρείτικη», «Γαϊδουρελιά», «Καλαμών», «Κονσερβολιά», «Χαλκιδικής») και η μελέτη της ενδο – ποικιλιακής παραλλακτικότητας των τεσσάρων πιο διαδεδομένων στον Ελλαδικό χώρο ποικιλιών («Κορωνέικη», «Καλαμών», «Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας») με την χρήση SSR εκκινήτων. Επίσης μελετήθηκε η ταυτοποίηση και η ιχνηλασία των προϊόντων των δέκα ποικιλιών ελιάς χρησιμοποιώντας νέα φύλλα, πράσινους και μαύρους καρπούς και εφαρμόζοντας δύο διαφορετικές μοριακές μεθόδους, εκείνες των δεικτών RAPDs και SSRs.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η εφαρμογή της μεθόδου των μοριακών δεικτών SSR προκειμένου να διαχωριστούν οι δέκα προς μελέτη ποικιλίες κρίθηκε αποτελεσματική. Οι ποικιλίες διαχωρίστηκαν μεταξύ τους και ομαδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες σύμφωνα με το μέγεθος του καρπού και την χρήση τους. Επίσης, οι εκκινήτες SSR, ενδο-ποικιλιακά, ομαδοποίησαν τα ελαιόδεντρα της κάθε ποικιλίας δίνοντας πανομοιότυπα αλληλόμορφα προφίλ. Τέλος στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε, για πρώτη φορά σε Ελληνικές ποικιλίες, η ταυτοποίηση πράσινων και μαύρων καρπών με την χρήση RAPD και SSR εκκινήτων. Οι RAPD εκκινήτες έδωσαν προϊόντα με παρόμοια πρότυπα ενώ οι SSR εκκινήτες έδωσαν πανομοιότυπα

πρότυπα αλληλομόρφων μεταξύ φύλλων και καρπών της ίδιας ποικιλίας. Και οι δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ταυτοποίηση και ιχνηλασία των καρπών της ελιάς, αλλά οι δείκτες SSR, που έδωσαν πανομοιότυπα πρότυπα κρίνονται πιο αξιόπιστοι.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης, οι ίδιες δέκα ποικιλίες ελιάς μελετήθηκαν ως προς την συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών καθώς επίσης και ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα φύλλων και καρπών τους διαφορετικών εποχών και ετών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών εκφράστηκε σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά gr νωπού φυτικού ιστού και η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε σε ppm με τη μορφή του δείκτη IC₅₀ (Inhibition Concentration) ο οποίος δηλώνει τη συγκέντρωση εκείνη του δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος DPPH κατά 50%. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των επιμέρους φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών διέφερε τόσο μεταξύ των ποικιλιών όσο και μεταξύ των ιστών ανά ποικιλία. Οι διαφορετικές ποικιλίες παρουσίασαν διαφορετική συγκέντρωση συνολικών φαινολικών αλλά παρόμοιο φαινολικό προφίλ. Και για τις δύο χρονιές, 2008 - 2009, οι περισσότερες ποικιλίες παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών στα νέα φύλλα από ότι στους πράσινους και μαύρους καρπούς. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 10,1 - 20,6 mg GAE/g v.φ.ι. ενώ στους πράσινους και μαύρους καρπούς του ίδιου έτους κυμάνθηκε μεταξύ 5,9 - 19,8 mg GAE/g v.φ.ι. και 5,4 - 9,9 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι. ενώ στους πράσινους και μαύρους καρπούς κυμάνθηκε μεταξύ 4,1 - 13,9 mg GAE/g v.φ.ι. και 5,6 - 10,1 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα. Τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι.) από τα φύλλα Σεπτεμβρίου (10,6 και 15,3 mg GAE/g v.φ.ι.) – Δεκεμβρίου (10,3 και 17,0 mg GAE/g v.φ.ι.) του ίδιου έτους. Συγκρίνοντας τις δύο χρονιές, 2008 – 2009, για τις περισσότερες ποικιλίες, τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 ενώ οι πράσινοι καρποί, για τις περισσότερες ποικιλίες, παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών το 2008 από ότι το

2009. Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Το φαινολικό προφίλ ήταν παρόμοιο μεταξύ των ποικιλιών διέφερε όμως ως προς τις συγκεντρώσεις της κάθε φαινολικής ουσίας.

Οι κυριότερες φαινολικές ουσίες στα φύλλα ήταν η ελευρωπαΐνη, η ρουτίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ενώ στους πράσινους και στους μαύρους καρπούς η ελευρωπαΐνη, η ρουτίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και ο βερμπασκοζίτης.

ABSTRACT

Since the dawn of Hellenic history, olive tree and its products are present as a vital and essential socioeconomical element. The constant demand by the consumers not only for improving the quality of olive tree products but also for ascertaining their origin, particularly if these products have been defined as products of specific geographical origin (i.e. Kalamon Olives), has led to the necessity for identification of the different olive tree cultivars and traceability of their products. At the same time, olive products (olive oil and table olives) play a fundamental part to the Mediterranean diet, a diet with high content of bioactive substances such as vitamins, flavonoids and polyphenols. It is well known that phenolic compounds are constituents of many plants and they have attracted a great deal of public and scientific interest because of their health promoting effects as antioxidants.

The purpose of the first part of this study was the identification of ten olive varieties (“Koroneiki”, “Lianolia Kerkyras”, “Mastoidis”, “Arbequina”, “Adramytini”, “Megaritiki”, “Gaidourelia”, “Kalamon”, “Konservolia” and “Chalkidiki”) and the study of intra - varietal variability of the four most common varieties in Greece (“Koroneiki”, “Kalamata”, “Konservolia” and “L. Kerkyras”) using SSR primers. Furthermore, molecular markers originating from two different molecular techniques, RAPD and SSR, were used for the identification and traceability of the products of the ten varieties of olive using new season leaves, green and black drupes. According to the results, SSR molecular markers, effectively separated the varieties grouping according to the size of the fruit and their use. In the intra-varietal level, SSR markers, grouped the trees of each variety giving identical allelic profiles. Identification of green and black drupes using RAPD and SSR primers was performed for the first time for Greek varieties. The RAPD primers gave products with similar patterns while the SSR primers gave identical allelic patterns between leaves and drupes of the same variety. Both methods can be used for identification and traceability of the olive drupes, with SSR primers, being more reliable.

In the second part of this study, the same ten olive varieties, were studied for total phenolic concentration, as well as for the antioxidant capacity of leaves and fruits of different seasons and years.

Total phenolic concentration was expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of fresh tissue and the antioxidant activity was expressed

through index IC₅₀ (Inhibition Concentration, mg/l of extract) which indicates the extract concentration required to reduce the initial DPPH concentration by 50%. Separation and identification of phenolic compounds was carried out with an analytical HPLC system.

According to the results, total phenolic concentration varied among varieties and among different tissues.

Different varieties showed different total phenolic concentration but similar phenolic profile. For both years, 2008 - 2009, most varieties had a higher total phenolic concentration in young leaves than in green and black drupes. In the new leaves of April 2008, total phenolic concentration varied between 10,1 - 20,6 mg GAE / g F.W. while in the green and black drupes ranged between 5,9 - 19,8 mg GAE / g F.W. and 5,4 - 9,9 mg GAE / g F.W. respectively. In the new leaves of April 2009, total phenolic concentration varied between 12,5 - 18,7 mg GAE / g F.W. and in the green and black drupes ranged between 4,1 - 13,9 mg GAE / g F.W. and 5,6 - 10,1 mg GAE / g F.W. respectively.

New leaves of April 2009 had a higher total phenolic concentration (12,5 - 18,7 mg GAE / g F.W.) than of September (10,6 and 15,3 mg GAE / g F.W.) and December (10,3 and 17,0 mg GAE / g F.W.). Comparing the two years (2008 - 2009), for most varieties, new leaves of April 2009 had a higher total phenolic concentration than the new leaves in April 2008 while green drupes, for most varieties, had a higher total phenolic concentration in 2008 than in 2009. A positive correlation was found between the concentration of total phenolics and antioxidant capacity.

The phenolic profile was similar between varieties but the concentrations of each phenolic compound was different.

The main phenolic compounds in the phenolic profile of leaves were oleuropein, rutin, 7-O-glycoside of luteolin, 4-O-glycoside of luteolin and 7-O-glycoside of apigenin, while in green and black drupes the main phenolic substances were oleuropein, rutin, 7-O-glycoside of luteolin and verbascoside.

Προίμιο

Όλοι γνωρίζουν πως κάθε δέντρο πάνω στη γη αποτελεί για τον άνθρωπο, πηγή ζωής, απόλαυση ομορφιάς και ευλογία. Απ' όλα όμως αυτά τα ζωοδότα δέντρα του κόσμου μας, ένα είναι αυτό που ξεχώρισε ανά τους αιώνες και κέρδισε δίκαια την καρδιά όλων των ανθρώπων, η **ΕΛΙΑ**, το ιερό δέντρο, που υμνήθηκε και τιμήθηκε όσο κανένα άλλο δέντρο πάνω στη γη, από τους ποιητές της φυλής μας. Δοξάστηκε, λατρεύτηκε και αγαπήθηκε, όχι μόνο από τον ίδιο τον άνθρωπο, αλλά ακόμα και από Θεούς, αφού ο ίδιος ο Χριστός λίγο πριν σταυρωθεί, ζήτησε να αναπαυθεί, κάτω από τον πλατύ γεμάτο ασήμια ίσκιο της!. Κατά τη Βιβλική παράδοση, με κλάδο ελαίας το περιστέρι μήνησε στον Νώε το τέλος του κατακλυσμού.

Γνωστή από την αρχαιότητα η ελιά, λατρεύτηκε για τον, μεγάλης διατροφικής αξίας, πολύτιμο καρπό της. Γι' αυτό και θεωρείτο απ' τους αρχαίους πρόγονούς μας άρρηκτα συνδεδεμένη, με τη ζωή και το θάνατο. Ταυτόχρονα τιμούσαν το πανάρχαιο τούτο δέντρο, και εξέφραζαν την ευγνωμοσύνη τους σ' αυτό, στεφανώνοντας τους νικητές των Ολυμπιακών αγώνων με “κλάδο ελαίας”. Η παράδοση, θέλει τον Ηρακλή να φέρνει στην αρχαία Ολυμπία την “Ιερή Καλλιστέφανο Ελαία” από τους κλάδους της οποίας κατασκευάζονταν οι στέφανοι των ολυμπιονικών. Ο Αριστοτέλης αναφέρει, ότι όποιος έκοβε ήμερη ελιά τιμωρούνταν με θάνατο. Οι νόμοι του Σόλωνα καθόριζαν την απόσταση φύτευσης της ελιάς και απαγόρευαν το ξερίζωμα περισσότερων από δύο δένδρων ανά έτος για κάθε ιδιοκτήτη (**Μπαλατσούρας, 1994**).

Στην Αττική, σύμφωνα με την Ελληνική μυθολογία, η θεά Αθηνά σε διαγωνισμό που έγινε μεταξύ αυτής και του θεού Ποσειδώνα, για το ποιος απ' τους δυο τους θα δώσει το όνομά του στη πόλη του Κέκροπα, τη σημερινή Αθήνα, κέρδισε η Αθηνά, και έδωσε στη πόλη το όνομά της, απλά φυτεύοντας, ένα δέντρο Ελιάς στον Ιερό Βράχο της Ακρόπολης. Ως αποτέλεσμα, το δέντρο της ελιάς καθιερώθηκε ως το “Ιερό Δέντρο” της θεάς Αθηνάς και συμβόλιζε “Ειρήνη”, “Ευφορία” και “Σοφροσύνη”.

Κατά τον Ελβετό ερευνητή-καθηγητή της Βοτανολογίας Alfonso De Candolle (1806-1893), η καλλιέργεια της Ελιάς είναι γνωστή εδώ και τέσσερες χιλιάδες χρόνια, παραδέχεται δε πως η Ελιά είχε κοιτίδα τη Μ. Ασία. Από κει, μεταφέρθηκε στην Αίγυπτο και στη συνέχεια ήρθε στην Στερεά Ελλάδα. Από την Στερεά Ελλάδα πήγε στην Εύβοια, και σύμφωνα με τον Ηρόδοτο, το μεγάλο αυτό νησί, έμοιαζε με

ΠΡΟΟΙΜΙΟ

απέραντο ελαιώνα. Από την Εύβοια η ελιά διαδόθηκε στα νησιά του Αιγαίου. Αναφέρεται επίσης πως, κατά την αρχαιότητα, τα νησιά Δήλος και Σάμος ήταν καλυμμένα ολόκληρα από ελαιώνες. Κατόπιν, μέσω των ελληνικών αποικιών η ελιά μεταφέρθηκε και στον ευρύτερο Μεσογειακό χώρο.

Το θαυματοργό λάδι της ελιάς ήταν γνωστό στους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους οι οποίοι απέδιδαν την ανακάλυψή του, στον ημίθεο Αρίσταιο. Την εποχή της αρχαιότητας το λάδι της ελιάς χρησιμοποιείτο ευρύτατα σαν καύσιμη ύλη, σαν θρεπτική ουσία, σαν καταπόσιμο φάρμακο, σε ιεροτελεστίες, για επάλειψη σώματος μετά το λουτρό, σε αγώνες, σε άσκηση και τέλος για την παρασκευή μύρων.

Το πολύτιμο τούτο αγαθό καθιερώθηκε επίσης και στη λειτουργική της Χριστιανικής Εκκλησίας, όπως στη τελετή του βαπτίσματος, του ευχέλαιου, του Χρίσματος και της ταφής των νεκρών.

ΕΛΙΑ

Ι.1. Καταγωγή & Εξάπλωση της Ελιάς

Η ελιά (*Olea europaea* L.) αποτελεί μία από τις πιο παραδοσιακές και σημαντικές δενδρώδεις καλλιέργειες, στην περιοχή της Μεσογείου. Το δένδρο της ελιάς είναι στενά συνυφασμένο με τις θρησκείες, τον πολιτισμό, την ιστορία αλλά και με την οικονομία και την ευημερία των μεσογειακών λαών, ενώ τα προϊόντα της αποτελούν αναπόσπαστο βασικό στοιχείο της μεσογειακής διαίτας.

Πολλοί ιστορικοί συγγραφείς θεωρούν ως πιθανότερο τόπο καταγωγής της ελιάς την περιοχή της Συρίας και της Μικράς Ασίας. Ένδειξη του τόπου καταγωγής της ελιάς είναι η ύπαρξη μεγάλης γενετικής παραλλακτικότητας που απαντάται στις περιοχές της Συρίας και της Παλαιστίνης καθώς και της Ελλάδας ως δευτερογενούς περιοχής καταγωγής της ελιάς (Μπαλατσούρας, 1994; Damania, 1995). Όπως επισημαίνουν οι Rubio *et al.*, (2002), η παρουσία άγριων ελαιόδεντρων θεωρείται ο καλύτερος βιοδείκτης προσδιορισμού των περιοχών που καλύπτονται από τη Μεσογειακή γλωρίδα.

Όσον αφορά στον Ελλαδικό χώρο, οι αρχαιότερες ενδείξεις ύπαρξης της ελιάς προέρχονται από απολιθώματα φύλλων στις Μυκήνες, στη Θήρα, και στην Κνωσό. Σύμφωνα με τους Friedrich & Velitzelos (1986), τα απολιθώματα φύλλων χρονολογούνται πριν από 60.000 χρόνια. Με βάση ιστορικά στοιχεία και αρχαιολογικά ευρήματα, η καλλιέργεια της ελιάς στην Ελλάδα χρονολογείται από τα Μινωικά και Μυκηναϊκά χρόνια (Fooks, 1995).

Στις ημέρες μας η καλλιέργεια της ελιάς έχει μεταφερθεί και σε περιοχές που δεν αυτοφύεται, εκτός της λεκάνης της Μεσογείου, όπως στην Αυστραλία, την Κίνα, την Ιαπωνία, την βόρεια και νότια Αμερική και την νότια Αφρική.

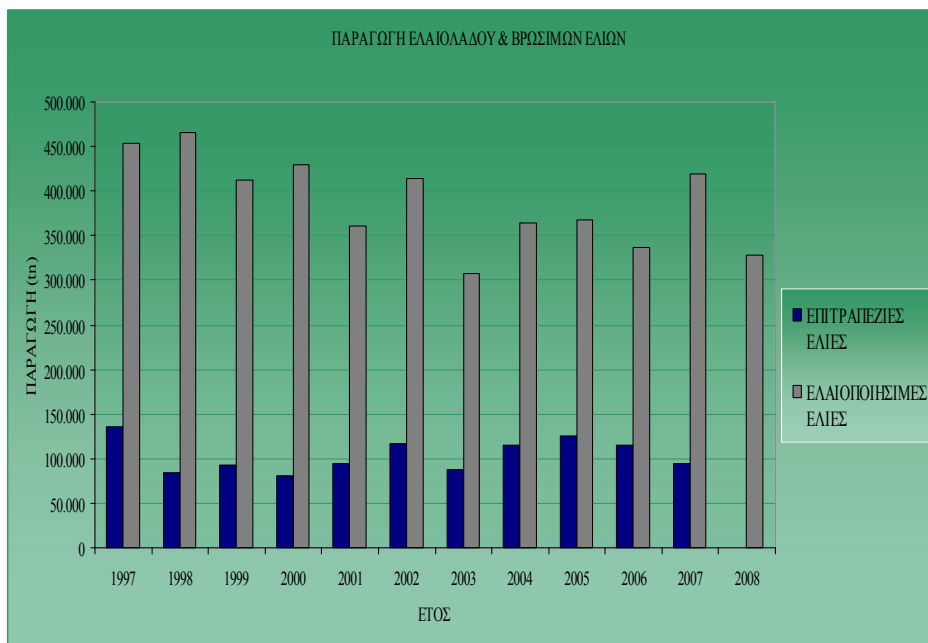
1.2. Η Ελαιοκαλλιέργεια και η Σημασία της

Το 98 % των ελαιώνων παγκοσμίως καλλιεργείται στη λεκάνη της Μεσογείου κυρίως λόγω των άριστων εδαφοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή οι οποίες και ευνοούν την ανάπτυξη του υποτροπικού είδους της ελιάς (**Ποντίκης, 2000**).

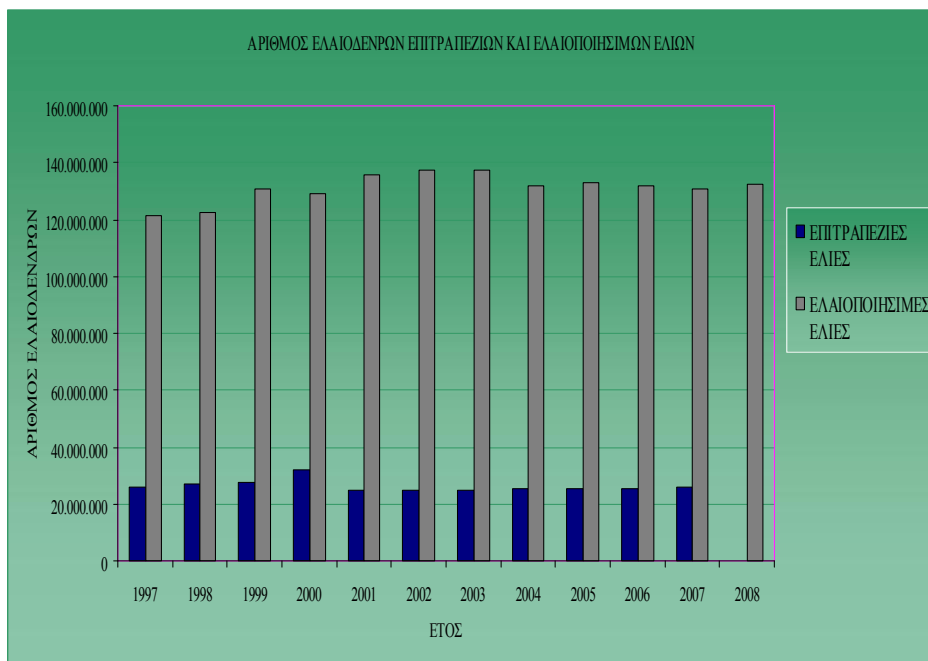
Σήμερα η Ελλάδα κατέχει μια από τις πρώτες θέσεις τόσο στην παραγωγή όσο και στην κατανάλωση λαδιού και επιτραπέζιων ελιών καθώς είναι η τρίτη σημαντικότερη παραγωγός χώρα ελαιόλαδου παγκοσμίως μετά την Ισπανία και την Ιταλία και η δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγός χώρα επιτραπέζιων ελιών στην Ευρωπαϊκή Ένωση (**Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων**).

Στη χώρα μας, η ελαιοκαλλιέργεια αντιστοιχεί στο 70% των δενδρωδών καλλιεργειών και καλύπτει το 21,2% του συνόλου της γεωργικής γης (**Ε.Σ.Υ.Ε., 2006**). Η καλλιέργειά της είναι σημαντική αφού το ελαιόδεντρο μπορεί να αξιοποιήσει εκτάσεις ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες, προστατεύει το έδαφος από τη διάβρωση και προσφέρει ικανοποιητικό εισόδημα στο 1/3 του αγροτικού πληθυσμού της χώρας (**Ε.Σ.Υ.Ε**).

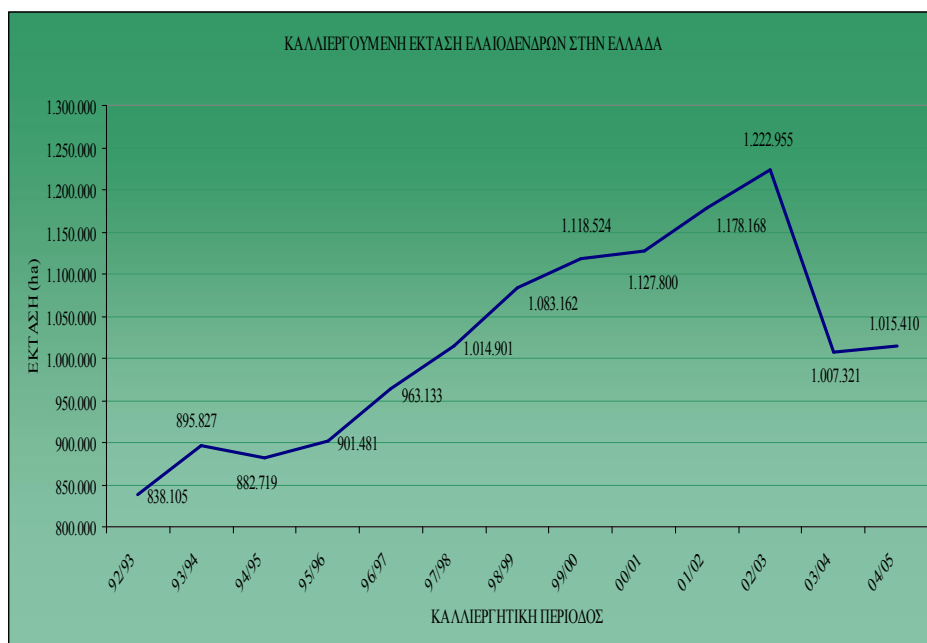
Η διακύμανση της ελληνικής παραγωγής ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών κατά τα έτη 1997-2008 φαίνεται στο **Γράφημα I-1** ενώ ο συνολικός αριθμός ελαιόδεντρων επιτραπέζιων και ελαιοποιήσιμων ελιών για το ίδιο διάστημα, παρουσιάζεται στο **Γράφημα I-2**. Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ακολουθούν τα τελευταία χρόνια φθίνουσα πορεία. Το ελαιοκομικό έτος 2004/05 στην Ελλάδα καλλιεργήθηκαν 1.015.410 εκτάρια. (**Γράφημα I-3**).



Γράφημα I-1. Εξέλιξη παραγωγής ελαιόλαδου και βρώσιμων ελιών στην Ελλάδα (σε χιλιάδες τόνους).
(<http://www.minagric.gr/greek/agropol/ladi.htm>)



Γράφημα I-2. Αριθμός ελαιόδεντρων επιτραπέζιων και ελαιοποιήσιμων ελιών στην Ελλάδα ανά έτος (σε εκατομμύρια).
(<http://www.minagric.gr/greek/agropol/ladi.htm>)



Γράφημα Ι-3. Εξέλιξη καλλιεργούμενης έκτασης ελαιόδεντρων στην Ελλάδα (σε εκτάρια) [Ο.Π.Ε.Κ.Ε.Π.Ε. / (αρχείο Α.Υ.Μ.Ε.Ε.Ε.)]

Η υψηλή διατροφική αξία των ελαιοκομικών προϊόντων, οι ευεργετικές ιδιότητές τους στην υγεία καθώς και η ευχάριστη γεύση τους οδηγούν σε έντονα ανοδική τάση την κατανάλωση τους σε παγκόσμιο επίπεδο. Όλο και περισσότεροι μη Μεσογειακοί καταναλωτές εντάσσουν το ελαιόλαδο στη διατροφή τους, ειδικά στην Αμερική, τον Καναδά, την Ιαπωνία, την Κίνα, την Αυστραλία, την Ν. Αφρική, αλλά και στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ενδεικτικό της αναγνώρισης της αξίας του ελαιόλαδου στην ανθρώπινη διατροφή είναι ότι ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) δέχτηκε να αναφέρεται, στη συσκευασία των προϊόντων που περιέχουν ελαιόλαδο, η ευεργετική επίδρασή του στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Έτσι, η παγκόσμια αγορά διευρύνεται, καθιστώντας την ελαιοκαλλιέργεια βασική πηγή εσόδων για τις χώρες της Μεσογείου.

Παρόλα αυτά, δεν είναι μόνο ο καρπός της ελιάς που την κάνει να είναι τόσο σημαντική και πολύτιμη για τον άνθρωπο. Το ξύλο της, θεωρείται ένα απ' τα καλύτερα καύσιμα, όπως επίσης και για την παραγωγή ξυλανθράκων. Ακόμα και το φύλλωμα του δέντρου είναι χρήσιμο, αφού αποτελεί δελεαστική τροφή για τα μηρυκαστικά ζώα.

1.3. Βοτανική Ταξινόμηση

Η ελιά είναι αιωνόβιο, αγγειόσπερμο, δικότυλο, αειθαλές δέντρο της τάξης των Scrophulariales και ανήκει στην οικογένεια Oleaceae (Ελαιίδες). Η επιστημονική της ονομασία είναι *Olea europaea*. Τα φυτά αυτά διαχωρίζονται σε 30 γένη με 600 περίπου είδη, είναι είδος διπλοειδές και ο αριθμός των χρωματοσωμάτων της είναι $2n=46$. Τα χαρακτηριστικά της οικογένειας των Ελαιιδών είναι ο μικρός ή ελλείπων κάλυκας, η άστροφη στεφάνη, οι δύο στήμονες και η δίχωρη ωοθήκη. Τα άνθη βρίσκονται σε ταξιανθία φόβη (**Στεφανάκη - Νικηφοράκη, 1999**).

Η αγριελιά (*Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris*) και η καλλιεργούμενη - ήμερη ελιά (*Olea europaea subsp. europaea var. europaea*) ανήκουν στο γένος *Olea* και στην υποοικογένεια *Oleoideae* (**Green, 2002**).

1.4. Ποικιλίες ελιάς

Υπολογίζεται ότι σε ολόκληρη τη Γη υπάρχουν 600 και πλέον διαφορετικές ποικιλίες ελαιόδεντρων, που προκαλούν διαφωνίες ανάμεσα στους επιστημονικούς κύκλους σχετικά με τους τρόπους και τις μεθόδους κατηγοριοποίησής τους. Οι ποικιλίες των ελαιόδεντρων διαφέρουν κατά τα χαρακτηριστικά κορμών και φύλλων, αλλά και τη μορφολογία καρπού-πυρήνα, θα πρέπει δε να συνυπολογισθούν και οι επιδράσεις του εδάφους και του τοπικού μικροκλίματος στην ανάπτυξή τους. Η βιοποικιλότητα του ελλαδικού χώρου προσφέρει τις ιδανικές συνθήκες για την καλλιέργεια 45 περίπου διαφορετικών ποικιλιών, οι οποίες ταξινομούνται περισσότερο με βάση τη χρήση, τους διαύλους πώλησης και διακίνησης, παρά με επιστημονικά κριτήρια. Ο **Αναγνωστόπουλος (1939)** ταξινόμησε τις διάφορες ποικιλίες ελιάς, με κριτήριο το βάρος των καρπών, στις εξής τρεις κατηγορίες:

- Μικρόκαρπες (1,2 – 2,6 g) ή 500 ελιές ανά kg
- Μεσόκαρπες (2,7 – 4,2 g) ή 280 ελιές ανά kg
- Αδρόκαρπες (4,6 – 10,5 g) ή 130 ελιές ανά kg

Οι καρποί των ελιών της πρώτης κατηγορίας συνήθως οδηγούνται στην παραγωγή λαδιού. Στην κατηγορία αυτή οι πιο γνωστές ποικιλίες είναι η Κορωνέικη

ή Κρητικά ή Βάτσικη της οποίας ο καρπός περιέχει 27% άριστης ποιότητας λάδι, η «Μαστοειδής» με 20% άριστης ποιότητας λάδι, η «Λιανολιά Κερκύρας» με 19% πολύ καλό λάδι, η Κουτσουρελιά ή Λαδολιά με 25 % μέτριας ποιότητας λάδι, και άλλες μικρότερης σημασίας. Στις λαδοελιές, το ζητούμενο είναι προφανώς η μεγάλη περιεκτικότητα σε λάδι, το μέγεθος του καρπού και τα γευστικά χαρακτηριστικά του λαδιού, δηλαδή το άρωμα, το χρώμα και η επίγευσή του.

Οι καρποί των δέντρων της δεύτερης κατηγορίας μπορούν και να καταναλωθούν ως βρώσιμοι αλλά και για παραγωγή λαδιού για αυτό οι καρποί αυτοί ονομάζονται και διπλής χρήσης. Στην κατηγορία αυτή οι πιο γνωστές ποικιλίες είναι η Θρούμπα και η «Μεγάρων».

Οι καρποί των δέντρων της τρίτης κατηγορίας προορίζονται κυρίως για βρώση και για αυτό είναι γνωστές και ως επιτραπέζιες ελιές. Εδώ οι σημαντικότερες ποικιλίες είναι η «Κονσερβολιά» ή Στρογγυλή από την οποία παίρνουμε όλους τους χρωματικούς τύπους ελαιών (πράσινες, ξανθές και μαύρες), η «Καλαμών» ή Νυχάτη την οποία συνήθως την συναντούμε χαρακωτή με λίγο ξύδι και πάντα μαύρη στο χρώμα και η «Χαλκιδικής» από την οποία παίρνουμε καρπούς πράσινους ή ελαφρά κοκκινωπούς αλλά ποτέ μαύρους. Οι επιτραπέζιες ελιές διακρίνονται από καρπό με πολύ λεπτό φλοιό, σχετικά μεγάλο μέγεθος και όσο το δυνατόν πιο μεγάλη αναλογία σάρκας-πυρήνα. Το ζητούμενο στις επιτραπέζιες ελιές είναι να έχουν πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα, ώστε να μπορούν να συντηρηθούν καλύτερα.

I.4.1. *Arbequina*

Η ποικιλία «Arbequina» είναι η σημαντικότερη ποικιλία της Καταλονίας στη βορειοανατολική Ισπανία. Χρησιμοποιείται ευρέως σε νέες φυτείες στην Αργεντινή και σε μικρότερο βαθμό στη Χιλή. Θεωρείται ανθεκτική στον παγετό και προσαρμόζεται καλά στους διαφορετικούς εδαφολογικούς τύπους. Ταυτόχρονα, είναι ευαίσθητη στο δάκο ενώ η ριζοβολία της υπό υδρονέφωση είναι υψηλή. Είναι ένα σχετικά μικρό δέντρο με μικρά φρούτα. Το δένδρο ανταποκρίνεται καλά στο αυστηρό κλάδεμα και αν απαιτηθεί μπορεί να κρατηθεί σε σχετικά μικρό μέγεθος. Τα φύλλα είναι μικρά, περίπου 4cm, συμμετρικά, με την ευρύτερη διάμετρο στο κέντρο περίπου 1,2cm, με ελλειπτικό σχήμα. Η άνω επιφάνεια είναι σκούρα πράσινη και η κάτω επιφάνεια γκριζωπή. Οι ταξιανθίες είναι μακριές και στενές με 22 έως 27 λουλούδια.

Οι καρποί είναι μικροί (1.5-1.8g) με την περιεκτικότητά τους σε λάδι να κυμαίνεται μεταξύ 20-22% σε ξερικές συνθήκες. Το σχήμα τους είναι γενικά στρογγυλεμένο με μια μικρή οβάλ και ασύμμετρη τάση. Η ευρύτερη διάμετρος μετατοπίζεται ελαφρώς από το κέντρο προς την πλησιέστερη πλευρά. Στην ωρίμανσή τους τα φρούτα παρουσιάζουν ομοιόμορφο μαύρο χρώμα ενώ η αλλαγή του χρώματος πραγματοποιείται βαθμιαία. Ο πυρήνας είναι σχετικά μεγάλος (18-20%), επιμήκης, με τραχιά επιφάνεια και η ακίδα στην άκρη του εμφανίζεται στρογγυλεμένη. Παραδοσιακά φυτεύονται μέχρι 200 δέντρα ανά εκτάριο. Σε νέους και σύγχρονους οπωρώνες, ενδείκνυται ακόμη πιο πυκνή φύτευση. Επισημαίνεται όμως ότι στη περίπτωση της πυκνής φύτευσης, η ελιά συγκομίζεται δύσκολα αν ακολουθηθούν συμβατικές μέθοδοι συγκομιδής. Η μηχανοποίηση της συγκομιδής με συμβατικούς δονητές δεν είναι πολύ αποδοτική (αφαίρεση φρούτων 85%). Πρόσφατα, στην Καταλονία, για αυτή τη ποικιλία εφαρμόστηκε η υπερυψωμένη συγκομιδή με πολύ θετικά αποτελέσματα. Το παραγόμενο λάδι θεωρείται υψηλής ποιότητας με φρουτώδη γεύση αλλά όχι πολύ σταθερό σε ότι αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η παραγωγή αρχίζει πρώιμα και χαρακτηρίζεται από υψηλές αποδόσεις.

(<http://www.agrolive.com.au/olivetreedetail.asp?Tree=1>)

1.4.2. Κορωνέικη

Μικρόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Ψιλολιά, Κρητικιά, Κορώνι, Λιανολιά, Λαδολιά. Είναι διαδομένη στην Πελοπόννησο (Αχαΐα, Μεσσηνία, Λακωνία), στην Κρήτη (Χανιά, Ρέθυμνο), στη Ζάκυνθο, στο Μεσολόγγι, στα νησιά Σάμο, Μήλο κλπ. Τα πολλά ονόματα της ποικιλίας οφείλονται στη μεγάλη εξάπλωσή της στη χώρα και το διαφορετικό μέγεθος που αποκτά ο καρπός ανάλογα με τις καλλιεργητικές περιποιήσεις και τις εδαφικές συνθήκες που επικρατούν ανά περιοχή. Είναι δένδρο οριζοντιόκλαδο ύψους 5-7m και η κόμη της έχει σχήμα ημισφαιρικό συμμετρικό ή κύπελλο. Τα φύλλα είναι βαθυπράσινα, μικρά, λογχοειδή, μήκους $5,47 \pm 0,52$ cm περίπου και πλάτους $1,03 \pm 0,12$ cm περίπου ενώ το μήκος του μίσχου είναι 0,2-0,6cm. Ο καρπός είναι κυλινδροκωνικός με βάρος περίπου 1,3 g και φέρει μικρή θηλή. Ο ποδίσκος είναι πολύ ισχυρός και η ομφαλική κοιλότητα πολύ μικρή. Ο πυρήνας έχει όμοιο σχήμα με τον καρπό και απολήγει σε οξεία ακίδα. Έχει μέσο

βάρος 0,17g και φέρει επτά αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα είναι 1,63-4,06:1 σε διάφορες παραλλαγές της «Κορωνέικης». Η ωρίμανση ξεκινά αρχές Οκτωβρίου και τελειώνει τέλη Δεκεμβρίου. Μεγάλο πλεονέκτημα της ποικιλίας είναι οι ικανοποιητικές αποδόσεις που κυμαίνονται από 30 έως 150kg καρπού ανά δένδρο (μέχρι 1.000 καρπούς ανά κιλό). Μειονεκτεί όμως, λόγω του μικρού μεγέθους του καρπού που δυσχεραίνει τη συλλογή. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι φτάνει το 27%. Χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως ελαιοποιήσιμη και το παραγόμενο ελαιόλαδο ίσως είναι το εκλεκτότερο από όλες τις ποικιλίες με πολύ καλό άρωμα και γεύση. Τέλος, είναι ανθεκτική στις ξηροθερμικές συνθήκες και τους ανέμους ενώ είναι ευπαθής στο δάκο, τη βαμβακάδα την καπνιά και στο ρυγχίτη (Ποντίκης, 2000; Θεριός, 2005).

1.4.3. Λιανολιά Κερκύρας

Μικρόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Κορφολιά, Λαδολιά, Νερολιά, Πρεβεζάνα, Σουβλολιά και Στρυφτολιά. Η Λιανολιά Κερκύρας είναι πολύ διαδεδομένο ελαιόδεντρο σε πολλά δύσκολα σημεία του ελληνικού εδάφους (κυρίως στα νησιά του Ιονίου, την Κρήτη και τη Στερεά) γιατί αντέχει σε αντίξοες καιρικές συνθήκες και πετρώδη εδάφη. Την συναντάμε συνήθως σε περιοχές με υψηλή υγρασία και πολλές βροχοπτώσεις. Τα φύλλα, μήκους $6,67 \pm 0,59$ cm και πλάτους $1,49 \pm 0,13$ cm, παρουσιάζουν βαθυπράσινο χρωματισμό. Ο καρπός της, που ωριμάζει σχετικά αργά και μαζεύεται καμιά φορά στις αρχές της άνοιξης, έχει σχήμα κυλινδροκωνικό, με την μία πλευρά λίγο κυρτωμένη και μέσο βάρος 2,3g. Ο πυρήνας έχει ανάλογο με τον καρπό σχήμα, μέσο βάρος 0,27g και φέρει δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 7,5:1. Η περιεκτικότητά του σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 19%. Ο καρπός της ωριμάζει σχετικά αργά και μαζεύεται καμιά φορά στις αρχές της άνοιξης. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή λαδιού πολύ καλής ποιότητας με φρουτώδες άρωμα. (Ποντίκης, 2000).

1.4.4. Μαστοειδής

Μικρόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Αθηνολιά, Ματσολιά, Μαστολιά, Μουρατολιά και Τσουνάτη. Καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Λακωνίας, Αρκαδίας (περιοχή Μεγαλόπολεως), Μεσσηνίας (άνω Μεσσηνία), Ρεθύμνης και Χανίων. Τα φύλλα είναι ανοικτοπράσινα, με ένα αυλάκι στη θέση του κεντρικού νεύρου, που καταλήγει σε μικρή ακίδα με μήκος $6,18 \pm 0,67$ cm και πλάτος $1,18 \pm 0,13$ cm. Ο καρπός έχει σχήμα ωοειδές, με μέσο βάρος 2,6g, και καταλήγει πάντοτε σε μαστοειδή απόφυση με χαρακτηριστική θηλή. Ο πυρήνας έχει ανάλογο με τον καρπό σχήμα, μέσο βάρος 0,37g, φέρει ακίδα στην άκρη και δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 6:1. Η περιεκτικότητα του σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 28%. Θεωρείται ποικιλία ανθεκτική στο ψύχος και μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο μέχρι 1000 μέτρων. Προτιμά τα ασβεστούχα εδάφη, αλλά αποδίδει καλά τόσο σε πλούσια όσο και σε μέτριας σύστασης εδάφη. Οι απαιτήσεις της σε βροχομετρικό ύψος κυμαίνονται από 600 έως 900mm. Το δένδρο είναι μέτριας ανάπτυξης και παραγωγικότητας. Ανθίζει όψιμα κατά το τέλος Μαΐου και ωριμάζει τον καρπό Δεκέμβριο – Ιανουάριο. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή καλής ποιότητας λαδιού αφού συνδυάζει τη φρουτώδη γεύση με την πικράδα και την πικάντικη αίσθηση. (http://www.easreth.gr/politismos-perivallon/Pikilies_elias.htm; Ποντίκης, 2000).

1.4.5. Αδραμυττινή

Μεσόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Αδραμυττιανή, Αϊβαλιώτικη, Μυτιληνιά και Φραγκολιά. Καλλιεργείται κατά κύριο λόγο στο νησί της Λέσβου, όπου μετέχει κατά 1/5 στη συγκρότηση των ελαιώνων της, εντοπιζόμενη κυρίως στην επαρχία της Μυτιλήνης. Επιπλέον, καλλιεργείται στο νησί της Άνδρου σε ποσοστό 5-20% επί του συνολικού αριθμού των ελαιόδεντρων της. Τα φύλλα, μήκους $5,83 \pm 0,62$ cm και πλάτους $1,43 \pm 0,62$ cm, παρουσιάζουν βαθυπράσινο χρωματισμό. Ο καρπός έχει σχήμα υποστρόγγυλο, ελαφρά ωοειδές και μέσο βάρος 3,5g. Παρόμοιο σχήμα με αυτό του καρπού παρουσιάζει και ο πυρήνας ο οποίος έχει μέσο βάρος 0,54g, φέρει ακίδα στην κορυφή και δέκα αβαθείς γλύφες. Η περιεκτικότητα της ποικιλίας σε λάδι φτάνει στο 22 - 25% του βάρους του καρπού. Ο ελαιόκαρπος

ωριμάζει κατά το Νοέμβρη - Δεκέμβρη, οπότε και πέφτει πάνω στο έδαφος, από όπου γίνεται η συλλογή του. Δίνει λάδι λεπτό, με εξαιρετικό άρωμα. Εντούτοις η απόδοση, είναι σαφώς κατώτερη από εκείνη της καλλιεργούμενης στον ίδιο χώρο Βαλανολιάς. Οι επιτραπέζιες ελιές της «Αδραμυτινής» είναι άριστης ποιότητας, συντηρούνται εύκολα μέσα σε άλμη και είναι οι καλύτερες για το νησί της Λέσβου. Γενικά, η ποικιλία «Αδραμυτινή» χαίρει εκτίμησης από μέρους των ελαιοπαραγωγών της Λέσβου, επειδή παράγει εκλεκτό λάδι και καλής ποιότητας επιτραπέζιες ελιές. Θεωρείται ποικιλία μέτρια ανθεκτική στο ψύχος και ευαίσθητη στο δάκο και τη φυματίωση (*Bacterium savastanoi*).

(http://www.lesvosonline.gr/lesvos_gr/Olives/tree.htm; Ποντίκης, 2000).

I.4.6. Μεγάρων

Μεσόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Βοβωδίτικη, Χονδρολιά Βοβώδης, Λαδολιά, που καλλιεργείται ιδιαίτερα στην Αττική και στην Βοιωτία. Είναι δένδρο πλαγιόκλαδο με πράσινα φύλλα μήκους $6,64 \pm 0,59$ cm και πλάτους $0,93 \pm 0,13$ cm. Οι καρποί της είναι μικροί (3-5g), έχουν σχήμα κυλινδροκωνικό και η μία τους πλευρά εμφανίζεται κυρτωμένη. Ο πυρήνας, μέσου βάρους 0,42g, έχει σχήμα ροπαλοειδές με τη μια πλευρά κυρτωμένη και φέρει 10 αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα είναι 9:1 και η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 21%. Είναι ποικιλία διπλού προορισμού. Μέρος της παραγωγής προορίζεται για την παραγωγή λαδιού και το υπόλοιπο για την παρασκευή ώριμης βρώσιμης ελιάς που συντηρείται σε αλάτι. Ως ποικιλία θεωρείται ανθεκτική στην ξηρασία, αλλά είναι ευαίσθητη στο ψύχος και στο φλοιοφάγο (*Hylezinus oleiperda*). (Ποντίκης, 2000).

I.4.7. Γαϊδουρελιά

Αδρόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Αδρόκαρπος, Δαμασκηνάτη, Κορομηλολιά, Ισπανική και Παλαμάρα. Τα φύλλα, μήκους $7,53 \pm 0,84$ cm και πλάτους $1,30 \pm 0,18$ cm, παρουσιάζουν ανοικτοπράσινο χρωματισμό. Ο καρπός της έχει σχήμα επίμηκες με την μία πλευρά κυρτωμένη και μέσο βάρος 10,5g. Ο πυρήνας έχει

ανάλογο με τον καρπό σχήμα, μέσο βάρος 0,98g, με ακίδα στην κορυφή και φέρει δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 9,7:1. Η περιεκτικότητα του σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 17%. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή πράσινων και ημιώριμων ελιών μέτριας όμως ποιότητας και χαμηλής οικονομικής αξίας. (Ποντίκης, 2000).

I.4.8. Καλαμών

Αδρόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Καλαματιανή, Αετονυχολιά, Τσιγκέλι, Καρακολιά, Χονδρολιά. Καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία, γύρω από την Καλαμάτα, που είναι και το κυριότερο κέντρο παρασκευής της βρώσιμης ελιάς. Επίσης βρίσκεται στη Λακωνία, στο Γύθειο (Καρακολιά), στη Ναυπακτία, στη Μεγαλόπολη και στην Αχαΐα. Αναπτύσσεται σε δένδρο μετρίου έως μεγάλου μεγέθους, είναι ορθόκλαδο και τα φύλλα είναι πλατιά και σκληρά, με ισχυρό μίσχο μήκους 0,6-1cm, βαθυπράσινα, μήκους $8,48 \pm 1,10$ cm και πλάτους $1,64 \pm 0,24$ cm. Ο καρπός είναι επιμήκης και αιχμηρός, στενούμενος προς την κορυφή και με κύρτωση προς τη μια πλευρά, με μέσο βάρος 5,6g. Οι καρποί φέρονται 1-2 μαζί. Ο πυρήνας έχει σχήμα παρόμοιο με τον καρπό, μέσο βάρος 0,60g και φέρει εννιά έως δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα είναι 8,3:1 και η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 17% (Ποντίκης, 2000). Έχει υψηλές απαιτήσεις σε νερό και γι' αυτό το λόγω ευδοκιμεί σε περιοχές υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας. Θεωρείται ποικιλία ανθεκτική στον αδηλομύκητα *Verticillium dahliae* και στις προσβολές από δάκο, ενώ είναι μέσης ανθεκτικότητας στο ψύχος. Οι καρποί της ωριμάζουν το Νοέμβριο, αν το φορτίο είναι μειωμένο ή αργά τον Δεκέμβριο, αν το φορτίο είναι βαρύ (Fooks, 1995). Στην περίπτωση αυξημένης καρποφορίας συνιστάται αραίωμα των καρπών. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαύρων επιτραπέζιων ελιών εκλεκτής ποιότητας.

I.4.9. Κονσερβολιά

Αδρόκαρπη ποικιλία με πιθανές συνωνυμίες: Αμφίσης, Πηλίου, Κορομηλάτη, Βολιώτικη, Άρτας, Αγρινίου, Ιστιαίας, Καρυδολιά, Φραγκολιά, Στογγυλολιά,

Αρβανιτολιά κλπ. Καλλιεργείται κυρίως στις ακόλουθες περιοχές: Άμφισσα, Πήλιο, Βόλο, Στυλίδα, Αταλάντη, Άρτα, Αγρίνιο, Ιστιαία, Ροβιές Εύβοίας, Παραμυθιά, Πρέβεζα, Κεφαληνιά κλπ. Το δένδρο είναι μάλλον ορθόκλαδο και μπορεί να αποκτήσει μεγάλο φύλλωμα (κόμη). Ανθίζει πολύ και παρενιαυτοφορεί. Ο καρπός της μπορεί να γίνει από τους πιο μεγάλους και βρώσιμους καρπούς. Μπορεί να φτάσει και τους 100 καρπούς ανά κιλό. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή πράσινων και μαύρων επιτραπέζιων ελιών εκλεκτής ποιότητας. Οι καρποί μπορούν να συγκομιστούν από αρχές Σεπτεμβρίου έως μέσα Οκτωβρίου για την παρασκευή πράσινων καρπών και από μέσα Οκτωβρίου έως τέλη Δεκεμβρίου για την παρασκευή μαύρων καρπών (Fooks, 1995). Αναπτύσσεται σε δέντρο μετρίου έως μεγάλου μεγέθους. Στα συνήθη εδάφη παίρνει μέτρια ανάπτυξη ενώ στα προσχωσιγενή όπως της Άμφισσας παίρνει μεγάλες διαστάσεις. Τα φύλλα της έχουν χρώμα βαθύ πράσινο, μήκος $7.40 \pm 0.75 \text{ cm}$ και πλάτος $1.29 \pm 0.20 \text{ cm}$. Ο καρπός είναι σφαιρικός ή ωοειδής και έχει μέσο βάρος 5,7g. Ο πυρήνας έχει σχήμα κυλινδρικό, μέσο βάρος 0.51 g. και φέρει ακίδα στην κορυφή του καθώς και επτά βαθιές γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 10,1:1 και η περιεκτικότητα σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 16% (Ποντίκης, 2000). Θεωρείται ποικιλία παραγωγική, ανεκτική στο ψύχος και πολύ ευαίσθητη στον αδηλομύκητα *Verticillium dahliae*.

1.4.10. Χαλκιδικής

Αδρόκαρπη ποικιλία που καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στη Χερσόνησο της «Χαλκιδικής» (νοτιοανατολικά της Θεσσαλονίκης) και κατέχει την τρίτη, σε προτίμηση, θέση στην Ελλάδα. Είναι γνωστή επίσης με το όνομα Γάιδαρο-ελιά, λόγω του μεγάλου όγκου των καρπών της. Το 60% περίπου των ελαιόδεντρων της Χαλκιδικής Χερσονήσου ανήκουν σε αυτή την ποικιλία. Το βάρος των καρπών κυμαίνεται γύρω στα 6-10g, αλλά μπορεί να είναι μεγαλύτερο όταν η μορφή του δένδρου δεν είναι ιδιαίτερα ογκώδης. Η απόδοσή της σε λάδι είναι της τάξης του 19-20%. Ένα κιλό περιέχει 120 με 140 ελιές με μέση σχέση σάρκας-πυρήνα 10:1. Ο καρπός αυτής της ποικιλίας υφίσταται ζύμωση με δυσκολία, τόσο όταν το χρώμα του είναι πράσινο όσο και όταν ωριμάσει. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη σακχάρων καθώς και στην έλλειψη χρώματος.

(<http://www.fileos.gr/tableolive-geo-representation.dhtml>).

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΙΧΝΗΛΑΣΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΙΑΣ

II.1. Εισαγωγή

Η ελιά αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες στην περιοχή της λεκάνης της μεσογείου και τα προϊόντα της, λάδι και καρποί, αποτελούν βασικό συστατικό της μεσογειακής διαίτας. Διασταυρώσεις ποικιλιών μεταξύ τους, διασταυρώσεις ποικιλιών με άγριες ελιές, αλλά και τοπικές επιλογές με κριτήριο την παραγωγή υψηλής ποιότητας προϊόντων, έχει οδηγήσει σε ένα μεγάλο αριθμό ποικιλιών γύρω από τις πιθανές περιοχές προέλευσης. Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των υφιστάμενων ποικιλιών, καθώς και η δυνατότητα ταυτοποίησης και ανίχνευσης της προέλευσης των προϊόντων της ελιάς, χρησιμοποιώντας μοριακές μεθόδους, αποτελούν τα σύγχρονα όπλα απέναντι στη νοθεία (προσιμίξεις ελαιόλαδων) και εξασφαλίζουν τον προσδιορισμό της προέλευσης των προϊόντων και την αυθεντικότητά τους, με απώτερο σκοπό την εξασφάλιση της προστασίας του καταναλωτή.

Για τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων, ο κανονισμός του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου (European Council Regulation) EEC/2081/1992 έχει θεσπίσει προσδιορισμούς όπως: προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) (Protected Designation of Origin – P.D.O.) και προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη (Π.Γ.Ε.), (Protected Geographical Indication – P.G.I.). Οι προσδιορισμοί αυτοί είναι πολύ αποτελεσματικοί, από την στιγμή που τόσο η καταγωγή του προϊόντος όσο και η χαρακτηριστική περιοχή καλλιέργειάς του μαρτυρούν την ασφάλεια του προϊόντος αυτού για το καταναλωτικό κοινό (**Roche et al., 2000**).

Η ταξινόμηση και ο καθορισμός των γενετικών σχέσεων στους φυτικούς οργανισμούς αντιμετωπίζουν συχνά προβλήματα τα οποία μπορούν να επιλυθούν με τη χρήση διαφόρων ειδών δεικτών, όπως οι μορφολογικοί δείκτες, οι καρυοτυπικοί δείκτες, οι βιοχημικοί δείκτες και οι μοριακοί δείκτες.

II.2. Μορφολογικοί Δείκτες

Οι μορφολογικοί δείκτες είναι πολυμορφικά, κληρονομήσιμα, μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να εκτιμηθούν οπτικά. Χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ ειδών και ποικιλιών αλλά μειονεκτούν στο ότι επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η χρήση των μορφολογικών δεικτών για την καταγραφή μόνο- ή ολίγο-γονιδιακών χαρακτηριστικών αποτελεί μια γρήγορη και οικονομική μέθοδο. Αντίθετα, η χρήση τους για πολυγονιδιακά χαρακτηριστικά δεν είναι εξίσου αποτελεσματική εξαιτίας κυρίως του χαμηλού συντελεστή κληρονομικότητας (**Patterson & Weatherup, 1984**).

Για τη διάκριση των καλλιεργούμενων ποικιλιών της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφοροι μορφολογικοί δείκτες, όπως είναι το μέγεθος των φύλλων, το σχήμα και το μέσο βάρος των καρπών, το σχήμα των πυρήνων καθώς και ο αριθμός και το βάθος των γλυφών αυτών. Επίσης, στη διάκριση των ποικιλιών έχει παίξει ρόλο η σχέση της σάρκας του καρπού προς τον πυρήνα και η μέση παραγωγή σε συνδυασμό φυσικά με τη γενικότερη εμφάνιση του ελαιόδεντρου. Όλοι, όμως, οι προαναφερθέντες χαρακτήρες δεν είναι σταθεροί και δεν αποτελούν πάντοτε αξιόπιστα κριτήρια, γιατί επηρεάζονται εκτός από τον παράγοντα ποικιλία και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που αφορούν στο έδαφος και στο κλίμα που καλλιεργούνται οι ποικιλίες. Προκειμένου ο μελετητής να απαλλάσσεται από κρίσεις βασισμένες σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιούνται άλλες μέθοδοι που επιτρέπουν τον καθορισμό της γενετικής συνθέσεως ενός οργανισμού ανεξάρτητα των περιβαλλοντικών επιδράσεων. (http://www.easreth.gr/politismos-perivallon/Pikilies_elias.htm).

II.3. Καρυοτυπικοί Δείκτες

Ο καρυότυπος ενός ευκαριωτικού κυττάρου περιγράφει τον αριθμό καθώς και τη μορφολογία των χρωμοσωμάτων στον πυρήνα του κυττάρου. Μέσω του καρυότυπου οπτικοποιούνται άμεσα, εκτός από τον αριθμό, το είδος των χρωμοσωμάτων και τυχόν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η μελέτη του καρυότυπου ενός κυττάρου είναι δυνατή με την χρήση καρυοτυπικών δεικτών:

- **χρωμοσωμικός αριθμός.** Τα χρωμοσώματα μπορεί να είναι παρόντα σε 2 αντίγραφα (διπλοειδή κύτταρα), σε πολλαπλά αντίγραφα (πολυπλοειδή κύτταρα) ή σε ένα και μόνο αντίγραφο (απλοειδή κύτταρα).
- **χρωμοσωμικά μορφολογικά χαρακτηριστικά.**
 - Διαφορές στο απόλυτο μέγεθος των χρωμοσωμάτων. Τα χρωμοσώματα μπορούν να διαφέρουν σε απόλυτο μέγεθος κατά τουλάχιστον είκοσι φορές μεταξύ των γενών της ίδιας οικογένειας.
 - Διαφορές στην θέση του κεντρομερούς.
 - Διαφορές στο σχετικό μέγεθος των χρωμοσωμάτων, που μπορεί μόνο να προκληθεί από τμηματική ανταλλαγή άνισων μηκών.
 - Διαφορές στον αριθμό και στη θέση των δορυφόρων, οι οποίοι (όταν υπάρχουν) είναι μικρά χρωμοσωμικά τμήματα που συνδέονται με το κυρίως χρωμόσωμα με ένα λεπτό νήμα. (Stebbins, 1971).
- **ειδικά πρωτόκολλα χρώσης του κυττάρου.**
- **in situ υβριδισμός,** ο οποίος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1969, αποτελεί πολύτιμη μέθοδο της μοριακής βιολογίας επειδή επιτρέπει την τοπολογική εντόπιση της γενετικής πληροφορίας. Ενώ οι κλασσικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως η Southern blot και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, P.C.R.), πιστοποιούν απλώς την παρουσία μιας αλληλουχίας DNA ή RNA, ο in situ υβριδισμός προσδιορίζει το υποκυτταρικό διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας) που εντοπίζεται η αλληλουχία. Επιπρόσθετα, πληροφοριοδοτεί εάν η παρουσία της αλληλουχίας αυτής σχετίζεται με συγκεκριμένες ανωμαλίες σε κυτταρικό και ιστικό επίπεδο (Katsiotis *et al.*, 1998; Stergiou *et al.*, 2002).

Γενικά, οι καρυοτυπικές, κυτταρογενετικές παρατηρήσεις απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό ενώ τα προπαρασκευαστικά πρωτόκολλα είναι απλά και χαμηλού κόστους. Επιπλέον, η ερμηνεία των κυτταρομορφολογικών γνωρισμάτων απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία και γνώσεις (Bretting & Widrlechner, 1995).

Η ελιά θεωρείται ένα γένος που περιέχει διπλοειδή είδη με βασικό αριθμό χρωμοσωμάτων $x=23$. Το περιεχόμενο, στον κυτταρικό πυρήνα, DNA της ελιάς καθορίστηκε για πρώτη φορά από τον Rugini *et al.*, (1996). Στην εργασία αυτή υπήρχαν ενδείξεις για την παρουσία τριπλοειδών και τετραπλοειδών μεταλλάξεων από τις ποικιλίες “Frantoio” και “Leccino”.

II.4. Βιοχημικοί Δείκτες

Βιοχημικοί δείκτες ονομάζονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πρωτεΐνες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις, προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ανώτερων φυτών (π.χ. ενώσεις φλαβονοειδών). Είναι δείκτες κληρονομήσιμοι και πολυμορφικοί, κυρίως σε ενδοειδικό και διειδικό επίπεδο. Η βιοχημική ταυτοποίηση των ποικιλιών της ελιάς, με ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου, πραγματοποιήθηκε από τους **Heimler et al., (1994)**.

Οι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι πρωτεΐνες που εξυπηρετούν συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης του γενετικού υλικού. Οι πληροφορίες που παρέχουν αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια, τα οποία δεν είναι τυχαία διασκορπισμένα στο γονιδίωμα (**Bretting & Widrlechner, 1995**). Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στις ισοενζυμικές τους μορφές, ο οποίος πραγματοποιείται με τις κατάλληλες ηλεκτροφορητικές τεχνικές, αποτέλεσε ένα σημαντικό τρόπο γενετικής σήμανσης, διάκρισης και ταυτοποίησης πολλών ειδών φυτών καθώς και της ελιάς. Τα ισοένζυμα είναι πολλαπλές μορφές ενός ενζύμου που παρουσιάζουν την ίδια εξειδίκευση δράσης ως προς το υπόστρωμα (καταλύουν την ίδια αντίδραση και δίνουν ίδια προϊόντα) έχουν όμως διαφορές ως προς την πρωτοταγή τους δομή και ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, με αποτέλεσμα να είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους με ηλεκτροφορητικές διαδικασίες.

Μια πρώτη προσπάθεια για τη διάκριση ανάμεσα σε ποικιλίες ελιάς με την χρήση βιοχημικών δεικτών χρονολογείται από τις αρχές του 1980 (**Pontikis et al., 1980**) όπου ως ηλεκτροφορητικό υλικό χρησιμοποιήθηκε γύρη. Η γύρη παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα όπως αυτά της ευχέρειας της εκχύλισης, της επαναληψιμότητας των ηλεκτροφορικών φαινοτύπων, χωρίς βέβαια να λείπουν τα μειονεκτήματα όπως ο απλοειδής χαρακτήρας, δυσχέρειες στη συλλογή και στη διατήρηση του δείγματος καθώς και το ότι η συλλογή του υλικού είναι δυνατή σε συγκεκριμένη μόνο περίοδο του χρόνου.

Μεταγενέστερες έρευνες χρησιμοποίησαν βιοχημικούς δείκτες που βασίζονταν στον εντοπισμό πολυμορφισμών ισοενζύμων και έδειξαν ότι ήταν κατάλληλοι για τον χαρακτηρισμό του γενετικού υλικού της ελιάς (**Potes et al., 1999; Trujillo et al., 1995**). Με την πάροδο του χρόνου όμως ήταν προφανές ότι αυτές οι προσεγγίσεις ήταν ανεπαρκείς για τη σαφή διάκριση των φυτών. Το στάδιο

ανάπτυξης του φυτού και οι περιβαλλοντικές συνθήκες υπό τις οποίες αναπτύσσεται, μπορεί να επιφέρουν ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στα ισοένζυμα. Αυτό συνεπάγεται την εμφάνιση νέων πολυμορφισμών ή και εξαφάνιση προϋπαρχόντων, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα χαμηλή αναπαραγωγιμότητα αποτελεσμάτων και ως εκ τούτου δυσχέρεια στην διεξαγωγή ταξικών μελετών με ισοένζυμα (**Loukas & Pontikis, 1979**). Επίσης τα ισοένζυμα ως προϊόντα έκφρασης γονιδίων παρέχουν πληροφορίες μόνο για το τμήμα εκείνο του γονιδιώματος που κωδικοποιεί λειτουργικά γονίδια με αποτέλεσμα μόνο ένα μικρό μέρος των γονιδίων να αντιπροσωπεύεται. Τέλος οι μεταλλάξεις των νουκλεοτιδίων είναι συχνά μη ανιχνεύσιμες, καθώς η αντικατάσταση τους δεν συνεπάγεται πάντα παραλλαγή των αμινοξέων (ειδικά εάν η μετάλλαξη παρουσιάζεται στο τρίτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου), και ως εκ τούτου και των πρωτεϊνών που προκύπτουν από αυτά (**Staub et al., 1996**).

II.5. Μοριακοί Δείκτες

Με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας αναπτύχθηκαν μοριακοί δείκτες οι οποίοι αναφέρονται απευθείας στο γενετικό υλικό και βασίζονται σε διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των μορίων του DNA. Η ανάδειξη των διαφορών αυτών μεταξύ των προς μελέτη ατόμων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών (**Fanourakis et al., 2004**).

Οι μοριακοί δείκτες αποτέλεσαν μία επανάσταση στην ανάλυση του γενετικού υλικού των φυτών καθώς είναι δείκτες που δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, ανιχνεύονται σε πολύ νεαρά στάδια του φυτού ή και στο σπόρο, ο προσδιορισμός τους γίνεται γρήγορα και καλύπτουν όλο το γονιδίωμα (**Morrel et al., 1995**). Επιπλέον, είναι απεριόριστοι σε αριθμό και εμφανίζουν υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού. Χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διαφόρων ποικιλιών ή οικοτύπων. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ότι έχουν υψηλό κόστος και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμό.

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξής:

- Ανάπτυξη επιστήμης μοριακής βελτίωσης φυτών (ανάλυση με μοριακούς δείκτες των απογόνων διασταύρωσης ή ποικιλιών στα βελτιωτικά προγράμματα φυτών)
- Ανίχνευση διαφορών μεταξύ των φυτών σε επίπεδο DNA.
- Ταυτοποίηση και πιστοποίηση γενετικού υλικού.
- Ταξινόμηση τραπεζών γενετικού υλικού.

(<http://www.agrool.gr/files/molmar.pdf>)

Στην κατηγορία των μοριακών δεικτών ανήκουν οι δείκτες RFLP και οι δείκτες που χρησιμοποιούν τεχνολογία PCR.

II.5.1. Δείκτες RFLP

Οι πιο διαδεδομένοι μοριακοί δείκτες, τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms - Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων από Περιορισμό), ήταν οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν (**Botstein *et al.*, 1980**) και αποτέλεσαν την απαρχή για την μετέπειτα εξέλιξη της μοριακής βελτίωσης φυτών. Ο πολυμορφισμός των RFLPs επιτυγχάνεται ως εξής: αρχικά γίνεται πέψη του DNA, σε θραύσματα, με ένζυμο περιορισμού (ένζυμο που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA). Τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης. Ακολουθεί μεταφορά κατά Southern σε μεμβράνη και υβριδισμός με σημασμένους συνήθως με ραδιενεργά ισότοπα ανιχνευτές (DNA probe), οι οποίοι στη συνέχεια εντοπίζονται με έκθεση με αυτοραδιογραφία με ραδιενεργό φώσφορο (^{32}P) ή και με άλλες μεθόδους (**Bebeli & Kaltsikis, 1993**). Τα ορατά σήματα που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν πολυμορφισμούς. Οι πολυμορφισμοί αυτοί οφείλονται σε ενθέσεις, διαγραφές ή σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν στη δημιουργία ή απώλεια θέσης αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού και τελικά στη μεταβολή του μεγέθους του τμήματος στο οποίο θα υβριδίσει ο ανιχνευτής. Η μέθοδος εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα κατάλληλων ανιχνευτών οι οποίοι είναι συνήθως μικρά (500- 3000 bp) (**Staub *et al.*, 1996**) κλωνοποιημένα τμήματα γονιδιωματικού ή συμπληρωματικού DNA που μπορεί να αντιπροσωπεύει γονίδιο ή περιοχή πολύ κοντά σε γονίδιο και προέρχεται από τον ίδιο (ομόλογοι ανιχνευτές) ή από διαφορετικό (ετερόλογοι ανιχνευτές) οργανισμό.

Τα RFLPs βρίσκουν εφαρμογές στην κατασκευή γενετικών χαρτών, στη βελτίωση φυτών, στην εκτίμηση γενετικών σχέσεων μεταξύ ειδών, σε φυλογενετικές και ταξινομικές μελέτες. Τα μειονεκτήματά τους είναι ότι απαιτούν χρονοβόρες διαδικασίες, μεγάλη ποσότητα DNA και υψηλό κόστος αναλύσεων ενώ η έκθεση των χρηστών σε ραδιενεργό ακτινοβολία έχει επιπτώσεις στην υγεία. Επίσης, η δυσκολία στην εύρεση κάθε φορά του κατάλληλου ανιχνευτή, οι απαιτήσεις σε εξειδικευμένο προσωπικό και η πολύωρη εργασία στο εργαστήριο, κυρίως όταν πρόκειται για την ανάλυση δειγμάτων μεγάλου γονιδιώματος, αποτελούν μερικά ακόμα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής (Sarkhosh *et al.*, 2006).

II.5.2. Δείκτες που χρησιμοποιούν τεχνολογία PCR

Την τελευταία εικοσαετία έχουν αναπτυχθεί μοριακοί δείκτες που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR).

Το 1990, οι Williams *et al.*, και οι Welsh & McClelland, περιέγραψαν μια νέα μέθοδο δημιουργίας μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό, τα RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες δεύτερης γενιάς στους οποίους ανήκουν οι ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos *et al.*, 1995) και διάφοροι τροποποιημένοι τύποι τους. Ακολούθησαν οι μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς οι οποίοι περιλαμβάνουν τους IFLPs (Intron Fragment Length Polymorphisms) (Landegren *et al.*, 1998) και SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Jordan & Humphries, 1994). Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών, όπως π.χ. οι ASSRs (Anchored Simple Sequence Repeat) (Wang *et al.*, 1998), SCARs (Sequence Characterize Amplified Regions) (Paran & Michelmore, 1993), SPARs (Simple Primer Amplification Reaction) (Gupta *et al.*, 1994), και άλλοι, βρίσκεται στη διάθεση των ερευνητών.

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται εξελίσσονται συνεχώς και η χρήση της μιας ή της άλλης εξαρτάται από τη ζητούμενη σάρωση των χρωμοσωμάτων με τους μοριακούς δείκτες, από το χρόνο και το κόστος.

II.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών όπως το βακτήριο *E. coli* ή οι ζύμες.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της, συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τον Dr. Kary Mullis το 1983 και θεωρήθηκε τόσο σημαντική για την προαγωγή της επιστήμης, ώστε το 1993 του απονεμήθηκε το βραβείο Nobel Χημείας.

Τα απαραίτητα συστατικά της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι (Mullis *et al.*, 1987):

- 1. Στόχος DNA (template DNA).** Το DNA που χρησιμοποιείται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης θα πρέπει α) να μην είναι κατεστραμμένο (degraded) στην περιοχή του στόχου DNA ώστε να υπάρχει δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και β) να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες ή άλλα χημικά που τα οποία μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση στην αντίδραση.
- 2. Εκκινητές (primers).** Οι εκκινητές είναι ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15-30 βάσεων), που χρησιμεύουν για την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά: α) οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G και C νουκλεοτίδια, ώστε οι T_m (melting temperature) θερμοκρασίες τους να μην διαφέρουν σημαντικά, β) η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να περιλαμβάνει περιοχές συμπληρωματικές, γιατί κατά την διάρκεια της αναδιάταξης δημιουργούνται φουρκέτες (hair pins), γ) η κατανομή των νουκλεοτιδίων τους θα πρέπει να είναι τυχαία. Προκειμένου να

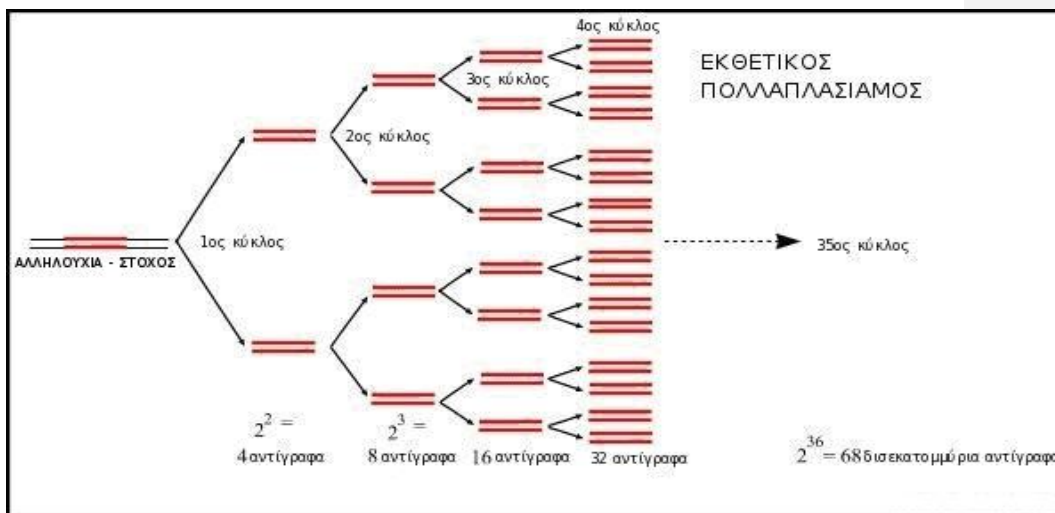
πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός.

3. **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).** Τα 4 τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, dATP, dTTP, dCTP και dGTP, είναι απαραίτητα για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Είναι σημαντικό να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους για να μην γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA.
4. **DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase).** Η πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Η πολυμεράση Taq έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) που ζει σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία (θερμοπίδακες). Είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηρότητά της σε θερμοκρασία 95°C για τουλάχιστον 40 λεπτά.
5. **Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (Buffer).** Το διάλυμα αυτό πρέπει να δημιουργεί ένα ιοντικό περιβάλλον για να διευκολύνεται η αναδιάταξη (annealing) του εκκινητή με το στόχο DNA, το οποίο παρέχεται από την παρουσία NaCl ή KCl. Στο διάλυμα επίσης υπάρχει Tris-HCl και σταθεροποιητές ενζύμου όπως ζελατίνη.
6. **Διάλυμα MgCl₂.** Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου, επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και των PCR προϊόντων, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστηρότητα και πιστότητα της πολυμεράσης.

Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιείται σε κύκλους. Ο κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Έτσι, ο DNA-στόχος, από αρχική ποσότητα δείγματος μη ανιχνεύσιμου με κλασικές τεχνικές υβριδισμού, ενισχύεται σε σημείο που να γίνει ευρέως ανιχνεύσιμος (Williams *et al.*, 1990).

Πιο συγκεκριμένα, στην *Εικόνα II-1* παρατηρούμε ότι στο τέλος της διαδικασίας του πρώτου κύκλου, από μια δίκλωνη γονική έλικα DNA δημιουργούνται δύο θυγατρικές δίκλωνες έλικες DNA. Στον αμέσως επόμενο κύκλο οι δίκλωνες

έλικες DNA γίνονται 4 (δυο του αρχικού υποστρώματος και δυο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα-καλούπια για την σύνθεση νέων κλώνων DNA-στόχου στον επόμενο κύκλο. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA-στόχου εκατομμύρια φορές μέσα σε λίγες ώρες. Μάλιστα, αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{25} (33.554.432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{40} (1.099.511.627.776) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA-στόχου.



Εικόνα II-1: Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA - στόχου.
(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

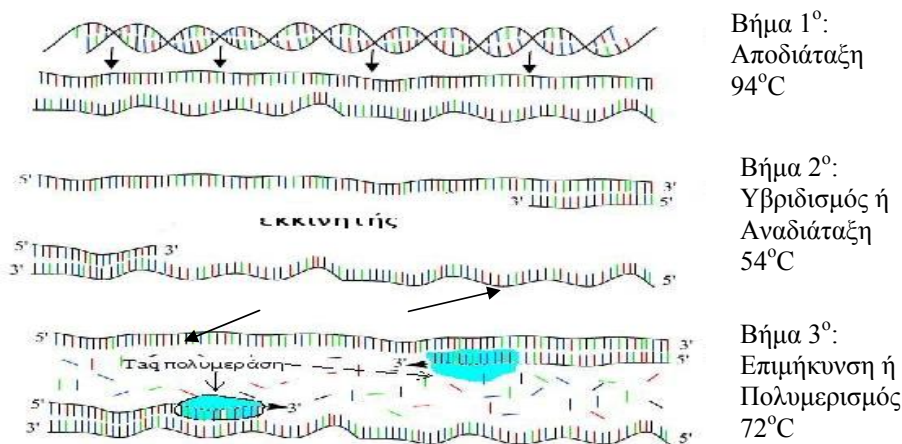
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία στάδια (Εικόνα II-2):

1. Το δίκλωνο μόριο του DNA πρέπει να θερμανθεί στους 94-96°C έτσι ώστε να χωριστεί σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες. Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δυο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **αποδιάταξη (denaturation step)** και ο χρόνος που συνήθως διαρκεί είναι 1-2 λεπτά.
2. Αφού γίνει ο διαχωρισμός των δυο αλυσίδων του DNA, η θερμοκρασία χαμηλώνει ώστε οι εκκινητές να μπορούν να προσκολληθούν σε κάθε μια από τις

μονές αλυσίδες. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **υβριδισμός ή αναδιάταξη (annealing step)**. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από τους εκκινητές και είναι συνήθως 5°C χαμηλότερα από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Συνήθως η θερμοκρασία αυτή κυμαίνεται από 45 μέχρι 60°C και έχει μεγάλη σημασία γιατί αν δεν είναι η ιδανική για τον εκάστοτε εκκινητή που χρησιμοποιείται, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το μη υβριδισμό του εκκινητή στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA ή τον υβριδισμό του σε τυχαία θέση. Η διάρκεια του σταδίου του υβριδισμού κυμαίνεται από 30 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά (**Εικόνα ΙΙ-2**).

- Τέλος, η DNA-πολυμεράση πρέπει να συμπληρώσει τις αντίστοιχες αλληλουχίες στη κάθε αλυσίδα που υβρίδισαν οι εκκινητές. Ξεκινάει από τον εκκινητή και συνεχίζει κατά μήκος της αλυσίδας με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **επιμήκυνση ή πολυμερισμός (extension step)** και η θερμοκρασία εξαρτάται από τη DNA-πολυμεράση (**Εικόνα ΙΙ-2**).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ



Εικόνα ΙΙ-2: Τα τρία στάδια ενός κύκλου της PCR: (1) Αποδιάταξη, (2) Υβριδισμός ή Αναδιάταξη και (3) Επιμήκυνση ή Πολυμερισμός. (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

Πριν από την κυκλική θερμική διαδικασία που περιγράφηκε, το αρχικό δείγμα DNA θερμαίνεται στους 94°C για 1 έως 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη του DNA. Επίσης, μετά τον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης, η θερμοκρασία διατηρείται στους 72°C για 5-15 λεπτά για την ολοκλήρωση της

επιμήκυνσης σε προϊόντα που η διαδικασία αντιγραφής έχει μείνει ημιτελής. Με την ολοκλήρωση του προγράμματος η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 4 °C, ώστε να σταματήσει η αντίδραση και να διατηρηθούν τα δείγματα.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) βασίζονται οι παρακάτω δείκτες: τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA), επαναλαμβανόμενες απλές ακολουθίες (SSR: Simple Sequence Repeats), ενδο- επαναλαμβανόμενες απλές ακολουθίες (ISSR: Inter Simple Sequence Repeats), πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων Θραυσμάτων (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) (Staub *et al.*, 1996; Morell *et al.*, 1995).

II.7. Μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.

II.7.1. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA): Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα DNA.

Τα RAPDs, ως μέθοδος για τη δημιουργία μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό περιγράφησαν για πρώτη φορά το 1990 από τους Williams *et al.*, & Welsh and McClelland. Οι πολυμορφισμοί αυτοί προκύπτουν όταν μικρή ποσότητα DNA (της τάξεως των νανογραμμαρίων) υποβάλλεται σε PCR με ένα μόνο εκκινητή μικρού μεγέθους (συνήθως 10 νουκλεοτιδίων) και τυχαίας αλληλουχίας. Όταν ο εκκινητής είναι μικρός υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να περιέχονται στο γονιδίωμα θέσεις όπου μπορεί να υβριδίσει με αντίθετη κατεύθυνση στις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και σε σχετικά μικρή απόσταση μεταξύ τους ώστε να επιτρέπεται ο πολλαπλασιασμός του τμήματος που περιέχεται ανάμεσά τους. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας τα μεγαλύτερα τμήματα του γονιδιώματος που δεν βρίσκονται μεταξύ δύο αντιστρόφων θέσεων υβριδισμού, αντιγράφονται μια μόνο φορά ενώ οι περιοχές του γονιδιώματος που βρίσκονται μεταξύ δύο αντιστρόφων θέσεων υβριδισμού αντιγράφονται 2 φορές. Έτσι στην πρώτη περίπτωση η ενίσχυση ακολουθεί γραμμική αύξηση ενώ στη δεύτερη εκθετική. Η τεχνική αυτή, ουσιαστικά, εντοπίζει μικρές ανεστραμμένες αλληλουχίες ενώ οι πολυμορφισμοί αντιστοιχούν στα πολλαπλασιασμένα τμήματα, τα οποία ποικίλλουν ως προς το μέγεθος ανάλογα με

την απόσταση των δύο θέσεων υβριδισμού του εκκινητή. Οι πολυμορφισμοί οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις που καταργούν ή δημιουργούν νέα θέση υβριδισμού του εκκινητή, σε ενθέσεις ή διαγραφές, που εισάγουν ή απαλείφουν αντίστοιχα θέσεις υβριδισμού, αλλά και σε ενθέσεις ή διαγραφές μεταξύ των θέσεων υβριδισμού που έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολή του μεγέθους του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος, είτε με κατάργηση κάποιου τμήματος (όταν μια ένθεση αποκρίνει σημαντικά τις θέσεις υβριδισμού) είτε δημιουργία νέου σε περίπτωση που μια διαγραφή μειώσει την απόσταση των θέσεων υβριδισμού. Τα προϊόντα της ενίσχυσης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Ακολουθεί χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο ή νιτρικό άργυρο, οπότε και γίνονται ορατά. Ο πολυμορφισμός μεταξύ ατόμων προσδιορίζεται με παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης ζώνης (**Williams et al., 1990**).

Τα RAPDs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε οποιονδήποτε οργανισμό και δεδομένου ότι μπορεί να συντεθεί μεγάλος αριθμός δεκαμερών εκκινητών τυχαίας αλληλουχίας, με τους κατάλληλους συνδυασμούς εκκινητών – γονιδιώματος μπορούν να εντοπιστούν πολυμορφισμοί ακόμα και σε πληθυσμούς με ελάχιστη γενετική ποικιλομορφία.

Για την εφαρμογή της μεθόδου των RAPDs δεν απαιτείται καμία γνώση αλληλουχιών του γονιδιώματος, ενώ τόσο το μέγεθος των τμημάτων που προκύπτουν (συνήθως δεν ξεπερνάει τις 2000 bp) όσο και η γνωστή αλληλουχία στα άκρα τους (εκείνη του εκκινητή) διευκολύνουν την εύρεση της αλληλουχίας τους (**Backmann, 1994**).

Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς εκκινητές τυχαίας αλληλουχίας, τόσο τα πολυμορφικά όσο και τα μη πολυμορφικά τμήματα που προκύπτουν από την PCR έχουν διαγνωστική αξία για την ταξινόμηση σε διάφορα επίπεδα (**Hadrys, 1992**) καθώς μπορούν να εντοπιστούν τμήματα σταθερά σε επίπεδο γένους, είδους αλλά και σε κατώτερα ταξινομικά επίπεδα που σε συνδυασμό με τα πολυμορφικά μπορούν να κατατάξουν τα υπό μελέτη άτομα ως και σε διαφορετικά στελέχη.

Στην ελιά οι RAPDs έχουν εφαρμοστεί στη διάκριση ποικιλιών (**Cresti et al., 1996; Khadari et al., 2003; Hagidimitriou, et al., 2005**), στη μελέτη ενδο- και διαποικιλιακής γενετικής παραλλακτικότητας (**Wiesman et al., 1998; Mekuria et al., 1999; Roselli et al., 2002; Belaj et al., 2002 & 2003a,b; Gemas et al., 2004**), στον καθορισμό γενετικών σχέσεων ανάμεσα σε ποικιλίες (**Besnard et al., 2001a; Belaj et**

al., 2002 & 2003b; Khadari *et al.*, 2003) και στη μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης στο σύμπλεγμα της ελιάς (olive complex) (Besnard *et al.*, 2001b).

Η τεχνική των RAPDs εκκινητών παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω:

Πλεονεκτήματα

- Είναι απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους μοριακή τεχνική (Belaj *et al.*, 2001).
- Παρουσιάζει υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού στην ελιά (Bogani *et al.*, 1994; Fabbri *et al.*, 1995; Cresti *et al.*, 1996; Wiesman *et al.*, 1998).
- Έχει υποστηριχθεί ότι πιθανότατα σχετίζεται με σημαντικούς λειτουργικά γενετικούς τόπους (Penner, 1996).
- Το DNA που μελετάται με αυτή την τεχνική απομονώνεται από μικρή ποσότητα φυτικού υλικού (Fritsch & Rieseberg, 1996).
- Δεν προαπαιτείται ιδιαίτερη γνώση του γονιδιώματος του προς μελέτη οργανισμού (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990).
- Σαρώνεται όλο το γονιδίωμα – πολλοί γενετικοί τόποι.
- Απαιτούνται σαφώς μικρότερες ποσότητες DNA από άλλες μεθόδους όπως στα RFPLs (Benter *et al.*, 1995).
- Παράγεται μεγάλος αριθμός ζωνών ανά εκκινητή (Benter *et al.*, 1995).
- Οι εκκινητές μπορούν να συντεθούν εύκολα (Benter *et al.*, 1995).
- Λόγω της χρήσης τυχαίων εκκινητών εξασφαλίζεται η αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων (Benter *et al.*, 1995).

Μειονεκτήματα

- Έχει χαμηλή επαναληψιμότητα (Schierwater & Ender, 1993; Jones *et al.*, 1997). Γι' αυτό το λόγω και η διαδικασία που ακολουθείται στο εργαστήριο θα πρέπει να είναι όσο γίνεται πιο ακριβής γιατί είναι ευαίσθητη στις συνθήκες αντίδρασης. Τα αποτελέσματα μπορούν να διαφέρουν από εργαστήριο σε εργαστήριο (Martins-Lopes *et al.*, 2007).
- Οι αναλύσεις με RAPD γενικά απαιτούν καθαρό, υψηλού μοριακού βάρους DNA (Spooner *et al.*, 2005).

- Είναι κυρίαρχοι δείκτες. Αν υποθεθεί ότι για την παραγωγή ενός προϊόντος από ένα γενετικό τόπο A (A, a) υπεύθυνος είναι ο αλληλόμορφος A, ενώ ο αλληλόμορφος a δεν δίνει προϊόν, τότε ετεροζυγωτά άτομα Aa θα εμφανίζουν φαινότυπο AA (Benter *et al.*, 1995).
- Η πηκτή αγαρόζης μπορεί να δημιουργήσει φτωχά πρότυπα ανάλυσης λόγω της περιορισμένης ικανότητας της αγαρόζης να διαχωρίζει παρόμοιου μεγέθους τμήματα DNA και κατά συνέπεια της εμφάνισης λιγότερων ζωνών (Benter *et al.*, 1995).

II.7.2. SSRs (Simple Sequence Repeats): Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες ή Μικροδορυφορικό DNA.

Οι δείκτες SSRs – δείκτες μικροδορυφορικού DNA (microsatellites) - είναι συγκυρίαρχοι DNA γενετικοί δείκτες που βασίζονται και αυτοί στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Το μικροδορυφορικό DNA βρίσκεται άφθονο στα φυτά. Αποτελείται από ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (2-6 αλλά συνήθως 2-3 νουκλεοτιδίων) οι οποίες επαναλαμβάνονται σε σειρά πολλές φορές στο γονιδίωμα λ.χ. (AG)_n ή (AAT)_n (Bruford & Wayne, 1993). Είναι άφθονοι, διασκορπισμένοι σε όλο το γονιδίωμα και παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού έναντι άλλων γενετικών δεικτών. Αυτό που καθιστά τις συγκεκριμένες αυτές θέσεις ενδιαφέρουσες είναι ότι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων ολιγονουκλεοτιδίων μπορεί να ποικίλει ευρέως μέσα στο είδος, δίνοντας στα ομόλογα αυτά τμήματα διάφορο μέγεθος. Εάν η νουκλεοτιδική αλληλουχία των βάσεων εκατέρωθεν των περιοχών του μικροδορυφορικού DNA είναι γνωστή, ειδικοί εκκινητές, μήκους 20-25 bp, μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να μπορούν να υβριδίσουν στις περιοχές αυτές. Με την τεχνική αυτή, τα τμήματα του μικροδορυφορικού DNA, μπορούν να πολλαπλασιαστούν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με προβλεπόμενο μέγεθος των προϊόντων, τις 100-300 bp και ακολούθως να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά.

Αυτές οι μοναδικές θέσεις – δείκτες χαρακτηρίζονται από μεγάλο πολυμορφισμό, από επαναληψιμότητα και από το μενδελικό τρόπο κληρονομικότητας.

Η τεχνική των SSRs εκκινητών παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω:

Πλεονεκτήματα

- Είναι δείκτες συγκυρίαρχοι. Μπορούν δηλαδή να ανιχνεύσουν ετεροζυγωτία (**Morgante *et al.*, 2002**).
- Απαιτούνται μικρές ποσότητες DNA (10 – 100 ng ανά αντίδραση).
- Λόγω της χρήσης μεγάλων σε μήκος εκκινητών (22-28 νουκλεοτιδίων) παρουσιάζουν υψηλή επαναληψιμότητα.
- Δεν απαιτείται υψηλής ποιότητας DNA (**Spooner *et al.*, 2005**).

Μειονεκτήματα

- Είναι υψηλού κόστους μοριακή τεχνική εάν δεν υπάρχουν ήδη διαθέσιμες αλληλουχίες εκκινητή για το συγκεκριμένο προς εξέταση είδος. Απαιτείται δηλαδή αλληλούχιση του γονιδιώματος του προς μελέτη οργανισμού.
- Παρότι οι μικροδορυφόροι είναι δείκτες συγκυρίαρχοι, τυχόν μεταλλάξεις στο σημείο υβριδισμού των εκκινητών μπορεί να οδηγήσει σε μη ενίσχυση των προϊόντων της PCR.
- Είναι δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πληθυσμιακές μελέτες που κυμαίνονται από ατομικό επίπεδο (π.χ. κλώνος και ταυτοποίησης στελέχους) έως και συγγενικών ειδών. Οι μικροδορυφόροι θεωρούνται επίσης ιδανικοί δείκτες για τις μελέτες χαρτογράφησης γονιδίων (**Hearne *et al.*, 1992; Morgante & Olivieri 1993; Jarne & Lagoda 1996**).

II.8. Μελέτη της Γενετικής Παραλλακτικότητας στην Ελιά

Η ελιά παρουσιάζει την πλουσιότερη γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσα σε όλα τα καρποφόρα δένδρα με πάνω από 1275 ποικιλίες να έχουν περιγραφεί. Οι περισσότερες ποικιλίες έχουν αναγνωριστεί σε χώρες της νότιας Ευρώπης και περιλαμβάνουν 538 στη Ιταλία, 183 στην Ισπανία 88 στην Γαλλία και 52 στην Ελλάδα (Sarri *et al.*, 2006; Ipek *et al.*, 2009). Οι ποικιλίες αυτές παρουσιάζουν αξιοσημείωτη παραλλακτικότητα στην ελαιοπεριεκτικότητα, το μέγεθος καρπού, το σχήμα της κόμης και στην προσαρμογή στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Bartolini *et al.*, 1998). Η μακροβιότητα του είδους και η χαμηλή πίεση βελτιωτικής επιλογής έχουν συνεισφέρει στη διατήρηση της παραλλακτικότητας ενώ η μειωμένη έκταση της γενετικής διάβρωσης μέσα στο γενετικό υλικό έχει επιτρέψει τη διατήρηση της ποικιλομορφίας (Rallo *et al.*, 2000).

Η ελιά είναι ένα διπλοειδές είδος ($2n=46$), πρωταρχικώς αλλόγαμο (Díaz *et al.*, 2006), το οποίο οδηγεί σε υψηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας και πολυμορφισμών του DNA μεταξύ των ποικιλιών (Rallo *et al.*, 2000). Ο πλούτος της γενετικής ποικιλότητας, το γεγονός ότι τόσο η παραγωγικότητα όσο και η ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων είναι κληρονομήσιμα γνωρίσματα των ποικιλιών, σε συνδυασμό με την σύγχυση γύρω από την ονοματολογία των ποικιλιών της ελιάς καθιστά απαραίτητη την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό τους με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών. Εικάζεται ότι διασταυρώσεις μεταξύ τοπικών άγριων ελαιόδεντρων και εισαγομένων επιλεγμένων ποικιλιών ή και μεταξύ καλλιεργούμενων ποικιλιών έχει οδηγήσει στη δημιουργία νέων ποικιλιών (Besnard *et al.*, 2001b).

Μέχρι και πριν μερικά χρόνια η ταυτοποίηση των ποικιλιών της ελιάς βασίζονταν στα μορφολογικά και φυσιολογικά γνωρίσματα της κάθε ποικιλίας. Οι Cantini *et al.*, (1999) χρησιμοποίησαν μορφολογικούς χαρακτήρες όπως το φύλλο, ο καρπός και ο τρόπος ανάπτυξης, για να αξιολογήσουν τη γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα αλλά και μέσα στις διαφορετικές καταχωρήσεις γνωστών και άγνωστων ποικιλιών ελιάς. Ωστόσο η ταυτοποίηση των ποικιλιών της ελιάς με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους είναι συχνά προβληματική, ιδίως κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των δένδρων (Banilas *et al.*, 2003). Οι Hamrick *et al.*, (1992)

ανέφεραν ότι τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία συνήθως καθορίζονται από πολλά γονίδια και ποικίλουν ανάλογα με το χρόνο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, δεν παρέχουν καμία άμεση πληροφορία για συγκεκριμένους γονότυπους. Με σκοπό την απάλειψη της αβεβαιότητας που προέκυψε από την μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών έγιναν μελέτες με τη χρήση διαφόρων γενετικών δεικτών. Αρχικά, ο γονοτυπικός προσδιορισμός ποικιλιών βασίστηκε στην ποικιλομορφία ισοενζύμων της γύρης (**Pontikis et al., 1980; Trujillo et al., 1995; Ouazzani et al., 1996**) και στον πολυμορφισμό αλλοενζύμων στα φύλλα (**Ouazzani et al., 1993 & 1995**). Όμως οι συγκεκριμένοι δείκτες παρουσίασαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα στη διάκριση ποικιλιών κοντινής συγγένειας (**Ouazzani et al., 1993 & 1995**). Σε ότι αφορά στη διάκριση των Ελληνικών ποικιλιών, έχουν γίνει προσπάθειες, αρχικά με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (**Αναγνωστόπουλος, 1939; Pontikis, 2000**) και στη συνέχεια, με τη χρήση βιοχημικών δεικτών / ισοένζυμων (**Pontikis et al., 1980**).

Η ικανότητα διάκρισης των ποικιλιών ελιάς και η εκτίμηση της γενετικής ομοιομορφίας είναι πολύ σημαντική για την επιτυχία προγραμμάτων βελτίωσης και διαχείρισης των γενετικών πόρων (**Owen et al., 2005**). Η χρήση μοριακών δεικτών για τη διαχείριση του γενετικού υλικού της ελιάς κρίνεται ιδιαίτερα συμφέρουσα αν μάλιστα συνυπολογίσουμε το γεγονός ότι η ελιά έχει μια εξαιρετικά μεγάλη νεανική περίοδο κατά την οποία μόνο η χρήση μοριακών δεικτών μπορεί να αποδώσει άμεσα αποτελέσματα (**Montemurro et al., 2005**).

Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως στις ημέρες μας για επακριβή γενετική περιγραφή, εξακρίβωση της καταγωγής και για τη διευκρίνιση του τρόπου διασποράς της ελιάς χρησιμοποιώντας ως αρχικό γενετικό υλικό φύλλα, καρπούς αλλά και λάδι.

Οι δείκτες AFLP, οι οποίοι αναπτύχθηκαν από τους **Vos et al., (1995)**, χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες γενετικών σχέσεων μεταξύ καλλιεργούμενων ελιών, αγριελιών και συγγενών ειδών χρησιμοποιώντας ως αρχικό γενετικό υλικό φύλλα (**Angiolillo et al., 1999; Busconi et al., 2003; Rotondi et al., 2003; Belaj et al., 2004b; Pafundo et al., 2005; Taamalli et al., 2006**) και λάδι (**Busconi et al., 2003; Pafundo et al., 2005; Montemurro et al., 2005 & 2008**). Με τη χρήση δεικτών AFLP δεικτών οι **Hagidimitriou et al., (2005)** μελέτησαν τη γενετική σχέση 26 Ελληνικών και 8 ξένων ποικιλιών.

ISSR δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη γενετικών σχέσεων, την διάκριση και την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας σε ποικιλίες ελιάς χρησιμοποιώντας ως αρχικό γενετικό υλικό φύλλα (Hess *et al.*, 2000; Gemas *et al.*, 2004; Essadki *et al.*, 2006; Martins-Lopes *et al.*, 2007) και καρπούς (Pasqualone *et al.*, 2001). Γενετικό υλικό από φύλλα χρησιμοποίησαν οι Terzopoulos *et al.*, (2005), όπου με την βοήθεια ISSR δεικτών ταυτοποίησαν 31 ποικιλίες ελιάς που διατηρούνται στο Ινστιτούτο υποτροπικών φυτών και ελιάς στα Χανιά, ανάμεσα τους και πολλές Ελληνικές.

Οι δείκτες SCAR έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς στην ελιά, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τους υπολοίπους μοριακούς δείκτες, με τη χρήση φύλλων (Hernandez *et al.*, 2001; Bautista *et al.* 2002; Busconi *et al.*, 2006) αλλά και λαδιού (De la Torre *et al.*, 2004; Pafundo *et al.*, 2007) ως υλικού απομόνωσης DNA.

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στον παρόν πείραμα, RAPDs και SSRs, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη των γενετικών σχέσεων στο σύμπλεγμα του είδους *Olea europaea*. Η ανάλυση με χρήση RAPDs έχει αποδειχθεί μια δυναμική, σχετικά απλή και οικονομική τεχνική για την ανάλυση του γενετικού υλικού των ποικιλιών της ελιάς και έχει εφαρμοστεί ευρύτατα χρησιμοποιώντας γενετικό υλικό από λάδι (Cresti *et al.*, 1996; Muzzalupo & Perri, 2002; Perri *et al.*, 2002; De la Torre *et al.*, 2004), και φύλλα (Fabbri *et al.*, 1995; Cresti *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2001; Bronzini de Caraffa *et al.*, 2002; Banilas *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2003; Busconi *et al.*, 2003; Belaj *et al.*, 2004b; Gemas *et al.*, 2004; Ganino *et al.*, 2007; Martins-Lopes *et al.*, 2007). RAPD εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν και από τους Hagidimitriou *et al.*, (2005), Nikoloudakis *et al.*, (2003), Λίνος & Χατζηδημητρίου (2007), Fabbri *et al.*, (1995), Besnard *et al.*, (2001a & 2001b), Belaj *et al.*, (2001 & 2002) προκειμένου να μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία των κυριότερων ελληνικών ποικιλιών. Παρά την καλή ικανότητα διάκρισης ποικιλιών, οι δείκτες RAPD συχνά αποτυγχάνουν να διαχωρίσουν κοντινούς συγγενικά κλώνους (όπως π.χ. μέσα στην ίδια ποικιλία).

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των δεικτών SSR έχει αυξηθεί κατακόρυφα λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν οι δείκτες αυτοί έναντι των υπολοίπων δεικτών. Η χρήση των SSR δεικτών εφαρμόζεται τόσο για DNA που έχει απομονωθεί από τα προϊόντα της ελιάς, καρπούς (Muzzalupo *et al.*, 2007) και λάδι (Pasqualone *et al.*, 2004; Testolin & Lain 2005; Muzzalupo *et al.*, 2007; Ayed *et al.*, 2009) όσο και από τα φύλλα (Rallo *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002;

Rotondi et al., 2003; Khadari et al., 2003; Belaj et al., 2004a; Muzzalupo et al., 2006, 2007, 2008, 2009; Taamalli et al., 2006; Ganino et al., 2007; Rekik et al., 2008; Bracci et al., 2009; D'Imperio et al., 2011). Χρήση δεικτών SSR σε Ελληνικές ποικιλίες ελιάς πραγματοποιήθηκε από τους **Rallo et al., (2003)** και **Roubos et al., (2010)** προκειμένου να εξετασθεί η γενετική ποικιλομορφία σε μοριακό επίπεδο.

Οι μοριακοί δείκτες δεν πρέπει να θεωρούνται ως κανονικά γονίδια, καθώς αυτοί συνήθως δεν έχουν καμία βιολογική επίδραση, αλλά αντί αυτού να θεωρηθούν ως σταθερά κεντρικά σημεία στο γονιδίωμα. Οι δείκτες αυτοί είναι αναγνωρίσιμες αλληλουχίες DNA, που βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος και μεταδίδονται από την μια γενιά στην άλλη βάση των βασικών κανόνων κληρονομικότητας. Η ύπαρξη διαφόρων μοριακών δεικτών, και οι διαφορές τους σε ότι αφορά τις αρχές και τις μεθοδολογίες τους απαιτούν προσοχή κατά την επιλογή ενός ή περισσότερων από αυτούς ως καταλληλότερη τεχνική που ταιριάζει σε κάθε ερευνητική εργασία.

ΙΙ.9. Σκοποί του Πειράματος

Τα προϊόντα της ελιάς, επιτραπέζιες ελιές και ελαιόλαδο, παίζουν σημαντικό κοινωνικοοικονομικό ρόλο στη χώρα μας, έχουν υψηλή διατροφική αξία και ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του καταναλωτή. Επίσης, η συνεχής απαίτηση του αγοραστικού κοινού τόσο για βελτίωση και διασφάλιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων της ελιάς όσο και για πιστοποίηση της προέλευσής τους, ειδικά όταν πρόκειται για προϊόντα ονομασίας προέλευσης (π.χ ελιές «Καλαμών»), έχει οδηγήσει στην ανάγκη ταυτοποίησης των διαφόρων ποικιλιών ελιάς και ιχνηλασίας των προϊόντων τους. Το έλλειμμα πληροφόρησης σχετικά με την ταυτοποίηση των προϊόντων της ελιάς, ιδιαίτερα για Ελληνικές ποικιλίες, ήταν και ένας από τους λόγους πραγματοποίησης της παρούσας διδακτορικής μελέτης.

Ο βασικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ταυτοποίηση και η ιχνηλασία των προϊόντων δέκα ποικιλιών ελιάς χρησιμοποιώντας DNA από νέα φύλλα Απριλίου, πράσινους και μαύρους καρπούς και εφαρμόζοντας δύο διαφορετικές μοριακές μεθόδους, των δεικτών RAPDs, (Random Amplified Polymorphic DNA - τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA) και SSRs, (Simple Sequence Repeats - δείκτες μικροδορυφορικού DNA).

II.10. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά & Αντιδραστήρια

- Φυτικό υλικό
- Υγρό άζωτο
- Αιθανόλη (Merk)
- Χλωροφόρμιο (Lab Scan)
- Ισοαμλική αλκοόλη (IAA) (Applichem)
- Τρις βάση (Tris base) (Applichem)
- EDTA (Ethylene Diaminate Traacetic Acid) (Serva)
- Πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP40) (Applichem)
- Εξαδεξίλ τριμέθυλοαμόνιο (CTAB) (Sigma)
- Χλωριούχο νάτριο (Applichem)
- Καυστικό νάτριο (Merck)
- DNTPs (μίγμα από dATP, dCTP, dGTP, & dTTP) (New England Biolabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer) (Promega)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (Promega)
- Tag πολυμεράση (Promega)
- Αγαρόζη (Applichem)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (Applichem)
- Φαινόλη (Applichem)
- Κυανούν της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Applichem)
- Πρότυπα μεγέθη θραυσμάτων DNA (DNA molecular weight marker) (Applichem)
- RNA-άση (Applichem)
- Οξικό Νάτριο (Merck)

Όργανα

- Φυγόκεντρος (Heraeus instruments Labofuge 400)
- Μικροφυγόκεντρος (Hermle Z160M)
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή στροβιλίσματος (Vortex)

- pH meter (Jen Way 3310)
- Ζυγαριές ακριβείας (Kern 410 και Kern 470)
- Θερμικός αναδευτήρας (Snijders Hotplate 34532 Stirrer)
- Συσκευή PCR (Sensoquest, LabCycler Standard)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Clever Multisub Maxi)
- Τροφοδοτικό ρεύματος (Consort E865)
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP)
- Κάλυμμα τράπεζας υπεριώδους ακτινοβολίας (Hood)
- Φωτογραφική μηχανή (Canon A630)
- Φασματοφωτόμετρο (Unicam Helios γ)
- Αυτόματες πιπέτες

II.10.1. Φυτικό υλικό

Στο συγκεκριμένο πείραμα το είδος *Olea europaea* αντιπροσωπεύτηκε από τις ποικιλίες που αναφέρονται στον *Πίνακα II-1*. Η επιλογή των ποικιλιών αυτών έγινε βάσει της σημαντικότητας των ποικιλιών αυτών για την Ελληνική γεωργία, και της διάκρισής τους ανάλογα με το μέσο βάρος του καρπού και τις χρήσεις τους. Η Ισπανική ποικιλία «Arbequina» επιλέχτηκε λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος και ζήτησης που παρουσιάζει στην Ελληνική αγορά.

Τον Οκτώβριο του 2006 παραλήφθηκαν 40 ελαιόδεντρα, από τα «Φυτώρια Ελιάς Κωστελένος» στον Πόρο Τροιζηνίας. Επρόκειτο για ελαιόδεντρα δύο ετών σε άριστη κατάσταση. Τα ελαιόδεντρα μεταφυτευτήκαν σε γλάστρες των πενήντα λίτρων, προστέθηκε μείγμα χώματος, τύρφης και περλίτη για να διασφαλιστεί η καλύτερη αποστράγγιση, μεταφέρθηκαν σε συγκεκριμένο χώρο στο денδροκομείο της σχολής και διασκορπίστηκαν τυχαία στο χώρο. Εγκαταστάθηκε αυτόματο σύστημα ποτίσματος για τους θερινούς μήνες και ορίστηκε εικοσάλεπτο πρόγραμμα ποτίσματος δύο φορές την εβδομάδα. Κατά την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαραίτητες καλλιεργητικές φροντίδες προκειμένου να διατηρηθούν σε καλή κατάσταση τα ελαιόδεντρα (επεμβάσεις με φυτοπροστατευτικά προϊόντα, λιπάνσεις, κ.α.).

Πίνακας ΙΙ-1: Ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός ελαιόδεντρων, χώρα καταγωγής, μέγεθος και χρήση καρπού.

α/α	Ποικιλία	Αριθμός ελαιόδεντρων	Χώρα καταγωγής	Μέγεθος Καρπού	Χρήση Καρπού
1	Κορωνέικη	4	Ελλάδα	Μικρόκαρπη	Λάδι
2	Λιανολιά Κερκύρας	5	Ελλάδα	Μικρόκαρπη	Λάδι
3	Μαστοειδής»	5	Ελλάδα	Μικρόκαρπη	Λάδι
4	Arbequina	4	Ισπανία	Μικρόκαρπη	Λάδι
5	Αδραμυτινή	4	Ελλάδα	Μεσόκαρπη	Διπλής Χρήσεως
6	Μεγάρων	4	Ελλάδα	Μεσόκαρπη	Διπλής Χρήσεως
7	Γαϊδουρελιά	4	Ελλάδα	Αδρόκαρπη	Βρώσιμη
8	Καλαμών	2	Ελλάδα	Αδρόκαρπη	Βρώσιμη
9	Κονσερβολιά	4	Ελλάδα	Αδρόκαρπη	Βρώσιμη
10	Χαλκιδικής	4	Ελλάδα	Αδρόκαρπη	Βρώσιμη

Για το πείραμα επίσης χρησιμοποιήθηκαν καρποί των ποικιλιών, «Καλαμών» και «Κονσερβολιάς», αγορασμένοι από το εμπόριο, προκειμένου αυτοί να ταυτοποιηθούν.

ΙΙ.10.2. Συλλογή υλικού

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA ήταν νεαρά φύλλα, πράσινοι και μαύροι καρποί. Οι πράσινοι καρποί συλλέχθηκαν στις 1-10-06 και οι μαύροι στις 16-11-06. Οι καρποί ήταν απαλλαγμένοι από κάθε είδους παθογόνα και αφού καθαρίστηκαν εξωτερικά τοποθετήθηκαν σε αριθμημένα πλαστικά σακουλάκια και στη συνέχεια σε φορητό ψυγείο.

Τα νεαρά φύλλα τα οποία συλλέχθηκαν στις 3-5-07 ήταν και αυτά απαλλαγμένα από ιούς, μύκητες και έντομα, που θα μπορούσαν να μολύνουν το φυτικό γενετικό υλικό του δείγματος με ξένο DNA. Ταυτόχρονα, τα μικρότερου μεγέθους χυμοτόπια σε αυτή την περίοδο ανάπτυξης αυξάνουν την αποδοτικότητα

της απομόνωσης. Τα νεαρά φύλλα τοποθετήθηκαν σε αριθμημένα πλαστικά σακουλάκια και εν συνεχεία σε φορητό ψυγείο προκειμένου να αποφευχθούν αλλοιώσεις κατά την μεταφορά τους στο εργαστήριο.

Όλα τα παραπάνω δείγματα, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Δενδροκομίας του Γ.Π.Α. και τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη στους -20°C .

II.10.3. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με την μέθοδο CTAB (Doyle & Doyle, 1987) με κάποιες τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, πέντε περίπου γραμμάρια ν.φ.ι. (φύλλα ή καρποί) λειοτριβήθηκαν σε υγρό άζωτο σε ιγδίο μεθ' υπέρου από πορσελάνη. Το λεπτόκοκκο υλικό μεταφέρθηκε σε falcon των 50 mL και αναμείχθηκε με 10 mL προθερμασμένου στους 65°C διαλύματος εκχύλισης CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 2% w/v (Παράρτημα I). Η ανακίνηση του μείγματος έγινε πολύ προσεκτικά ώστε το μείγμα να ομογενοποιηθεί και να μην υπάρχουν συσσωματώματα. Τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 65°C για 60 λεπτά με περιοδική ανάδευση κάθε περίπου 10 λεπτά. Εν συνεχεία τα δείγματα αναμείχθηκαν με ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου : ισοαμλικής αλκοόλης (C:IAA) 24:1 (Παράρτημα I) και φυγοκεντρήθηκαν για 6 λεπτά στις 3000 στροφές το λεπτό (3000 rpm). Η υπερκείμενη υδατική φάση αναμείχθηκε, σε falcon των 50 mL, με προθερμασμένο στους 65°C διάλυμα CTAB 5% w/v (Παράρτημα I) ίσο με το 1/5 του όγκου που πήραμε από την υπερκείμενη φάση και C:IAA (24:1) ίσου όγκου με το σύνολο των 2 προηγούμενων. Ακολούθησε ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντρωση για 6 λεπτά στις 3000 rpm. Η άνω φάση μεταφέρθηκε σε falcon των 50 mL και προστέθηκε διπλάσιος όγκος παγωμένης αιθανόλης 95%. Μετά από προσεκτική ανάδευση, το αφυδατωμένο DNA συλλέχτηκε με γυάλινο γάντζο και επαναδιαλύθηκε σε 500 μL διαλύματος TE [Tris (hydroxymethyl) methylamine – Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)] (Παράρτημα I).

II.10.4. Καθαρισμός DNA

Οι φυτικοί ιστοί περιέχουν, εκτός από το DNA, διάφορα μόρια (RNA, χρωστικές, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες κ.ά.), τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA κατάλληλο για τις αντιδράσεις PCR. Έχει αναφερθεί ότι οι πολυσακχαρίτες παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό του DNA αφού η παρουσία τους αποτρέπει την παραγωγή του τελικού προϊόντος της PCR (Vroh *et al.*, 1996).

Στα δείγματα προστέθηκαν 8μL RNAase συγκέντρωσης 10 mg/mL και αφού επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37⁰C για μία ώρα, ακολούθησε προσθήκη 500μL φαινόλης, φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά και ανάκτηση της υπερκείμενης φάσεως. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλη μία φορά.. Στην υπερκείμενη φάση που προέκυψε προστέθηκαν 250μL φαινόλης και 250μL CIAA και έγινε νέα φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm. Ο καθαρισμός των δειγμάτων ολοκληρώθηκε με την προσθήκη περίπου ίσου όγκου C:IAA με τον όγκο του δείγματος που έχουμε συλλέξει. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου για 5 λεπτά στις 13.000 rpm. Εν συνεχεία, η υπερκείμενη φάση αναμείχθηκε με ένα δέκατο όγκου οξικού νατρίου (CH₃COONa) 0,5 M (Παράρτημα I) και 1 mL αιθανόλης 100% και αναμείχθηκαν ήπια για να κατακρημνιστεί το DNA. Τα δείγματα παρέμειναν για 1 ώρα περίπου στους -20⁰C και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 13.000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα αφέθηκε για να στεγνώσει για περίπου 30 λεπτά. Το ίζημα (DNA) επαναδιαλύθηκε σε 200 μL TE και αποθηκεύτηκε στους -20⁰C. Το DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 4⁰C σε αιώρηση μέσα σε διάλυμα TE για αρκετές εβδομάδες ή στους -20⁰C ή -80⁰C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

II.10.5. Ποσοτικός Προσδιορισμός του DNA

Οι οπτικές πυκνότητες (OD) των δειγμάτων DNA καθορίστηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού (UV/VIS) (Unicam Helios γ) με τις μετρήσεις στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Από την απορρόφηση στα 260 nm υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA σε κάθε δείγμα, ενώ ο λόγος

OD_{260nm}/OD_{280nm} παρέχει πληροφορίες για την καθαρότητα του DNA (τιμές από 1,8 έως 2 αντιστοιχούν σε καθαρό παρασκεύασμα DNA ενώ τιμές κοντά στο 1 υποδηλώνουν παρουσία πρωτεϊνών ή φαινόλης). Το OD και στα δύο μήκη κύματος μετρήθηκε για 10μL του απομονωμένου DNA που προστέθηκε σε 2mL απιονισμένου νερού. Μία μονάδα μέτρησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 μg/mL διπλής έλικας DNA. Η συγκέντρωση του DNA καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{DNA concentration (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} = A_{260} * 50 * \text{dilution factor}/1000$$

Στην περίπτωση μας ο παράγοντας αραιώσης (dilution factor) ισούται με 200μL (2mL H₂O / 10 μL DNA).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA πραγματοποιήθηκε και με την χρήση ηλεκτροφορηγράφηματος πηκτής αгарόζης 1% (w/v) όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα II-3**. Κατά την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε λDNA γνωστής συγκέντρωσης, και αλληπάλληλες αραιώσεις του οποίου έτρεξαν σε ηλεκτροφορηγράφημα μαζί με άγνωστα δείγματα πυκνού DNA. Η σύγκριση φθορισμού ανάμεσα στα γνωστής συγκέντρωσης DNA και στα άγνωστα δείγματα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατά προσέγγιση ποσοτικοποίηση του DNA που υπάρχει στα άγνωστα δείγματα. Στην **Εικόνα II-3** τα 5 πρώτα κελία αντιστοιχούν στις ακόλουθες συγκεντρώσεις DNA: 12,5 ng/μL, 25 ng/μL, 50 ng/μL, 100 ng/μL και 150 ng/μL.



Εικόνα II-3: Απεικόνιση γνωστών και άγνωστων συγκεντρώσεων DNA σε ηλεκτροφορηγράφημα πηκτής αгарόζης.

Με βάση τις μετρήσεις αυτές υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA και έγινε αραιώση του κάθε δείγματος στα 25 ng/μL, με την προσθήκη διαλύματος TE.

ΙΙ.10.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR

Η προετοιμασία των αντιδράσεων του PCR έγιναν υπό συνθήκες που απέτρεπαν την επιμόλυνση των δειγμάτων με ξένο DNA (μολύνσεις από το περιβάλλον ή μεταξύ των δειγμάτων). Όλα τα αντιδραστήρια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φυλάσσονταν στους -20°C και ο χειρισμός τους κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων γινόταν σε πάγο.

Στον **Πίνακα ΙΙ-2** παρουσιάζονται τα μίγματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης τόσο για τα RAPDs όσο και για τα SSRs που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 30 μL για τα RAPDs και 25 μL για τα SSRs.

Πίνακας ΙΙ-2: Μείγματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τα RAPDs και για τα SSRs.

RAPD		SSR	
Διάλυμα	Ποσότητα (μL)	Διάλυμα	Ποσότητα (μL)
DNA (25 ng/mL)	3	DNA (25 ng/mL)	2
Primers (1 μM)	0,6	SSR Forward (0,5 μM)	1,5
		SSR Reverse (0,5 μM)	1,5
Buffer (1x)	6	Buffer (1x)	5
dNTPs (270 μM)	0,81	dNTPs (100 μM)	0,5
MgCl ₂ (300 μM)	3,6	MgCl ₂ (1mM)	2
Taq (3,3 U)	0,2	Taq (0,5 U)	0,4
ddH ₂ O	15,79	ddH ₂ O	12, 1
Final Volume	30	Final Volume	25

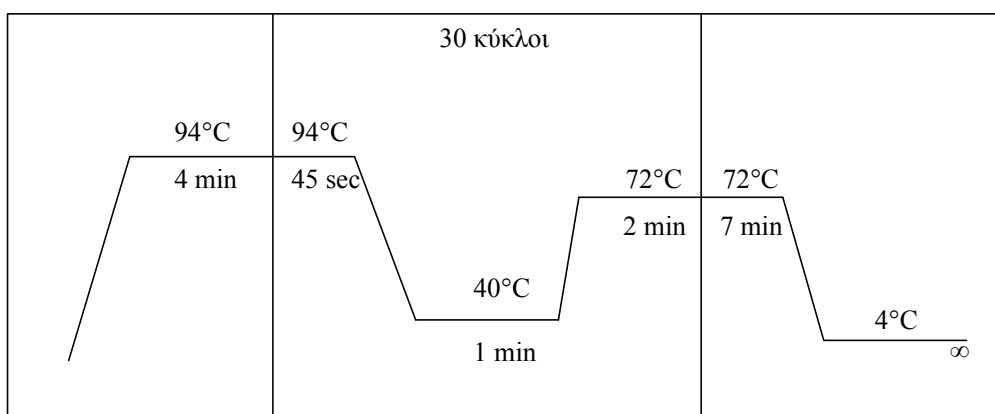
ΙΙ.10.7. Αντιδράσεις Τυχαίας Ενίσχυσης Πολυμορφικού DNA (RAPD)

Στις αντιδράσεις RAPD δοκιμάστηκαν 12 εκκινητές RAPD (**Πίνακας ΙΙ-3**). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PCR το οποίο απεικονίζεται σχηματικά στο **Σχήμα ΙΙ-1**. Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν οι εξής: Η θερμοκρασία της συσκευής ανέρχεται στους 94°C για 4 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται θερμική αποδιάταξη του DNA (διαχωρισμός της διπλής έλικας). Στην συνέχεια ακολουθούν 30 κύκλοι – επαναλήψεις που εκτελεί η συσκευή. Κάθε

κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια: 94⁰C για 45 δευτερόλεπτα (denaturation, θερμική αποδιάταξη του DNA), 40⁰C για 1 λεπτό (annealing, υβριδισμός του εκκινητή) και 72⁰C για 2 λεπτά (extension, σύνθεση νέου κλώνου). Στο τέλος του προγράμματος προστέθηκε ένα βήμα επέκτασης του DNA σε 72⁰C για 7 λεπτά (final extension). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα προϊόντα της αντίδρασης παρέμειναν στην θερμοκρασία των 4⁰C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2,5% w/v.

Πίνακας II-3 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις των RAPDs και αλληλουχία των βάσεων

Εκκινητές RAPD	Αλληλουχία Βάσεων
1. RAPD – 1	TCCGCAACCA
2. RAPD – 3	GTAGACCCGT
3. RAPD – 12	TAAGTTGGTA
4. RAPD – 13	CACCACCACC
5. RAPD 14	ACGCTGCGAC
6. OPB – 1	GTTTCGCTCC
7. OPB – 11	GTAGACCCGT
8. OPAH – 17	CAGTGGGGAG
9. OPA – 9	TGTAGCTGGG
10. OPG – 5	CTGAGACGGA
11. RI – 4	ATACACCAGC
12. RI – 5	TTGCGTCATG



Σχήμα II-1. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις RAPD.

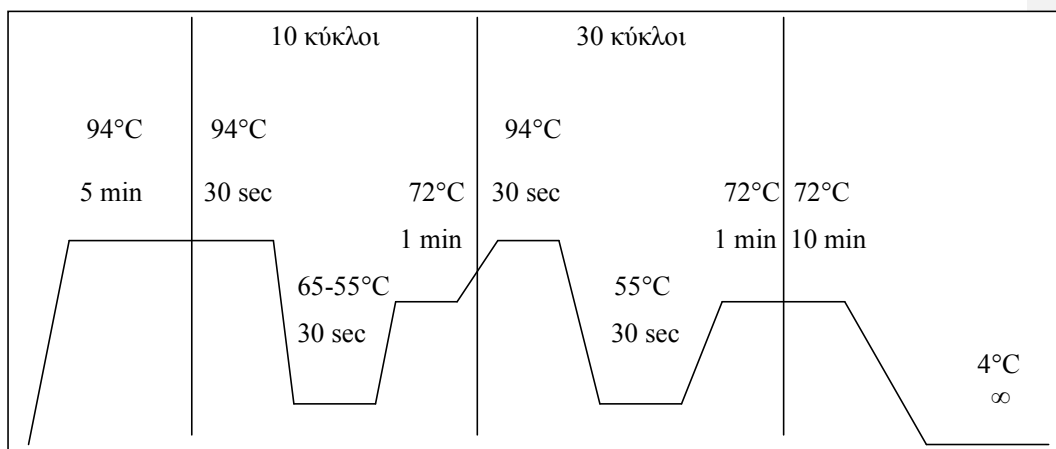
II.10.8. Αντιδράσεις Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (SSR)

Οι αντιδράσεις SSR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PCR το οποίο απεικονίζεται σχηματικά στο *Σχήμα II-2*. Αρχικά προηγήθηκε ένα βήμα αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 5 min. Δέκα κύκλοι σε 94°C για 30 sec, 65°C για 30 sec (που σε κάθε κύκλο η θερμοκρασία μειώνεται κατά 1°C μέχρι τους 55°C) και 72°C για 1 min, που ακολουθείται από 30 κύκλους σε 94°C για 1 min, 55°C για 30 sec, και 72°C για 1 min. Ένα βήμα επέκτασης του DNA σε 72°C για 10 min προστέθηκε στο τέλος του προγράμματος. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα προϊόντα της αντίδρασης παρέμειναν στην θερμοκρασία των 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

Στις αντιδράσεις SSR δοκιμάστηκαν 10 ζευγάρια συγκεκριμένων, σύμφωνα με την βιβλιογραφία για την ελιά, εκκινητών SSR (*Πίνακας II-4*).

Πίνακας II-4: 10 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις των SSRs και αλληλουχία των βάσεων

Εκκινητές SSR	Αλληλουχία Βάσεων	Μήκος	Θερμοκρασία
GAPU101 F	catgaaaggagggggacata	20 bases	57,7 °C
GAPU101 R	ggcacttgttgacagattg	20 bases	57,7 °C
GAPU59 F	ccctgctttggtcttctctaa	20 bases	57,7 °C
GAPU59 R	caaaggtgcactttctctcg	20 bases	57,7 °C
GAPU45 F	atcgggagggatgtgatgta	20 bases	57,7 °C
GAPU45 R	catcgcatcgcctgtaata	20 bases	55,6 °C
GAPU71 A F	gatcatttaaaatattagagagagaga	27 bases	54,7 °C
GAPU71 A R	Tccatccatgctgaactt	18 bases	52,5 °C
GAPU71 B F	gatcaaaggaagaaggggataaa	23 bases	56,7 °C
GAPU71 B R	acaacaatccgtacgcttg	20 bases	55,6 °C
GAPU89 F	gatcattccacacagagag	20 bases	57,7 °C
GAPU89 R	aacacatgcccacaaactga	20 bases	55,6 °C
GAPU11e17 F	cgcgttaccataccttagcc	20 bases	59,7 °C
GAPU11e17 R	ttgaatctgacgtggatgga	20 bases	55,6 °C
GAPU47 F	gatcagcttagtctcatattctctc	27 bases	60,7 °C
GAPU47 R	cctcgactgatttacacacca	21 bases	58,0 °C
GAPU103 F	tgaatttaactttaaccacaca	24 bases	53,5 °C
GAPU103 R	gcacgcctcgattttatcc	20 bases	55,6 °C
GAPU12 F	ttttgcaaaagcattagagca	20 bases	51,5 °C
GAPU12 R	agcagcagcagaagcttgat	20 bases	57,7 °C



Σχήμα II-2. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις SSR.

II.10.9. Ηλεκτροφόρηση

Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR έγινε σε πηκτή αγαρόζης 2,5% w/v για τους RAPD και 2% w/v για τους SSR εκκινητές, βυθισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Σε κάθε οπή φόρτωσης της πηκτής φορτώθηκε ποσότητα δείγματος όγκου 18μL, που έχει αναμειχθεί με 1μL διαλύματος χρωστικής (Κυανούν της Βρωμοφαινόλης) για την καταβύθισή του. Για την ανάλυση των δειγμάτων στην πηκτή εφαρμόστηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ρεύμα τάσης 70 Volt για 3 ώρες. Στην πρώτη και στην τελευταία οπή φόρτωσης της πηκτής φορτώθηκε μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) σύμφωνα με τον οποίο και ανάλογα με την θέση κάθε ζώνης υπολογίζεται το μοριακό βάρος του προς μελέτη DNA.

Το διαχωρισμό των προϊόντων ακολούθησε χρώση της πηκτής αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική που έχει την ιδιότητα να φθορίζει με την παρουσία υπεριώδους φωτός) και στη συνέχεια φωτογράφιση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας με τη φωτογραφική μηχανή Canon A630.

Π.10.10. Αριθμητική Ανάλυση των Δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου NTSYS pc 2.2i (Rohlf, 1998). Η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων υπολογίστηκε με βάση το συντελεστή ομοιότητας του *Jaccard*. όπως αυτός ορίζεται και περιγράφεται από τους **Sneath & Sokal (1973)**. Ο συντελεστής αυτός χρησιμοποιείται ευρέως για κυρίαρχους δείκτες, όπως είναι και οι δείκτες RAPD που εφαρμόστηκαν στο πείραμα. Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας κάθε δυνατού ζεύγους των ποικιλιών που μελετήθηκαν υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$J = a / (n - d)$$

- Όπου: (a) η παρουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης μεταξύ των ζευγών που συγκρίνονται,
 (n) ο αριθμός των κοινών ζωνών μεταξύ των ζευγών των ποικιλιών,
 (d) η απουσία ηλεκτροφορητικής ζώνης μεταξύ των ζευγών που συγκρίνονται.

Σχηματικά αυτό παρουσιάζεται στο σχέδιο που ακολουθεί όπου υπάρχουν όλες οι δυνατές περιπτώσεις (*a*, *b*, *c*, *d*) για δύο ενισχυμένες ζώνες DNA σε δύο δείγματα *i* και *j*. Τα *a* και *d* εκφράζουν ταυτόχρονη παρουσία (*a*) ή απουσία (*d*) των δύο ενισχυμένων ζωνών DNA. Αντίστοιχα, υπάρχουν άλλες δύο περιπτώσεις όπου μπορεί να υπάρχει παρουσία μιας ενισχυμένης ζώνης στο ένα δείγμα και απουσία της στο άλλο. Εκεί έχουμε τις περιπτώσεις *c* και *b*. Το άθροισμα των $a+b+c+d$ συμβολίζεται με το γράμμα *n* στον προαναφερθέντα τύπο.

		<i>j</i>	
		+	-
<i>i</i>	+	<i>a</i>	<i>b</i>
	-	<i>c</i>	<i>d</i>

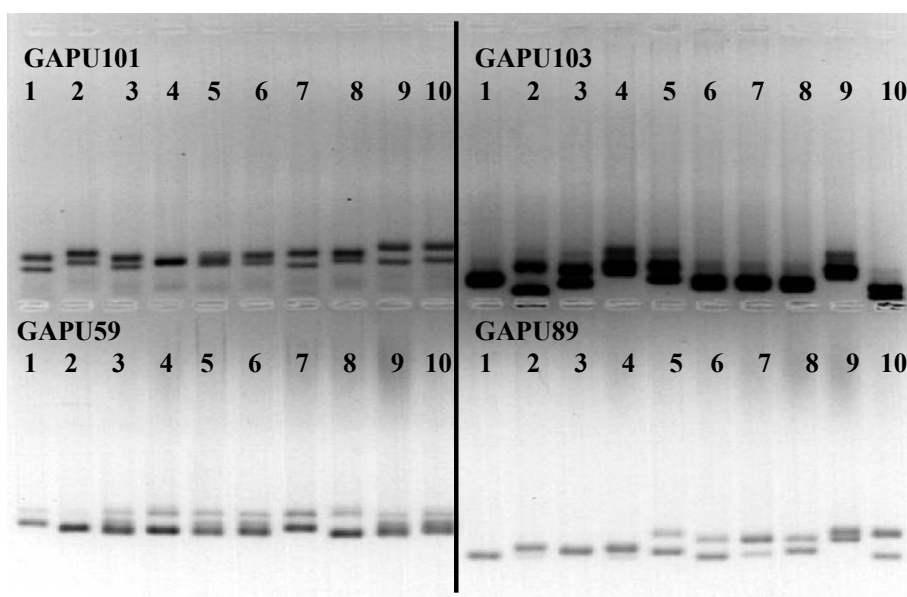
Ο βαθμός γενετικής ομοιότητας που προκύπτει με βάση των συντελεστή κυμαίνεται από 0 (καμία κοινή ηλεκτροφορητική ζώνη) έως 1 (όλες οι ηλεκτροφορητικές ζώνες, του υπό μελέτη ζεύγους των ποικιλιών, κοινές).

Με βάση το συντελεστή ομοιότητας του *Jaccard* κατασκευάζεται μια μήτρα ομοιότητας (πίνακας των γενετικών αποστάσεων) από την οποία αντλούνται τα στοιχεία για την ανάλυση συστάδων (cluster analysis) με τη μέθοδο UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means). Σύμφωνα με τους **Saitou & Nei (1987)**, η μέθοδος UPGMA χρησιμοποιείται κυρίως σε μελέτες μοριακών δεικτών, όπου η ομαδοποίηση ξεκινά από τα πιο κοντινά ζεύγη δειγμάτων και συνεχίζει στα υπόλοιπα.

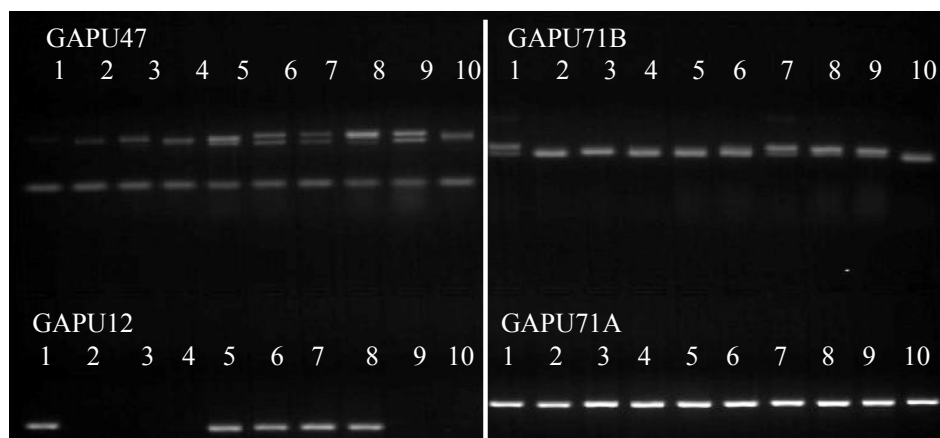
ΙΙ.11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πρώτο βήμα στο συγκεκριμένο ερευνητικό κομμάτι περιελάμβανε τη χρήση μοριακών δεικτών SSR σε DNA απομονωμένο από νέα φύλλα, προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα επαρκούς διαχωρισμού διαφορετικών ποικιλιών

Η χρήση των δεικτών (SSR) σε νέα φύλλα Απριλίου έδειξε ότι οι υπό εξέταση ποικιλίες διαχωρίστηκαν επαρκώς. Στις *Εικόνες ΙΙ-4* και *ΙΙ-5* εμφανίζονται ηλεκτρογραφήματα SSR αλληλόμορφων των εκκινητών GAPU 101, GAPU 103, GAPU 59, GAPU 89, GAPU 47, GAPU 71B, GAPU 12 & GAPU 71A. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στα ηλεκτρογραφήματα αντιστοιχούν στις ποικιλίες, όπως αυτές παρουσιάζονται στον *Πίνακα ΙΙ-5*.



Εικόνα ΙΙ-4: Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων των εκκινητών GAPU 101, GAPU 103, GAPU 59 και GAPU 89. (Αριθμοί όπως στον *Πίνακα ΙΙ-5*).



Εικόνα ΙΙ-5: Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων των εκκινητών GAPU 47, GAPU 71B, GAPU 12 & GAPU 71A. (Αριθμοί όπως στον *Πίνακα ΙΙ-5*)

Πίνακας ΙΙ-5: Δείγματα φύλλων ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τις ποικιλίες στις *Εικόνες ΙΙ-4* και *ΙΙ-5*.

1	Arbequina	5	Καλαμών	9	Μεγάρων
2	Γαϊδουρελιά	6	Κορωνέικη	10	Χαλκιδικής
3	Αδραμυττινή	7	Λιανολιά Κερκύρας		
4	Κονσερβολιά	8	Μαστοειδής		

Από τα ηλεκτρογραφήματα που παρουσιάζονται στις *Εικόνες ΙΙ-4* και *ΙΙ-5* φαίνεται ότι οι εκκινητές GAPU 101, GAPU 103, GAPU 59, GAPU 89, GAPU 47 και GAPU 71B διαχώρισαν επαρκώς τις 10 ποικιλίες μεταξύ τους ενώ οι εκκινητές GAPU 12 & GAPU 71A δεν έδωσαν καθόλου αλληλόμορφα τμήματα.

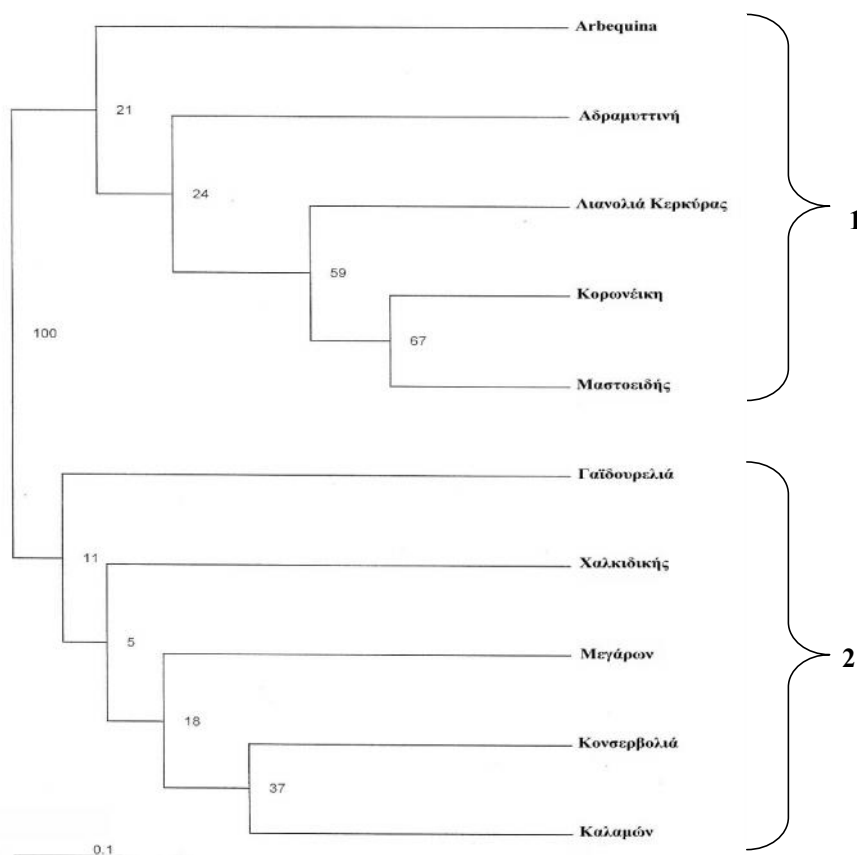
Η γενετική ομοιότητα, όπως αυτή εκφράζεται μέσω του συντελεστή ομοιότητας Jaccard, των 10 υπό μελέτη ποικιλιών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσαν οι εκκινητές SSR, παρουσιάζεται στον *Πίνακα ΙΙ-6*. Ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard κυμάνθηκε από 0,16 μεταξύ των ποικιλιών «Λ. Κερκύρας» και «Γαϊδουρελιάς» μέχρι 0,80 μεταξύ των ποικιλιών «Κορωνέικη» και «Μαστοειδής».

Πίνακας ΙΙ-6: Ο συντελεστής ομοιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψε με τη

χρήση του συντελεστή του *Jaccard* για τα SSR.

	Arbequina	Γαϊδουρελιά	Αδραμυτινή	Κονσερβολιά	Καλαμών	Κορωνέικη	Λ. Κερκύρας	Μαστοειδής	Μεγάρων	Χαλκιδικής
Arbequina	1									
Γαϊδουρελιά	0,1904	1								
Αδραμυτινή	0,4347	0,2000	1							
Κονσερβολιά	0,2608	0,6000	0,4545	1						
Καλαμών	0,3846	0,4347	0,4800	0,6400	1					
Κορωνέικη	0,3846	0,2608	0,5600	0,4000	0,5714	1				
Λ. Κερκύρας	0,6428	0,1600	0,5185	0,2222	0,4000	0,7333	1			
Μαστοειδής	0,4285	0,2400	0,5925	0,2962	0,6000	0,8000	0,6875	1		
Μεγάρων	0,2222	0,3333	0,3846	0,5384	0,5517	0,5517	0,4516	0,5806	1	
Χαλκιδικής	0,4000	0,3636	0,5000	0,5000	0,5185	0,5185	0,2758	0,4137	0,4285	1

Στην *Εικόνα ΙΙ-6* παρουσιάζεται ο διαχωρισμός των ποικιλιών με τη μέθοδο UPGMA σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις ποικιλίες «Arbequina» «Αδραμυτινή», «Λιανολιά Κερκύρας», «Κορωνέικη» και «Μαστοειδής». Οι τέσσερις από τις πέντε αυτές ποικιλίες είναι μικρόκαρπες και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή λαδιού ενώ μόνο η «Αδραμυτινή» χαρακτηρίζεται ως μεσόκαρπη και χρησιμοποιείται για την παραγωγή λαδιού και ως βρώσιμη. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τις αδρόκαρπες ποικιλίες «Γαϊδουρελιά», «Χαλκιδικής», «Κονσερβολιά» και «Καλαμών» που χρησιμοποιούνται μόνο ως βρώσιμες ενώ η «Μεγάρων» χαρακτηρίζεται ως μεσόκαρπη και χρησιμοποιείται για την παραγωγή λαδιού και ως βρώσιμη. Μεταξύ των μικρόκαρπων ποικιλιών που ομαδοποιήθηκαν στην πρώτη ομάδα, ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* (*Πίνακας ΙΙ-6*) κυμάνθηκε από 0,38 μεταξύ των ποικιλιών «Arbequina» και «Κορωνέικη» μέχρι 0,80 μεταξύ των ποικιλιών «Κορωνέικη» και «Μαστοειδής» ενώ μεταξύ των αδρόκαρπων ποικιλιών, οι οποίες ομαδοποιήθηκαν στη δεύτερη ομάδα, ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,33 μεταξύ των ποικιλιών «Μεγάρων» και «Γαϊδουρελιά» μέχρι 0,64 μεταξύ των ποικιλιών «Καλαμών» και «Κονσερβολιά».



Εικόνα II-6: Δενδρογράμμα SSR με τη μέθοδο UPGMA

Το βασικό συμπέρασμα από τα αποτελέσματα του δενδρογράμματος, δείχνουν ότι οι ποικιλίες ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με το μέγεθος του καρπού και την χρήση τους καθώς οι ποικιλίες με μεγάλο μέγεθος καρπών χρησιμοποιούνται κυρίως ως βρώσιμες ενώ οι ποικιλίες με μικρό μέγεθος καρπού χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή λαδιού.

Η ομαδοποίηση των ποικιλιών σύμφωνα με το μέγεθος του καρπού μπορεί να οφείλεται είτε σε ένα κοινό απόγονο των ποικιλιών με μεγάλο μέγεθος καρπού είτε στη μεγάλη γενετική απόσταση των ποικιλιών με μεγάλο μέγεθος καρπού από τις άγριες ποικιλίες (που χαρακτηρίζονται από μικρό μέγεθος καρπού) εξαιτίας μιας δυνατής και μακροχρόνιας φυσικής επιλογής προς μεγαλύτερο μέγεθος καρπών (Besnard *et al.*, 2001b).

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δείχνει ότι υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την ομαδοποίηση ποικιλιών ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση ή το μέγεθος του καρπού και την χρήση τους. Ιδιαίτερα για τις Ελληνικές ποικιλίες οι οποίες υποεκπροσωπούνται στις μελέτες μοριακής διαφοροποίησης του γενετικού υλικού της ελιάς, πολύ λίγα συμπεράσματα είναι γνωστά.

Οι **Hagidimitriou et al., (2005)** μελέτησαν τη γενετική σχέση ανάμεσά σε 26 Ελληνικές και οκτώ ξένες ποικιλίες. Επιλέγοντας AFLP και RAPD εκκινητές, κατέληξαν ότι η γεωγραφική καταγωγή των ποικιλιών δεν είχε επίδραση στην ομαδοποίηση τους και υπήρχε τάση ομαδοποίησης των ποικιλιών βάση του μεγέθους των καρπών και της χρήσης τους. Οι **Montemurro et al., (2005)** χρησιμοποιώντας AFLP και SSR εκκινητές, μελέτησαν 60 ποικιλίες ελιάς προερχόμενες από Ιταλία, Ισπανία Γαλλία και Ελλάδα και ανέφεραν ότι οι ποικιλίες ομαδοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, σύμφωνα με τον τρόπο χρησιμοποίησής τους, σε ελαιοποιήσιμες, βρώσιμες και διπλής χρήσεως. Οι **Ipek et al., (2009)**, μελετώντας Τουρκικές και ξένες ποικιλίες, χρησιμοποιώντας SSR εκκινητές, επίσης αναφέρουν ότι δεν βρέθηκε καμία ομαδοποίηση με βάση τη γεωγραφική προέλευση των ποικιλιών. Οι **Fabbri et al., (1995)** χρησιμοποιώντας RAPD εκκινητές μελέτησαν 17 ποικιλίες, ανάμεσά τους και δύο Ελληνικές και ανέφεραν ότι η απουσία οποιουδήποτε εμφανούς συσχετισμού μεταξύ πολυμορφισμού του DNA και περιοχής προέλευσης της ποικιλίας της ελιάς είναι συνεπής με την υπόθεση ότι κατά τα πρώτα στάδια εξημέρωσης, ποικιλίες ελιάς με επιθυμητά χαρακτηριστικά μεταφέρθηκαν ευρέως από περιοχή σε περιοχή γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, όπως ακριβώς συμβαίνει και στις ημέρες μας.

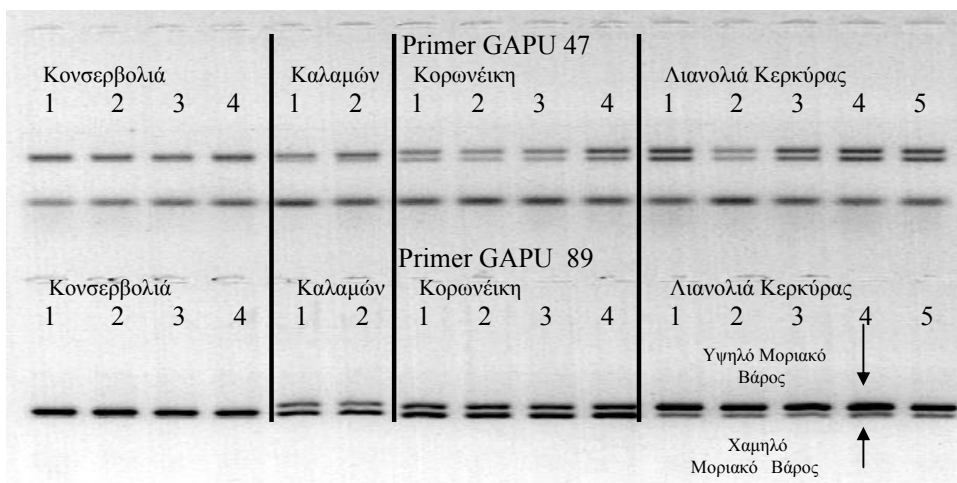
Οι **Roubos et al., (2010)** μελέτησαν 26 Ελληνικές ποικιλίες, χρησιμοποιώντας SSR εκκινητές και κατέληξαν ότι παρατηρήθηκε μικρή σχέση μεταξύ ταξινόμησης ποικιλιών και μεγέθους καρπού και χρήσης. Νωρίτερα, οι **Belaj et al., (2001)** μελέτησαν τον πολυμορφισμό και την δυνατότητα διάκρισης των RAPD εκκινητών σε 51 ποικιλίες ελιάς από πολλές χώρες της Μεσογείου ανάμεσά τους και τις ποικιλίες «Καλαμών», «Κονσερβολιά» και «Κορωνέικη». Τα αποτελέσματα έδειξαν καλή σχέση μεταξύ των ποικιλιών και της γεωγραφική τους προέλευση. Παρόλα αυτά όμως, οι ποικιλίες «Καλαμών» και «Κορωνέικη» δεν εντάχθηκαν σε καμία από τις βασικές ομάδες του δενδρογράμματος, ενώ η ποικιλία «Κονσερβολιά» ομαδοποιήθηκε με μία Ιταλική και δύο Τουρκικές ποικιλίες. Οι **Sarri et al., (2006)**, χρησιμοποιώντας SSR εκκινητές μελέτησαν 118 ποικιλίες, ανάμεσά τους και δέκα Ελληνικές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 75,4% των υπό εξέταση ποικιλιών

ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την γεωγραφική τους προέλευση και διαχωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες (πληθυσμοί προερχόμενοι από ανατολική, κεντρική και δυτική μεσόγειο). Οι **Besnard *et al.*, (2001b)** χρησιμοποιώντας RAPD και RFLP εκκινητές, μελέτησαν τη γενετική σχέση 102 ποικιλιών ελιάς από πολλές χώρες της μεσογείου, ανάμεσά τους και 6 Ελληνικές και συμπέραναν ότι τα προφίλ των ποικιλιών παρουσίασαν σημαντική σχέση τόσο με την τυπική χρήση των καρπών όσο και την γεωγραφική τους προέλευση. Οι σχέσεις αυτές δείχνουν ότι κατά την εξημέρωση του είδους, που διήρκεσε χιλιάδες χρόνια, διατηρήθηκε η μνήμη των κινήσεων που πραγματοποιήθηκαν διαμέσου των μεσογειακών χωρών, σημειώνοντας ότι η επικρατούσα μετακίνηση πραγματοποιήθηκε από τα ανατολικά προς τα δυτικά (**Besnard and Berville, 2000**). Τέλος οι **Besnard *et al.*, (2001a)** χρησιμοποιώντας RAPD εκκινητές μελέτησαν 113 ποικιλίες από πολλές χώρες της Μεσογείου, ανάμεσά τους και 6 Ελληνικές. Κατέληξαν ότι με την μέθοδο UPGMA οι ποικιλίες ομαδοποιούνται στενά χωρίς να είναι δυνατή η διαφοροποίηση τους είτε βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης είτε βάσει της χρήσης τους. Χρησιμοποιώντας όμως την μέθοδο **Ward (1963)** (minimum variance algorithm), οι ποικιλίες διαχωρίστηκαν, βάσει της χρήσης τους, σε 2 μεγάλες ομάδες, και βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης, σε υποομάδες που βρίσκονται μέσα στις προαναφερθείσες 2 μεγάλες ομάδες.

Η ασυμφωνία μεταξύ των διαφόρων γενετικών μελετών αντικατοπτρίζει δύο συμπληρωματικά χαρακτηριστικά της εξημέρωσης της ελιάς. Πρώτον ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της εξέλιξης, ποικιλίες ελιάς με επιθυμητά χαρακτηριστικά μεταφέρθηκαν ευρέως από περιοχή σε περιοχή γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου και δεύτερον ότι από τις τοπικές ποικιλίες (προερχόμενες είτε από μητρικές είτε ως αποτέλεσμα διασταυρώσεων με ποικιλίες από άλλες περιοχές) ακολουθήθηκε μια διαδικασία επιλογής και διασποράς σε πολλές περιοχές. (**Sanz-Cortes *et al.*, 2001**).

Μια δεύτερη παράμετρος που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία ήταν η ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα των τεσσάρων πιο διαδεδομένων στον Ελληνικό χώρο ποικιλιών («Κορωνέικη», «Καλαμών», «Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας») με τη χρήση δύο SSR εκκινητών GAPU 47 και GAPU 89. Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από τέσσερα ελαιόδεντρα της ποικιλίας «Κονσερβολιά», δύο της ποικιλίας «Καλαμών», τέσσερα της ποικιλίας «Κορωνέικη» και πέντε ελαιόδεντρα της ποικιλίας «Λιανολιά Κερκύρας». Όπως παρατηρούμε από την **Εικόνα II-7** οι δύο εκκινητές ενώ σε δια-ποικιλιακό επίπεδο διαφοροποίησαν τις ποικιλίες μεταξύ τους

δίνοντας διαφορετικά αλληλόμορφα προφίλ για κάθε ποικιλία, ενδο-ποικιλιακά, ομαδοποίησαν τα ελαιόδεντρα της κάθε ποικιλίας δίνοντας πανομοιότυπα αλληλόμορφα προφίλ. Πιο συγκεκριμένα, ο εκκινητής GAPU 47 έδωσε τριών ειδών αλληλόμορφα προφίλ διαχωρίζοντας ξεκάθαρα τις ποικιλίες «Καλαμών» και «Κονσερβολιά» από τις υπόλοιπες, ενώ ο εκκινητής GAPU 89 έδωσε 4 διαφορετικά αλληλόμορφα προφίλ διαχωρίζοντας και τις τέσσερις προς μελέτη ποικιλίες. Ειδικότερα για τις ποικιλίες «Καλαμών», «Κορωνέικη» και «Λιανολιά Κερκύρας», και για τον εκκινητή GAPU 89, παρατηρείται ότι τα αλληλόμορφα προφίλ είναι πανομοιότυπα. Παρόλα αυτά ο διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται ανάλογα με την θέση του υψηλού μοριακού βάρους αλληλομόρφου, σε σχέση με αυτό του χαμηλού μοριακού βάρους (**Εικόνα II-7**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα της κάθε ποικιλίας ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους και η γενετική ομοιότητα μέσα στις ποικιλίες ήταν εμφανής όπως και η μεταξύ τους ετερογένεια.



Εικόνα II-7: Ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα τεσσάρων ποικιλιών ελιάς χρησιμοποιώντας τους SSR εκκινητές GAPU 47 και GAPU 89.

Οι μελέτες που αφορούν ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα, όπως αυτές προκύπτουν από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, είναι πολύ περιορισμένες. Οι **Λίνος και Χατζηδημητρίου (2007)** χρησιμοποίησαν τη μέθοδο των RAPD εκκινητών στην ταυτοποίηση και μελέτη της παραλλακτικότητας μητρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεθοδολογία που

ακολουθήθηκε κρίνεται επαρκής για την ταυτοποίηση των μητρικών φυτών, τη μελέτη της ενδοποικιλιακής ομοιομορφίας και την ξεκάθαρη διαφοροποίηση των ποικιλιών. Συγκεκριμένα, ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* εντός των ποικιλιών ήταν μεγαλύτερος από 0,95. Οι **Despotaki et al (2011)** χρησιμοποιώντας RAPD και ISSR εκκινητές μελέτησαν την ενδοποικιλιακή γενετική παραλλακτικότητα δύο κύριων Ελληνικών ποικιλιών ελιάς, της ελαιοποιήσιμης ποικιλίας «Κορωνέικη» και της επιτραπέζιας ποικιλίας «Καλαμών» και κατέληξαν ότι οι Ελληνικές ποικιλίες παρουσιάζουν μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα σε σχέση με τις μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας γεγονός που δείχνει την ομοιογένεια των ποικιλιών. Οι **Τουλουμενίδου κ.ά. (2005)** χρησιμοποιώντας RAPD και ISSR εκκινητές μελέτησαν τη γενετική ποικιλομορφία δειγμάτων ποικιλίας «Καλαμών» και συνωνύμων ποικιλιών από περιοχές της Ελλάδας και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι εντός της ποικιλίας «Καλαμών» υπάρχει χαμηλή γενετική ποικιλομορφία καθώς ο συντελεστής του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,90 έως 1,00. Οι **Gemas et al., (2000)** μελετώντας τις γενετικές σχέσεις αλλά και την ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα των τριών ελαιοποιήσιμων Πορτογαλικών ποικιλιών (*Galega Vulgar*, *Cordovil de Sepra* και *Verdeal Alentejana*), χρησιμοποίησαν 20 RAPD εκκινητές για τον προσδιορισμό των γενετικών σχέσεων ανάμεσα στις τρεις ποικιλίες και 7 RAPD εκκινητές κατά την ανάλυση της ενδοποικιλιακής παραλλακτικότητας. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η τεχνική των RAPD εκκινητών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση του γενετικού υλικού των τριών ποικιλιών. Επιπλέον, επισημαίνουν ότι η μέθοδος των RAPD είναι ικανή να ανιχνεύσει τις διαποικιλιακές σχέσεις χρησιμοποιώντας ένα πολύ περιορισμένο αριθμό δειγμάτων καθώς επίσης και να αναλύει την ενδοποικιλιακή διαφοροποίηση. Τέλος, οι **Martins-Lopes et al., (2009)**, χρησιμοποιώντας 10 RAPD και 10 ISSR εκκινητές, μελέτησαν 120 κλώνους της Πορτογαλικής ποικιλίας *Cobrançosa*. Οι RAPD και οι ISSR εκκινητές έδωσαν 50% και 55% πολυμορφισμού αντίστοιχα και όλοι οι κλώνοι διαχωρίστηκαν. Ο συντελεστής του *Jaccard* κυμάνθηκε μεταξύ 0,69 - 0,99 για τα RAPDs, 0,41 - 0,99 για τα ISSRs και 0,51 - 0,98 για το συνδυασμό τους.

Το τρίτο βήμα στο συγκεκριμένο ερευνητικό κομμάτι περιελάμβανε τη χρήση μοριακών δεικτών SSR και RAPD σε DNA απομονωμένο από νέα φύλλα Απριλίου, πράσινους και μαύρους καρπούς προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα ταυτοποίησης των καρπών των δέκα προς εξέταση ποικιλιών ελιάς.

Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν οι δύο αυτοί εκκινητές, είναι γιατί στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος παρέχοντας ευρύτερη κάλυψη σε μια ολοκληρωμένη ανάλυση. Οι βιβλιογραφικές αναφορές, σχετικά με την ταυτοποίηση καρπών, είναι πολύ περιορισμένες, καθώς η πλειοψηφία των μελετών, ως αρχικό γενετικό υλικό, χρησιμοποιεί κατά κύριο λόγο νέα φύλλα και λάδι.

Στη μελέτη των προϊόντων της ελιάς (λαδιού και καρπών) με μοριακούς δείκτες, μία κρίσιμη πτυχή που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η εξαγωγή καλού τόσο σε ποσότητα όσο και ποιότητα DNA. Γενικότερα, τόσο το λάδι όσο και οι καρποί, δίνουν μικρή ποσότητα DNA χαμηλής ποιότητας. Επιπρόσθετα, υπολείμματα φαινολικών ενώσεων, πολυσακχαριτών και λιπιδίων, μπορεί να αναστείλουν τη δραστηριότητα της πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και αυτό να οδηγήσει σε αναξιόπιστα αποτελέσματα (**Wilson, 1997; Rossen et al., 1992**). Όπως έχουμε ήδη αναφέρει οι SSR εκκινητές δεν απαιτούν ούτε υψηλή ποιότητα ούτε και μεγάλες ποσότητες DNA προκειμένου να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα γεγονός που τους καθιστά ιδανικούς δείκτες σε μελέτες ταυτοποίησης των προϊόντων της ελιάς. Επιπλέον λόγω της χρήσης μεγάλων σε μήκος εκκινητών (22-28 νουκλεοτιδίων) παρουσιάζουν και υψηλή επαναληψιμότητα. Οι RAPD εκκινητές είναι μια απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους μοριακή τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στη μελέτη των γενετικών σχέσεων μεταξύ των ποικιλιών της ελιάς που απαιτεί όμως καθαρό, υψηλού μοριακού βάρους DNA (**Spooner et al., 2005**). Η χαμηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων είναι μία ακόμη αρνητική όψη της τεχνικής των RAPDs. (**Schierwater & Ender, 1993; Jones et al., 1997**).

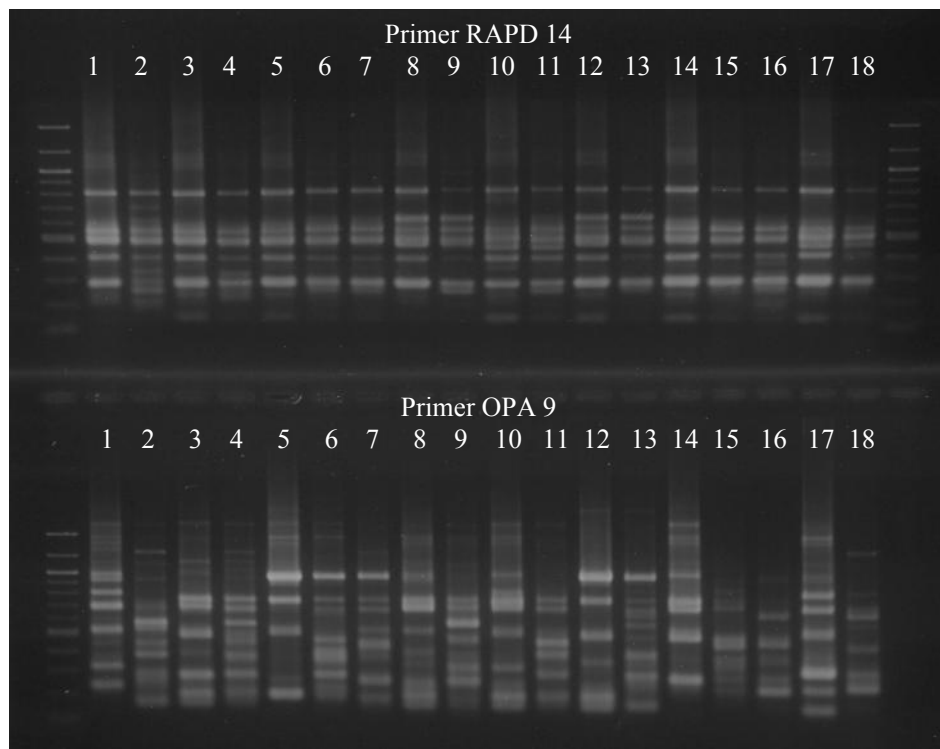
Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 6 RAPD εκκινητές και 3 ζευγάρια εκκινητών SSR. Από τους 6 RAPD εκκινητές προέκυψαν συνολικά 60 πολυμορφικά τμήματα DNA ενώ από τα 3 ζευγάρια εκκινητών SSR προέκυψαν συνολικά 12 αλληλόμορφοι (**Πίνακας II-7**).

Πίνακας ΙΙ-7: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις των RAPDs και SSRs και ο αριθμός των πολυμορφικών τμημάτων ανά εκκινητή RAPD και αλληλομόρφων ανά SSR εκκινητή.

Εκκινητές	Αλληλουχία Βάσεων	Αριθμός Πολυμορφικών Τμημάτων DNA
RAPD		
1. RAPD 14	ACGCTGCGAC	12
2. OPAH 17	CAGTGGGGAG	12
3. OPA 9	TGTAGCTGGG	11
4. RAPD 12	TAAGTTGGTA	8
5. RAPD 1	TCCGCAACCA	7
6. OPB 11	GTAGACCCGT	10
	Σύνολο	60
SSR		
		Αριθμός Αλληλομόρφων
1. GAPI101	(GA)8(G)3(AG)3	3
2. GAPI103	(TC)26	6
3. GAPI47	(CT)16	3
	Σύνολο	12

Παρακάτω παρουσιάζονται ηλεκτρογραφήματα των RAPD εκκινητών, RAPD 14 και OPA 9 (*Εικόνες ΙΙ-8, ΙΙ-9*) και SSR εκκινητών, GAPI 103 και GAPI 101 (*Εικόνες ΙΙ-10, ΙΙ-11 & ΙΙ-12*).

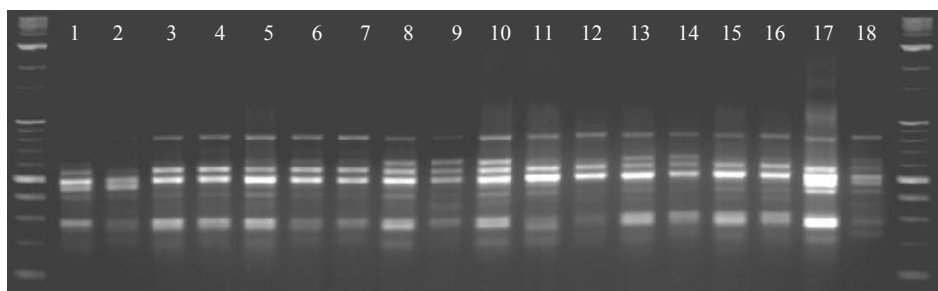
Οι RAPD εκκινητές έδωσαν προϊόντα με παρόμοια πρότυπα μεταξύ φύλλων και καρπών της ίδιας ποικιλίας, ενώ οι SSR εκκινητές έδωσαν πανομοιότυπα πρότυπα αλληλομόρφων μεταξύ φύλλων, πράσινων και μαύρων καρπών της ίδιας ποικιλίας. Οι διαφορές των RAPD προτύπων μεταξύ των φύλλων και των καρπών της ίδιας ποικιλίας μπορεί να οφείλονται είτε σε μερική καταστροφή του DNA είτε σε διαφορές στην ποσότητα του DNA των φύλλων & των καρπών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Οι αριθμοί που εμφανίζονται στα ηλεκτρογραφήματα αντιστοιχούν στις ποικιλίες, όπως αυτές παρουσιάζονται στους *Πίνακες ΙΙ-8, ΙΙ-9 & ΙΙ-10*.



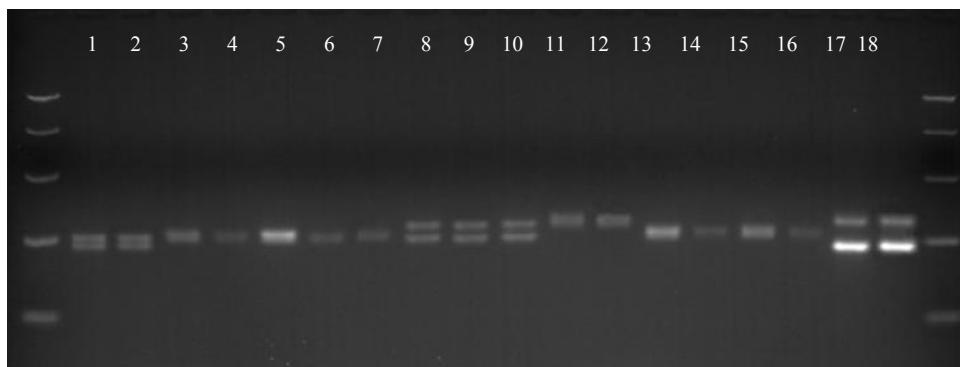
Εικόνα ΙΙ-8: Ηλεκτρογράφημα RAPD προϊόντων των εκκινητών RAPD14 και OPA9. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον **Πίνακα ΙΙ-8**

Πίνακας ΙΙ-8: Δείγματα φύλλων και καρπών ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στο ηλεκτρογράφημα της **Εικόνας ΙΙ-8**

1	Μεγάρων – φύλλα	7	Αρbequina- μαύρος καρπός	13	Λιανολιά Κερκύρας- πράσινος καρπός
2	Μεγάρων – μαύρος καρπός	8	Αδραμυττινή- φύλλα	14	Μαστοειδής - φύλλα
3	Κορωνέικη – φύλλα	9	Αδραμυττινή- μαύρος καρπός	15	Μαστοειδής – πράσινος καρπός
4	Κορωνέικη πράσινος καρπός	10	Χαλκιδικής – φύλλα	16	Μαστοειδής – μαύρος καρπός
5	Αρbequina- φύλλα	11	Χαλκιδικής – μαύρος καρπός	17	Γαϊδουρελιά- φύλλα
6	Αρbequina- πράσινος καρπός	12	Λιανολιά Κερκύρας- φύλλα	18	Γαϊδουρελιά- μαύρος καρπός



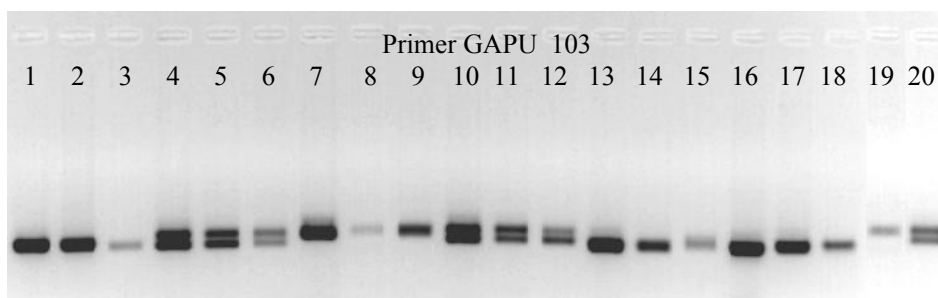
Εικόνα ΙΙ-9: Ηλεκτρογράφημα RAPD προϊόντων του εκκινητή RAPD14. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα ΙΙ-9.



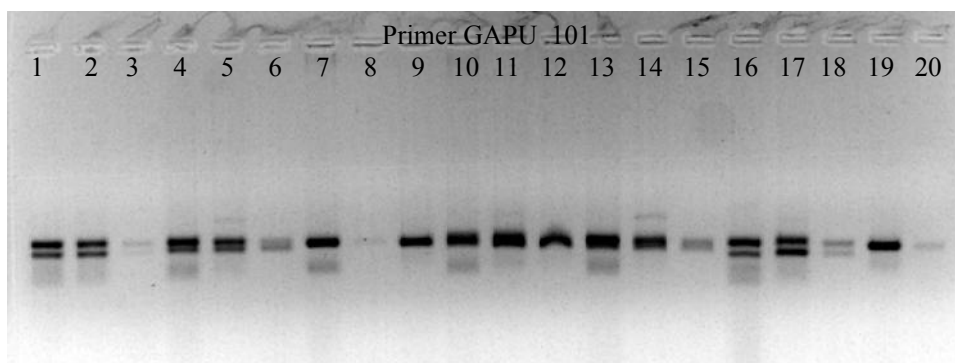
Εικόνα ΙΙ-10: Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων του εκκινητή GAPU 103. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα ΙΙ-9.

Πίνακας ΙΙ-9: Δείγματα φύλλων και καρπών ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα ηλεκτρογραφήματα των **Εικόνων ΙΙ-9** και **ΙΙ-10**.

1	Χαλκιδικής- φύλλα	7	Αρbequina- μαύρος καρπός	13	Λιανολιά Κερκύρας- φύλλα
2	Χαλκιδικής- πράσινος καρπός	8	Αδραμυττινή- φύλλα	14	Λιανολιά Κερκύρας- πράσινος καρπός
3	Μαστοειδής- φύλλα	9	Αδραμυττινή- πράσινος καρπός	15	Κορωνέικη- φύλλα
4	Μαστοειδής- πράσινος καρπός	10	Αδραμυττινή- μαύρος καρπός	16	Κορωνέικη- πράσινος καρπός
5	Αρbequina- φύλλα	11	Μεγάρων- φύλλα	17	Γαϊδουρελιά- φύλλα
6	Αρbequina- πράσινος καρπός	12	Μεγάρων- πράσινος καρπός	18	Γαϊδουρελιά- πράσινος καρπός



Εικόνα ΙΙ-11: Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων του εκκινητή GAPU 103. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα ΙΙ-10.



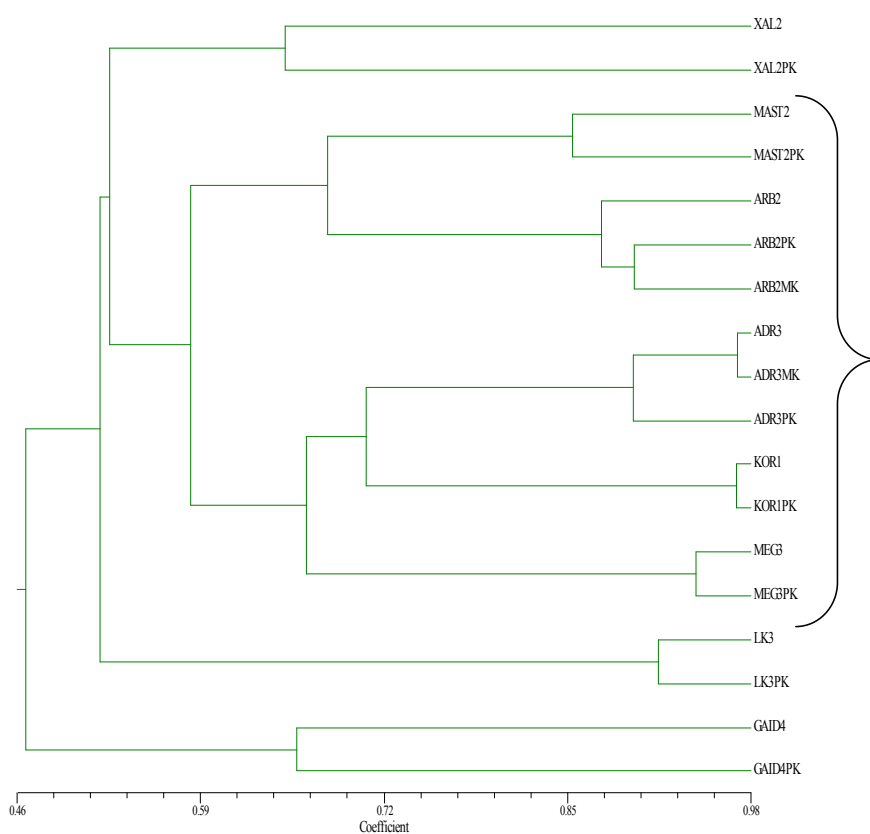
Εικόνα ΙΙ-12: Ηλεκτρογράφημα SSR αλληλόμορφων του εκκινητή GAPU 101. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ποικιλίες όπως αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα ΙΙ-10.

Πίνακας ΙΙ-10 : Δείγματα φύλλων και καρπών ποικιλιών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στα ηλεκτρογραφήματα των **Εικόνων ΙΙ-11** και **ΙΙ-12**

1	Arbequina- φύλλα	8	Κονσερβολιά - πράσινος καρπός	15	Κορωνέικη- μαύρος καρπός
2	Arbequina- πράσινος καρπός	9	Κονσερβολιά - μαύρος καρπός	16	Λιανολιά Κερκύρας- φύλλα
3	Arbequina- μαύρος καρπός	10	Καλαμών - φύλλα	17	Λιανολιά Κερκύρας- πράσινος καρπός
4	Αδραμυττινή- φύλλα	11	Καλαμών - πράσινος καρπός	18	Λιανολιά Κερκύρας- μαύρος καρπός
5	Αδραμυττινή- πράσινος καρπός	12	Καλαμών - μαύρος καρπός	19	Κονσερβολιά (Εμπορίου)
6	Αδραμυττινή- μαύρος καρπός	13	Κορωνέικη- φύλλα	20	Καλαμών (Εμπορίου)
7	Κονσερβολιά - φύλλα	14	Κορωνέικη- πράσινος καρπός		

Στις **Εικόνες II-11 & II-12** τα δείγματα με αριθμό 19 και 20 είναι καρποί «Κονσερβολιάς» και «Καλαμών» αντίστοιχα αγορασμένοι από το εμπόριο, προκειμένου αυτοί να ταυτοποιηθούν. Όπως ξεκάθαρα φαίνεται στις **Εικόνες II-11 & II-12** τα αλληλόμορφα προφίλ των δύο αυτών δειγμάτων είναι πανομοιότυπα με τα αλληλόμορφα προφίλ των ποικιλιών «Κονσερβολιά» και «Καλαμών».

Ακολουθώντας τη μέθοδο UPGMA, προέκυψε το δενδρόγραμμα της **Εικόνας II-13** όπου παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των φύλλων με τους πράσινους και μαύρους καρπούς της ίδιας ποικιλίας, όπως προέκυψε από τη χρήση RAPD δεικτών. Και σε αυτό το δενδρόγραμμα όπως και στο δενδρόγραμμα της **Εικόνας II-6** παρατηρείται ομαδοποίηση των μικρόκαρπων και των μεσόπαρπων ποικιλιών σε μία μεγάλη ομάδα με εξαίρεση την «Λιανολιά Κερκύρας» που διαφοροποιείται σε διαφορετικό κλάδο του δενδρογράμματος από την υπόλοιπη ομάδα των μικρόκαρπων και των μεσόπαρπων ποικιλιών.



Εικόνα II-13 : Δενδρόγραμμα με την μέθοδο UPGMA για τους RAPD δείκτες.

Οι **Pasqualone et al., (2001)**, χρησιμοποιώντας ISSR εκκινητές, ταυτοποίησαν καρπούς δέκα Ιταλικών ποικιλιών. Τα ηλεκτροφορητικά μοτίβα που παρουσιάστηκαν μεταξύ καρπών και φύλλων της ίδιας ποικιλίας ήταν πανομοιότυπα. Ένας περαιτέρω καθαρισμός του DNA που προήλθε από τους καρπούς ήταν απαραίτητος, καθώς ουσίες όπως φαινολικές ενώσεις και λίπη, που παρεμποδίζουν την αντίδραση της PCR, ήταν παρόντα. Οι **Muzzalupo et al., (2007)**, χρησιμοποιώντας SSR εκκινητές, ταυτοποίησαν φύλλα, καρπούς και λάδι της ποικιλίας Ogliarola salentina. Τα ηλεκτροφορητικά μοτίβα που παρουσιάστηκαν μεταξύ φύλλων καρπών και ελαιόλαδου της ίδιας ποικιλίας ήταν πανομοιότυπα. Και σε αυτή τη μελέτη όπως και στους **Pasqualone et al., (2001)** περαιτέρω καθαρισμός του DNA των καρπών και του ελαιόλαδου ήταν απαραίτητος προκειμένου να απομακρυνθούν οι ουσίες που παρεμποδίζουν την αντίδραση της PCR.

II.12. Συμπεράσματα

Η εφαρμογή της μεθόδου των μοριακών δεικτών SSR προκειμένου να διαχωριστούν οι δέκα προς μελέτη ποικιλίες κρίθηκε αποτελεσματική. Οι ποικιλίες διαχωρίστηκαν μεταξύ τους και ομαδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες σύμφωνα με το μέγεθος του καρπού και την χρήση τους. Μεταξύ των μικρόκαρπων ποικιλιών που ομαδοποιήθηκαν στην πρώτη ομάδα, ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,38 μεταξύ των ποικιλιών «Arbequina» και «Κορωνέικη» έως 0,80 μεταξύ των ποικιλιών «Κορωνέικη» και «Μαστοειδής» ενώ μεταξύ των αδρόκαρπων ποικιλιών, οι οποίες ομαδοποιήθηκαν στη δεύτερη ομάδα, ο συντελεστής ομοιότητας του *Jaccard* κυμάνθηκε από 0,33 μεταξύ των ποικιλιών «Μεγάρων» και «Γαΐδουρελιάς» έως 0,64 μεταξύ των ποικιλιών «Καλαμών» και «Κονσερβολιά».

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε επίσης η ενδοποικιλιακή παραλλακτικότητα των τεσσάρων πιο διαδεδομένων στον Ελληνικό χώρο ποικιλιών («Κορωνέικη», «Καλαμών», «Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας») με τη χρήση SSR εκκινητών. Οι εκκινητές ενώ σε δια-ποικιλιακό επίπεδο διαφοροποίησαν τις ποικιλίες μεταξύ τους δίνοντας διαφορετικά αλληλόμορφα προφίλ για κάθε ποικιλία, ενδο-ποικιλιακά, ομαδοποίησαν τα ελαιόδεντρα της κάθε ποικιλίας δίνοντας πανομοιότυπα αλληλόμορφα προφίλ.

Τέλος στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε, για πρώτη φορά σε Ελληνικές ποικιλίες, η ταυτοποίηση πράσινων και μαύρων καρπών με την χρήση RAPD και SSR εκκινητών χρησιμοποιώντας τα PCR πρότυπα αντιστοίχως από DNA που απομονώθηκε από φύλλα. Οι RAPD εκκινητές έδωσαν προϊόντα με παρόμοια πρότυπα ενώ οι SSR εκκινητές έδωσαν πανομοιότυπα πρότυπα αλληλομόρφων μεταξύ φύλλων και καρπών της ίδιας ποικιλίας. Οι λόγοι για τους οποίους τα RAPDs παρουσιάζουν παρόμοια και όχι πανομοιότυπα πρότυπα είναι η χαμηλή επαναληψιμότητα που παρουσιάζουν γενικότερα ως εκκινητές, καθώς και το γεγονός ότι τα RAPDs γενικά απαιτούν καθαρό, υψηλού μοριακού βάρους DNA που στην περίπτωση της απομόνωσης του DNA από τους καρπούς της ελιάς οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη, πρωτεΐνες και φαινόλες, δεν είναι πάντα εφικτό. Και οι δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ταυτοποίηση και ιχνηλασία των καρπών της ελιάς, αλλά οι δείκτες SSR, που έδωσαν πανομοιότυπα πρότυπα κρίνονται πιο αξιόπιστοι. Το γεγονός αυτό, πιστοποιείται και από την επιτυχή ταυτοποίηση των καρπών των ποικιλιών «Καλαμών» και «Κονσερβολιάς» που αγοράστηκαν από το εμπόριο, με τα φύλλα των ποικιλιών αυτών καθώς τα αλληλόμορφα προφίλ των δύο αυτών δειγμάτων ήταν πανομοιότυπα με τα αλληλόμορφα προφίλ των ποικιλιών «Κονσερβολιά» και «Καλαμών». Η απουσία διεθνούς και Ελληνικής βιβλιογραφίας σχετικά με την ταυτοποίηση πράσινων και μαύρων καρπών, καθιστά τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής μελέτης πολύ σημαντικά, στον τομέα ιχνηλασίας των προϊόντων της ελιάς ιδιαιτέρως αν ληφθεί υπ' όψη η σημαντικότητα της καλλιέργειας της ελιάς στον Ελλαδικό χώρο.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ & ΕΠΟΧΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ & ΕΝΤΟΣ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΕΛΙΑΣ

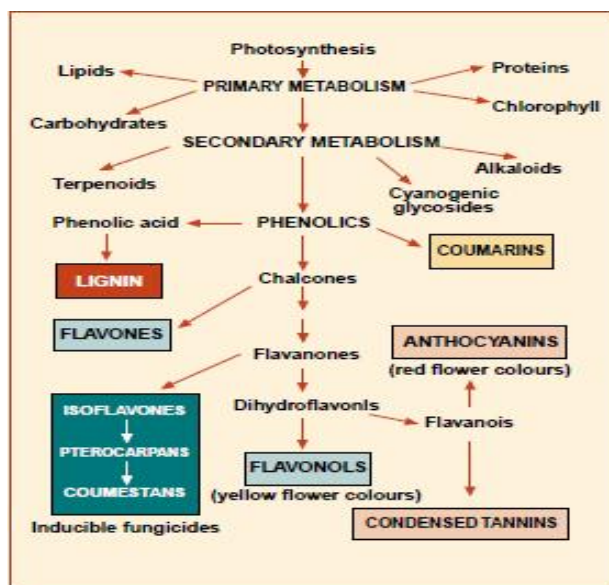
ΙΙΙ.1. Εισαγωγή

Τα προϊόντα της ελιάς, επιτραπέζιες ελιές και ελαιόλαδο, παίζουν σημαντικό κοινωνικοοικονομικό ρόλο στη χώρα μας και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διαίτας, μιας διαίτας με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοενεργές ουσίες όπως βιταμίνες, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες. Τα τελευταία χρόνια οι φαινολικές ουσίες έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

ΙΙΙ.2. Φαινολικές Ενώσεις ως Αποτέλεσμα Δευτερογενούς Μεταβολισμού

Τα ανώτερα φυτά συσσωρεύουν στα κύτταρά τους ένα ευρύ φάσμα χημικών δομών οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις ενώσεις εκείνες που είναι αποτέλεσμα πρωτογενούς μεταβολισμού των φυτών όπως πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες, καθώς και σε εκείνες τις ενώσεις που είναι αποτέλεσμα δευτερογενούς μεταβολισμού όπως φαινολικά, τερπενοειδή και αλκαλοειδή. Στο *Διάγραμμα ΙΙΙ-1* εμφανίζεται η συσχέτιση πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού των ανώτερων φυτών (Morris *et al.*, 1997).

Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται βιοσυνθετικά από το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων. Συνεπώς ο όρος “δευτερογενή προϊόντα” οφείλεται στη βιοσύνθεση αυτών και όχι στη σημασία τους για τα φυτά. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω έχει πλέον επιβεβαιωθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις συνδέονται στενά με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών και με μία πλειάδα οικολογικών ρόλων, όπως εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων, επικοινωνία κ.ά.



Διάγραμμα ΙΙΙ-1: Συσχέτιση πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών (Morris et al., 1997)

ΙΙΙ.3. Ορισμός Φαινολικών Ενώσεων

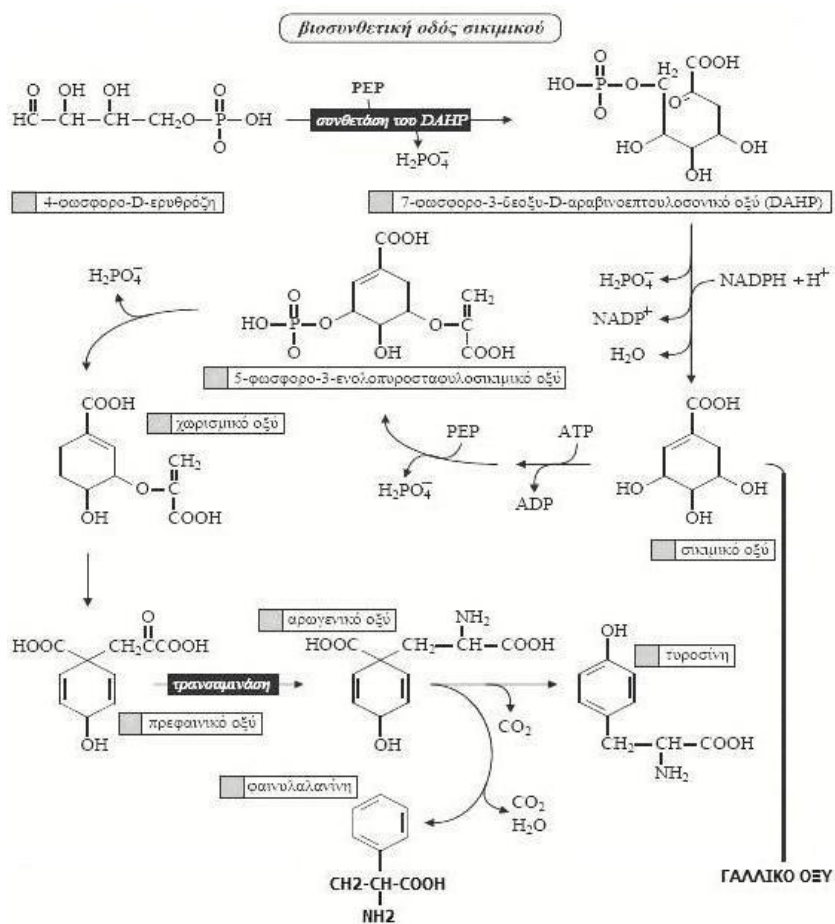
Ως φαινολικές ενώσεις, προσδιορίζεται μια κατηγορία χημικών ενώσεων που η δομή τους χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου ο οποίος φέρει μια ή περισσότερες προς αντικατάσταση υδροξυλομάδες συμπεριλαμβανομένων και των παραγώγων τους (εστέρες, μεθυλεστέρες κ.ά.). Ο ορισμός αυτός δεν κρίνεται ικανοποιητικός καθώς περιλαμβάνει και τις τερπενοειδείς ενώσεις. Ο ορισμός που έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια είναι ότι ως “φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται οι ενώσεις εκείνες που προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου” (Ryan et al., 1999).

Οι χημικές δομές κυμαίνονται, από πολύ απλές ενώσεις όπως το καφεϊκό οξύ, μέχρι υψηλού πολυμερισμού και μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις όπως οι τανίνες. Οι φαινολικές ενώσεις συνήθως βρίσκονται είτε με τη μορφή γλυκοζιτών, με ένα ή περισσότερα σάκχαρα (για το λόγο αυτό είναι συνήθως υδατοδιαλυτές) σαν υποκαταστάτες της υδροξυλομάδας, είτε άμεσα συνδεδεμένα με κάποιο άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου, είτε ως αγλυκόνες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη κι ολιγοσακχαρίτης.

Το σάκχαρο που συναντάται πιο συχνά σαν υποκατάστατης είναι η γλυκόζη, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια.

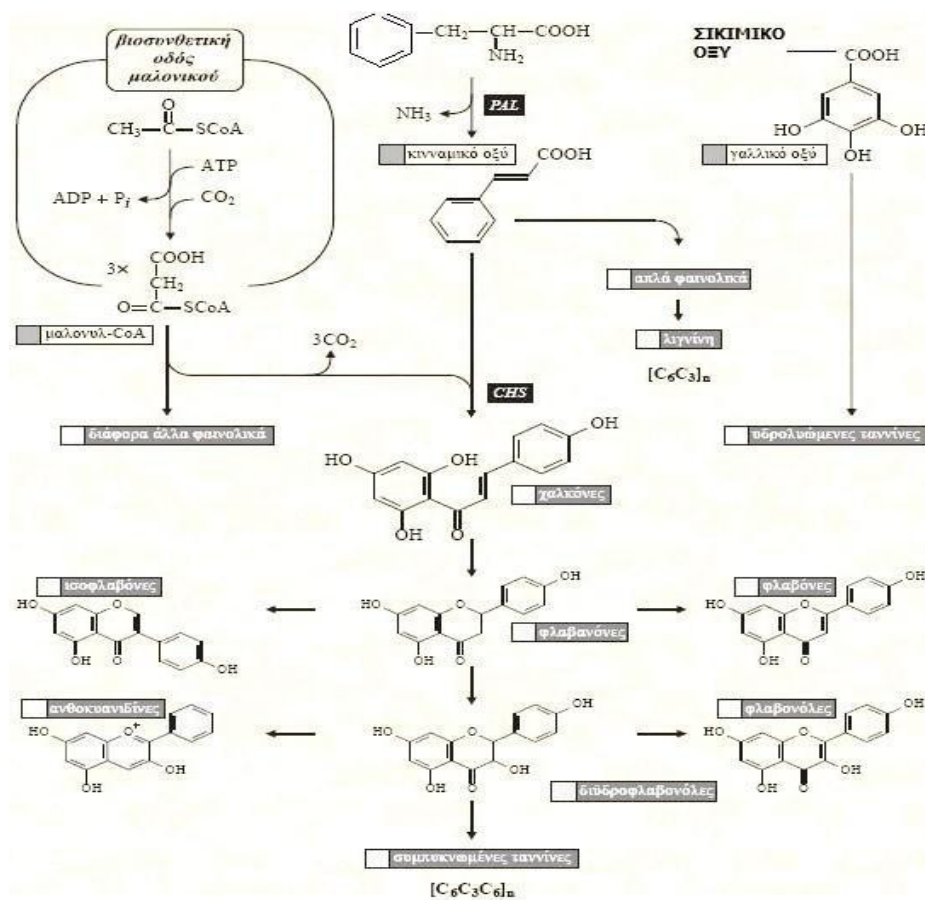
ΙΙΙ.4. Βιοσύνθεση Φαινολικών Ενώσεων

Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις έχουν ως πρόδρομο μόριο την φαινυλαλανίνη, η οποία συντίθεται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος (Σχήμα ΙΙΙ-1).



Σχήμα ΙΙΙ-1: Βιοσυνθετική οδός σικιμικού οξέος (Καραμπουρνιώτης, 2002).

Σε ορισμένες περιπτώσεις ο σκελετός άνθρακα πολυπλοκότερων φαινολικών μορίων συναρμολογείται από απλούστερες δομικές μονάδες που προέρχονται από διαφορετικές βιοσυνθετικές οδούς του πρωτογενούς μεταβολισμού. Έτσι, στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και όλων των συναφών παραγώγων μορίων, συνεργάζονται οι βιοσυνθετικές οδοί του σικιμικού και του μαλονικού οξέος (**Σχήμα ΙΙΙ-2**).



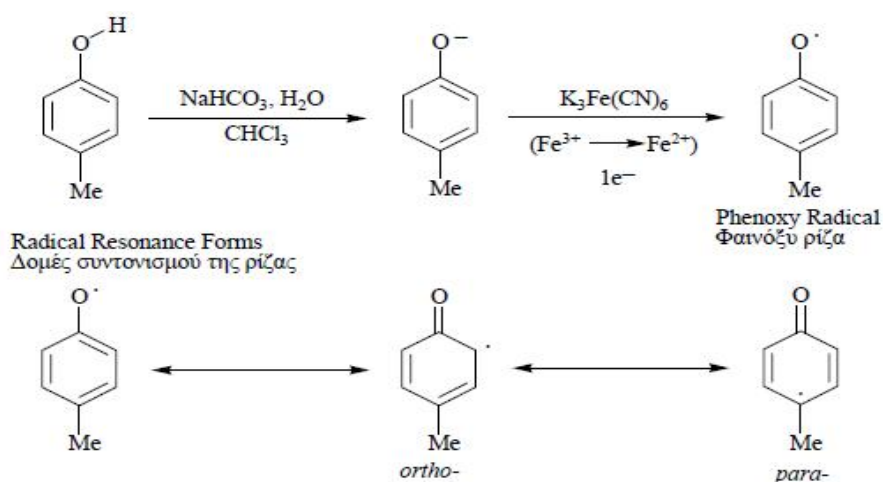
Σχήμα ΙΙΙ-2: Βιοσυνθετική οδός φαινυλαλανίνης και φαινυλοπροπανοειδών (Καραμπουρνιώτης, 2002)

Μια σημαντική ιδιότητα των φαινολικών υδροξυλομάδων είναι η οξύτητά τους, που οφείλεται στην τάση διάσπασης του δεσμού μεταξύ οξυγόνου και υδρογόνου με σχηματισμό του αρνητικά φορτισμένου ιόντος φαινοξειδίου (**Σχήμα**

III-3). Το φαινοξείδιο παρουσιάζει αυξημένη υδατοδιαλυτότητα, κυρίως υπό την παρουσία απλών μεταλλοκατιόντων π.χ. νατρίου κ.ά..

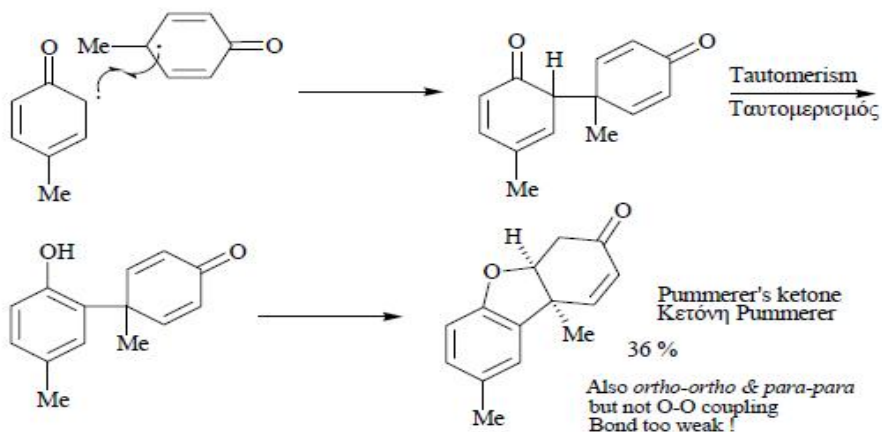


Σχήμα ΙΙΙ-3: Αντίδραση σχηματισμού του φαινοξειδίου ArO⁻



Phenolic oxidative coupling is "joining the dots" from two phenoxy radicals.
Φαινολική οξειδωτική σύζευξη "ενώνει τις τελειες" από δύο φαινόξυ ρίζες.

Eg.: *ortho-para* coupling - σύζευξη



Σχήμα ΙΙΙ-4: Φαινολική οξειδωτική σύζευξη
(<http://www2.ucy.ac.cy/~koutenti/TEACHING/lectures/>)

Ανάμεσα στις σημαντικές ιδιότητες των φαινολών περιλαμβάνονται και οι παρακάτω:

1. Η δυνατότητα απεντοπισμού του ιόντος φαινοξειδίου, δηλαδή η κίνηση του αρνητικού φορτίου στον αρωματικό δακτύλιο και ο σχηματισμός ημικινονικών ανιόντων όπου το φορτίο βρίσκεται σε άτομο άνθρακα αντί σε άτομο οξυγόνου. Τέτοια αρνητικά φορτισμένα κέντρα μπορούν να έλκουν θετικά φορτισμένες (ηλεκτρονιόφιλες) αλκυλικές ομάδες.
2. Η δυνατότητα του ιόντος φαινοξειδίου να αποβάλει ένα ακόμα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσει μια ρίζα που επίσης εμφανίζει το φαινόμενο του απεντοπισμού. Δύο τέτοιες ρίζες μπορούν να ακολουθήσουν μια διαδικασία γνωστή ως οξειδωτική σύζευξη όπου σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα ή άνθρακα υδρογόνου (*Σχήμα ΙΙΙ-4*).
3. Η ικανότητα των φαινολών να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με άλλα μόρια με αλληλεπίδραση του όξινου (θετικά φορτισμένου) φαινολικού υδρογόνου και βασικών (αρνητικά φορτισμένων) κέντρων των άλλων μορίων. π.χ. η αλληλεπίδραση μεταξύ καφεΐνης και τριών μορίων γαλλικού οξέος.

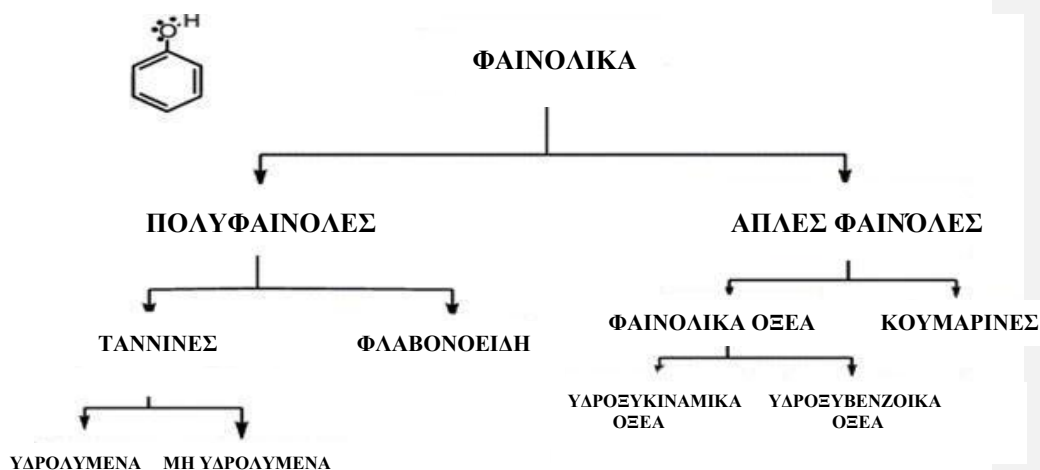
ΙΙΙ.5. Κατηγοριοποίηση Φαινολικών Ενώσεων

Η κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων εμφανίζεται στη βιβλιογραφία με διάφορους τρόπους. Οι **Urquiaga & Leighton (2000)**, κατηγοριοποίησαν τις φαινολικές ενώσεις ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο τους (*Πίνακας ΙΙΙ-1*) ενώ οι **Scalbert & Williamson (2000)**, σύμφωνα με τη χημική δομή του μορίου τους και το είδος του ανθρακικού σκελετού.

Ένας ακόμη τρόπος κατηγοριοποίησης των φαινολικών ενώσεων είναι, ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν (*Σχήμα ΙΙΙ-5*), οπότε και διακρίνονται σε απλές φαινόλες, εάν περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο και σε πολυφαινόλες, εάν περιέχουν περισσότερους. Οι απλές χωρίζονται σε φαινολικά οξέα και σε κουμαρίνες, ενώ οι πολυφαινόλες σε φλαβονοειδή (πολυφαινόλες με δύο αρωματικούς δακτυλίους) και ταννίνες (πολυφαινόλες με τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους) (**Robbins, 2003; Lee & Widmer, 1996**).

Πίνακας ΙΙΙ-1: Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο τους (Urquiaga & Leighton, 2000).

Number of carbon atoms	Basic skeleton	Class	Examples
6	C6	Simple phenols Benzoquinones	Catechol, hydroquinone 2,6-Dimethoxybenzoquinone
7	C6-C1	Phenolic acids	Gallic, salicylic
8	C6-C2	Acetophenones Tyrosine derivatives Phenylacetic acids	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde Tyrosol, p-Hydroxyphenylacetic
9	C6-C3	Hydroxycinnamic acids Phenylpropenes Coumarins Isocoumarins Chromones	Caffeic, ferulic Myristicin, eugenol Umbelliferone, aesculetin Bergenon Eugenin
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone, plumbagin
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Stilbenes Anthraquinones	Resveratrol Emodin
15	C6-C3-C6	Flavonoids Isoflavonoids	Quercetin, cyanidin Genistein
18	(C6-C3) ₂	Lignans Neolignans	Pinoresinol Eusiderin
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoids	Amentoflavone
N	(C6-C3) _n (C6) _n (C6-C3-C6) _n	Lignins Catechol melanins Flavolans (Condensed Tannins)	



Σχήμα ΙΙΙ-5: Κατηγοριοποίηση των φαινολικών ενώσεων ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων (Robbins, 2003).

Επίσης, υπάρχει και η κατηγορία των **σεκοϊριδοειδών** ενώσεων που απαντά αποκλειστικά σε φυτά της οικογένειας *Oleaceae* και περιλαμβάνει ενώσεις όπως η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροζίτης (ligstroside) (Soler-Rivas *et al.*, 2000).

ΙΙΙ.6. Κύριες Κατηγορίες Φαινολικών Συστατικών

ΙΙΙ.6.1. Απλές Φαινόλες C₆

Πρόκειται για τις φαινόλες εκείνες που αποτελούνται από ένα αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες (**Σχήμα ΙΙΙ-6**). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η υδροκινόνη και η κατεχόλη). Η υδροκινόνη είναι αξιόλογος λευκαντικός, φαρμακευτικός και καλλυντικός παράγοντας (αναλόγως των συγκεντρώσεων) καθώς δρα κατά των υπερμελαγχρώσεων του δέρματος. Η κατεχόλη, αποτελεί συχνά μέρος πιο σύνθετων μορίων.



Σχήμα ΙΙΙ-6: Απλές Φαινόλες (δι-υδροξύ ενώσεις): κατεχόλη, ρεσορκινόλη και υδροκινόνη

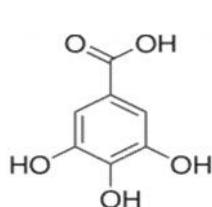
ΙΙΙ.6.2. Φαινολικά Οξέα (C₆-C₁ & C₆-C₃)

Στα φαινολικά οξέα ο αρωματικός δακτύλιος μπορεί να φέρει ως υποκαταστάτες είτε καρβοξυλικό οξύ (παράγωγα βενζοϊκού οξέος με σκελετό C₆-C₁), προπενικό οξύ (παράγωγα κινναμωμικού οξέος με σκελετό C₆-C₃), είτε αλδεϋδομάδα (**Πίνακας ΙΙΙ-2**).

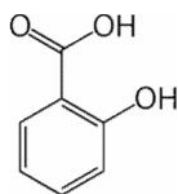
Πίνακας ΙΙΙ-2 : Τα κυριότερα φαινολικά οξέα (Robbins, 2003).

R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	code	common name
H	H	H	H	a	1	cinnamic acid
-OH	H	H	H	a	2	<i>o</i> -coumaric acid
H	H	-OH	H	a	3	<i>p</i> -coumaric acid
H	-OH	H	H	a	4	<i>m</i> -coumaric acid
H	-OCH ₃	-OH	H	a	5	ferulic acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	6	sinapic acid
H	-OH	-OH	H	a	7	caffeic acid
H	H	H	H	b	8	benzoic acid
-OH	H	H	H	b	9	salicylic acid
H	H	-OH	H	b	10	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
H	-OCH ₃	-OH	H	b	11	vanillic acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	12	syringic acid
H	-OH	-OH	H	b	13	protocatechuic acid
-OH	H	H	-OH	b	14	gentisic acid
-OH	-OH	-OH	-OH	b	15	gallic acid
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	16	veratric acid
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	17	syringaldehyde
H	-OCH ₃	-OH	H	c	18	vanillin

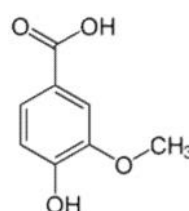
Υδροξυβενζοϊκά παράγωγα (C₆-C₁) (π.χ. π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, βανιλικό οξύ) είναι απλές φαινόλες οι οποίες φέρουν μία καρβοξυλική ομάδα (Σχήμα ΙΙΙ-7). Η πιο σημαντική φαινόλη σε αυτή την κατηγορία είναι το γαλλικό οξύ, στο οποίο η παράπλευρη ανθρακική αλυσίδα είναι ένα καρβοξυλικό οξύ (Vermerris & Nicholson, 2008).



Γαλλικό οξύ



Σαλικυλικό οξύ



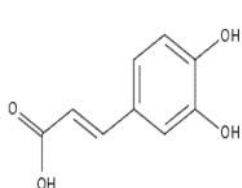
Βανιλικό οξύ

Σχήμα ΙΙΙ-7: Υδροξυβενζοϊκά παράγωγα: γαλλικό οξύ, σαλικυλικό οξύ και βανιλικό οξύ

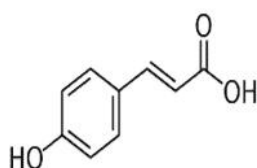
Το γαλλικό οξύ και η διμερής του μορφή το ελλαγικό οξύ αποτελούν τα κύρια συστατικά των υδρολυόμενων ταννινών (Strack, 1997). Επειδή είναι οξέα, έχουν την ικανότητα να ενώνονται με ενώσεις που περιέχουν υδροξυλομάδα/ες (φαινόλες, αλκοόλες) και να σχηματίζουν εστέρες (Shahidi, 2000). Τα υδροξυβενζοϊκά παράγωγα (C₆-C₁) όπως και τα υδροξυκιναμωμικά παράγωγα (C₆-C₃) που

αναφέρονται πιο κάτω, μπορεί να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή (σπάνια) ή δεσμευμένα με δομικά συστατικά του φυτού όπως κυτταρίνη, πρωτεΐνες, λιγνίνη καθώς επίσης και με μικρότερα οργανικά μόρια όπως γλυκόζη, οργανικά οξέα και με άλλα φυτικά προϊόντα όπως τερπένια. Βρίσκονται σε όλα τα μέρη του φυτού όπως σπόρους, τα φύλλα, τα άνθη και το βλαστό (Strack, 1997).

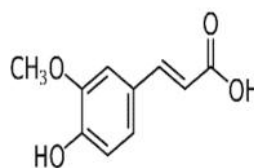
Τα υδροξυκιναμωμικά παράγωγα (C_6-C_3) φέρουν ένα αρωματικό σύστημα στο οποίο είναι προσκολλημένη μία πλευρική αλυσίδα από τρία άτομα άνθρακα. Σε αυτά ανήκουν τα: κινναμωμικά οξέα, κινναμωμικές αλδεΐδες, κινναμωμικές αλκοόλες. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας ονομάζονται φαινυλοπροπένια και φαινυλοπροπάνια, ανάλογα με την ύπαρξη (στην περίπτωση των φαινυλοπροπενίων) ή απουσία (στην περίπτωση των φαινυλοπροπανίων) διπλού δεσμού στον τρίτο άνθρακα όπως παράπλευρης αλυσίδας. Στην κατηγορία των υδροξυκιναμωμικών οξέων, περιλαμβάνονται το καφεϊκό, το π-κουμαρικό, και το φερουλικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ απαντάται κυρίως με την εστεροποιημένη του μορφή και καλείται χλωρογενικό οξύ, ενώ το π-κουμαρικό αποτελεί την πρόδρομη ένωση για την δημιουργία των φλαβονοειδών. (Σχήμα ΙΙΙ-8)



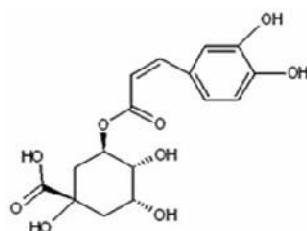
Καφεϊκό οξύ



π-κουμαρικό οξύ



Φερουλικό οξύ



Χλωρογενικό οξύ

Σχήμα ΙΙΙ-8: Υδροξυκιναμωμικά παράγωγα: καφεϊκό και η εστεροποιημένη του μορφή χλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό, φερουλικό οξύ.

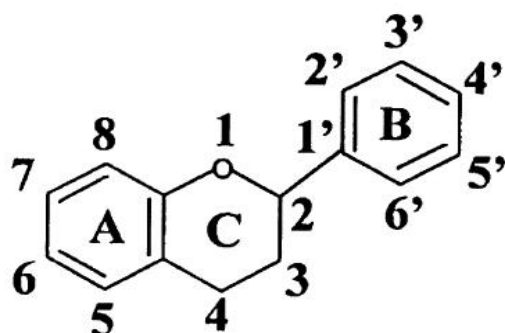
Από τα υδροξυκιναμμομικά οξέα, με υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο ή οξειδωση της παράπλευρης αλυσίδας, προκύπτουν ενώσεις όπως η κονιφερυλοαλκοόλη και η ευγενόλη. Η κονιφερυλοαλκοόλη αποτελεί τον πυρήνα για το σχηματισμό λιγνίνης, ή άλλου φαινολικού πολυμερούς υψηλού μοριακού βάρους. Όπως και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, έτσι και τα υδροξυκιναμμομικά οξέα μπορούν να εστεροποιούν φαινόλες (Shahidi, 2000).

ΙΙΙ.6.3. Σύνθετες φαινόλες βασισμένες στο σκελετό C_6-C_3

- Οι λιγνάνες (C_6-C_3 διμερή), τις οποίες δεν πρέπει να συγχέουμε με τη λιγνίνη, είναι προϊόντα διμερισμού δύο προδρόμων ενώσεων των φαινυλοπροπενίων ή των φαινυλοπροπανίων.
- Οι **κουμαρίνες** θεωρούνται παράγωγα της βενζο-α-πυρόνης (κυρίως της βενζο-2-πυρόνης) ή λακτόνες του ο-υδροξυκιναμμομικού οξέος. Σχεδόν όλες οι γνωστές κουμαρίνες είναι υποκατεστημένες από ένα -OH στη θέση 7. Η υποκατάσταση με -OH μπορεί επίσης να γίνει και στις θέσεις 6 και 8. Οι κουμαρίνες χρησιμοποιούνται ως διορθωτικά οσμής και γεύσης στα τρόφιμα.
- Οι **χρωμόνες**, σε αντίθεση με τις κουμαρίνες, θεωρούνται παράγωγα της βενζο-4-πυρόνης υποκατεστημένες στη θέση 2. Η αλοεσίνη και η ευγενίνη αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα.

ΙΙΙ.6.4. Φλαβονοειδή $C_6C_3C_6$

Τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν την πιο κοινή και ευρέως διαδεδομένη ομάδα φαινολικών ουσιών στο φυτικό βασίλειο. Θεωρούνται παράγωγα της βένζο-γ-πυρόνης (Heim *et al.*, 2002). Φέρουν έναν αρωματικό δακτύλιο A, έναν αρωματικό δακτύλιο B και έναν κεντρικό ετεροδακτύλιο C ο οποίος αποτελείται από τρεις άνθρακες και φέρει οξυγόνο (Σχήμα ΙΙΙ-9) (Harborne, 1980).



Σχήμα ΙΙΙ-9: Βασική δομή των φλαβονοειδών (Heim *et al.*, 2002).

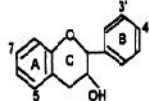
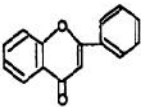
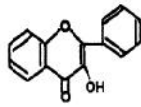
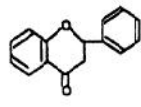
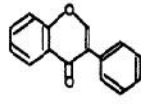
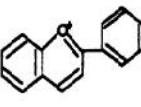
Η δομή των τυπικών φλαβονοειδών είναι αποτέλεσμα συνένωσης δύο προϊόντων που προέρχονται από δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια. Ο αρωματικός δακτύλιος Β και η γέφυρα των τριών ατόμων άνθρακα είναι μια φαινυλοπροπανική μονάδα που προέρχεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος ενώ τα έξι άτομα άνθρακα του δακτυλίου Α προέρχονται από το μονοπάτι του μαλονικού οξέος (Crozier *et al.*, 2000).

Ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου καθώς και τη θέση των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων στους δακτυλίους, τα φλαβονοειδή μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες – κατηγορίες (Πίνακας ΙΙΙ-3) (Heim *et al.*, 2002).

Τα φλαβονοειδή, απαντώνται συνηθέστερα υπό τη μορφή γλυκοζιτών. Με τη μορφή αυτή τα φλαβονοειδή καθίστανται πιο υδατοδιαλυτά και λιγότερο ενεργά έναντι των ελευθέρων ριζών. Η γλυκόζη είναι το συνηθέστερο σάκχαρο με το οποίο τα φλαβονοειδή αντιδρούν και σχηματίζουν γλυκοζίτες. Εκτός της γλυκόζης, σάκχαρα που εμπλέκονται συνηθέστερα στο σχηματισμό γλυκοζιτών είναι η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη και αραβινόζη καθώς και δισακχαρίτες, όπως η ρουτινόζη (Cook & Samman, 1996; Urquiaga & Leighton 2000).

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ιδανική χημική δομή για να δράσουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά απέναντι στις ελεύθερες ρίζες. *In vitro*, έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή είναι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από τις βιταμίνες Ε και C σε μοριακή βάση (Rice- Evans *et al.*, 1997).

Πίνακας ΙΙΙ-3: Ταξινόμηση Φλαβονοειδών (Heim et al., 2002).

Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinose 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin myricetin tamarixetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinose
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

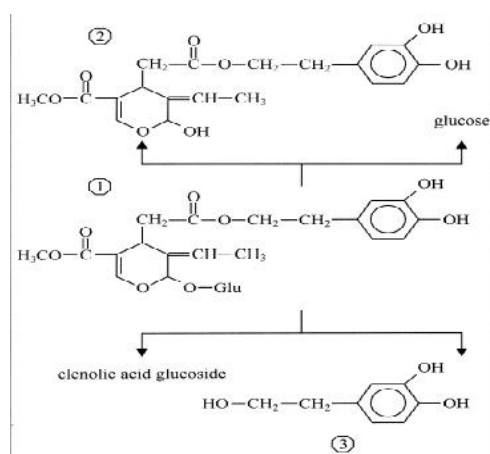
Τα φλαβονοειδή συνήθως συσσωρεύονται στα επιδερμικά κύτταρα των φυτικών οργάνων, όπως είναι τα φύλλα, τα άνθη, ο βλαστός, οι ρίζες, οι σπόροι και οι καρποί. Πολλά είναι υπεύθυνα για το χρωματισμό ανθών και καρπών (π.χ. ανθοκυάνες) ενώ άλλα βοηθούν και στην άμυνα των φυτών ενάντια σε προσβολές από έντομα και μικροοργανισμούς.

ΙΙΙ.6.5. Ταννίνες

Υπάρχουν τρία κύρια είδη ταννινών: οι φλοροταννίνες, οι υδρολυώμενες ταννίνες και οι συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι φλοροταννίνες σχηματίζονται ολοκληρωτικά με πολυμερισμό της φλορογλυκινόλης ή από μονάδες φλορογλυκινόλης υποκατεστημένες από αλογόνα. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες, προέρχονται από τον πολυμερισμό απλών κατεχινών ή γαλλοκατεχινών (εστέρων κατεχίνης με γαλλικό οξύ). Δημιουργούνται έτσι διμερή και στη συνέχεια ανώτερα oligομερή με δεσμούς -C-C- 4-8 ή 6-8. Στις υδρολυώμενες ταννίνες ανήκουν δύο τάξεις, οι εστέρες της γλυκόζης με το γαλλικό οξύ και οι εστέρες της γλυκόζης με ένα διμερές του γαλλικού οξέος. Με υδρόλυση παράγεται ελλαγικό οξύ. Χαρακτηριστική είναι η ιδιότητα των ταννινών να δεσμεύουν πρωτεΐνες, οπότε μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητα των πρωτεϊνών.

ΙΙΙ.6.6. Σεκοϊριδοειδείς Ενώσεις

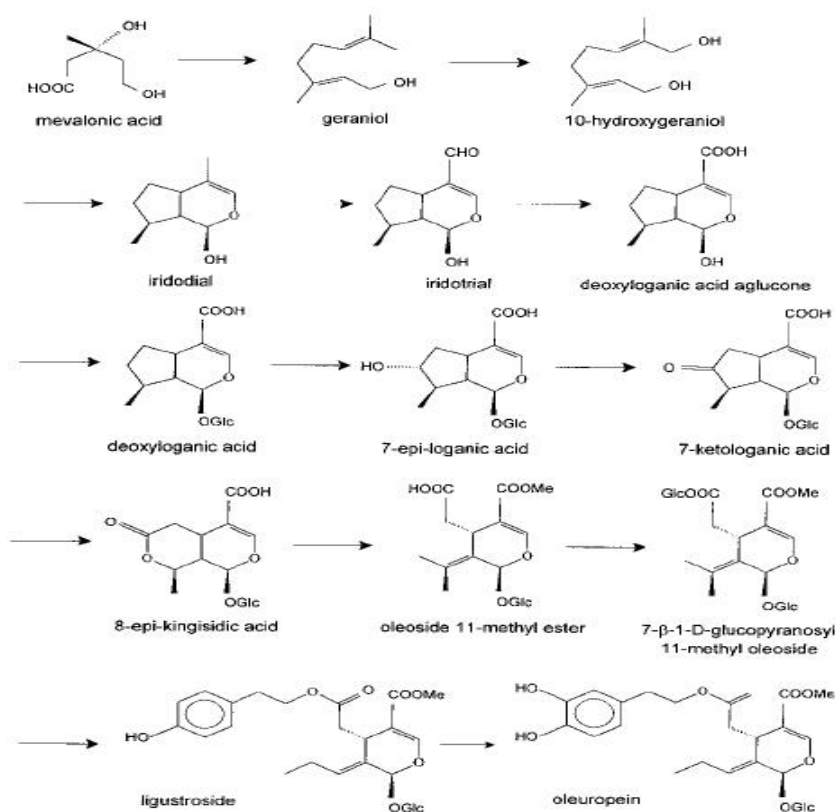
Τα σεκοϊριδοειδή είναι γλυκοζυδιομένες ενώσεις που προέρχονται από το δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων και είναι πρόδρομες ενώσεις πολλών αλκαλοειδών (Soler-Rivas *et al.*, 2000). Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η ελευρωπαΐνη (oleuropein) και ο λιγκστροζίτης (ligstroside).



Σχήμα ΙΙΙ-10: Χημική δομή της ελευρωπαΐνης και των παραγωγών της: (1) ελευρωπαΐνη (2) άγλυκο της ελευρωπαΐνης και (3) υδροξυτυροσόλη (Manna *et al.*, 2004).

Η ελευρωπαΐνη, η σημαντικότερη φαινολική ουσία παρούσα σε φυτά της οικογένειας *Oleaceae*, ανακαλύφθηκε το **1938** από τους **Bourquelot & Vintileso**. Είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης (secoiridoid glucoside) και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea Europaea*), από την οποία και πήρε την ονομασία της. Μπορεί να υδρολυθεί είτε σε υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol) και γλυκοζίτη του ελενολικού οξέος (elenolic acid glucoside) είτε σε άγλυκο της ελευρωπαΐνης (oleuropein aglycone) και γλυκόζη (glucose) (**Σχήμα ΙΙΙ-10**) (**Manna et al., 2004**). Η ελευρωπαΐνη και τα επιμέρους συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο στα φυτά, γιατί με την προστατευτική τους δράση (κυρίως αντιοξειδωτική, αλλά και λόγω της πικρής τους γεύσης) υπερασπίζονται με διάφορους μηχανισμούς τις ελιές από παθογόνους μύκητες και επιβλαβή έντομα.

Η βιοσύνθεση της ελευρωπαΐνης γίνεται μέσω διακλάδωσης στο μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος του δευτερογενούς μεταβολισμού όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα ΙΙΙ-11**).



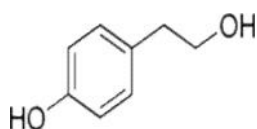
Σχήμα ΙΙΙ-11: Βιοσύνθεση ελευρωπαΐνης (**Soler-Rivas et al., 2000**).

ΙΙΙ.7.Κύριες Φαινολικές Ενώσεις της Ελιάς - Φαινολικές Ενώσεις στον Ελαιόκαρπο

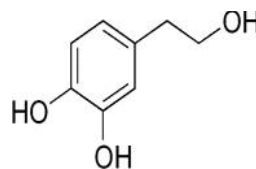
Οι πιο σημαντικές φαινολικές ομάδες στον ελαιόκαρπο, είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή και τα σεκοϊριδοειδή (Macheix *et al.*, 1990; Ryan & Robards, 1998; Soler-Rivas *et al.*, 2000).

Πιο συγκεκριμένα οι φαινολικές αλκοόλες του ελαιόκαρπου είναι (Macheix *et al.*, 1990; Mazza & Miniati, 1993; Romero *et al.*, 2002a; Ryan & Robards, 1998) οι (Σχήμα ΙΙΙ-12):

- τυροσόλη [p-hydroxyphenylethanol (tyrosol)]
- υδροξυτυροσόλη [3,4-dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol)]



Τυροσόλη



Υδροξυτυροσόλη

Σχήμα ΙΙΙ-12: Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.

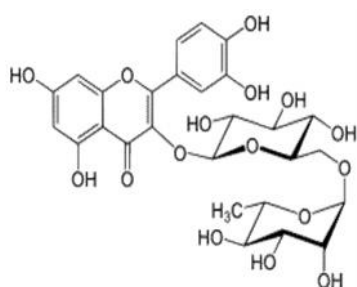
Τα πιο συχνά αναφερόμενα φλαβονοειδή είναι τα ακόλουθα:

- 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (luteolin 7-O-glucoside) (Σχήμα ΙΙΙ-13)
- ρουτίνη (rutin) (Σχήμα ΙΙΙ-13)
- 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης (apigenin 7-O-glucoside)

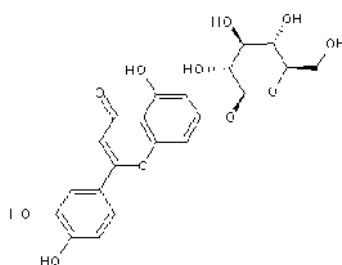
καθώς και οι ανθοκυανίνες:

- 3-Ο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης (cyanidin 3-O-glucoside)
- 3-Ο ρουτινοζίτης της κυανιδίνης (cyanidin 3-O-rutinoside) (Amiot *et al.*, 1989; Esti *et al.*, 1998; Romani *et al.*, 1999; Ryan & Robards, 1998).

Σε μερικές ποικιλίες ο γλυκοζίτης της δελφινιδίνης έχει επίσης περιγραφεί. (Macheix *et al.*, 1990).



Ρουτίνη



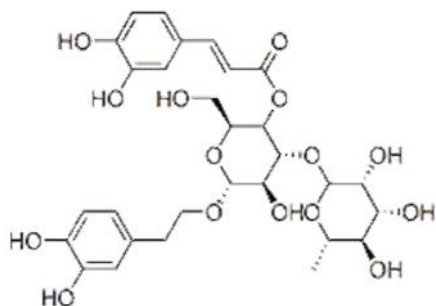
7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης

Σχήμα ΙΙΙ-13. Χημική δομή ρουτίνης και 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης.

Η ελευρωπαΐνη (Oleuropein) και ο λιγκστροζίτης (ligstroside) είναι τα επικρατέστερα σεκοϊριδοειδή στον ελαιόκαρπο. Η ελευρωπαΐνη είναι το πικρό συστατικό που εξουδετερώνεται με την κατεργασία του ελαιόκαρπου. Μερικά παράγωγα της ελευρωπαΐνης, έχουν επίσης αναφερθεί (Amiot *et al.*, 1989; Esti *et al.*, 1998; Romani *et al.*, 1999; Soler-Rivas *et al.*, 2000) όπως:

- απομεθυλο-ελευρωπαΐνη (demethyloleuropein),
- άγλυκο της ελευρωπαΐνη (oleuropein aglycone) και
- ελενολικό οξύ (elenolic acid)

Ο βερμπασκοζίτης (Verbascoside) είναι το επικρατέστερο φαινολικό οξύ στον ελαιόκαρπο (Σχήμα ΙΙΙ-14) και είναι παράγωγο του υδροξυκινναμικού οξέος (hydroxycinnamic acid) (Romani *et al.*, 1999; Ryan & Robards, 1998; Servili *et al.*, 1999).



Σχήμα ΙΙΙ-14. Χημική δομή βερμπασκοζίτη.

Οι φαινολικές ενώσεις γενικότερα και τα σεκοϊριδοειδή (Secoiridoids) ειδικότερα, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόκαρπου και του ελαιόλαδου και είναι υπεύθυνα για τις μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των επιτραπέζιων ελιών (Brenes *et al.*, 1995). Ειδικότερα τα σεκοϊριδοειδή δρουν ανασταλτικά στην αυτοοξειδωση και φωτοοξειδωση του λαδιού (Botia *et al.*, 2001; Papadopoulos & Boskou, 1999; Romani *et al.*, 1999).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ελαιόκαρπου, έχουν παρατηρηθεί ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στη σύνθεση των φαινολικών ουσιών. Σημαντικές διαφορές μπορούν να παρατηρηθούν ανάλογα με το στάδιο εξέλιξης του ελαιόκαρπου (Amiot *et al.*, 1989; Esti *et al.*, 1998; Romani *et al.*, 1999). Το γεγονός ότι κάποιες ποικιλίες ελιάς προορίζονται για την παραγωγή βρώσιμων ελιών και κάποιες για την παραγωγή ελαιόλαδου και ότι τα λάδια που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, οφείλεται στις διαφορές που υπάρχουν στη χημική σύσταση των ποικιλιών αυτών (Vinha *et al.*, 2005).

ΙΙΙ.8. Φαινολικές Ενώσεις στο Φύλλο της Ελιάς

Όπως αναφέρεται από τους Benavente-Garcia *et al.*, (2000), 5 ομάδες φαινολικών ουσιών είναι παρούσες στο φύλλωμα της ελιάς:

- 1) **Oleuropeosides** [ελευρωπαΐνη (oleuropein), βερμπασκοζίτης (verbascoside)].
- 2) **Flavones** [(7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (Luteolin 7-O glucoside), 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης (Apigenin 7-glucoside), λουτεολίνη (luteolin)].
- 3) **Flavonols** [ρουτίνη (rutin)].
- 4) **Flavan-3-ols** [κατεχίνη (catechin)].
- 5) **Substituted phenols** [τυροσόλη (tyrosol), υδροξυτυροσόλη (hydroxytyrosol), βανιλικό οξύ (vanillin acid), καφεϊκό οξύ (caffeic acid)].

Τις μεγαλύτερες ποσότητες στο φύλλο της ελιάς παρουσιάζουν κατά σειρά οι παρακάτω ουσίες: ελευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης και βερμπασκοζίτης. Η ουσία υδροξυτυροσόλη είναι ο πρόδρομος της ελευρωπαΐνης ενώ ο βερμπασκοζίτης προέρχεται από την ένωση υδροξυτυροσόλης και καφεϊκού οξέος.

Οι ιδιότητες των φύλλων της ελιάς έχουν αποδοθεί κατά κύριο λόγο στα σεκοϊριδοειδή ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη (Ghisalberti, 1998; Le Tutour &

Guedon, 1992). Τα δύο αυτά σεκοϊριδοειδή είναι γνωστά και για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (**Owen et al., 2000**), ενώ θεωρείται ότι δίνουν στο δέντρο της ελιάς αντοχή κατά των βλαβών από έντομα και βακτήρια. Ιδιαίτερα η ελευρωπαΐνη, έχει βρεθεί ότι, είναι δυνατό αντιοξειδωτικό με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και έχει αντιμικροβιακή δράση σε ιούς-βακτήρια-μύκητες και άλλα παράσιτα (**Aziz et al., 1998; Juven & Henys 1972; Koutsoumanis et al., 1998; Tassou & Nychas, 1995**).

ΙΙΙ.9. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Βιοσύνθεση των Φαινολικών Ουσιών

Από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των φαινολικών ουσιών, σημαντικότεροι είναι η ηλικία του ιστού (υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις στο εάν και κατά πόσο στους νεαρούς ιστούς η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών είναι υψηλότερη αυτής των γηραιότερων (**Waterman & Mole, 1994**), το στάδιο ανάπτυξης, οι βιοτικοί παράγοντες, ο γονότυπος, οι εδαφικοί παράγοντες, το μικροκλίμα και κάθε είδους καλλιεργητική φροντίδα, γιατί επηρεάζουν το μεταβολισμό τους και αλλάζουν τις ποσοτικές σχέσεις των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους (**Karakaya & Nehir 1999**).

Πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών επηρεάζεται από το στάδιο ανάπτυξης και τα μέρη του φυτού (καρποί, φύλλα, άνθη, σπέρματα) (**Wang & Lin, 2000**), Επίσης το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας των δενδροκομικών ειδών πιστεύεται ότι επιδρά στα επίπεδα των φαινολικών συστατικών (**Ryan et al., 2003**). Διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων παρατηρούνται όχι μόνον μεταξύ ποικιλιών του ίδιου είδους, αλλά και μέσα στην ίδια ποικιλία ανάλογα με την εποχή συγκομιδής (**Ryan et al., 1999**). Επιπλέον, μεταβολές στη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών μπορεί να προκαλέσει η έλλειψη ή η περίσσεια ενός θρεπτικού στοιχείου. Η ανεπαρκής τροφοδοσία του φυτού με άζωτο οδηγεί συνήθως στη σύνθεση μεταβολιτών που περιέχουν αποκλειστικά άνθρακα στο μόριο τους (π.χ. φαινολικές ουσίες, σε βάρος μεταβολιτών που περιέχουν άζωτο π.χ. αλκαλοειδή) (**Hamilton et al., 2001; Gershenzon, 1984**)

Ο Βιότυπος των φυτών (γεωγραφική διαφοροποίηση), η γενετική ιδιοσυστασία τους, η ανάπτυξη σε σχέση με τις εποχές του έτους (phenology) και η έκθεση σε παθογόνα ή ζιζανιοκτόνα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στη

διαφοροποίηση τόσο της συγκέντρωσης όσο και του φαινολικού προφίλ μιας καλλιέργειας (Appel, 1993).

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επίσης επηρεάζουν το φαινολικό περιεχόμενο των φυτών. Ο σχηματισμός γλυκοσιδίων φλαβονών και φλανονολών, προάγεται από την παρουσία φωτός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών να βρίσκονται στα εξωτερικά μέρη του φυτού και μόνο ίχνη αυτών στα σκιερά τμήματα τους (Kubasek *et al.*, 1998). Συνθήκες ξηρασίας μπορούν επίσης να προκαλέσουν μείωση της δραστηριότητας της οξειδάσης των πολυφαινολών (PPO) στην ελιά με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των φαινολικών συστατικών στους ιστούς της (Sofa *et al.*, 2005). Η ρύπανση του περιβάλλοντος, το έδαφος (Figueiredo *et al.*, 2008) και οι θερμοκρασίες αποθήκευσης (Wang & Stretch, 2001) αποτελούν επίσης παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση του φαινολικών ουσιών.

Οι προσβολές από εχθρούς και ασθένειες καθώς και οι μηχανικές βλάβες μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα φαινολικών ενώσεων στα φυτά. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω, τα φαινολικά συστατικά συμμετέχουν στους μηχανισμούς επαγόμενης άμυνας των φυτών βοηθώντας στην επιβίωση τους.

Η σύνθεση των φαινολικών ενώσεων μπορεί να επηρεασθεί και από τη γεωγραφική τοποθεσία στην οποία βρίσκεται ένα φυτό και να επηρεάσει με αυτόν τον τρόπο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Σε έρευνα που έγινε στη Σαρδηνία, αποδείχθηκε ότι ελαιώνες της ποικιλίας «Bosana» εγκατεστημένοι σε νοτιότερες και με μεγαλύτερο υψόμετρο περιοχές, παράγαγαν λάδι καλύτερης ποιότητας από άλλες περιοχές του νησιού (Deidda *et al.*, 1994).

Τέλος ο τρόπος επεξεργασίας του τελικού προϊόντος επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενό του. Το ελαιόλαδο εξάγεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικές διαδικασίες (Caponio *et al.*, 2001). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος φαινολικών ουσιών που υπάρχουν στη σάρκα του καρπού να απομακρύνονται με τα απόνερα, ενώ ένα μικρό μέρος τους μεταβαίνει στο ελαιόλαδο.

ΙΙΙ.10. Ο Ρόλος των Φαινολικών Ενώσεων στα Ανώτερα Φυτά

Οι ρόλοι των φαινολικών συστατικών στα ανώτερα φυτά επικεντρώνονται κυρίως στις σχέσεις των φυτών με το περιβάλλον, τόσο με την αβιοτική όσο και την βιοτική του συνιστώσα και συνοψίζονται στα παρακάτω:

➤ δομικός ρόλος.

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών περιλαμβάνει φαινολικά συστατικά με διάφορες δομές και τρόπο σύνδεσης. Κυρίαρχο φαινολικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι η λιγνίνη. Πρόκειται για φαινολικό πολυμερές, το πλέον άφθονο φαινολικό συστατικό στα ανώτερα φυτά και δεύτερο σε διάδοση πολυμερές μόριο στη βιόσφαιρα, μετά την κυτταρίνη. Τα μονομερή της λιγνίνης απαρτίζονται από φαινολικές αλκοόλες όπως η κονιφερυλαλκοόλη, η σιναπυλαλκοόλη και η π-κουμαροϋλαλκοόλη (Whetten & Sederoff, 1995).

Εκτός από την λιγνίνη, στο κυτταρικό τοίχωμα απαντούν φαινολικά οξέα με κυρίαρχα τα π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ τα οποία προσδένονται εστερικά σε υδατανθρακικά υπολείμματα της πηκτίνης όπως η γαλακτόζη και η αραβινόζη (Levigne *et al.*, 2004). Ο φυσιολογικός ρόλος της παρουσίας των φαινολικών οξέων στα κυτταρικά συστατικά φαίνεται πως περιλαμβάνει εκτός των άλλων την αποτροπή ενζυμικής υδρόλυσης των ημικυτταρινών και την μηχανική ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Ishii, 1997) ενώ ενδέχεται να αποτελούν θέσεις έναρξης εναπόθεσης λιγνίνης ή δευτερογενούς πάχυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Wallace & Fry, 1994).

Μια άλλη κατηγορία υλικών στη δομή των οποίων συμμετέχουν φαινολικά συστατικά είναι η κουτίνη (Kolattukudy, 1981) η σουβερίνη (Wallace & Fry, 1994) και οι εφουμενιδικό κηροί. Στη σύσταση των εφουμενιδικών κηρών συμμετέχουν εκτός των άλλων τερπένια, φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, συνήθως ενωμένα ομοιοπολικά με άλλα εφουμενιδικά υλικά (Kolattukudy, 1980 & 1996; Jetter *et al.*, 2000; Riley & Kolattukudy, 1975).

➤ λειτουργικός ρόλος

Εκτός από τις γνωστές κατηγορίες ρυθμιστών αύξησης, ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες, μεταξύ αυτών και φαινολικές ενώσεις, επιδρούν άμεσα ή έμμεσα στην αύξηση ή τη διαφοροποίηση των φυτικών ιστών. Έχει αναφερθεί ότι το σινναμικό και π-κουμαρικό οξύ μπορεί να δρουν ως ρυθμιστές αύξησης (**Harborne, 1993**). Επίσης το σαλικυλικό οξύ εμπλέκεται σε πλήθος φυσιολογικών λειτουργιών. Το μόριο αυτό επάγει την άνθηση σε φυτικά είδη, και αποτελεί διασυστηματικό σήμα συναγερμού σε περιπτώσεις προσβολών από παθογόνα (**Scott et al., 1999**).

➤ αμυντικός ρόλος

Τα φαινολικά συστατικά διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην άμυνα του φυτού απέναντι στο αντίξοο βιοτικό περιβάλλον. Η παρουσία φλαβονοειδών στα κυτταρικά τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων, επιτρέπει την προστασία των κυττάρων αυτών από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, επειδή απορροφούν έντονα την ακτινοβολία στην υπεριώδη περιοχή, ενώ επιτρέπουν στο ορατό μήκος κύματος (φωτοσυνθετικά δραστικό) να περάσει (**Markham et al., 2000a; Karabourniotis et al., 1998**). Επίσης, η παρουσία ανθοκυανινών στα χυμοτόπια των επιδερμικών κυττάρων παίζει παρόμοιο προστατευτικό ρόλο έναντι κυρίως των υψηλών εντάσεων ορατής ακτινοβολίας καθώς παρουσιάζουν υψηλή απορροφητικότητα σε αυτά τα μήκη κύματος (**Neill & Gould, 1999; Field et al., 2001; Steyn et al., 2002**).

Οι φαινολικές ενώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μηχανισμούς άμυνας του φυτού έναντι σε εχθρούς και ασθένειες. Η ελευρωπαΐνη και τα παράγωγά της έχουν εντομοαπωθητικές ιδιότητες αφού αποτρέπουν το δάκο της ελιάς να εναποθέσει τα αυγά του στους καρπούς, ενώ άλλες φαινολικές ουσίες όπως το καφεϊκό οξύ, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το πρωτοκατεχικό οξύ και το χλωρογενικό οξύ, έχουν αντιβακτηριακές ιδιότητες (**Soler-Rivas et al., 2000; Vermerris & Nicholson, 2008**). Επίσης, η εναπόθεση λιγνίνης ή / και σουβερίνης στην περιοχή του τραύματος ή της προσβολής, περιορίζει την εξάπλωση των παθογόνων (**Whetten & Sederoff, 1995; Dixon & Paiva, 1995**). Τέλος οι φαινολικές ενώσεις συμμετέχουν στη σύνθεση των φυτοαλεξινών. Στην οικογένεια *Oleaceae*, η ελευρωπαΐνη λαμβάνει μέρος στη σύνθεση τους (**Soler-Rivas et al., 2000**).

➤ αναπαραγωγικός ρόλος

Η διαδικασία της αναπαραγωγής είναι ακόμα μια λειτουργία των φυτών στην οποία τα φαινολικά συστατικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Ορισμένα φλαβονοειδή απορροφούν φως σε μικρά μήκη κύματος που δεν είναι ορατά από το ανθρώπινο μάτι. Ακόμη και οι άχρωμες φλαβόνες και φλαβονόλες, έχοντας την ιδιότητα αυτή, συμμετέχουν στην δημιουργία συμμετρικών ακτινωτών ή κυκλικών σχημάτων τα οποία ονομάζονται οδηγοί νέκταρος. Τα σχήματα αυτά, πιστεύεται ότι γίνονται αντιληπτά από τα έντομα – επικονιαστές τα οποία έχουν τη δυνατότητα οράσεως σε αυτά τα μήκη κύματος και τα βοηθούν στο να εντοπίζουν την τοποθεσία της γύρης και το νέκταρ (Seigler, 1998). Τέλος, μία ακόμη ομάδα των φλαβονοειδών, οι ανθοκυανίνες, διαμορφώνουν τους χρωματισμούς πολλών φυτικών επιφανειών, κυρίως των πετάλων, ελκύοντας έτσι τους φορείς γύρης και καρπών (Markham *et al.*, 2000b).

➤ άλλοι ρόλοι

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυτικών προϊόντων. Στην ελιά, τόσο η χαρακτηριστική πικρή γεύση όσο και το χρώμα των ώριμων καρπών οφείλεται στην ελευρωπαΐνη και στα παράγωγά της (Ryan & Robards, 1998). Όταν η ελιά είναι άγουρη (πράσινη), τα ποσοστά της ουσίας αυτής είναι αρκετά υψηλά και βέβαια ο καρπός πολύ πικρός. Όσο προχωρά η ωρίμανση και το χρώμα από πράσινο γίνεται σιγά-σιγά κόκκινο για να καταλήξει μαύρο, τόσο μειώνονται τα ποσοστά περιεκτικότητας αυτής της ουσίας στον καρπό. Το ελαιόλαδο, βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής οφείλει την γεύση και το άρωμά του σε συστατικά όπως οι πολυφαινόλες (Benavente-Garcia *et al.*, 2000).

ΙΙΙ.11. Ο Ρόλος των Φαινολικών Ενώσεων στην Ανθρώπινη Υγεία

Τα χαμηλά ποσοστά καρδιακών παθήσεων και καρκίνου στη λεκάνη της Μεσογείου, οφείλονται μεταξύ άλλων και στη μεσογειακή διατροφή η οποία είναι πλούσια σε φρούτα και λαχανικά τα οποία και παρουσιάζουν υψηλή αναλογία σε ουσίες όπως βιταμίνες, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου κι επιπλέον παρουσιάζουν κι άλλες δράσεις, πολλές από τις οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία (**Hertog *et al.*, 1995**). Οι κυριότερες δράσεις των πολυφαινολών συνοψίζονται παρακάτω:

- Επιδρούν στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να καταβυθίζουν πρωτεΐνες. Η συγκεκριμένη δράση είναι πιο έντονη σε πολυφαινόλες μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες εμφανίζουν υψηλό βαθμό υδροξυλίωσης.
- Τα φλαβονοειδή, με την δημιουργία συμπλόκων, παρεμποδίζουν την απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων Fe, Cu, Zn, Na, Al τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών.
- Μειώνουν τα επίπεδα σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα. Αυξάνουν τα επίπεδα της HDL («καλής χοληστερόλης») και μειώνουν τα επίπεδα της LDL («κακής χοληστερόλης»).
- Προστατεύουν τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος
- Παρουσιάζουν αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση
- Έχουν αντιαλλεργικές ιδιότητες καθώς μπορούν να εμποδίσουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μάλιστα ο μηχανισμός δράσης τους διαφέρει ανάλογα με την τάξη στην οποία ανήκουν.
- Παρουσιάζουν αγγειοδιασταλτική δράση.
- Προστατεύουν το DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές.

Η πρώτη επίσημη αναφορά για τη χρήση των φύλλων της ελιάς στην ιατρική χρονολογείται από το 1854, όταν ο Hanbury ανέφερε στην επιθεώρηση *Pharmaceutical Journal* μια απλή συνταγή για τη χρήση του υδατικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς ως αντιπυρετικό. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα υπάρχουν

αναφορές στη βιβλιογραφία για την σύσταση και τη δράση των φύλλων της ελιάς (Bourquelot & Vintilesco, 1938). Ειδικότερα αναφέρεται, αντιοξειδωτική (Ghisalberti, 1998; Le Tutour & Guedon, 1992; Owen *et al.*, 2000), αντιμικροβιακή (Ghisalberti, 1998; Walter *et al.*, 1973) αντιυπερτασική (Ghisalberti, 1998; Visioli & Galli, 1994 & 1998; Ziyat *et al.*, 1997) αγγειοδιασταλτική (Zarzuelo *et al.*, 1991) και υπογλυκαιμική (Gonzalez *et al.*, 1992) δράση για το εκχύλισμα των φύλλων ή για μεμονωμένα συστατικά του.

Το ελαιόλαδο και οι καρποί της ελιάς είναι πλούσιοι σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά και έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν προστασία κατά της στεφανιαίας νόσου ενώ παράλληλα μειώνουν τα επίπεδα της LDL («κακής χοληστερόλης») και αυξάνουν τα επίπεδα της HDL («καλής χοληστερόλης»). Η επίδραση των φαινολικών συστατικών της ελιάς έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει αποδειχθεί ότι η ελευρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη, το καφεϊκό οξύ, ο βερμπασκοζίτης και άλλες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε ιστούς της ελιάς, βοηθούν στην πρόληψη ασθενειών όπως ο καρκίνος ενώ έχουν και αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντιοικικές ιδιότητες (Tripoli *et al.*, 2005).

ΙΙΙ.12. Ο Ρόλος των Φαινολικών Ενώσεων ως Συντηρητικά Τροφίμων

Τα τρόφιμα υφίστανται διάφορες αλλαγές μέχρι την κατανάλωσή τους. Η επεξεργασία, αποθήκευση και μεταφορά των τροφίμων επιφέρει την ποιοτική τους υποβάθμιση που μπορεί να οφείλεται στη δράση μικροοργανισμών, στην οξείδωση ή σε άλλους παράγοντες. Η προστασία των τροφίμων από την οξειδωτική υποβάθμιση εξασφαλίζεται συνήθως με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων αντιοξειδωτικών συστατικών (Rajalakshmi & Narasimhan, 1996).

Τα συνθετικά χημικά συντηρητικά τροφίμων χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην εποχή μας εξ αιτίας των αντιοξειδωτικών ή/και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους με αμφισβητούμενες ωστόσο και αμφίβολες επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή τόσο άμεσα, όσο και μακροπρόθεσμα (Ito *et al.*, 1983; Shahidi, 2000).

Τα πιο γνωστά συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι:

- Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA).
- Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT).
- Η δι-tert-βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ).
- Εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπανικός (PG) (Μπόσκου, 1997).

Τα BHA και BHT είναι αρκετά πτητικά και αποσυντίθενται εύκολα σε υψηλές θερμοκρασίες (Branen, 1975). Οι Iqbal & Bhanger (2007) ανέφεραν ότι τα BHA, BHT και TBHQ εμπλέκονται σε πολλούς κινδύνους για την υγεία, όπως καρκίνο και καρκινογένεση. Επίσης, υπάρχουν σοβαρά προβλήματα αναφορικά με την ασφάλεια και την τοξικότητα των BHA, BHT και TBHQ που σχετίζονται με τον μεταβολισμό τους, την πιθανή απορρόφησή τους και την συσσώρευσή τους σε διάφορα όργανα του σώματος και διάφορους ιστούς (Linderschmidt *et al.*, 1986; Tappel, 1995). Το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό, το TBHQ, δεν επιτρέπεται για εφαρμογή και χρήση σε Ιαπωνία, Καναδά και Ευρώπη (Iqbal & Bhanger, 2007).

Στην επιδίωξη για υγιεινότερη διατροφή εξ αιτίας της δικαιολογημένης, ως ένα βαθμό, καχυποψίας του καταναλωτή απέναντι στο επεξεργασμένο τρόφιμο και τα χημικά συντηρητικά, ήταν αναμενόμενη η στροφή προς την ανάπτυξη και την εφαρμογή περισσότερο «φυσικών» συντηρητικών και μεθόδων συντήρησης. Η ανησυχία του καταναλωτή για πιθανά ανεπιθύμητα αποτελέσματα στην υγεία του εξαιτίας των χημικών συντηρητικών, η ζήτηση για λιγότερο «επεξεργασμένα» τρόφιμα με καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, καθώς και η αυξημένη ζήτηση για τρόφιμα με μεγάλη διάρκεια ζωής, έχει ασκήσει πίεση στις βιομηχανίες τροφίμων, ώστε να χρησιμοποιούν περισσότερο «φυσικά» εναλλακτικά συντηρητικά για την επέκταση του χρόνου διατήρησης του τροφίμου.

Αυτή η επιβαλλόμενη από τον καταναλωτή τάση, έχει πυροδοτήσει νέες έρευνες για συντηρητικά και μεθόδους συντήρησης προερχόμενες από φυσικές πηγές. Σημαντικές πηγές φυσικών συντηρητικών θεωρούνται τα φυτά. Πολλά βότανα είναι άριστες πηγές ουσιών, όπως είναι τα φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά συστατικά, τα οποία θα μπορούσαν όχι μόνο να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά συντηρητικά, αλλά ίσως και να συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας του καταναλωτή.

Τα πιο σημαντικά φυσικά αντιοξειδωτικά σήμερα είναι η βιταμίνη E (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη A (ρετινόλη), τα καροτενοειδή (β-καροτίνη, λυκοπένιο, λουτεΐνη κ.α.), το κιτρικό οξύ,

το σελήνιο και άλλα μέταλλα απαραίτητα για την δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού, καθώς και φυτοχημικές ουσίες, με αντιοξειδωτικές ικανότητες, όπως φυτικές στερόλες, φλαβονοειδή, θειούχες φυτικές ενώσεις και φαινολικές ενώσεις (Τριχόπουλος κ.ά., 2000). Ειδικότερα, το κιτρικό οξύ είναι αρκετά αποτελεσματικό στην επιβράδυνση της οξειδωτικής υποβάθμισης των λιπών στα φαγητά (Rizner Hras *et al.*, 2000).

Οι τοκοφερόλες, είναι η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία. Διακρίνονται σε δύο ομάδες, τις τοκοφερόλες (Τοc) και τις τοκοτριενόλες (Τοc-3). Η κάθε ομάδα περιλαμβάνει τέσσερα ομόλογα, δηλαδή α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη και αντίστοιχα α-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλη (Pokorny *et al.*, 2001). Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυξάνεται από το α- ομόλογο προς το δ-, εν αντιθέσει με τη βιταμινική τους δράση που ελαττώνεται (Γάλαρης & Δούλιας, 2001).

ΙΙΙ.13. Ελεύθερες Ρίζες.

Οι χρόνιες εκφυλιστικές παθήσεις, κυρίως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, είναι η κύρια αιτία θανάτων στο δυτικό κόσμο. Πέρα από τους γενετικούς λόγους και την ηλικία, σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και ανάπτυξη αυτών των ασθενειών παίζει ο τρόπος ζωής και διατροφής. Περίπου το 50% του συνόλου των καρκίνων έχουν αποδοθεί στον τρόπο διατροφής. Οι σύγχρονες διατροφικές υποδείξεις για την καταπολέμηση των χρόνιων ασθενειών, συστήνουν αυξημένη κατανάλωση φυτικών προϊόντων δηλαδή φρούτων και λαχανικών, τα οποία είναι πλούσιες πηγές πολυτίμων αντιοξειδωτικών. Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη των γνώσεων στη βιολογία σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη οξυγόνου ROS, οδήγησε σε μία ιατρική επανάσταση που υπόσχεται μία νέα εποχή στην υγεία. Πράγματι, η ανακάλυψη του ρόλου των ελευθέρων ριζών στις χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες είναι το ίδιο σημαντική με την ανακάλυψη του ρόλου των μικροοργανισμών στις μολυσματικές ασθένειες (Bray, 1999).

Μέσα στη τελευταία δεκαετία, η σημασία των ελευθέρων ριζών στην αιτιολογία των ασθενειών έχει αναγνωριστεί όλο και περισσότερο και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων στη βιοχημική αξιολόγηση των γεγονότων που συνδέονται με την ανάπτυξη μεταλλαξιογένεσης, ογκογένεσης και καρκίνου. Η ελεύθερη ρίζα (free radical), είναι άτομο ή ομάδα ατόμων που φέρει ένα ή

περισσότερα ασύζευκτα (unpaired) ηλεκτρόνια. Ως ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, καλείται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό (**Gutteridge & Halliwell, 1994**). Τα ηλεκτρόνια που συζευγνύονται σε τροχιακά έχουν αντιπαράλληλο spin και είναι πιο σταθερά σε σχέση με τα ασύζευκτα. Έτσι οι ελεύθερες ρίζες πολύ γρήγορα αντιδρούν μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες ή ενώσεις, προκειμένου να σχηματίσουν ζεύγος ηλεκτρονίων.

Τα μόρια αυτά, είναι πολύ δραστικά και εκδηλώνουν έντονη δράση πάνω στις πρωτεΐνες ιστών, στα ένζυμα, στα λιπίδια, στις κυτταρικές μεμβράνες και στο DNA, προκαλώντας οξειδώσεις οι οποίες προκαλούν καταστροφή μεμβρανών, μεταβολές πρωτεϊνών-ενζύμων και καταστροφή DNA. Αυτά είναι τα αίτια πρόκλησης ασθενειών όπως καρδιακές παθήσεις, καταρράκτης, καρκίνος.

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

1. Με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^+$
2. Με προσθήκη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^-$
3. Με ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A\cdot + B\cdot$

Η λύση του δεσμού μπορεί να συμβεί είτε αυθόρμητα, είτε με τη μεσολάβηση φωτός, θερμότητας ή μετάλλων.

Η δραστικότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται τόσο από την ελεύθερη ρίζα όσο και από το μόριο με το οποίο αυτή η ρίζα αντιδρά. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με μόρια ή άτομα με διάφορους τρόπους:

1. Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να συνδεθεί με ένα μόριο ή άτομο: $X\cdot + Y \rightarrow [X-Y]\cdot$
2. Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να δράσει σαν αναγωγικός παράγοντας, παραχωρώντας το ασύζευκτο της ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο ή άτομο: $X\cdot + Y \rightarrow X^+ + Y^-\cdot$
3. Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να δράσει σαν οξειδωτικός παράγοντας, δεχόμενη ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο ή άτομο: $X\cdot + Y \rightarrow X^- + Y^+\cdot$
4. Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από τον ανθρακικό σκελετό μιας οργανικής ένωσης: $>CH + OH\cdot \rightarrow >C\cdot + H_2O$

Ιδιαίτερο βιοχημικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Με τον όρο “δραστικές μορφές οξυγόνου”, εννοούμε τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου καθώς και όλα τα παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ελεύθερες ρίζες (π.χ. O_3) και που προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αντιδράσεις με στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος. Οι ROS είναι πιο ισχυρά οξειδωτικά σε σχέση με το μοριακό οξυγόνο.

Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παρουσιάζονται στον παρακάτω **Πίνακα ΙΙΙ-4**.

Πίνακας ΙΙΙ-4 : Οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (**Jacob, 1995**)

Species	Common name
OH [•]	Hydroxyl radical
HO ₂ [•]	Hydroxyperoxy radical
O ₂ ^{•-}	Superoxide anion radical
¹ O ₂	Singlet oxygen
RO [•]	Alkoxy radical
ROO [•]	Peroxy radical
NO [•]	Nitric oxide radical
NO ₂ [•]	Nitrogen dioxide radical
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HOCl	Hypochlorous acid

Το οξυγόνο στην απλή κατάσταση (singlet oxygen, ¹O₂), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), υπάρχουν σε ζωντανούς οργανισμούς χωρίς όμως να είναι ελεύθερες ρίζες.

Οι ROS και άλλες ελεύθερες ρίζες, παράγονται ενδογενώς στον οργανισμό ως υποπροϊόντα της κανονικής κυτταρικής δραστηριότητας όπως για παράδειγμα κατά την αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου σε νερό ή από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων. Σε αυτήν την αντίδραση, το οξυγόνο ανάγεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε δύο ηλεκτρόνια γίνονται δεκτά από κάθε άτομο οξυγόνου, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό του μορίου του νερού. Ταυτόχρονα όμως, ένα μικρό ποσοστό ηλεκτρονίων διαφεύγει από την κύρια οδό της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα τη μονοσθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και τον τελικό σχηματισμό του ανιόντος του υπεροξειδίου (O₂^{•-}). Μία επιπλέον ποσότητα ελευθέρων ριζών σχηματίζεται καθημερινά στον ανθρώπινο οργανισμό από εξωγενείς αιτίες, όπως, υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, κάπνισμα, όζον, αιθαλομίχλη, χημικά και φάρμακα, έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, κ.α

Οι ελεύθερες ρίζες επιτελούν χρήσιμες λειτουργίες, όπως η συμμετοχή τους στην αποδόμηση των φαρμάκων, στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης στο ανοσοποιητικό και στη σύνθεση των προσταγλανδινών. Για παράδειγμα η ρίζα του υπεروξειδίου (O-O[•]) χρησιμεύει στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στην υδροξυλίωση και στην ανοσολογική απόκριση.

Ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές για να είναι ανεκτές σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ζωντανούς ιστούς. Εξωτερικοί παράγοντες μπορούν να επιφέρουν δραματική αύξηση στα επίπεδά τους με αποτέλεσμα να οξειδώσουν και να βλάψουν ζωτικά βιολογικά μόρια του κυττάρου όπως λίπη, πρωτεΐνες και DNA. Οι βιομεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα στην αλλοίωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες, διαδικασία γνωστή ως υπεροξειδωση των λιπιδίων. Το αποτέλεσμα είναι η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και η απενεργοποίηση των πρωτεϊνικών ενζύμων του που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο και την αποσύνθεση του κυττάρου. Τα προϊόντα της οξειδωσης είναι υπεύθυνα για αρκετές ασθένειες, όπως καρκίνος, καρδιοπάθειες, καταρράκτης, νευροπάθειες και ενζυμικές ασθένειες.

ΙΙΙ.14. Οξειδωτικό Στρες.

Όταν οι οξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού υπερτερούν των αντίστοιχων αντιοξειδωτικών, τότε τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια (Aruoma, 1998). Το οξειδωτικό στρες (oxidative stress) σχετίζεται με την διαταραγμένη αυτή ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και στους φυσικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, προς όφελος των πρώτων. Τότε, προκύπτει ένα πρόβλημα επαγωγής της δράσης των ελευθέρων ριζών πέραν των φυσιολογικών τους λειτουργιών, με αποτέλεσμα, την αναστολή δράσης ορισμένων ενζύμων, την οξείδωση των λιπιδίων, την καταστροφή της δομής του κυτταρικού DNA ή άλλες κυτταροτοξικές δράσεις. Η παθοφυσιολογική κατάσταση της αυξημένης παραγωγής ROS και άλλων ελευθέρων ριζών ή της ανεπάρκειας της αντιοξειδωτικής δράσης, έχει ενοχοποιηθεί για μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση και η υπέρταση, η χρόνια φλεγμονή, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ευαισθησία (λόγω ανοσοανεπάρκειας) σε μόλυνση από τον ιό HIV, η άπνοια κατά τη διάρκεια του ύπνου και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Aruoma, 1998). Οι κυριότεροι παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και προκαλούν οξειδωτικό στρες είναι: το άγχος, η περιβαλλοντική ρύπανση, η ηλιακή (υπεριώδης) ακτινοβολία και διαφόρων τύπων ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η βαριά σωματική άσκηση, το κάπνισμα, η κακή διατροφή, οι ασθένειες, τα φάρμακα, το αλκοόλ κ.α. (Masella *et al.*, 2005).

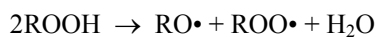
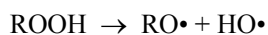
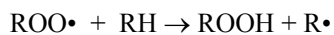
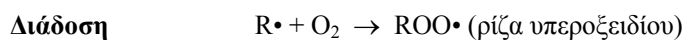
ΙΙΙ.15. Μηχανισμός Δράσης Ελευθέρων ριζών.

Η αλληλουχία των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών χωρίζεται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμός (termination).

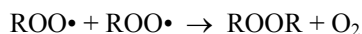
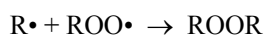
Κατά το αρχικό στάδιο της αυτοοξειδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων, αλλά και κάθε αντίδρασης ελευθέρων ριζών, δημιουργούνται ρίζες. Στα ακόρεστα λιπαρά οξέα, οι ρίζες δημιουργούνται με απόσπαση του αλλυλικού υδρογόνου, λόγω ενεργοποίησης (π.χ. θέρμανση):



Στη συνέχεια το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προστίθεται στο ενεργοποιημένο μεθυλένιο που έχει δημιουργηθεί δίνοντας ένα υδροϋπεροξειδίο και μια νέα ρίζα λιπαρού οξέος, η οποία μπορεί εκ νέου να προκαλέσει οξείδωση. Το οξυγόνο μπορεί να προστεθεί απευθείας στον διπλό δεσμό σχηματίζοντας ένα υδροϋπεροξειδίο. Τα υδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται είναι πολύ ασταθή και διασπώνται προς νέες δραστικές ρίζες (στάδιο εξάπλωσης):



Κατά το στάδιο του τερματισμού, σχηματίζονται σταθερά προϊόντα. Αυτό συμβαίνει είτε μέσω της αντίδρασης δύο ελεύθερων ριζών, είτε λόγω της ύπαρξης αντιοξειδωτικών που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (Jadhav *et al.*, 1996).



Με βάση τον ανωτέρω μηχανισμό πιστεύεται ότι επιτελείται η αυτοοξείδωση των λιπών και των ελαίων, δηλαδή η αντίδρασή τους με το οξυγόνο (Μπόσκου, 1997; Zhu *et al.*, 2001). Η παραπάνω διαδικασία είναι γνωστή ως αλυσωτή αντίδραση.

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους: αυτά που παρεμποδίζουν ή καθυστερούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (παρεμποδιστικά αντιοξειδωτικά - preventive antioxidants) και αυτά που παρεμβαίνουν και ανακόπτουν την αλυσωτή αντίδραση (αντιοξειδωτικά ‘διάσπασης αλυσίδας’ – ‘chain-breaking’ antioxidants). Η δεύτερη κατηγορία αντιοξειδωτικών, είναι αυτή που έχει μελετηθεί πιο πολύ και ο μηχανισμός της ακολουθεί αυτόν της προσφοράς υδρογόνου, όπου το αντιοξειδωτικό λειτουργεί ως δότης ατόμου υδρογόνου στη ρίζα ROO^{\bullet} πιο γρήγορα από ότι αυτή αντιδρά με το υπόστρωμα με σχηματισμό μιας απεντοπισμένης σταθερής ρίζας. Έτσι η αλυσωτή αντίδραση δεν συνεχίζεται ή συνεχίζεται με μικρή απόδοση. Άλλοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί επιτυγχάνονται με παροχή ηλεκτρονίου/ων (electron donation) και διακοπή δράσης του οξυγόνου στην απλή κατάσταση (singlet oxygen quenching).

ΙΙΙ.16. Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτική μπορεί να οριστεί οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με την συγκέντρωση ενός υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Percival, 1998; Young & Woodside, 2001). Ως υπόστρωμα χαρακτηρίζεται κάθε μόριο που μπορεί να οξειδωθεί, όπως πρωτεΐνες, λίπη, DNA κ.α..

Ο έλεγχος των επιπέδων των ελευθέρων ριζών, πιθανώς αποτέλεσε ισχυρό μηχανισμό εξελικτικής πίεσης μετά την εμφάνιση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα και μια σειρά ιεραρχημένων μηχανισμών αναπτύχθηκε προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα δραστικά ενδιάμεσα παράγωγα. Προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση ROS, οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν ένα αμυντικό σύστημα που λειτουργεί στον ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό χώρο, καθώς και στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας στοχεύουν τόσο στα πρώιμα στάδια σχηματισμού ριζών, όσο και στην αλυσίδα των μετασχηματισμών που αυτές υφίστανται και επιτυγχάνει ισορροπία ανάμεσα στις οξειδωτικές και τις αντιοξειδωτικές ουσίες του κυττάρου (Saffari & Sadrzadeh, 2004). Είναι γεγονός ότι χωρίς την ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού, η συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών στον οργανισμό θα ήταν σε τέτοιο βαθμό που δεν θα επέτρεπε την επιβίωσή του (Liu

et al., 2000). Με άλλα λόγια τα αντιοξειδωτικά είναι οι συλλέκτες των ελευθέρων ριζών που παράγονται.

Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει στον οργανισμό μια προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, όπως αυτή που προσφέρουν ορισμένα ένζυμα και διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια. Όταν η ισορροπία ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και την αντιοξειδωτική άμυνα διαταραχτεί, τότε οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη διάφορων ασθενειών.

Κάτω από συνθήκες καταπόνησης η περιεκτικότητα των φυτών σε φαινολικά συστατικά αυξάνει, πιθανώς λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών. Πολλές φορές όμως η υπερπαραγωγή αντιοξειδωτικών δε συμβαδίζει με την προστασία των φυτικών κυττάρων, γιατί αυτά, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, μπορεί να εμφανίσουν προοξειδωτική δράση.

Προκειμένου μία ένωση, π.χ. φαινόλη, να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό, θα πρέπει να έχει τις εξής δύο ιδιότητες:

1. Όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξειδωση υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοοξειδωση ή την προκληθείσα από ελεύθερες ρίζες οξειδωση και
2. Η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται μετά την δράση της, πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακού υδρογονικού δεσμού) σε περαιτέρω οξειδωση (**Vinson, 1998**).

Επιπρόσθετα, ένα αντιοξειδωτικό θα πρέπει:

1. Να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με το υπόστρωμα για την ενεργή διάμεση ουσία.
2. Να επαναγεννάται γρήγορα από το βιολογικό σύστημα.
3. Να έχει πρόσβαση στην ενεργή διάμεση ουσία στο μικροπεριβάλλον. Το αντιοξειδωτικό πρέπει να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξειδωση υπόστρωμα (**Bravo, 1998**).

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα αντιοξειδωτικά είναι μια ανομοιογενής ομάδα χημικών που δεν έχουν τίποτα κοινό μεταξύ τους, εκτός από την ιδιότητά τους να συνδέονται με ελεύθερες ρίζες ή με χημικές ενώσεις που δημιουργούν ελεύθερες

ρίζες, έτσι ώστε να προστατεύουν τον οργανισμό των ζώντων οργανισμών από την οξειδωση (Horiuchi *et al.*, 1992).

Τα βιολογικά αντιοξειδωτικά έχουν τις εξής ιδιότητες (Γάλαρης & Δούλιας, 2001):

A. Η ανασταλτική δράση τους εστιάζεται κυρίως στον ενδοκυτταρικό χώρο. Έχουν δηλαδή την ικανότητα να διαπερνούν με κάποιο τρόπο τις κυτταρικές μεμβράνες και να βρίσκονται την κατάλληλη στιγμή στο κατάλληλο σημείο και στην κατάλληλη συγκέντρωση.

B. Μπορούν να βοηθούν τους αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου συντελώντας, για παράδειγμα, στη διατήρηση της στάθμης της γλουταθειόνης και κατ' επέκταση βοηθώντας την απομάκρυνση του H₂O₂.

Γ. Μπορούν να δράσουν ως χηλικοί παράγοντες δεσμεύοντας οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα μετάλλων και άρα αναστέλλοντας την συμμετοχή τους σε αντιδράσεις παραγωγής κυταροτοξικών προϊόντων.

Δ. Σε ορισμένες περιπτώσεις προάγουν τη βιοσύνθεση νέων πρωτεϊνών, οι οποίες ενέχονται είτε στην άμυνα είτε σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων.

E. Προστατεύουν τα κύτταρα αναστέλλοντας τις διαδικασίες μεταγωγής του σήματος, τις οποίες προκαλεί ο συγκεκριμένος οξειδωτικός παράγοντας.

Ένα συνθετικό αντιοξειδωτικό, για να είναι λειτουργικό, οφείλει να συνδυάζει τις παρακάτω ιδιότητες (Μπόσκου, 1997) :

- ✓ Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
- ✓ Να μην έχει καμία βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
- ✓ Να μην προσδίδει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
- ✓ Να είναι, έστω και ελάχιστα, λιποδιαλυτό.
- ✓ Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου.

Σύμφωνα με την Βαφοπούλου – Μαστρογιαννάκη (2003) θα πρέπει επίσης :

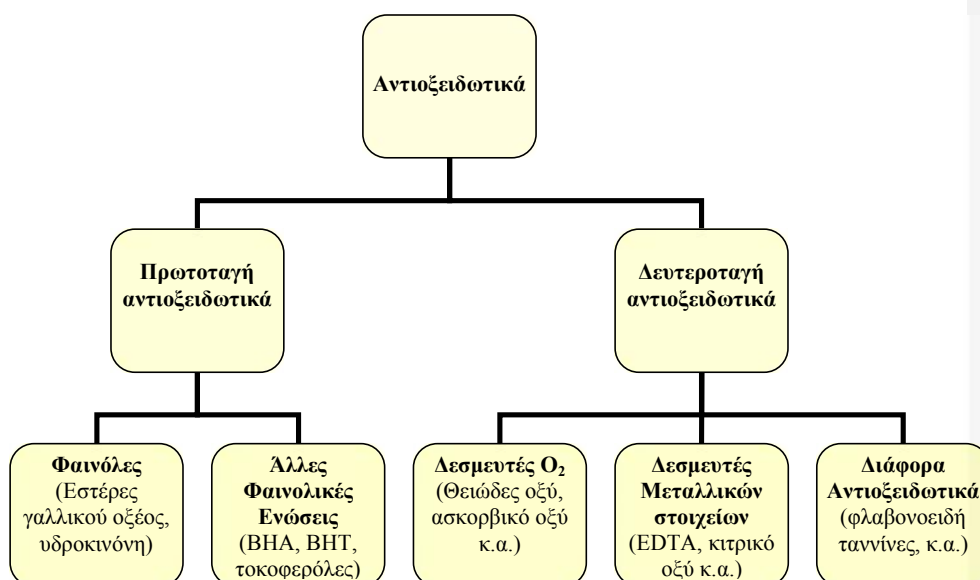
- ✓ Να μην μεταβάλλει το φυσικό χρώμα των τροφίμων.
- ✓ Να είναι εύκολη η παρασκευή ή η προμήθεια του.

- ✓ Να έχει μικρό κόστος.

Σε σχέση με τα βιολογικά αντιοξειδωτικά τα συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα και έχουν χαμηλό κόστος (Chen *et al.*, 1992).

ΙΙΙ.17. Κατάταξη Αντιοξειδωτικών Ουσιών

Τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα πρωτοταγή και τα δευτεροταγή (Σχήμα ΙΙΙ-15).



Σχήμα ΙΙΙ-15: Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών.

ΙΙΙ.17.1. Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελεύθερων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι φαινολικές ενώσεις. Παραδείγματα πρωτογενών αντιοξειδωτικών αποτελούν η BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), η TBHQ (δι-τριπ-βουτυλουδροκινόνη), ο PG

(προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), οι φυσικές και συνθετικές τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά. (Γάλαρης και Δούλιας, 2001).

ΙΙΙ.17.2. Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κάποιες ομάδες αντιοξειδωτικών με διαφορετικές ιδιότητες και είναι:

- ✓ Ενώσεις που έχουν την δυνατότητα να δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν με το οξυγόνο, σχηματίζουν ενώσεις με αυτό, και μειώνουν τη συγκέντρωσή του σε ένα κλειστό σύστημα. Την ικανότητα αυτή παρουσιάζουν αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και οι εστέρες του, το θειώδες οξύ και τα άλατά του, αλλά και τα καροτενοειδή (Pokorny *et al.*, 2001). Το ασκορβικό οξύ δρα ως συνεργός με κύρια αντιοξειδωτικά, συχνά με τοκοφερόλες, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ως το κυρίως αντιοξειδωτικό σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Επίσης το ασκορβικό οξύ, με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα (για να είναι λιποδιαλυτό), πιστεύεται ότι αναγεννά τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρέχοντας υδρογόνο στις φαινόξυ-ρίζες και έτσι έχει μία έμμεση δράση ως αντιοξειδωτικό. Ως αναγωγικό, το ασκορβικό οξύ μεταφέρει άτομα υδρογόνου στις κινόνες που σχηματίζονται κατά την ενζυμική αμάυρωση των φαινολικών ουσιών και αυτό παρέχει μία προστασία στις πρόσφατα κομμένες επιφάνειες των φρούτων και λαχανικών.
- ✓ Ενώσεις που σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, όπως αυτά του χαλκού και του σιδήρου. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύουν τα μέταλλα, τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Τέτοιες ενώσεις είναι τα οξέα ή τα παράγωγά τους που σχηματίζουν χηλικές ενώσεις όπως το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), το κιτρικό οξύ, το φωσφορικό οξύ κ.α.. (Gordon, 1990; Jadhav, 1996).
- ✓ Οι αποσβεστές διηγεργμένου (singlet) οξυγόνου, οι οποίοι απενεργοποιούν το μονήρες οξυγόνο. Εδώ ανήκουν οι τοκοφερόλες και το β-καροτένιο.
- ✓ Ένζυμα. Αυτά δρουν είτε απομακρύνοντας το εν διαλύσει οξυγόνο, είτε απομακρύνοντας συστατικά του τροφίμου που είναι ευοξειδωτα. Παραδείγματα για την κατηγορία αυτή αποτελούν αντίστοιχα η οξειδάση της

γλυκόζης, η υπεροξειδάση της δισμουτάσης, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (**Roberfroid, 1995**).

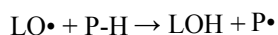
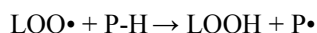
- ✓ Τέλος σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση. Τέτοια είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard (**Μπόσκου, 1997**).

ΙΙΙ.18. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων

Λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, τα τελευταία χρόνια οι πολυφαινόλες έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος. Οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν και αναστέλλουν την οξειδωση μέσω ελευθέρων ριζών με 3 τρόπους:

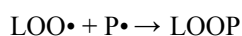
- ✓ Μπορούν να δράσουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές των αλυσωτών οξειδωτικών αντιδράσεων εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (P-H) είναι άριστοι δότες υδρογόνου (H atom transfer mechanism) ή ηλεκτρονίου (singlet electron transfer) σε ρίζες λιπιδίων (LOO•, LO•) σύμφωνα με τις παρακάτω χημικές αντιδράσεις (**Shahidi & Wanasundara, 1992**). Οι προαναφερθέντες μηχανισμοί λειτουργούν σχεδόν παράλληλα και με κυριαρχία του ενός ή του άλλου μηχανισμού (**Prior et al., 2005**).

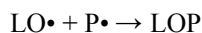
Η ευκολία απόσπασης του φαινολικού τους υδρογόνου (H atom transfer mechanism) αποτελεί σημαντικό παράγοντα χαρακτηρισμού της δραστηρότητάς της ως αντιοξειδωτικό αφού όσο πιο ασθενής είναι ο δεσμός O-H, τόσο λιγότερη ενέργεια απαιτείται για την διάσπαση του και τόσο πιο εύκολα θα αντιδράσει με τις ελεύθερες ρίζες (**Wright et al., 2001**).



Με αυτόν τον τρόπο, καθίστανται οι ίδιες ελεύθερες ρίζες, που είναι όμως πολύ σταθερές λόγω της πολυφαινολικής δομής που μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά (**Halliwell, 2008**).

Επίσης τα ενδιάμεσα της φαινοξυρίζας έχουν τη δυνατότητα να τερματίζουν τον πολλαπλασιασμό των ριζών αντιδρώντας με άλλες ελεύθερες ρίζες:





- ✓ Δρουν ως δεσμευτές μεταλλικών ιόντων τα οποία συχνά είναι οι εκκινητές μίας οξειδωσης, μέσω της δημιουργίας ενός χηλικού συμπλόκου (**Mira et al., 2002**).
- ✓ Αναγεννούν άλλα αντιοξειδωτικά τα οποία είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό όπως π.χ. τη βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη), ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, μέσω της μείωσης της ρίζας α-τοκοφερόλης (**Natella et al., 1999**).

Η ικανότητα των πολυφαινόλων ως αντιοξειδωτικές ενώσεις εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική τους δομή. Η φαινόλη είναι ανενεργή ως αντιοξειδωτικό, αλλά τα ορθο- και παρα- διφαινολικά παράγωγα έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία αυξάνει με την αντικατάσταση ατόμων με αιθυλικές ή η-βουτυλικές ομάδες (**Shahidi & Wanasundara, 1992**).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται από την παρουσία σακχάρου στο μόριο της φαινολικής ένωσης. Έτσι, ενώ π.χ. κάποιοι γλυκοζίτες δεν είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι αντίστοιχες αγλυκόνες μπορεί να είναι (**Ratty & Das, 1988**).

Παραδοσιακά αντιοξειδωτική ικανότητα έχει αποδοθεί μόνο στις εκχυλιζόμενες πολυφαινόλες (διαλυτά φαινολικά συστατικά). Ωστόσο σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι μη εκχυλιζόμενες πολυφαινόλες (πολυμερείς προανθοκυανιδίνες και υψηλού μοριακού βάρους υδρολυόμενες ταννίνες) είναι 15 με 30 φορές ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από τις εκχυλιζόμενες. Λόγω της μη απορρόφησης τους οι εκχυλιζόμενες πολυφαινόλες μπορούν να εμφανίσουν αντιοξειδωτική ικανότητα μέσα στο γαστρεντερικό σωλήνα προστατεύοντας έτσι τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες από την οξειδωτική βλάβη κατά την πέψη, κι εξοικονομώντας με αυτό τον τρόπο τα διαλυτά αντιοξειδωτικά (**Hagerman et al., 1998**).

ΙΙΙ.19. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο ισχυρών φυσικών αντιοξειδωτικών επειδή έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω δομικά στοιχεία τα οποία εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική ικανότητα:

1. Μία ο-διφαινολική ομάδα στο δακτύλιο Β, η οποία προσφέρει υψηλή σταθερότητα στο σχηματισμό ριζών και συμμετέχει στον εκτοπισμό των ηλεκτρονίων.
2. Έναν 2-3 διπλό δεσμό σε συζυγία με την 4-οξο δράση στον C δακτύλιο, υπεύθυνο για τον εκτοπισμό ηλεκτρονίων από τον Β δακτύλιο και
3. Υδροξυλάσες στις θέσεις 3 και 5 μαζί με την 4-οξο δράση στους Α και C δακτυλίους για μέγιστη δυνατότητα δέσμευσης των ριζών (**Heim et al., 2002; Ratty & Das, 1988**).

Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών οφείλεται επίσης στο γεγονός ότι είναι πολύ καλοί δέκτες υδροξυλικών και υπεροξυλικών ριζών, μια ιδιότητα που διατηρούν ακόμη και μετά το σχηματισμό συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα (**Afanas et al., 1989**). Ο βαθμός υδροξυλίωσης των φλαβονοειδών επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση. Έτσι οι ενώσεις που διαθέτουν πολλές ομάδες υδροξυλίου έχουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα. Για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ισομερών της κατεχίνης είναι τουλάχιστον διπλάσια από αυτή της βιταμίνη Ε (**Rice-Evans & Miller, 1995**).

ΙΙΙ.20. Προοξειδωτική & συνεργός δράση των Φαινολικών Ενώσεων

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να εκκινήσουν μια πορεία αυτοοξειδωσης και να συμπεριφερθούν ως προοξειδωτικά (επιταχυντές οξειδωσης) κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως είναι η υψηλή συγκέντρωση φαινολικών αντιοξειδωτικών, το υψηλό pH και η παρουσία σιδήρου (**Shahidi & Wanasundara, 1992**). Η προοξειδωτική τους δράση, φαίνεται να είναι ευθέως ανάλογη προς τον αριθμό των υδροχρ- ομάδων που φέρουν (**Heim et al., 2002; Simić et al., 2007**).

Συνέργεια ή συνεργός δράση, ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία η δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών αυξάνεται όταν αυτές χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό (**Moure et al., 2001**). Η συνεργός δράση έχει μελετηθεί σε διάφορες ερευνητικές μελέτες, όπως η ενέργεια του π-κουμαρικού και του φερουλικού οξέος κατά την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος (**Maillard & Berset, 1995**), η δράση μίγματος τεσσάρων φαινολικών ενώσεων (κατεχίνης, εσπεριδίνης, κερκετίνης και

φερουλικού οξέος) στην παρεμπόδιση της οξειδωτικής μετατροπής της LDL (Cirico & Omaye, 2006) κ.α..

ΙΙΙ.21. Ανάλυση και Μελέτη Φαινολικών Ενώσεων

ΙΙΙ.21.1. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Συνολικών Φαινολικών Συστατικών: Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEU

Προκειμένου να καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών συστατικών σε ένα φυτικό ιστό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι όπως, του τιτανίου, του κυανού του Βερολίνου κ.α.. Μεταξύ αυτών, η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι η σημαντικότερη και χρησιμοποιείται ευρύτατα στις χημικές αναλύσεις. Η μέθοδος αναπτύχθηκε στην Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου του Χάρβαρντ από τον Folin και τους συνεργάτες του το 1912, για τη μελέτη του μεταβολισμού των πρωτεϊνών στον άνθρωπο. Το 1927 τροποποιήθηκε από τους Folin και Ciocalteu (Folin, 1927) και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών συστατικών (Vermerris & Nicholson, 2008). Συγκαταλέγεται δε στις επίσημες μεθόδους της A.O.A.C. (*Association of Analytical Commities*).

Είναι μία φωτομετρική τεχνική που βασίζεται στη “αναγωγική δράση” παρουσία πολυφαινολικών ομάδων. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη αφού επιτρέπει την εκτίμηση του συνόλου των πολυφαινολικών συστατικών ενός φυσικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί. Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται Η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο F.C. είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται σε αλκαλικό περιβάλλον με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων του αντιδραστηρίου. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που

απορροφά στο ορατό (725nm). Το εξασθενές σύμπλοκο παρουσιάζει τις ακόλουθες δομές :



Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (35%, w/v) που αφενός μεν δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του F.C. και του προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου δε, αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων (**Balentine et al., 1997; Prior et al., 2005**).

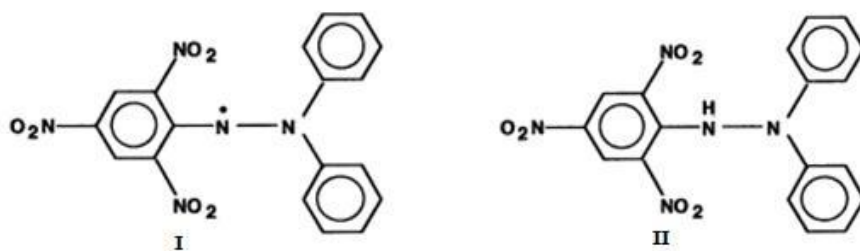
Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε τιμές ισοδύναμες με αυτές κάποιας πρότυπης ουσίας όπως το γαλλικό ή το καφεϊκό οξύ. Έτσι, εξασφαλίζεται η γραμμικότητα με βάση το νόμο *Beer-Lambert* και υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων.

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι μια απλή, ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού ολικών φαινολών. Το μειονέκτημά της έγκειται στο γεγονός ότι δεν προσδιορίζει μόνο τα εκχυλιζόμενα φαινολικά συστατικά, αλλά και μεγαλομοριακές ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους φαινολική υδροξυλομάδα όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα, ασκορβικό οξύ, οργανικά οξέα κ.α. (**Prior et al., 2005**). Επιπλέον, από τη συγκεκριμένη μέθοδο δίδεται μόνο μια απλή εικόνα για το ολικό ποσό των φαινολικών συστατικών σε ένα εκχύλισμα και δεν μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για συγκεκριμένα επιμέρους φαινολικά συστατικά.

III.21.2. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Ικανότητας: Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH (διφαινολοπικρυλυδραζύλιο, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών, των αντιοξειδωτικών συστατικών ενός δείγματος. Ως μέθοδος προτάθηκε το 1958 από τον Marsden Blois του πανεπιστημίου Stanford προκειμένου να μετρηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του αμινοξέος κυστεΐνη (**Blois, 1958**). Έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό τις αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών. Το DPPH είναι μια από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου ($\lambda_{\text{max}}=517\text{nm}$) με έντονο ιώδες χρώμα, που μπορεί

να διατηρηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα αφού δεν διμερίζεται και δεν αντιδρά με το οξυγόνο. Έχει χρησιμοποιηθεί σε έρευνες για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φαινολικών συστατικών, αμινών, βιταμινών και φαρμακευτικών προϊόντων (Ionita, 2003). Στο Σχήμα ΙΙΙ-16 παρουσιάζεται η δομή του DPPH ως ελεύθερη και δεσμευμένη ρίζα (Molyneux, 2004).



Σχήμα ΙΙΙ-16: Ελεύθερη (I) και Δεσμευμένη (II) ρίζα DPPH (Molyneux, 2004)

Υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση των ελευθέρων (κατά τα άλλα σταθερών) ριζών του DPPH., παραγωγή ανοιχτόχρωμου προϊόντος (από ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο) και κατ' επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης. Η ικανότητα αυτή του δεσμευτικού παράγοντα στηρίζεται στην προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου κάθε φορά, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του βαθμού δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Balentine *et al.*, 1997; Roginsky & Lissi, 2004). Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 517 nm (Huang *et al.*, 2005) και υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο :

$$\% \text{ μείωση DPPH} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

όπου : A_{DPPH} η απορρόφηση του DPPH στα 517 nm (blank δείγμα) και

$A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

Επειδή η ποσότητα των αντιοξειδωτικών στα φυτικά εκχυλίσματα ποικίλει, τόσο το τελικό ποσοστό δέσμευσης όσο και η ταχύτητα δέσμευσης της ρίζας διαφοροποιούνται. Για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη βοήθεια του δείκτη EC_{50} (Efficient Concentration) ή IC_{50} (Inhibition Concentration). Ο δείκτης IC_{50} (mg/l) εκφράζει τη συγκέντρωση του δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η απορρόφηση του διαλύματος DPPH κατά 50% (Brand-Williams *et al.*,

1995; Sanchez – Moreno *et al.*, 1998). Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του IC₅₀, τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Η μέθοδος αποτελεί *in vitro* τεχνική, έχει χαμηλό κόστος, είναι απλή και πλεονεκτεί ως προς το ότι η δέσμευση των ελεύθερων ριζών του DPPH από τις πολυφαινόλες του δείγματος και η φασματοφωτομέτρηση του συνολικού διαλύματος αντίδρασης (π.χ. εκχύλισμα-DPPH) δεν είναι χρονοβόρες διαδικασίες. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι η ρίζα DPPH δεν αντιδρά με φλαβονοειδείς ενώσεις που δεν διαθέτουν υδροξυλομάδες στον Β αρωματικό δακτύλιο καθώς και με αρωματικά οξέα που περιέχουν μόνο μια υδροξυλομάδα (Brand-Williams *et al.*, 1995; Yokozawa *et al.*, 1998). Τέλος, η μέθοδος DPPH δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα που περιέχουν ανθοκυανίνες, λόγω παρεμπόδισης του χρώματος του DPPH από τα δείγματα αυτά (Arnao, 2000).

ΙΙΙ.21.3. Ταυτοποίηση και Ποσοτικός Προσδιορισμός των Φαινολικών Ουσιών: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) είναι μια διαχωριστική τεχνική με πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια, καθώς θεωρείται η πλέον κατάλληλη για τον ακριβή προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων. Η τεχνική αυτή αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης και οφείλει την ανάπτυξή της στην πρόοδο της τεχνολογίας, η οποία οδήγησε στην παρασκευή χαλύβδινων στηλών ανθεκτικών στις υψηλές πιέσεις καθώς και σε αντλίες υψηλής πίεσης και σταθερής παροχής. Συν τω χρόνω, οι αντλίες έγιναν ακριβείς και τα υλικά πλήρωσης περισσότερο αποτελεσματικά για τους διάφορους διαχωρισμούς. Η HPLC υπερτερεί της χρωματογραφίας στήλης καθώς επιτυγχάνονται ταχύτεροι και καλύτερης απόδοσης διαχωρισμοί μιγμάτων.

Η HPLC ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής (*stationary phase*) και μιας κινητής φάσης (*mobile phase*). Η επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού στατικής και κινητής φάσης είναι πολύ σημαντική, προκειμένου τα μίγματα των φαινολικών ουσιών που εξετάζονται να διαχωριστούν και να αναλυθούν καθώς τόσο η ποιότητα

όσο και η απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις των ουσιών αυτών με την στήλη και την κινητή φάση (**Harnly et al., 2007**).

Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται υπό πίεση στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του διέρχονται μέσα από αυτή με τη μορφή των ζωνών και τελικά εκκλούνται το ένα μετά το άλλο. Ο βαθμός αλληλεπίδρασης των διαφόρων συστατικών του δείγματος με τη στατική φάση επηρεάζει το διαχωρισμό τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αναλυόμενες ουσίες να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης και συνεπώς να εκκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους.

Στο τέλος της στήλης τοποθετείται συνήθως ένας ανιχνευτής, ο οποίος παράγει ένα σήμα κάθε φορά που εκκλύεται ένα συστατικό (χρωματογραφική κορυφή – peak). Το διάγραμμα αυτού του σήματος ως συνάρτηση του χρόνου συγκράτησης (t_R) ονομάζεται χρωματογράφημα (chromatogram).

ΙΙΙ.21.3.1. Μηχανισμοί στη Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης

Βάσει των διαφόρων μηχανισμών αλληλεπίδρασης των συστατικών του μίγματος με τη στατική φάση, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης διακρίνεται σε :

1. Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography): η στατική φάση είναι ένας προσροφητής (π.χ silica gel) και ο διαχωρισμός βασίζεται στην διαφορετικού βαθμού προσρόφηση των συστατικών του μίγματος στην επιφάνεια της, συνήθως, στερεής στατικής φάσης. Εφαρμόζεται σε ενώσεις με παρόμοια δομή αλλά διαφορετική πολικότητα. Βάσει της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία προσρόφησης χωρίζεται σε:

- ❖ **Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης:** η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή στην οποία χρησιμοποιούνται άπολοι διαλύτες όπως το εξάνιο. Στήλες κανονικής φάσεως (normal phase) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μη πολικών φαινολικών συστατικών όπως αγλυκόνες φλαβονοειδών κ.α. (**Prior et al., 2005**).

❖ **Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης** είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική HPLC και χρησιμοποιείται στο 80% των περιπτώσεων. Η στατική φάση είναι πιο άπολη (C₈,C₁₈) από την κινητή φάση. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε στήλη αντιστρόφου φάσεως (reversed-phase) καθώς τα φαινορικά συστατικά που εξετάστηκαν χαρακτηρίζονται από πολικότητα, η οποία αν ήταν παρόμοια με εκείνη της στατικής φάσης θα οδηγούσε σε μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης καθώς θα υπήρχαν περισσότερες αλληλεπιδράσεις με την στατική φάση (Harnly *et al.*, 2007). Για την κινητή φάση χρησιμοποιούνται συνήθως μίγματα πολικών οργανικών διαλυτών (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κλπ.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.

2. Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής (ion-exchange chromatography): ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Όσο μεγαλύτερο είναι το φορτίο των ιονικών συστατικών του μίγματος, τόσο περισσότερο αυτά θα συγκρατηθούν ηλεκτροστατικά στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Η κινητή φάση είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα, όπου το pH και η ιοντική ισχύς χρησιμοποιούνται για να ελέγχεται ο χρόνος έκλουσης (Skoog, 1985).

3. Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Size exclusion chromatography): ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει σχήματος και μεγέθους μορίων των αναλυόμενων ενώσεων και χρησιμοποιείται στα πολυμερή. Η κινητή φάση διέρχεται από μια πορώδη πηκτή, το μέγεθος των πόρων της οποίας είναι αρκετά μικρό ώστε να επιτρέπει την είσοδο μόνο μορίων μικρού μεγέθους, αποκλείοντας τα μόρια μεγάλου μεγέθους. Έτσι, τα μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως, ενώ τα μόρια μικρού μεγέθους αργούν να εξέλθουν από τη στήλη, αφού χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης για να τα παρασύρει (Skoog, 1985).

ΙΙΙ.21.3.2. Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Σύστημα παροχής κινητής φάσης (pump)
- Μονάδα εισαγωγής του δείγματος (injector)
- Χρωματογραφική στήλη(column)
- Ανιχνευτή (detector)
- Σύστημα συλλογής δεδομένων και καταγραφής αποτελεσμάτων (recorder or data collecting system)

Στην αναλυτική στήλη, λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος ενώ η προώθηση της κινητής φάσης γίνεται με τη χρήση αντλίας υψηλής πίεσης. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας. Καθένα από τα συστατικά του δείγματος εκλούεται κι εμφανίζεται ως κορυφή στο σύστημα καταγραφής. Η ανίχνευση των εκλούομένων συστατικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο και μπορεί να είναι είτε εκλεκτική είτε όχι, ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Η απόκριση του ανιχνευτή για κάθε συστατικό του δείγματος είναι το χρωματογράφημα.

Η κινητή φάση είναι μίγματα διαφόρων αναλογιών κατ' όγκο, ενός ή περισσοτέρων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικών διαλυμάτων στην κατάλληλη τιμή pH στην περίπτωση της HPLC αντίστροφης φάσης ή μίγματα άπολων διαλυτών στην περίπτωση της HPLC κανονικής φάσης. Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι χαμηλή τιμή, χαμηλή τοξικότητα, να μην αντιδρούν με τα συστατικά υπό ανάλυση, να είναι πτητικοί και να έχουν χαμηλό ιξώδες.

Η επιλογή της κινητής φάσης αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων. Η βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης αποτελεί επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Η εύρεση της καταλληλότερης κινητής φάσης γίνεται με κριτήριο πάντα τον επιτυχή διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος σε εύλογο χρονικό διάστημα.

Η έκλουση των αναλυόμενων συστατικών μπορεί να είναι ισοκρατική (isocratic elution) ή βαθμωτή (gradient elution). Στην ισοκρατική έκλουση διατηρείται σταθερή η σύσταση της κινητής φάσης σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Η ισοκρατική έκλουση επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, έχει χαμηλότερο κόστος σε σχέση με τη βαθμωτή, με σταθερότερη βασική γραμμή. Το κυριότερο μειονέκτημά της είναι ότι πολλές φορές ο διαχωρισμός δεν είναι επιτυχής. Στην βαθμωτή έκλουση, η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με το χρόνο οπότε επιτυγχάνεται ταχύτερη μετακίνηση των συστατικών που συγκρατούνται ισχυρά στη στήλη και ο ικανοποιητικός διαχωρισμός αυτών που συγκρατούνται ελάχιστα. Συνήθως στην HPLC αντίστροφης φάσης, η αρχική σύσταση της κινητής φάσης χαρακτηρίζεται από μικρό ποσοστό οργανικού διαλύτη, γεγονός που επιτρέπει το διαχωρισμό των συστατικών που δε συγκρατούνται ισχυρά στην στατική φάση. Τα συστατικά που συγκρατούνται ισχυρότερα μετακινούνται μόνο όταν αυξηθεί αρκετά το ποσοστό του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση λόγω των ανταγωνιστικών δράσεων που λαμβάνουν χώρα. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης της κινητής φάσης μπορεί να επιτευχθεί αναμιγνύοντας δύο ή περισσότερους διαλύτες σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα (Skoog, 1985).

Σε ένα διαχωρισμό με βαθμωτή έκλουση ακολουθούνται τα εξής στάδια:

- Καθορισμός αρχικής και τελικής σύστασης της κινητής φάσης
- Καθορισμός του χρόνου ανάλυσης
- Επιλογή του τρόπου μεταβολής της σύστασης της κινητής φάσης
- Βελτιστοποίηση της ταχύτητας ροής και
- Επαναφορά της στήλης στις αρχικές συνθήκες εξισορρόπησης.

Συστήματα βαθμωτής έκλουσης εφαρμόζονται για τον διαχωρισμό φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών καθώς αυτά διαχωρίζουν περισσότερα συστατικά (Ong, 2004).

Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης των στηλών έχουν ως βάση την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) λόγω χαμηλού κόστους και ανθεκτικότητας. Η επιφάνεια του αποτελείται από σιλανολικές (-SiOH) και σιλοξανικές (-Si-O-Si) ομάδες.

Οι αντλίες (δηλαδή τα συστήματα παροχής κινητής φάσης) που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι υψηλής πίεσης. Ο ρόλος τους είναι η άντληση της κινητής φάσης και η διαβίβασή της κάτω από υψηλή πίεση στη στήλη. Οι αντλίες αυτές λαμβάνουν ακριβή όγκο διαλύτη με σταθερή ταχύτητα ροής

και πίεση. Οι ταχύτητες ροής που μπορούν να επιτευχθούν με τέτοιου είδους αντλίες είναι 0,5-5mL/min. Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται σε όλες τις εφαρμογές HPLC είναι αντλίες σταθερής ροής.

Στα διάφορα συστήματα HPLC είναι δυνατόν να θερμοστατείται η στήλη ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης. Με τον όρο θερμοστάτηση εννοείται η διατήρηση της θερμοκρασίας της στήλης σταθερή είτε χαμηλότερα είτε ψηλότερα από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος χώρου.

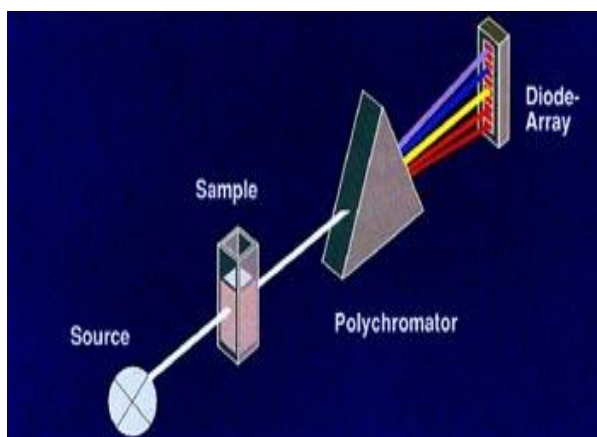
Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι είτε γενικοί και μετρούν την αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης, είτε ειδικοί. Οι γενικοί ανιχνευτές μετράνε την αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης ενώ οι ειδικοί μετράνε την αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των αναλυόμενων συστατικών η οποία μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα του ανιχνευτή μπορεί να είναι ανάλογο είτε της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας είτε της ροής μάζας της ουσίας.

Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι οι εξής:

- Υπεριώδους-ορατού
- Παράταξης φωτοδιόδων
- Αγωγιμομετρικοί
- Δείκτη διάθλασης
- Φασματογράφοι μάζας
- Ηλεκτροχημικοί
- Φθορισμομετρικοί
- Ραδιομετρικοί
- Σκεδασμού φωτός
- Φλόγας.

Από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Με τον ανιχνευτή UV-Vis η ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας βασίζεται αποκλειστικά στον χρόνο κατακράτησης αυτής, γεγονός που οδηγεί συχνά σε λανθασμένες εκτιμήσεις αφού πολλές φορές μια κορυφή κρύβει παρεμποδίζουσες ενώσεις που συνεκλούνται. Λύση στο πρόβλημα αυτό δόθηκε με ένα νέου τύπου ανιχνευτή UV-Vis, τον ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (diode array detector, DAD) ο οποίος συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της αναλυόμενης ουσίας σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους. Η τεχνική διαφορά των δυο ανιχνευτών είναι η παρουσία του ολογραφικού φράγματος στη θέση

του μονοχρωμάτορα. Το δείγμα δέχεται ακτινοβολία ολόκληρου φάσματος και η ακτινοβολία που βγαίνει από την κυψελίδα αφού αναλυθεί στο ολογραφικό φράγμα, προσπίπτει σε παράταξη φωτοдиодων η οποία περιλαμβάνει φωτοευαίσθητα στοιχεία. Κάθε δίodos δέχεται την ακτινοβολία από ένα μόνο nm και το σήμα ενισχύεται και μετατρέπεται σε ψηφιακό για να αποθηκευτεί (Σχήμα ΙΙΙ-17).



Σχήμα ΙΙΙ-17: Ανιχνευτής με συστοιχία διοδίων (DAD)

Η δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης της ανάλυσης σε περισσότερα του ενός μήκη κύματος καθώς και η ανάλυση μιγμάτων ενώσεων που απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος είναι τα βασικά πλεονεκτήματα με κύριο μειονέκτημα τη μειωμένη ευαισθησία σε σχέση με τον ανιχνευτή UV-Vis (Dorsey *et al.*, 1994; Παπαδογιάννης κ.α. 2000; McMaster, 1994). Το σύστημα συστοιχίας διοδίων επιτρέπει τη συλλογή φασμάτων και την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών σε πολλά μήκη κύματος, χαρακτηριστικό το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό αφού τα φαινολικά συστατικά εμφανίζουν μέγιστα απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος (Rice- Evans *et al.*, 1996).

ΙΙΙ.22. Σκοποί του Πειράματος

Τα φυτά παράγουν ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών μερικές εκ των οποίων έχουν ταξινομηθεί ως φαινολικοί δευτερογενείς μεταβολίτες. Το φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων και καρπών της ελιάς είναι πολύπλοκο και διαφέρει τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά σε ότι αφορά στις φαινολικές ουσίες που περιέχει καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ποικιλία, το κλίμα, το καθεστώς άρδευσης, τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού, και την διαδικασία επεξεργασίας εφόσον αναφερόμαστε σε επεξεργασμένους καρπούς. Από την αναδρομή στην διεθνή και Ελληνική βιβλιογραφία, προκύπτει ότι τα δεδομένα τα οποία σχετίζονται με τη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών, την αντιοξειδωτική ικανότητα και το φαινολικό προφίλ των διαφόρων ιστών της ελιάς, ειδικά για Ελληνικές ποικιλίες, είναι περιορισμένα και σποραδικά.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η παρούσα εργασία έθεσε ως στόχους:

- Την επίδραση του γονοτύπου, των ιστών και της εποχής συγκομιδής στη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.
- Τη συσχέτιση της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.
- Την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών σε διαφορετικές ποικιλίες, διαφορετικούς ιστούς και διαφορετικές εποχές.

ΙΙΙ.23. Υλικά & Μέθοδοι

Δέκα ποικιλίες ελιάς μελετήθηκαν ως προς το συνολικό φαινολικό τους περιεχόμενο και ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα σε διαφορετικούς ιστούς (φύλλα, καρπούς) και διαφορετικές εποχές και έτη, σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και DPPH, αντίστοιχα. Έγινε επίσης ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών που περιείχαν, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

ΙΙΙ.23.1. Συλλογή – Αποθήκευση Φυτικού Υλικού

Το φυτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από δέκα ποικιλίες ελιάς: «Κορωνέικη», «Λιανολιά Κερκύρας», «Μαστοειδής», «Arbequina», «Αδραμυττινή», «Μεγάρων», «Γαϊδουρελιά», «Καλαμών», «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδικής».

Η συλλογή του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε κατά τις πρωινές ώρες, ενώ ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στη συλλογή υγιούς ιστού απαλλαγμένου από οποιοδήποτε είδος ασθένειας. Για κάθε μια από τις 10 ποικιλίες επιλέχθηκαν 2 δένδρα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις φύλλων και καρπών, από 4 σημεία περιμετρικά της κόμης τους. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο των Υποδιαμεμένων Τεμαχίων (Split plot design). Οι ημερομηνίες συλλογής των δειγμάτων, το είδος του ιστού, καθώς και το βλαστικό στάδιο των δένδρων στις συγκεκριμένες ημερομηνίες δειγματοληψίας εμφανίζονται στον **Πίνακα ΙΙΙ-5**.

Πίνακας ΙΙΙ-5: Δεδομένα συλλογής των υπό μελέτη φυτικών δειγμάτων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΙΣΤΟΣ	ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2008	ΦΥΛΛΑ	Τρέχουσα βλάστηση
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2008	ΚΑΡΠΟΙ	Πράσινοι καρποί
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2008	ΚΑΡΠΟΙ	Μαύροι καρποί
ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2009	ΦΥΛΛΑ	Τρέχουσα βλάστηση
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2009	ΦΥΛΛΑ & ΚΑΡΠΟΙ	Φύλλα του έτους & πράσινοι καρποί
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2009	ΦΥΛΛΑ & ΚΑΡΠΟΙ	Φύλλα του έτους & μαύροι καρποί

Το έτος 2008 ήταν έτος αυξημένης παραγωγής σε αντίθεση με το έτος 2009, όπου λόγω του φαινομένου της παρενιαιοφορίας, η παραγωγή ήταν μειωμένη. Εξαιτίας του παραπάνω φαινομένου καθώς και λόγω του νεαρού της ηλικίας των ελαιόδεντρων, για το έτος 2009 κατέστη δυνατή η συγκομιδή πράσινων ελαιόκαρπων από τις ποικιλίες «Κορωνέικη», «Λιανολιά Κερκύρας», «Μαστοειδής», «Αδραμυτινή» & «Κονσερβολιά» και μαύρων ελαιόκαρπων από τις ποικιλίες «Κορωνέικη», «Λιανολιά Κερκύρας», «Μαστοειδής» & «Κονσερβολιά». Το έτος 2008 λόγω σημαντικής εντομολογικής προσβολής των ελαιόδεντρων και αδυναμίας εύρεσης υγιών δειγμάτων, κατέστη δυνατή η συγκομιδή μαύρων καρπών από τις ποικιλίες «Λιανολιά Κερκύρας», «Μαστοειδής», «Μεγάρων», «Γαϊδουρελιά», & «Χαλκιδικής».

Μετά τη συλλογή, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια με κατάλληλη σήμανση μέσα σε φορητό ψυγείο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο και την τοποθέτησή τους σε καταψύκτη με θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ΙΙΙ.23.2. Παραλαβή Φαινολικών Συστατικών – Εκχύλιση

Υλικά & Αντιδραστήρια

1. Φυτικά δείγματα (φύλλα & καρποί)
2. Διαλύτες
 - Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
 - Εξάνιο αναλυτικής καθαρότητας (Merck)

Όργανα

1. Ζυγός Ακριβείας
2. Ομογενοποιητής Ultra-Turrax T25 Basic (IKA LABORRTECHNIK)
3. Φυγόκεντρος Labofuge 400, Functionline (Heraeus)
4. Σύστημα συσκευής Buchner

Η εκχύλιση των φυτικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όπως αυτή αναφέρθηκε από τους **Ryan et al., (2002)** με μικρές τροποποιήσεις. Ζυγίστηκαν 0,8 g φυτικού ιστού (φύλλο ή καρπός) και προστέθηκαν 4mL μεθανόλης. Ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων σε ομογενοποιητή τύπου Ultra-Turrax T25 Basic. Το διάλυμα, αφού παρέμεινε σε σκοτεινό χώρο για διάστημα 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 6 λεπτά στις 4000 στρ/λεπτό σε φυγόκεντρο τύπου Labofuge 400, Functionline και ακολούθησε ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Η υγρή φάση τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε falcons των 15mL, ενώ στη στερεά μάζα που ανακτήθηκε προστέθηκαν ακόμη 4mL μεθανόλης και επαναλήφθηκε η παραπάνω διαδικασία ακόμη μια φορά. Τα διηθήματα συνδυάστηκαν και φιλτραρίστηκαν σε συσκευή Buchner. Στο φιλτραρισμένο πλέον δείγμα προστέθηκαν 5mL εξάνιου προκειμένου να απομακρυνθούν τα λιπαρά συστατικά και οι χρωστικές του δείγματος. Το εξάνιο απορρίφθηκε με τη βοήθεια διαχωριστικής χοάνης. Ο καθαρισμός της υδατικής φάσης με εξάνιο επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές. Το παραγόμενο εκχύλισμα τοποθετήθηκε στην κατάψυξη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής δράσης σύμφωνα με τις μεθόδους Folin-Ciocalteu (**Shahidi & Nack, 1995**) και DPPH (**Molyneux, 2004**), αντίστοιχα, καθώς επίσης και για την χρωματογραφική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

ΙΙΙ.23.3. Φασματοφωτομετρικές Αναλύσεις

Υλικά & Αντιδραστήρια

1. Οργανικά εκχυλίσματα φυτικών δειγμάτων
2. Διαλύτες
 - Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
 - Υπερκάθαρο νερό
3. Αντιδραστήρια
 - Αντιδραστήριο F.C. (Folin-Ciocalteu) (Merck)
 - Ανυδρό ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) (Carlo Erba Reagenti)
 - Γαλλικό οξύ (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) (Serva)
 - Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot) (Sigma-Aldrich)

Όργανα

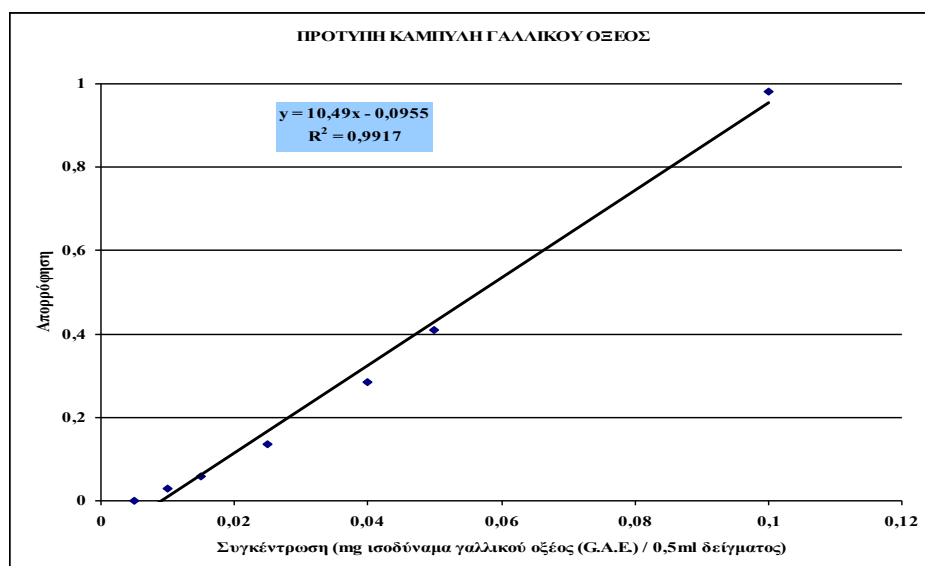
1. Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού – υπεριώδους (Jasco V-530)
2. Αναδευτήρας (Vortex)
3. Ζυγός ακριβείας
4. Μαγνητικός Αναδευτήρας
5. Υδατόλουτρο
6. Θερμόμετρο
7. Χρονόμετρο

ΙΙΙ.23.4. Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, βασίστηκε στη μέθοδο που περιγράφεται από τους **Shahidi & Naczk (1995)** χρησιμοποιώντας το γαλλικό οξύ ως πρότυπη ουσία.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν: 9 mL μεθανόλης και 1mL του προς ανάλυση φυτικού εκχυλίσματος αναμίχθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10mL. Το διάλυμα αναδεύτηκε ήπια για ένα λεπτό. Ακολούθως, σε 0,5mL αραιωμένου φυτικού εκχυλίσματος, προστέθηκαν 5mL αραιωμένου αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu (1:10 v/v). Τέλος, και μετά το πέρας 3 λεπτών προστέθηκαν και 4mL Na_2CO_3 1M. Το διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε ήπια και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 45°C για 15 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 765 nm. Ως δείγμα αναφοράς για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) / g νωπού φυτικού ιστού (mg G.A.E. / g. v.φ.ι.).

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων από 10 έως 300 ppm που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Η καμπύλη που προέκυψε παρουσιάζεται στο παρακάτω **Γράφημα ΙΙΙ-1**.



Γράφημα ΙΙΙ-1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

ΙΙΙ.23.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH (Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων ακολουθήθηκε η μέθοδος DPPH[•] όπως αυτή περιγράφεται από τους **Brand et al.** (1995). Αρχικά, προετοιμάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες διαφορετικές συγκεντρώσεις του προς ανάλυση δείγματος (20-800 ppm ή 40-1600 ppm ανάλογα με την συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών όπως αυτή προέκυψε από τη μέθοδο *Folin-Ciocalteu*). Στη συνέχεια, για την παρασκευή διαλύματος DPPH 10^{-4} M, ζυγίστηκαν 0,0039g αντιδραστήριου DPPH τα οποία και διαλύθηκαν σε 100mL υδατικής μεθανόλης (70% v/v) με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθως, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3mL διαλύματος DPPH, το μίγμα αναδευτήκε δυνατά με Vortex και τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 517nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε μίγμα 3mL διαλύματος DPPH με 1mL υδατικής μεθανόλης 70%, ενώ για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε υδατική μεθανόλη 70%.

Η μείωση της απορρόφησης του διαλύματος του DPPH υποδηλώνει τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας από τα αντιοξειδωτικά συστατικά που υπάρχουν στα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα. Το ποσοστό δέσμευσης του DPPH δίνεται από τη σχέση :

$$\% \text{ μείωση DPPH} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

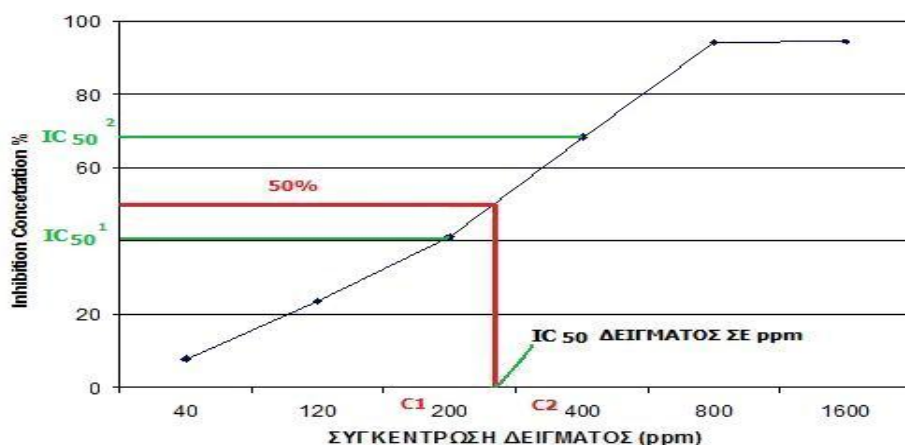
όπου : A_{DPPH} η απορρόφηση του DPPH στα 517 nm (τυφλό δείγμα) και

$A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων εκφράστηκε με τη μορφή του δείκτη IC_{50} (Inhibition Concentration, ppm), ο οποίος δηλώνει τη συγκέντρωση εκείνη του δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του τυφλού δείγματος DPPH κατά 50%. Η συγκέντρωση αυτή βρέθηκε από τη γραφική παράσταση (Γράφημα ΙΙΙ-2) των ποσοστών δέσμευσης του DPPH με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων σύμφωνα με τον τύπο :

$$IC_{50} \text{ (ppm)} = C^2 * (IC_{50}^1 + 50) - C^1 * (IC_{50}^2 - 50) / (IC_{50}^1 + IC_{50}^2)$$

όπου C^1 και C^2 δύο διαδοχικές συγκεντρώσεις του δείγματος μεταξύ των οποίων το ποσοστό δέσμευσης του DPPH είναι 50% και IC_{50}^1 και IC_{50}^2 δύο διαδοχικά ποσοστά δέσμευσης του DPPH μεταξύ των οποίων βρίσκεται το 50%



Γράφημα ΙΙΙ-2 : Υπολογισμός IC_{50} δείγματος με τη βοήθεια γραφικής παράστασης.

ΙΙΙ.23.6. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Φαινολικών Συστατικών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης (HPLC)

Υλικά & Αντιδραστήρια

1. Οργανικά εκχυλίσματα φυτικών δειγμάτων (φύλλα & καρποί)
2. Διαλύτες
 - Μεθανόλη HPLC grade (SDS)
 - Παγόμορφο οξικό οξύ HPLC grade (Panreac)
 - Νερό HPLC grade (Merck)
 - Ακετονιτρίλιο HPLC grade (SDS)
3. Πρότυπες φαινολικές ενώσεις

Όργανα

1. Αναλυτικό Σύστημα HPLC (Jasco Corporation, Japan)
2. Ζυγός ακριβείας
3. Μικροπιπέτες
4. Αναδευτήρας (Vortex)

Το προϊόν της εκχύλισης, πριν χρησιμοποιηθεί για τη χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών και προκειμένου να αποφευχθεί το φράξιμο των μηχανικών τμημάτων της HPLC από τυχόν στερεά σωματίδια που βρίσκονταν στο εκχύλισμα, φιλτράρονταν σε φίλτρο διαμέτρου 20 μm (Millex Milligore). Από το φιλτραρισμένο δείγμα 20μL χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση στην HPLC.

Η χρωματογραφική ανάλυση στα φυτικά εκχυλίσματα έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι αναλύσεις έγιναν με συσκευή τύπου Jasco (Jasco Corporation, Japan) η οποία εξοπλίστηκε με σύστημα διαβάθμισης σύστασης (gradient) LG-2089 plus, περισταλτική αντλία PU-2089, στήλη αντιστρόφου φάσεως τύπου Waters Spherisorb ODS2/C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5μm particle size (Waters Corporation, Milford, USA) και MD-910 ανιχνευτή σειράς

διοδίων (diode-array detector, DAD). Η εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική στήλη γινόταν μέσω βαλβίδας Rheodyne model 7725i με κυκλική διαδρομή όγκου 20μL. Η λειτουργία όλου του συστήματος ελεγχόταν από υπολογιστή, στον οποίο καταγράφονταν οι μετρήσεις. Η επεξεργασία των μετρήσεων της HPLC έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Jasco ChromPass Version 1.7.403.1.

Οι ενώσεις διαχωρίστηκαν με την εφαρμογή συστήματος έκλουσης με χρονική διαβάθμιση σύστασης της κινητής φάσης (gradient elution).

Οι διαλύτες (κινητή φάση) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- Διαλύτης Α : 2,2% Οξικό οξύ HPLC grade σε νερό HPLC grade
- Διαλύτης Β : 100% Μεθανόλη HPLC grade
- Διαλύτης Γ : 100% Ακετονιτρίλιο HPLC grade

Το πρόγραμμα έκλουσης που περιγράφεται από τους **Cai *et al.*, (2004)**, ήταν διάρκειας 100 λεπτών και είχε ως εξής :

- 0-15 λεπτά: 95% διαλύτης Α + 5% διαλύτης Β
- 15-40 λεπτά 70% διαλύτης Α + 30% διαλύτης Β
- 40-50 λεπτά: 65% διαλύτης Α + 35% διαλύτης Β
- 50-55 λεπτά: 60% διαλύτης Α + 40% διαλύτης Β
- 55-60 λεπτά: 55% διαλύτης Α + 45% διαλύτης Β
- 60-70 λεπτά: 50% διαλύτης Α + 50% διαλύτης Β
- 70-90 λεπτά: 45% διαλύτης Α + 55% διαλύτης Β
- 90-100 λεπτά: 100% διαλύτης Α

Μεταξύ των αναλύσεων η στήλη ξεπλενόταν με 100% διαλύτη Α για 5 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν 1 mL/λεπτό σε θερμοκρασία στηλών 20°C.

Ο διαλύτης Γ χρησιμοποιούνταν για τον καθαρισμό της στήλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το πρόγραμμα καθαρισμού ήταν διάρκειας 40 λεπτών και είχε ως εξής

- 0-10 λεπτά: 100% διαλύτης Α
- 10-20 λεπτά: 100% διαλύτης Γ
- 20-40 λεπτά 100% διαλύτης Α

Η ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα έγινε φασματοσκοπικά στις περιοχές του υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) μέσω του συστήματος diode-array

της HPLC. Η ταυτοποίησή τους έγινε μέσω της σύγκρισης των χρόνων κατακράτησης (retention time, t_R) και των φασμάτων απορρόφησης τους στην περιοχή από 250-400 nm με εκείνα των πρότυπων φαινολικών ουσιών ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός τους στα δείγματα (mg/g νωπού δείγματος) πραγματοποιήθηκε βάσει των πρότυπων καμπύλων αναφοράς που προέκυψαν για κάθε μία από τις πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.

ΙΙΙ.23.7. Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών

Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Η ποσοτικοποίηση τους βασίστηκε στο εμβαδό της κορυφής. Η κάθε φαινολική ένωση σε κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε βάσει των εξισώσεων των πρότυπων καμπύλων αναφοράς, η κατασκευή των οποίων περιγράφεται παρακάτω.

ΙΙΙ.23.8. Παρασκευή πρότυπων φαινολικών διαλυμάτων

Ο χρόνος κατακράτησης και το φάσμα απορρόφησης (**Παράρτημα ΙΙ**) 24 πρότυπων φαινολικών ουσιών οι οποίες, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, συναντώνται κατά κύριο λόγο σε φυτικά εκχυλίσματα ελιάς, υπολογίστηκε με τη χρήση HPLC. Οι πρότυπες αυτές ουσίες διαλύθηκαν σε μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας και παρασκευάστηκαν διαλύματά τους συγκέντρωσης 1000 ppm. Από τα αρχικά αυτά διαλύματα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαφόρων συγκεντρώσεων (500ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 20 ppm) για κάθε πρότυπη ουσία και στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης με βάση το εμβαδό των κορυφών των πρότυπων ουσιών, μετά από την εισαγωγή των δειγμάτων αυτών στο σύστημα της HPLC.

Οι εξισώσεις των καμπύλων (εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης), βάσει των οποίων επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών των δειγμάτων δίνονται στο **Παράρτημα ΙΙ**. Αποδεκτές έγιναν οι καμπύλες με

συντελεστή συσχέτισης $r^2 \geq 0.96$. Όλα τα πρότυπα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20°C .

ΙΙΙ.23.9. Στατιστική Ανάλυση

Το πείραμα αναλύθηκε ως εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο με δύο επαναλήψεις και τρεις υποδειγματοληψίες σε κάθε δένδρο.

Αρχικά έγινε έλεγχος της κανονικότητας των δεδομένων με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk, της ομοσκεδαστικότητας (ομοιογένειας διακυμάνσεων) των πληθυσμών με τη δοκιμασία Levene, της αθροιστικότητας με την δοκιμασία Tukey και τέλος της ανεξαρτησίας των σφαλμάτων με την δοκιμασία του χ^2 . Σε περιπτώσεις απουσίας κανονικότητας η/και ομοσκεδαστικότητας, πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλοι μετασχηματισμοί. Για τις συγκρίσεις των μέσων των επεμβάσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς LSD.

Η εξέταση της συσχέτισης μεταξύ αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ολικού φαινολικού περιεχομένου για τον κάθε ιστό χωριστά πραγματοποιήθηκε μέσω προσδιορισμού του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (r) κατά Pearson (Pearson correlation coefficient, r) και της στατιστικής του σημασίας (p), όπου για $p < 0,01$ θεωρήθηκε σημαντική (σε επίπεδο σημαντικότητας 99%).

Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το JMP 7.

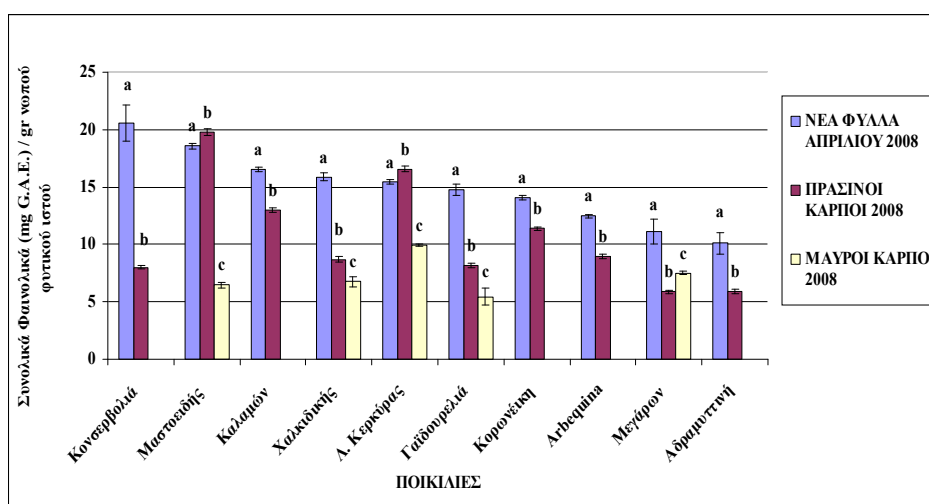
ΙΙΙ.24. Αποτελέσματα

ΙΙΙ.24.1. Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και αντιοξειδωτική ικανότητα

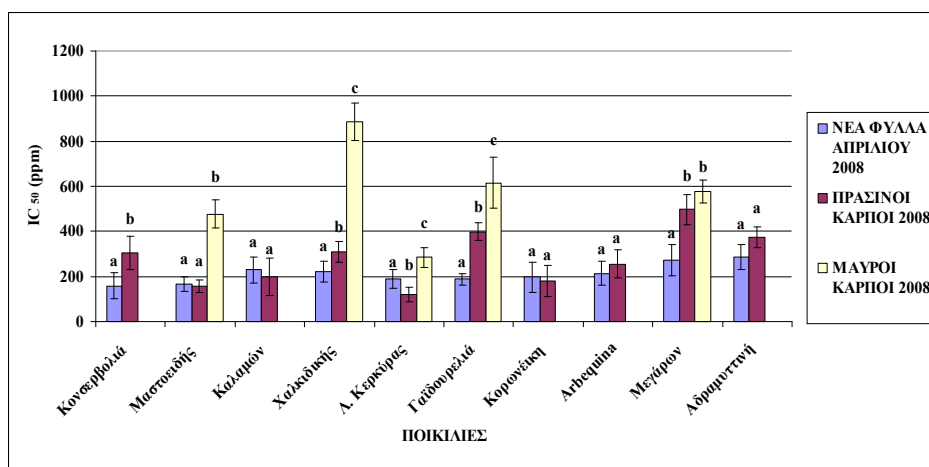
Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών των διαφόρων ιστών των δέκα ποικιλιών που μελετήθηκαν, υπολογίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και εκφράστηκε σε ισοδύναμα GAE / g νωπού φυτικού ιστού (ν.φ.ι.). Υπολογίστηκε επίσης η αντιοξειδωτική ικανότητα των ίδιων δειγμάτων, εκφρασμένη με το δείκτη IC₅₀ (ppm). Οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για τους διάφορους ιστούς, τις διαφορετικές ποικιλίες και τις διαφορετικές χρονικές περιόδους παρουσιάζεται στα γραφήματα που ακολουθούν. Η συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για επίπεδο σημαντικότητας 99% (p<0,01), επίσης υπολογίστηκε και παρουσιάζεται.

Στα *Γραφήματα ΙΙΙ-3* και *ΙΙΙ-4* που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg G.A.E. / g νωπού φυτικού ιστού (ν.φ.ι.) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφρασμένη σε ppm για τους τρεις ιστούς όλων των ποικιλιών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και συλλέχτηκαν το έτος 2008. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των διαφορετικών ιστών ανά ποικιλία. Στις περισσότερες ποικιλίες τα νέα φύλλα Απριλίου παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών [10,1 - 20,6 mg GAE/g ν.φ.ι. («Αδραμυττινή» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα)], ακολουθούμενα από τους πράσινους καρπούς [5,9 - 19,8 mg GAE/g ν.φ.ι. («Μεγάρων» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα)] και μετά τους μαύρους καρπούς [5,4 - 9,9 mg GAE/g ν.φ.ι. («Γαϊδουρελιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα)]. Εξάιρεση αποτέλεσαν οι ποικιλίες «Λ. Κερκύρας» και «Μαστοειδής», όπου οι πράσινοι καρποί παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα νέα φύλλα Απριλίου και η ποικιλία «Μεγάρων» όπου οι μαύροι καρποί παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τους πράσινους καρπούς της ίδιας ποικιλίας (*Γράφημα ΙΙΙ-3*). Ως προς την

αντιοξειδωτική ικανότητα (**Γράφημα ΙΙΙ-4**), τα νέα φύλλα Απριλίου των ποικιλιών «Μεγάρων», «Γαϊδουρελιά», «Χαλκιδικής» και «Κονσερβολιά» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με αυτή των πράσινων καρπών τους, ενώ οι πράσινοι καρποί της ποικιλίας «Λ. Κερκύρας» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με αυτή των νέων φύλλων Απριλίου. Όλοι οι μαύροι καρποί είχαν στατιστικώς σημαντικά την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα νέα φύλλα Απριλίου και τους πράσινους καρπούς εκτός της ποικιλίας «Μεγάρων» που ήταν μεν μικρότερη αλλά όχι στατιστικώς σημαντική.

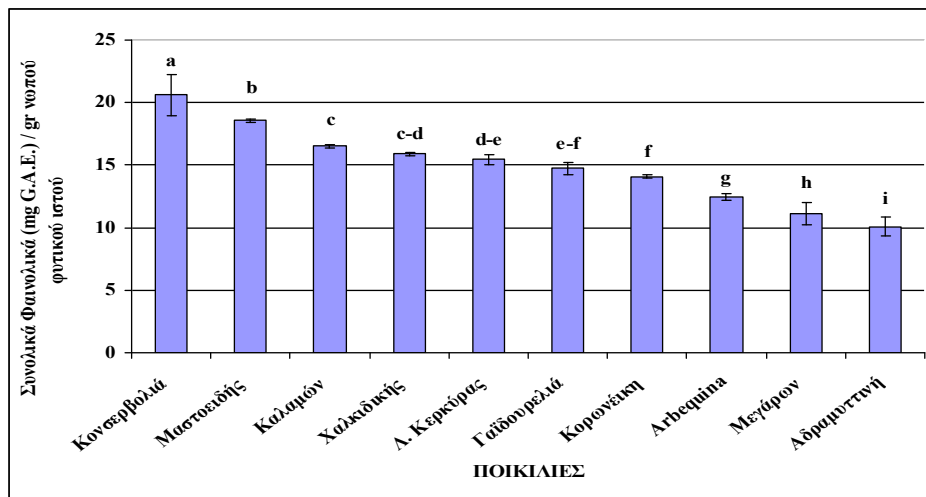


Γράφημα ΙΙΙ-3: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2008 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

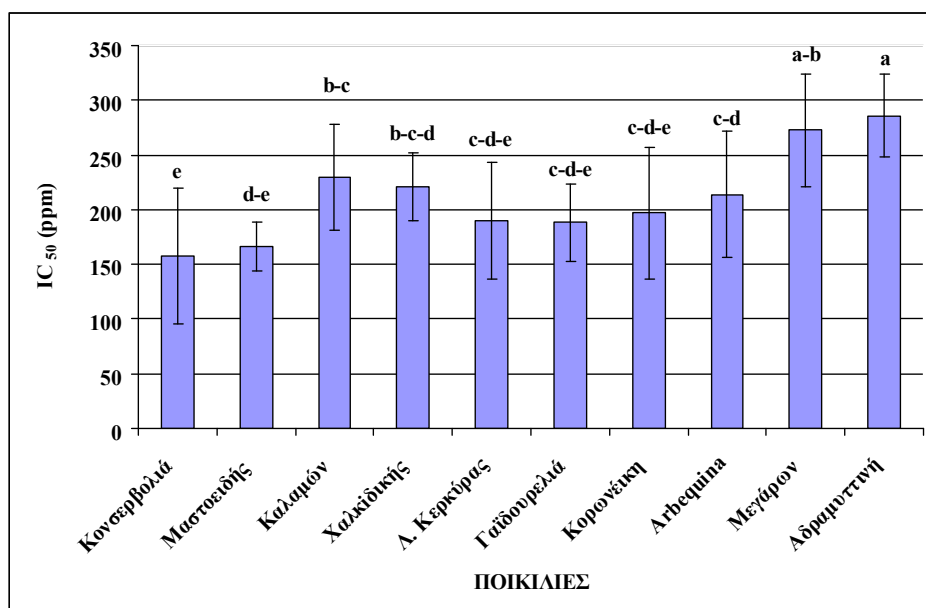


Γράφημα ΙΙΙ-4: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2008 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

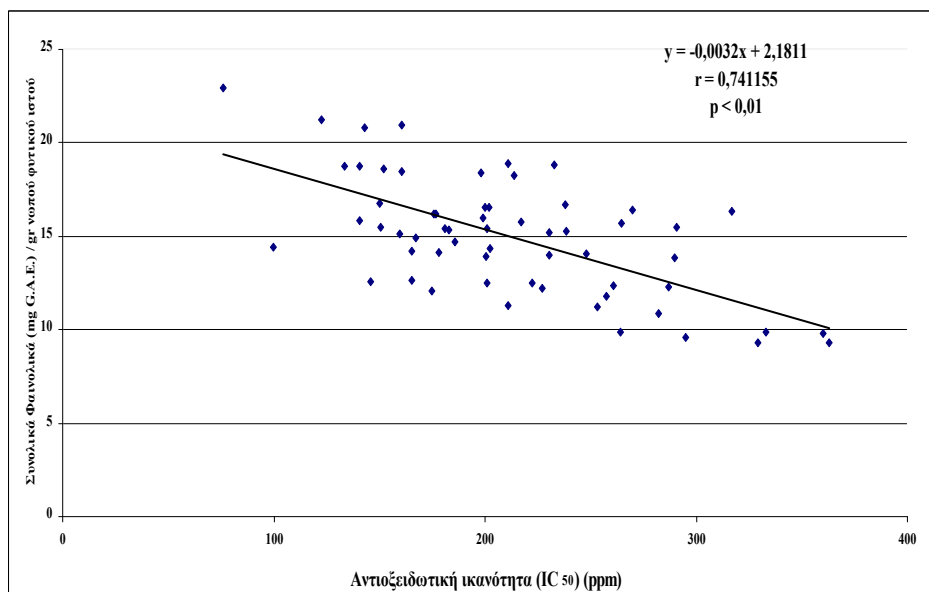
Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και η αντίστοιχη αντιοξειδωτική ικανότητα για τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 ανά ποικιλία παρουσιάζονται στα **Γραφήματα ΙΙΙ-5** και **ΙΙΙ-6**, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 10,1 και 20,6 mg GAE/g ν.φ.ι. («Αδραμυτινή» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-5**) ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 157,64 και 285,80 ppm («Κονσερβολιά» και «Αδραμυτινή» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-6**). Όπως έχει ήδη αναφερθεί (**ΙΙΙ.22.5.**) ο δείκτης IC_{50} (Inhibition Concentration, ppm), δηλώνει τη συγκέντρωση εκείνη του δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η αρχική συγκέντρωση του τυφλού δείγματος DPPH κατά 50%. Ως εκ τούτου, όσο μικρότερη είναι η τιμή του δείκτη IC_{50} , τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα, του υπό εξέταση δείγματος. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008, η ποικιλία «Κονσερβολιά» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ η ποικιλία «Αδραμυτινή» είχε τη στατιστικώς σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στο **Γράφημα ΙΙΙ-7** παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC_{50} και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Υψηλή συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συνοδεύεται από αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (μείωση της τιμής του δείκτη IC_{50}).



Γράφημα ΙΙΙ-5: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

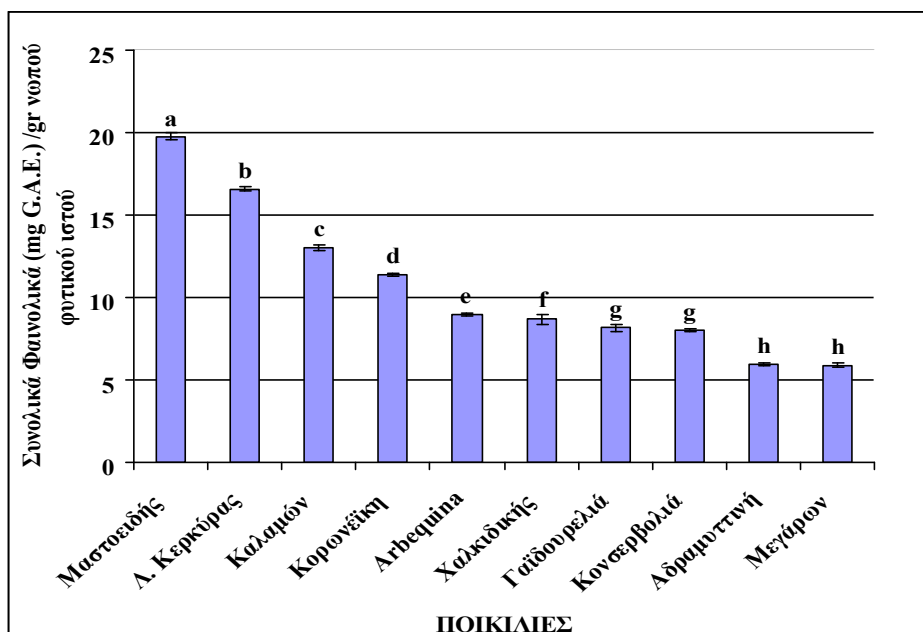


Γράφημα ΙΙΙ-6: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

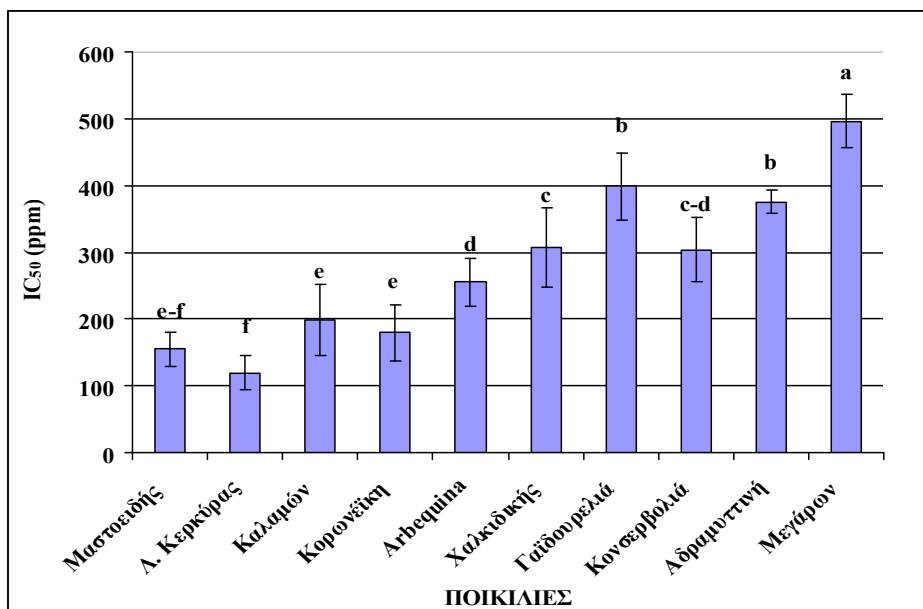


Γράφημα ΙΙΙ-7 : Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008 (p<0,01).

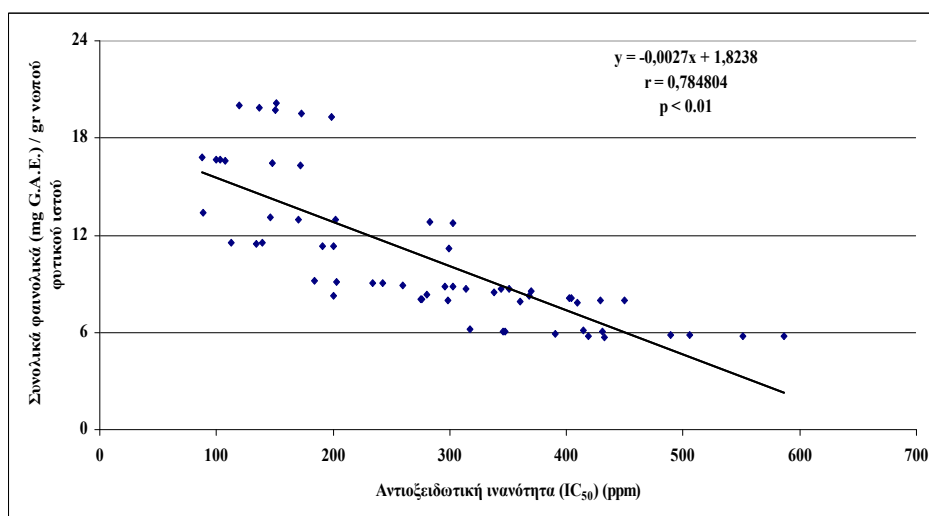
Στους πράσινους καρπούς του 2008, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 5,9 και 19,8 mg GAE/g ν.φ.ι. («Μεγάρων» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-8**). Η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 119,66 και 496,45 ppm («Λιανολιά Κερκύρας» και «Μεγάρων» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-9**). Η ποικιλία «Μαστοειδής» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την δεύτερη κατά σειρά, μετά την «Λ. Κερκύρας», ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ οι ποικιλίες «Μεγάρων» και «Αδραμυτινή» είχαν τη στατιστικώς σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και η ποικιλία «Μεγάρων» την στατιστικώς σημαντικά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στο **Γράφημα ΙΙΙ-10** παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τους πράσινους καρπούς του 2008 σε επίπεδο σημαντικότητας 99% (p<0,01). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στους πράσινους καρπούς του 2008.



Γράφημα ΙΙΙ-8: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

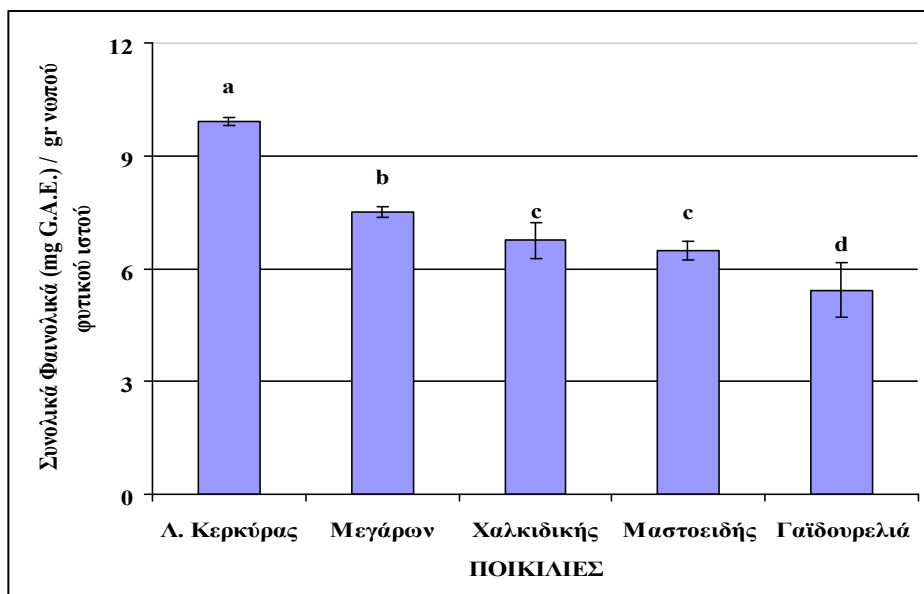


Γράφημα ΙΙΙ-9: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε πράσινους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

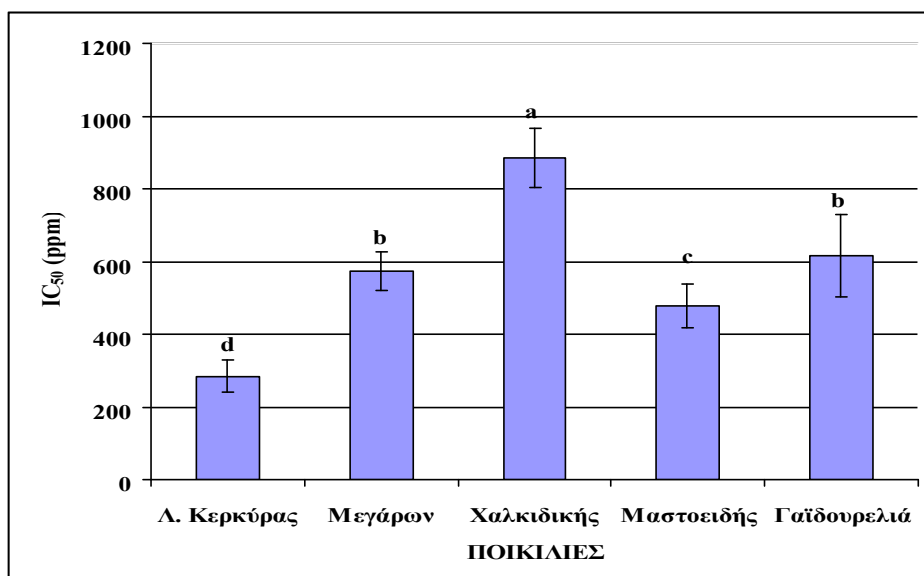


Γράφημα ΙΙΙ-10: Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2008 (p<0,01).

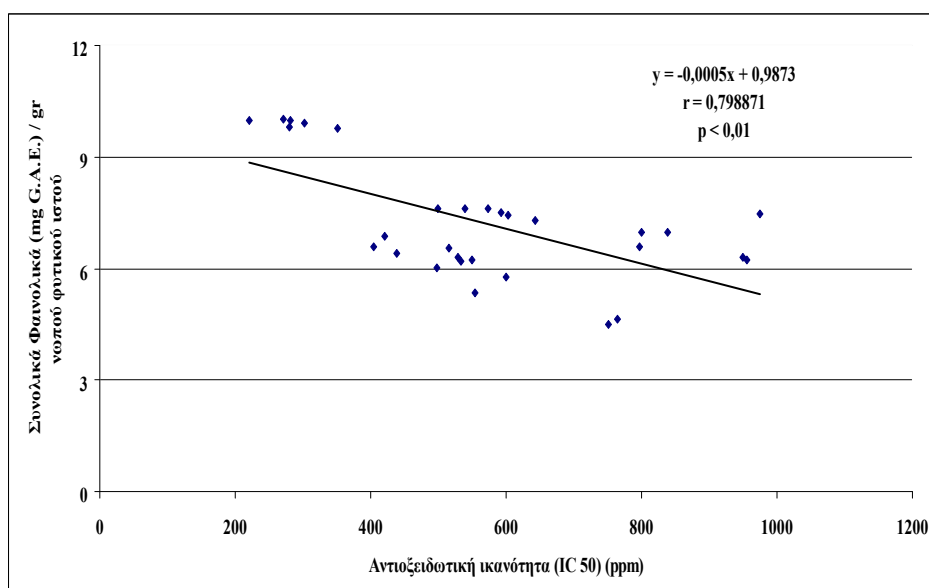
Στους μαύρους καρπούς του 2008 η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 5,4 και 9,9 mg GAE/g ν.φ.ι. («Γαϊδουρελιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα) (*Γράφημα ΙΙΙ-11*) ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 284,23 και 886,36 ppm («Λ. Κερκύρας» και «Χαλκιδικής» αντίστοιχα) (*Γράφημα ΙΙΙ-12*). Η ποικιλία «Λ. Κερκύρας» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την στατιστικώς σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ποικιλία «Γαϊδουρελιά» είχε την στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την δεύτερη κατά σειρά μικρότερη, μετά την ποικιλία «Χαλκιδικής», αντιοξειδωτική ικανότητα. Στο *Γράφημα ΙΙΙ-13* παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τους μαύρους καρπούς του 2008 σε επίπεδο σημαντικότητας 99% (p<0,01). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στους μαύρους καρπούς του 2008.



Γράφημα ΙΙΙ-11: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).



Γράφημα ΙΙΙ-12: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε μαύρους καρπούς του 2008. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

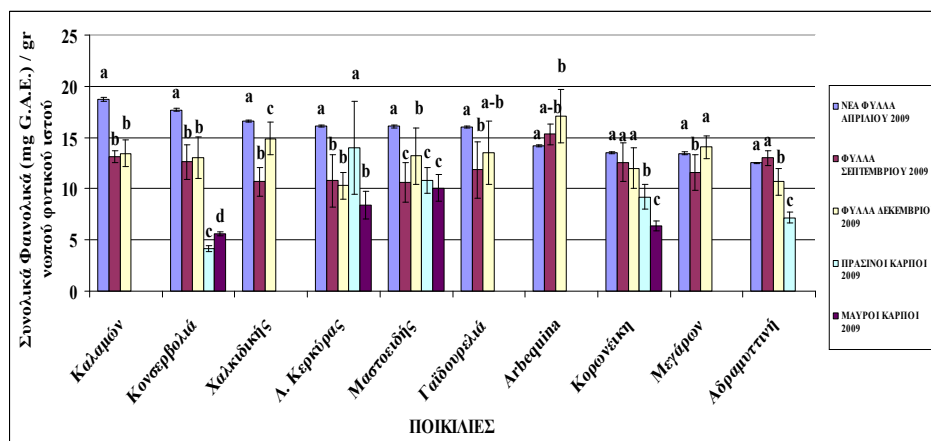


Γράφημα ΙΙΙ-13: Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2008 (p<0,01).

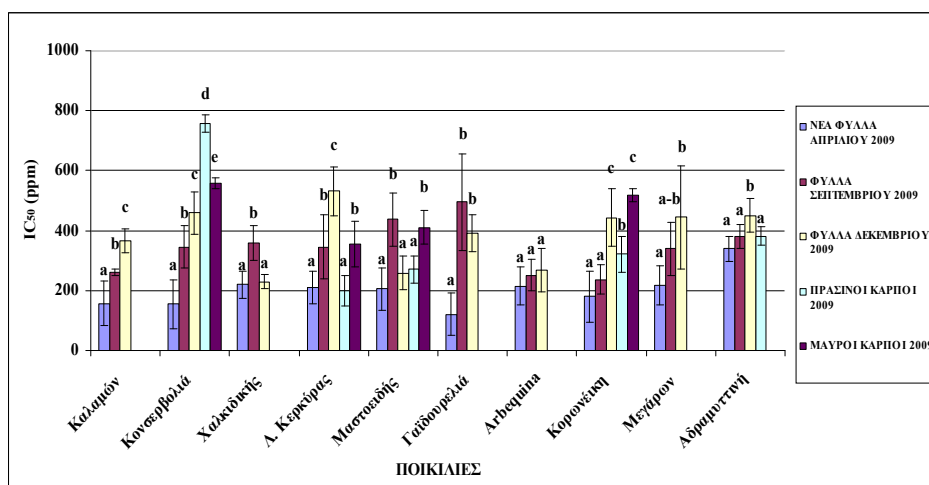
Στα *Γραφήματα ΙΙΙ-14* και *ΙΙΙ-15* που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας για τους πέντε ιστούς όλων των ποικιλιών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και συλλέχτηκαν το έτος 2009. Τα νέα φύλλα Απριλίου των ποικιλιών «Καλαμών», «Κονσερβολιά», «Χαλκιδικής» και «Μαστοειδής» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα φύλλα Σεπτεμβρίου και Δεκεμβρίου, καθώς επίσης και από τους πράσινους και μαύρους καρπούς. Οι ποικιλίες «Λ. Κερκύρας», «Γαϊδουρελιά» και «Κορωνέικη» παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών στα νέα φύλλα Απριλίου από τα φύλλα Σεπτεμβρίου και Δεκεμβρίου, καθώς επίσης και από τους πράσινους και μαύρους καρπούς, χωρίς όμως να παρουσιάσουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Τα φύλλα Δεκεμβρίου της ποικιλίας «Atbequina» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα νέα φύλλα Απριλίου. Τα φύλλα Δεκεμβρίου των ποικιλιών «Χαλκιδικής», «Μαστοειδής» και «Μεγάρων» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα φύλλα Σεπτεμβρίου. Τα φύλλα Σεπτεμβρίου της ποικιλίας «Αδραμυτινή» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη

συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα φύλλα Δεκεμβρίου. Οι μαύροι καρποί των ποικιλιών «Λ. Κερκύρας» και «Κορωνέικη» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τους πράσινους καρπούς. Οι πράσινοι καρποί της ποικιλίας «Κονσερβολιά» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τους μαύρους καρπούς της ίδιας ποικιλίας. (Γράφημα ΙΙΙ-14).

Ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα (Γράφημα ΙΙΙ-15), τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 των ποικιλιών «Καλαμών», «Κονσερβολιά» και «Γαϊδουρελιά» παρουσίασαν την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα φύλλα Σεπτεμβρίου και Δεκεμβρίου καθώς επίσης και από τους πράσινους και μαύρους καρπούς του ίδιου έτους. Οι πράσινοι καρποί των ποικιλιών «Λ. Κερκύρας», «Μαστοειδής» και «Κορωνέικη» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τους μαύρους καρπούς. Οι μαύροι καρποί της ποικιλίας «Κονσερβολιά» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τους πράσινους καρπούς της ίδιας ποικιλίας.

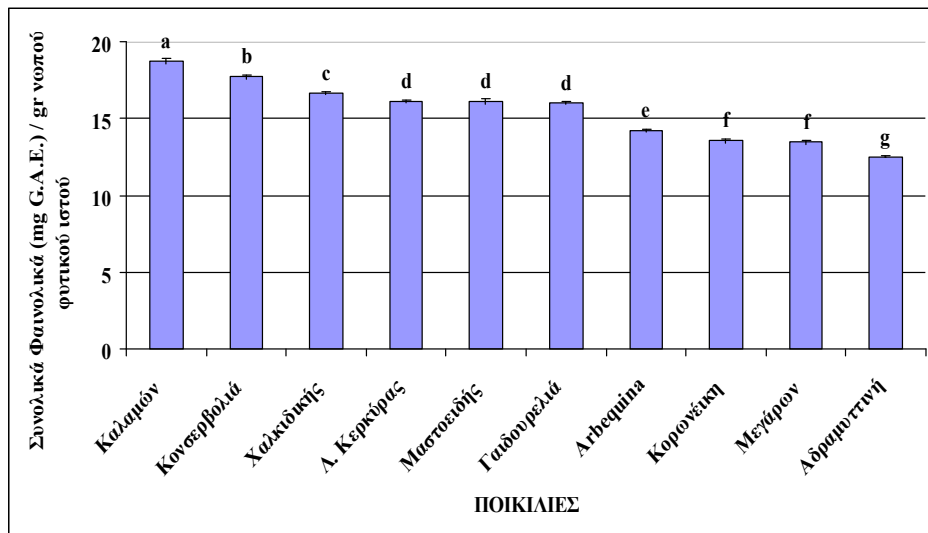


Γράφημα ΙΙΙ-14 : Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου, φύλλα Σεπτεμβρίου, φύλλα Δεκεμβρίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

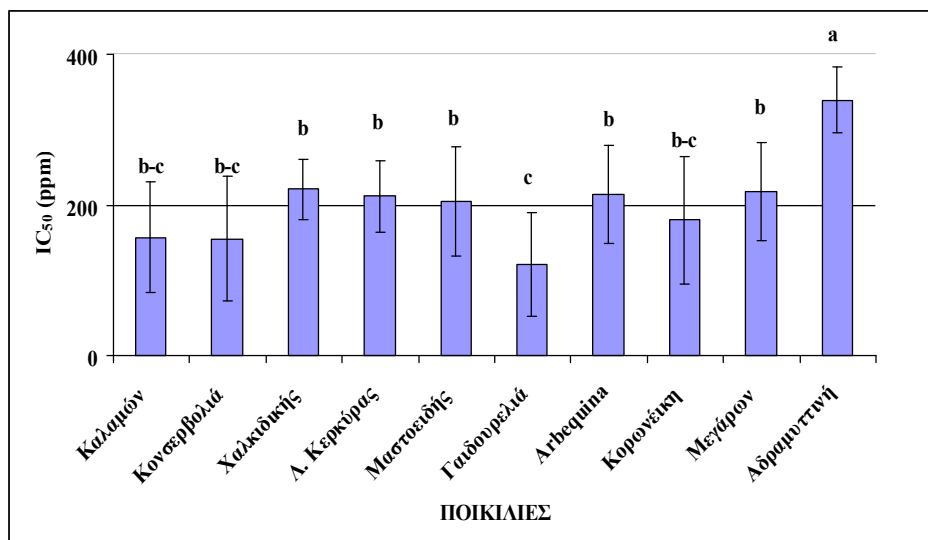


Γράφημα ΙΙΙ-15 : Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου, φύλλα Σεπτεμβρίου, φύλλα Δεκεμβρίου, πράσινους και μαύρους καρπούς του 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία (p<0,05).

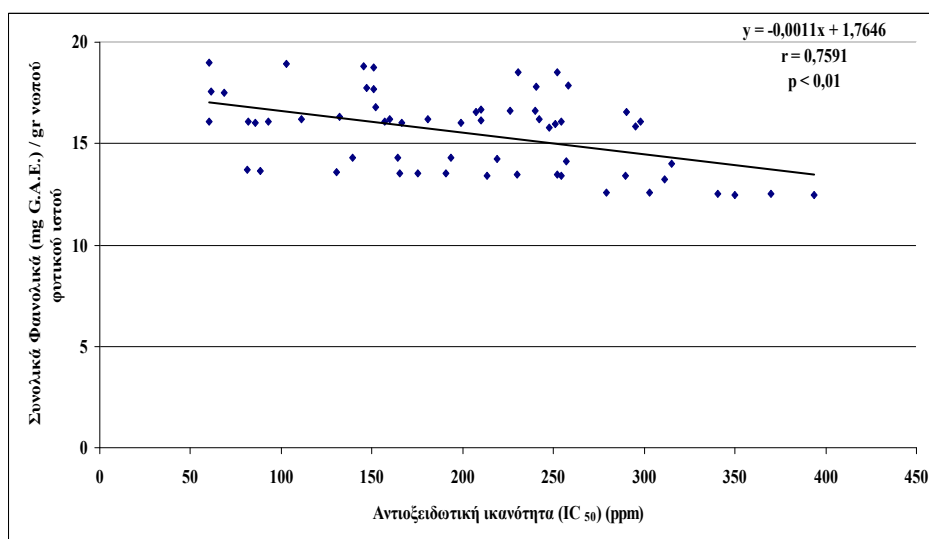
Συγκρίνοντας μεταξύ τους της ποικιλίες ως προς τη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 12,5 και 18,7 mg GAE/g ν.φ.ι. («Αδραμυτινή» και «Καλαμών» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-16**) ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 121,0 και 339,28 ppm («Γαϊδουρελιά» και «Αδραμυτινή» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-17**). Η ποικιλία «Καλαμών» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την τρίτη κατά σειρά ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα μετά τις ποικιλίες «Κονσερβολιά» και «Γαϊδουρελιά». Η ποικιλία «Αδραμυτινή» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την στατιστικώς σημαντικά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπολοίπων ποικιλιών (πλην «Αδραμυτινής») σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των νέων φύλλων Απριλίου του 2009 (**Γράφημα ΙΙΙ-17**). Στο **Γράφημα ΙΙΙ-18** παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 σε επίπεδο σημαντικότητας 99% (p<0,01). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009.



Γράφημα ΙΙΙ-16: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

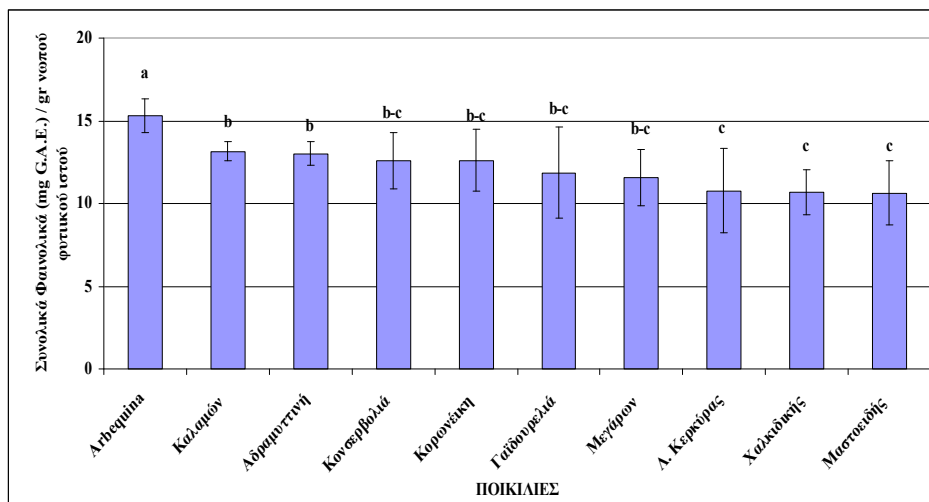


Γράφημα ΙΙΙ-17 : Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

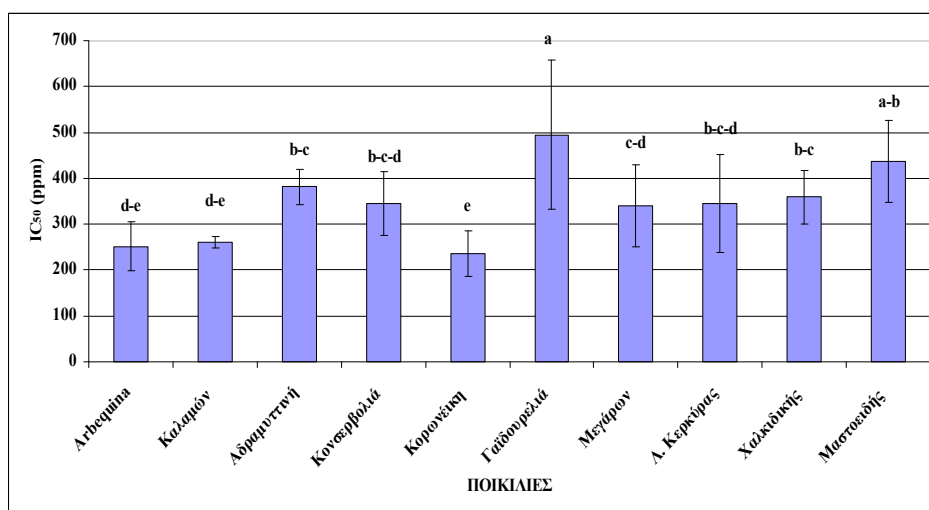


Γράφημα ΙΙΙ-18 : Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009 (p<0,01).

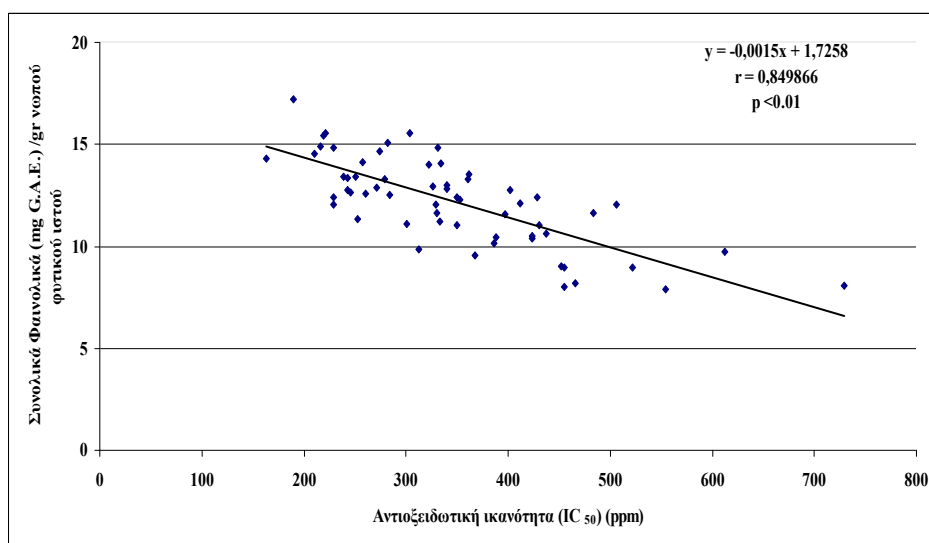
Η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών για τα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 κυμάνθηκε μεταξύ 10,6 και 15,3 mg GAE/g ν.φ.ι. («Μαστοειδής» και «Arbequina» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-19**), ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 235,9 και 494,77 ppm («Κορωνέικη» και «Γαϊδουρελιά» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-20**). Η ποικιλία «Arbequina» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών. Επίσης, είχε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα μαζί με τις ποικιλίες «Καλαμών» και «Κορωνέικη». Η ποικιλία «Μαστοειδής» παρουσίασε τη χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την δεύτερη κατά σειρά χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα μετά την ποικιλία «Γαϊδουρελιά». Στο **Γράφημα ΙΙΙ-21** παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 για επίπεδο σημαντικότητας 99% (p<0,01). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στα φύλλα Σεπτεμβρίου του έτους 2009.



Γράφημα ΙΙΙ-19: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

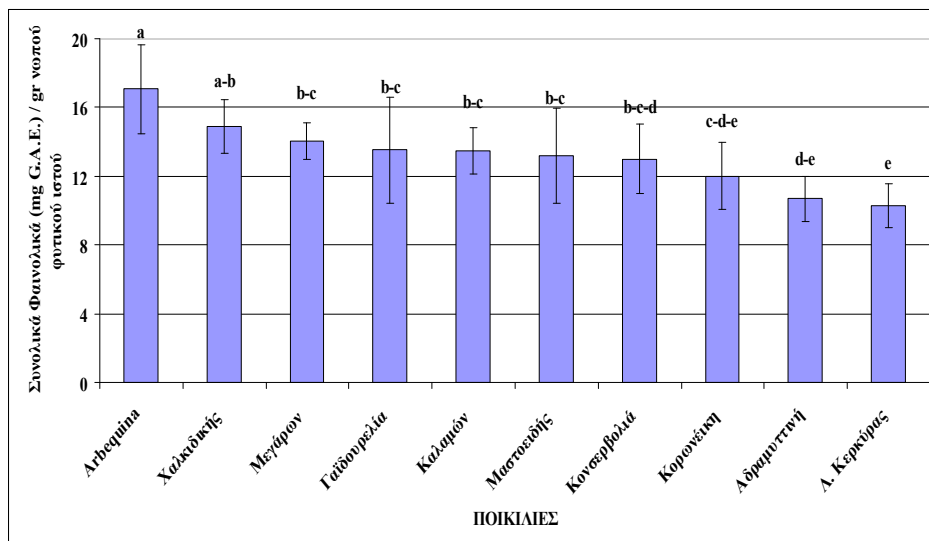


Γράφημα ΙΙΙ-20 : Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

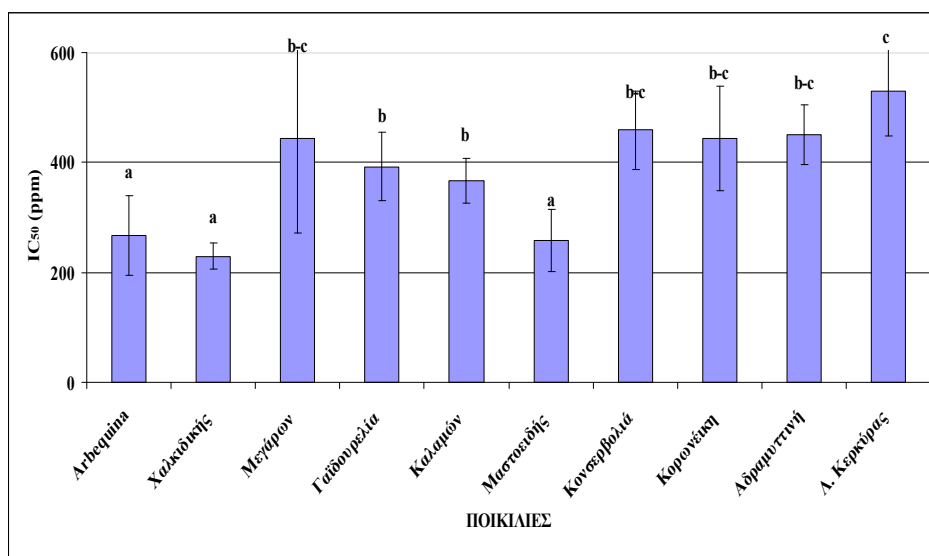


Γράφημα ΙΙΙ-21: Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο v.φ.ι. σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 ($p < 0,01$).

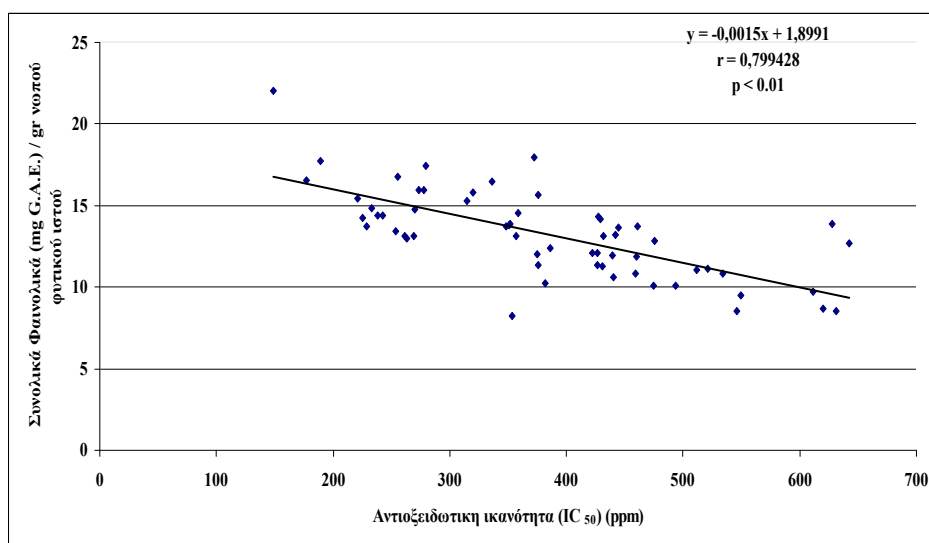
Τα *Γραφήματα ΙΙΙ-22* και *ΙΙΙ-23* παρουσιάζουν τη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και την αντιοξειδωτική ικανότητα για τα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 των διαφόρων ποικιλιών. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 10,3 και 17,0 mg GAE/g v.φ.ι. («Λ. Κερκύρας» και «Aγbequina» αντίστοιχα) (*Γράφημα ΙΙΙ-22*) και η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 229,5 και 530,9 ppm («Χαλκιδικής» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα) (*Γράφημα ΙΙΙ-23*). Η ποικιλία «Aγbequina» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ποικιλίες εκτός της ποικιλίας «Χαλκιδικής» με την οποία δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Επίσης, η ποικιλία «Aγbequina» μαζί με τις ποικιλίες «Χαλκιδικής» και «Μαστοειδής» είχαν την στατιστικώς σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ποικιλίες. Η ποικιλία «Λ. Κερκύρας» παρουσίασε την χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στο *Γράφημα ΙΙΙ-24* παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 για επίπεδο σημαντικότητας 99% ($p < 0,01$). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009.



Γράφημα ΙΙΙ-22: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

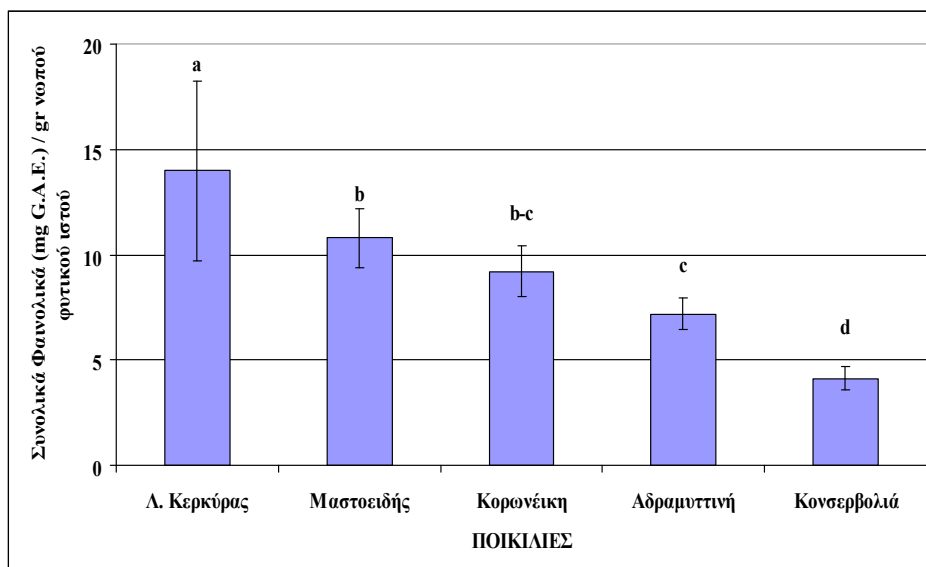


Γράφημα ΙΙΙ-23: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

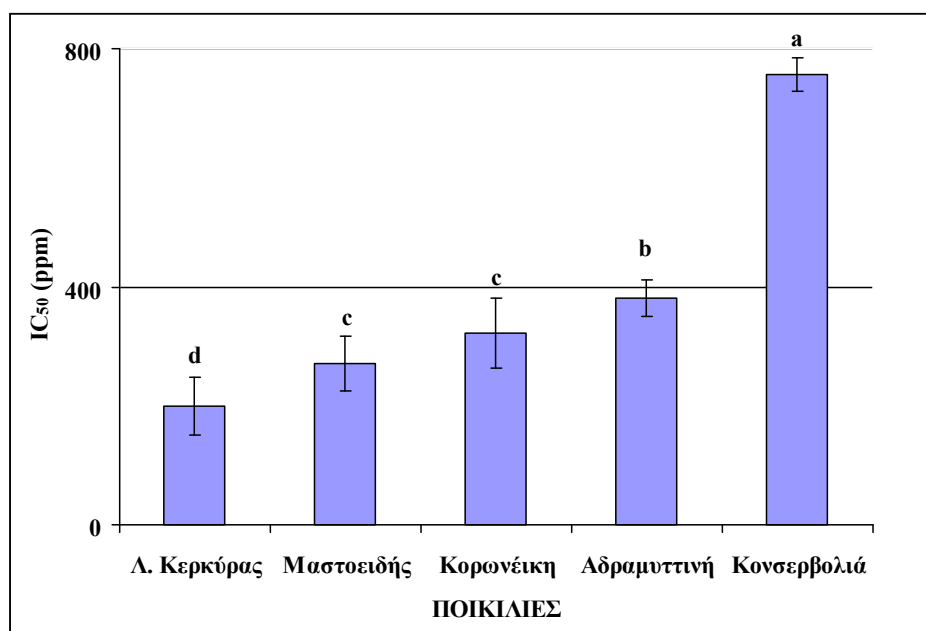


Γράφημα ΙΙΙ-24: Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 (p<0,01).

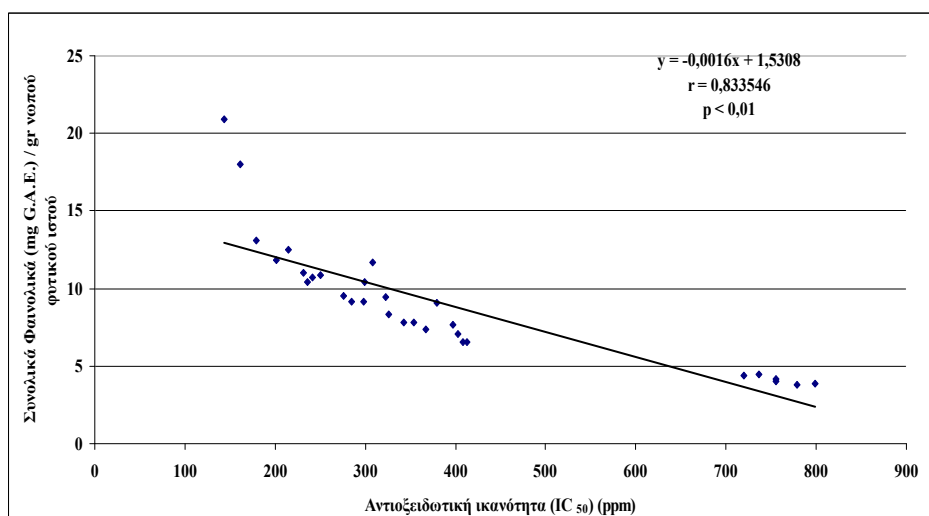
Το 2009, συλλέχθηκαν πράσινοι καρποί από πέντε ποικιλίες. Στις ποικιλίες αυτές, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 4,1 και 13,9 mg GAE/g ν.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα) (*Γράφημα ΙΙΙ-25*) ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 199,46 και 757,45 ppm («Λ. Κερκύρας» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα) (*Γράφημα ΙΙΙ-26*). Η ποικιλία «Λ. Κερκύρας» είχε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την στατιστικώς σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ η ποικιλία «Κονσερβολιά» είχε τη στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών και την στατιστικώς σημαντικά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Στο *Γράφημα ΙΙΙ-27* παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τους πράσινους καρπούς του 2009 για επίπεδο σημαντικότητας 99% (p<0,01). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στους πράσινους καρπούς του 2009.



Γράφημα ΙΙΙ-25 : Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

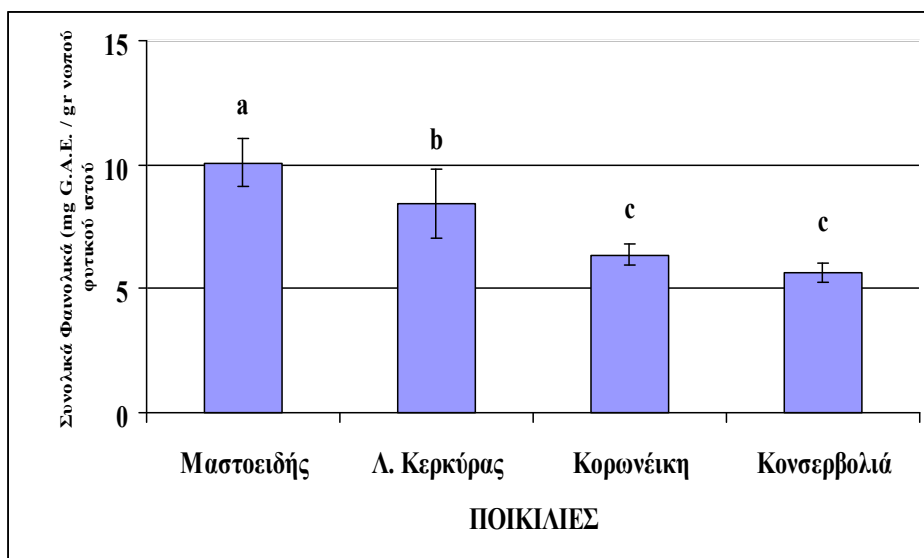


Γράφημα ΙΙΙ-26 : Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε πράσινους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

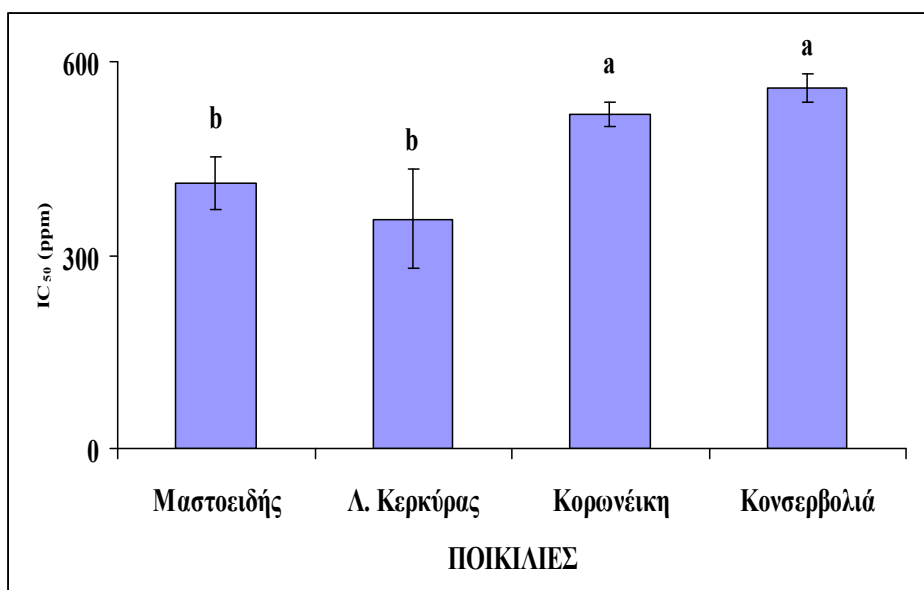


Γράφημα ΙΙΙ-27: Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε πράσινους καρπούς του 2009 ($p < 0,01$).

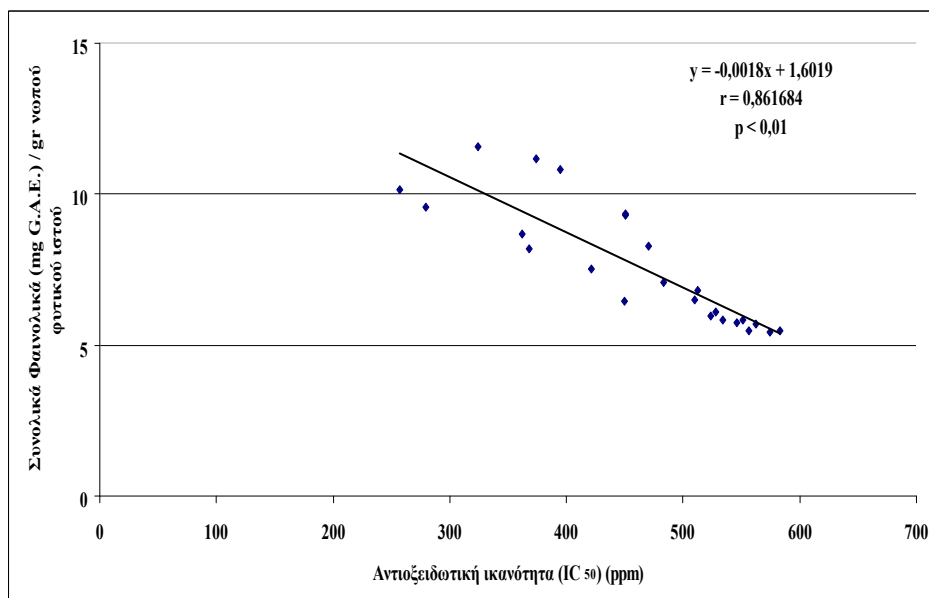
Το έτος 2009 συλλέχθηκαν μαύροι καρποί από τις ποικιλίες «Μαστοειδής», «Λ. Κερκύρας», «Κορωνέικη» και «Κονσερβολιά». Στις ποικιλίες αυτές, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 5,6 και 10,1 mg GAE/g ν.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-28**) ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 356,1 και 559,34 ppm («Λ. Κερκύρας» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα) (**Γράφημα ΙΙΙ-29**). Η ποικιλία «Μαστοειδής» παρουσίασε την στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών. Η ποικιλία «Μαστοειδής» μαζί με την ποικιλία «Λ. Κερκύρας» είχαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Οι ποικιλίες «Κορωνέικη» και «Κονσερβολιά» παρουσίασαν την στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών αλλά και την στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (**Γραφήματα ΙΙΙ-28 και ΙΙΙ-29**). Στο **Γράφημα ΙΙΙ-30** παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC₅₀ και της συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών για τους μαύρους καρπούς του 2009 για επίπεδο σημαντικότητας 99% ($p < 0,01$). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών και στους μαύρους καρπούς του 2009.



Γράφημα ΙΙΙ-28: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι. σε μαύρους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

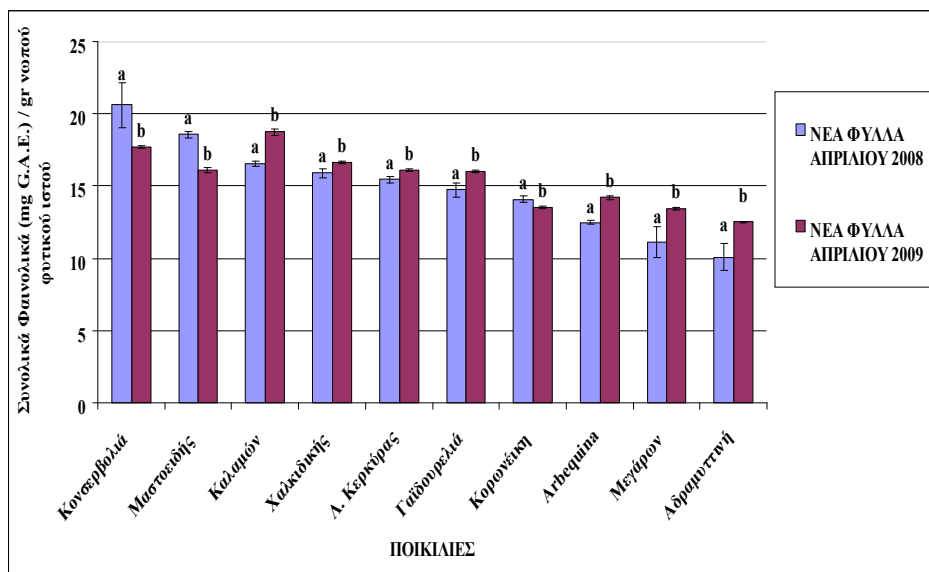


Γράφημα ΙΙΙ-29: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε μαύρους καρπούς του 2009. Ποικιλίες με διαφορετικά γράμματα, διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$).

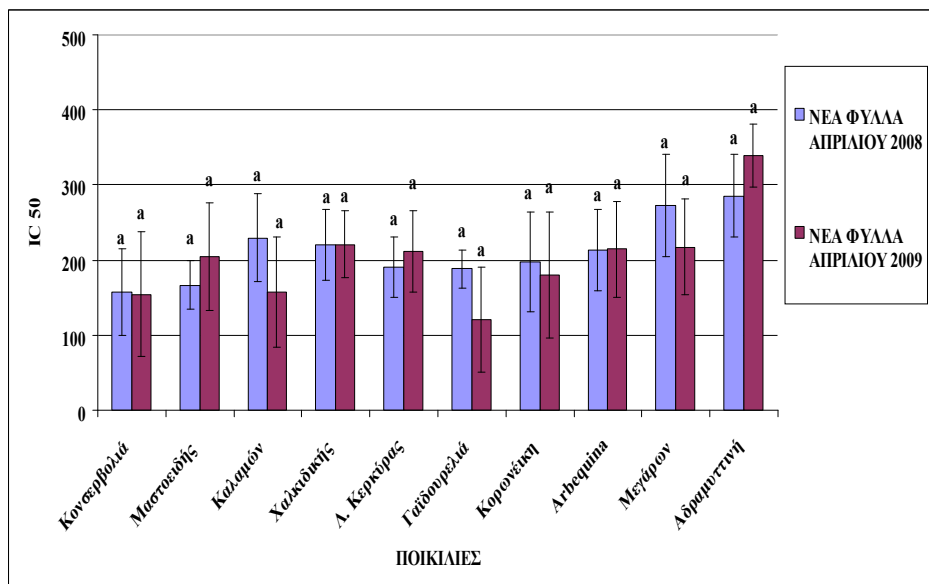


Γράφημα ΙΙΙ-30: Συσχέτιση αντιοξειδωτικής ικανότητας (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών εκφρασμένης σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι σε μαύρους καρπούς του 2009 (p<0,01).

Στο *Γράφημα ΙΙΙ-31* παρουσιάζεται η διακύμανση της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών για τα νέα φύλλα Απριλίου μεταξύ των ετών 2008 και 2009. Στις περισσότερες ποικιλίες τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (12,5 - 18,7 mg GAE/g ν.φ.ι.) από τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 (10,1 - 20,6 mg GAE/g ν.φ.ι.) εκτός των ποικιλιών «Κονσερβολιά», «Μαστοειδής» και «Κορωνέικη» όπου τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Όπως παρουσιάζεται στο *Γράφημα ΙΙΙ-32* δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των νέων φύλλων Απριλίου του 2008 και νέων φύλλων Απριλίου του 2009 για όλες τις ποικιλίες.

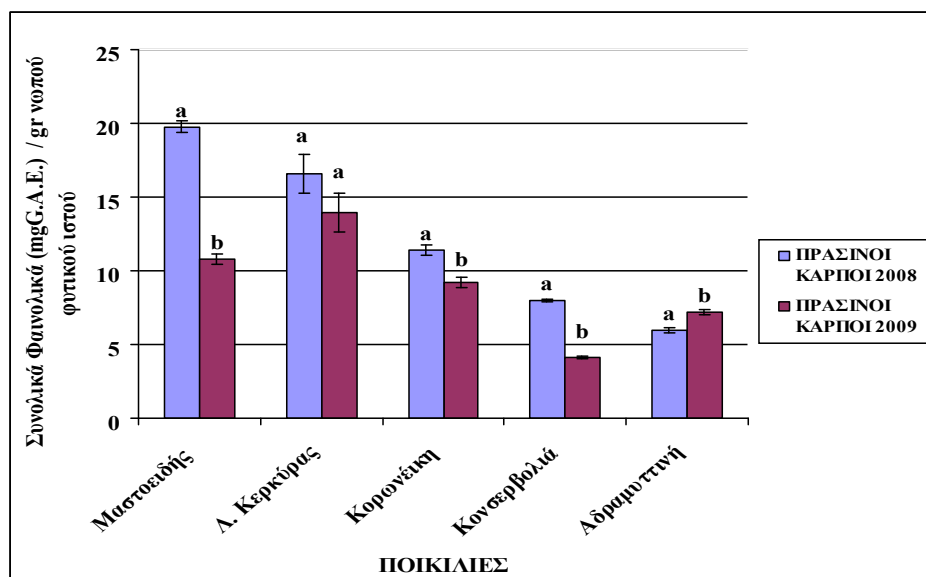


Γράφημα ΙΙΙ-31: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι σε νέα φύλλα Απριλίου, των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

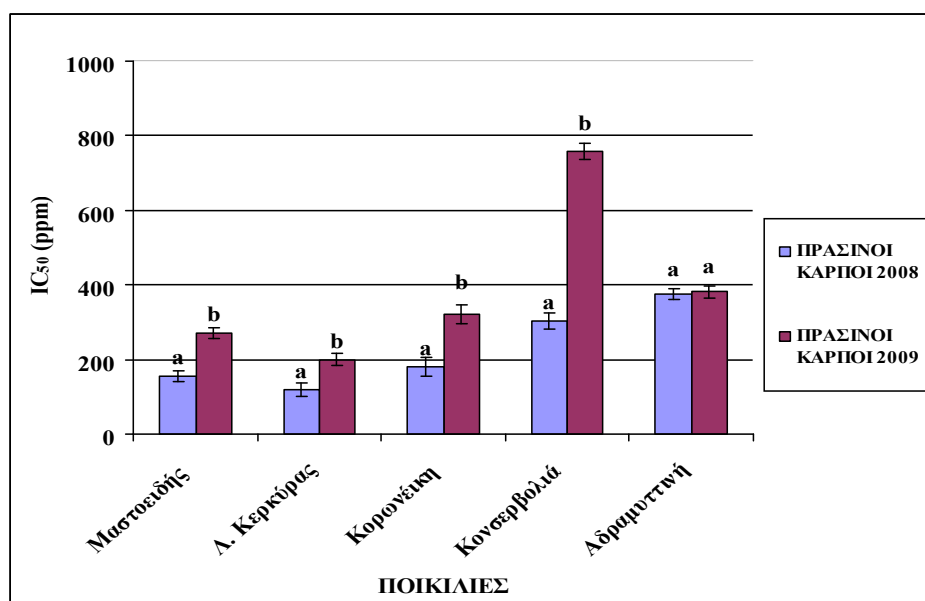


Γράφημα ΙΙΙ-32: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε νέα φύλλα Απριλίου των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

Οι πράσινοι καρποί του 2008 όλων των ποικιλιών παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (5,9 – 19,8 mg GAE/g v.φ.ι.) σε σχέση με τους πράσινους καρπούς του 2009 (4,1 – 13,9 mg GAE/g v.φ.ι.) με εξαίρεση την ποικιλία «Αδραμυττινή» όπου οι πράσινοι καρποί του 2009 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με τους πράσινους καρπούς του 2008 (Γράφημα ΙΙΙ-33). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πράσινων καρπών του 2008 ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από αυτή των πράσινων καρπών του 2009 με εξαίρεση την ποικιλία «Αδραμυττινή» όπου δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ετών 2008 και 2009 στους πράσινους καρπούς (Γράφημα ΙΙΙ-34).

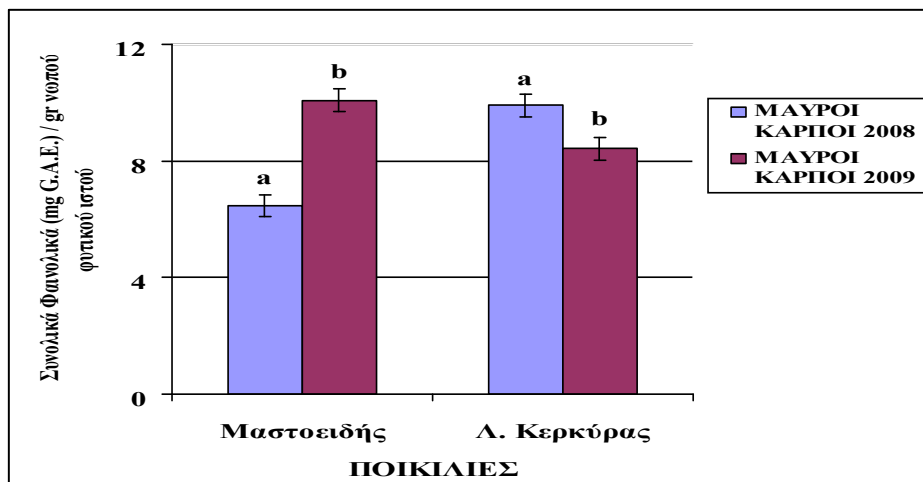


Γράφημα ΙΙΙ-33: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο v.φ.ι σε πράσινους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ετών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

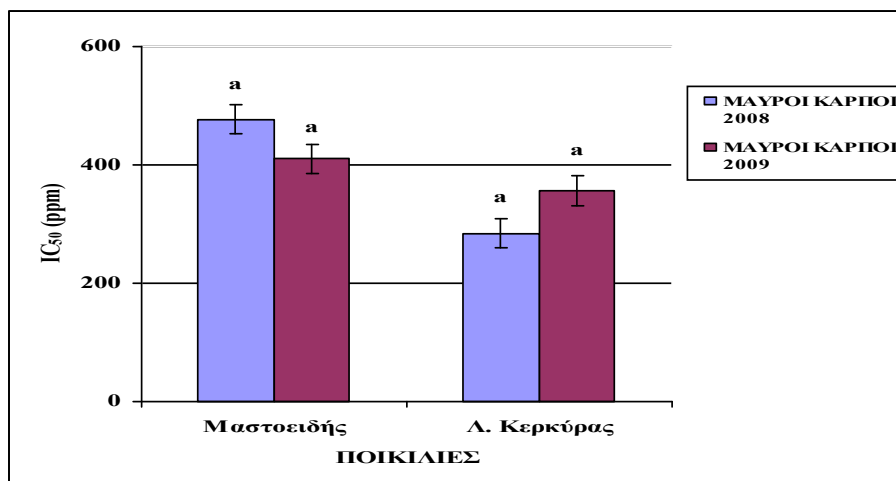


Γράφημα ΙΙΙ-34: Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC_{50}) εκφρασμένη σε ppm σε πράσινους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

Οι μαύροι καρποί του 2009 της ποικιλίας «Μαστοειδής» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με αυτή των μαύρων καρπών του 2008. Αντιθέτως οι μαύροι καρποί του 2009 της ποικιλίας «Λ. Κερκύρας» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με αυτή των μαύρων καρπών τους 2008 (*Γράφημα ΙΙΙ-35*). Δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών στις δύο ποικιλίες, σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. (*Γράφημα ΙΙΙ-36*).



Γράφημα ΙΙΙ-35: Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (G.A.E.) ανά γραμμάριο ν.φ.ι σε μαύρους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).



Γράφημα ΙΙΙ-36 : Αντιοξειδωτική ικανότητα (IC₅₀) εκφρασμένη σε ppm σε μαύρους καρπούς των ετών 2008 - 2009 ανά ποικιλία. Τα διαφορετικά γράμματα, δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ιστών σε κάθε ποικιλία ($p < 0,05$).

ΙΙΙ.24.2. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με HPLC

Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των επιμέρους φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο φαινολικό προφίλ των δέκα ποικιλιών στα νέα φύλλα Απριλίου και των δύο ετών, 2008 και 2009, ήταν σχεδόν ίδιο με μικρές διαφοροποιήσεις.

Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 και σε όλες τις ποικιλίες, οι φαινολικές ουσίες που παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν: η ελευρωπαΐνη που κυμάνθηκε μεταξύ 0,31 - 4,76 mg/g v.φ.ι. («Μεγάρων» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα), ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης που κυμάνθηκε μεταξύ 0,19 - 1,82 mg/g v.φ.ι. («Αδραμυττινή» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα), και η ρουτίνη που κυμάνθηκε μεταξύ 0,14 - 1,41 mg/g v.φ.ι. [(«Μεγάρων» & «Αδραμυττινή») και «Κορωνέικη» αντίστοιχα]. Σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύτηκαν οι ουσίες χλωρογενικό οξύ, μ-κουμαρικό οξύ, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και λουτεολίνη (**Πίνακας ΙΙΙ-6**). Επίσης ανιχνεύτηκε μία ουσία (I) που δεν κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθεί, με χρόνο έκλουσης τα 51,92 min και δύο μέγιστα μήκη κύματος (λ_{\max} : 246 & 290 nm). Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009, οι φαινολικές ουσίες που παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν επίσης: η ελευρωπαΐνη που κυμάνθηκε μεταξύ 0,59 - 9,39 mg/g v.φ.ι. («Αδραμυττινή» και «Arbequina» αντίστοιχα), η ρουτίνη που κυμάνθηκε μεταξύ 0,11 - 1,55 mg/g v.φ.ι. («Μεγάρων» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα), ο 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης που κυμάνθηκε μεταξύ 0,30 - 1,41 mg/g v.φ.ι. [(«Γαΐδουρελιά» & «Αδραμυττινή») και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα) και ο 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης που κυμάνθηκε μεταξύ 0,12 - 1,10 mg/g v.φ.ι. («Αδραμυττινή» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα). Σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν οι ουσίες υδροξυτυροσόλη, χλωρογενικό οξύ, μ-κουμαρικό οξύ, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και λουτεολίνη (**Πίνακας ΙΙΙ-7**). Επίσης και στις δέκα ποικιλίες ανιχνεύτηκε η ίδια ουσία (I), που ανιχνεύτηκε και στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Η ουσία ελευρωπαΐνη ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στα νέα φύλλα Απριλίου των περισσότερων ποικιλιών του 2009 (0,59 - 9,39 mg/g v.φ.ι.) από ότι στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 (0,31 - 4,76 mg/g v.φ.ι.).

Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ποικιλίες «Κονσερβολιά», «Χαλκιδικής», «Λ. Κερκύρας» και «Κορωνέικη» όπου η ουσία ελευρωπαΐνη ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Η ουσία 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στα νέα φύλλα Απριλίου των περισσοτέρων ποικιλιών του 2008 (0,19 - 1,82 mg/g ν.φ.ι.) από ότι στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 (0,17 - 0,87 mg/g ν.φ.ι.). Εξαίρεση αποτέλεσε η ποικιλία «Αδραμυτινή» όπου η ουσία 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερες ποσότητες στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 από ότι στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008, η ποικιλία «Γαΐδουρελιά» όπου η ουσία 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης δεν ανιχνεύτηκε στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 και η ποικιλία «Χαλκιδικής», όπου η ουσία 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης ανιχνεύτηκε σε ίδιες ποσότητες τόσο στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 όσο και στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009.

Στο *Γράφημα ΙΙΙ-37* ενδεικτικά παρουσιάζεται HPLC χρωματογράφημα νέων φύλλων Απριλίου του 2008 της ποικιλίας «Μεγάρων», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλυσης των φαινολικών ουσιών. Επίσης στο *Γράφημα ΙΙΙ-38* παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό HPLC χρωματογράφημα νέων φύλλων έτους 2009 της ποικιλίας «Γαΐδουρελιά», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλυσης των φαινολικών ουσιών. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις φαινολικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο φαινολικό προφίλ των δέκα ποικιλιών τόσο στα φύλλα Σεπτεμβρίου όσο και στα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 ήταν σχεδόν ίδιο με μικρές διαφοροποιήσεις ενώ το φαινολικό προφίλ των φύλλων Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου του 2009 διαφοροποιήθηκε από το φαινολικό προφίλ των νέων φύλλων Απριλίου του 2009. Στα φύλλα Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου του 2009 ανιχνεύτηκαν οι ουσίες βανιλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ και ο-κουμαρικό οξύ οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Η ουσία υδροξυτυροσόλη ανιχνεύτηκε στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 και όχι στα φύλλα Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου του ίδιου έτους.

Η ελευρωπαΐνη, ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και η ρουτίνη ήταν οι ουσίες με την μεγαλύτερη συγκέντρωση τόσο στα φύλλα Σεπτεμβρίου όσο και στα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Συγκεκριμένα, στα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 η ελευρωπαΐνη κυμάνθηκε μεταξύ 1,23 - 20,31 mg/g ν.φ.ι. («Χαλκιδικής» και «Arbequina» αντίστοιχα), ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης μεταξύ 0,95 - 2,01 mg/g ν.φ.ι., («Γαΐδουρελιά» και «Καλαμών» αντίστοιχα), ο 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης μεταξύ 0,66 - 1,39 mg/g ν.φ.ι. («Γαΐδουρελιά» και

«Καλαμών» αντίστοιχα) και η ρουτίνη μεταξύ 0,54 - 1,32 mg/g v.φ.ι. («Μεγάρων» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα). Σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν οι ουσίες βανιλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, μ-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης και λουτεολίνη (**Πίνακας ΙΙΙ-8**). Στα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009, η ελευρωπαϊνή κυμάνθηκε μεταξύ 0,25 - 8,91 mg/g v.φ.ι. («Λ. Κερκύρας» και «Arbequina» αντίστοιχα), ο 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης μεταξύ 1,16 και 2,03 mg/g v.φ.ι. («Λ. Κερκύρας» και «Καλαμών» αντίστοιχα), ο 4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης μεταξύ 0,87 - 1,60 mg/g v.φ.ι. («Κορωνέικη» και «Καλαμών» αντίστοιχα) και η ρουτίνη μεταξύ 0,40 - 1,10 mg/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα). Σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν οι ουσίες χλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης και λουτεολίνη (**Πίνακας ΙΙΙ-9**).

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών μεταξύ των νέων φύλλων Απριλίου του 2009 και των φύλλων Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου του ίδιου έτους παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές. Συγκεκριμένα η ουσία 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης ήταν μία από τις ουσίες που εμφάνισαν υψηλή συγκέντρωση στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 (0,12 – 1,10 mg/g v.φ.ι.) κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα φύλλα Σεπτεμβρίου (0,13 – 0,32 mg/g v.φ.ι.) και στα φύλλα Δεκεμβρίου (0,15 – 0,39 mg/g v.φ.ι.) του 2009. Αντίθετα, η ουσία 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης παρουσίασε υψηλές συγκέντρωσης στα φύλλα Σεπτεμβρίου (0,95 – 2,01 mg/g v.φ.ι.) και Δεκεμβρίου (1,16 – 2,03 mg/g v.φ.ι.) του 2009 και χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,17 – 0,87 mg/g v.φ.ι.) στα νέα φύλλα Απριλίου του ίδιου έτους. Η συγκέντρωση της ουσίας ελευρωπαϊνή αυξάνεται κατά την περίοδο Απριλίου – Σεπτεμβρίου και μειώνεται κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου. Συγκεκριμένα στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 η ελευρωπαϊνή κυμάνθηκε μεταξύ 0,59 - 9,39 mg/g v.φ.ι. («Αδραμυττινή» και «Arbequina» αντίστοιχα), στα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 μεταξύ 1,23 - 20,31 mg/g v.φ.ι. («Χαλκιδικής» και «Arbequina» αντίστοιχα) και στα φύλλα Δεκεμβρίου μεταξύ 0,25 - 8,91 mg/g v.φ.ι. («Λ. Κερκύρας» και «Arbequina» αντίστοιχα).

Στο **Γράφημα ΙΙΙ-39** ενδεικτικά παρουσιάζεται HPLC χρωματογράφημα φύλλων Σεπτεμβρίου του 2009 της ποικιλίας «Μαστοειδής», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλυσης των φαινολικών ουσιών. Επίσης στο **Γράφημα ΙΙΙ-40** παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό HPLC χρωματογράφημα φύλλων Δεκεμβρίου του 2009 της ποικιλίας

«Arbequina», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλουσης των φαινολικών ουσιών. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις φαινολικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν.

Το φαινολικό προφίλ των πράσινων καρπών του 2008 ήταν σχεδόν ίδιο με το φαινολικό προφίλ των πράσινων καρπών του 2009. Η ελευρωπαϊνή, ο βερμπασκοζίτης και η ρουτίνη ήταν οι ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταξύ των φαινολικών ουσιών στους πράσινους καρπούς των ετών 2008 και 2009. Συγκεκριμένα στους πράσινους καρπούς του 2008 η ελευρωπαϊνή κυμάνθηκε μεταξύ 0,87 - 5,68 mg/g v.φ.ι. («Arbequina» και «Καλαμών» αντίστοιχα), ο βερμπασκοζίτης μεταξύ 0,19 - 3,90 mg/g v.φ.ι. («Γαϊδουρελιά» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα) και η ρουτίνη μεταξύ 0,35 - 1,51 mg/g v.φ.ι. («Μεγάρων» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα). Σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν οι ουσίες γαλλικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, χλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και λουτεολίνη (**Πίνακας ΙΙΙ-10**). Επίσης, και στις δέκα ποικιλίες, ανιχνεύτηκε η ίδια ουσία (I), που ανιχνεύτηκε και στα νέα φύλλα Απριλίου των ετών 2008 και 2009. Στους πράσινους καρπούς του 2009, η ελευρωπαϊνή κυμάνθηκε μεταξύ 0,39 - 12,23 mg/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα), ο βερμπασκοζίτης μεταξύ 0,56 - 3,18 mg/g v.φ.ι. («Αδραμυττινή» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα) και η ρουτίνη μεταξύ 0,14 - 0,74 mg/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Αδραμυττινή» αντίστοιχα). Υδροξυτυροσόλη, χλωρογενικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και λουτεολίνη ήταν οι ουσίες που βρέθηκαν σε μικρότερες ποσότητες (**Πίνακας ΙΙΙ-11**). Το γαλλικό οξύ ανιχνεύτηκε σε τρεις («Κονσερβολιά», «Γαϊδουρελιά» και «Μεγάρων») από τις δέκα ποικιλίες μόνο στους πράσινους καρπούς του 2008 και δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις πέντε ποικιλίες στους πράσινους καρπούς του 2009. Επίσης, το φαινολικό προφίλ των πράσινων καρπών του 2008, για όλες τις ποικιλίες, περιλάμβανε την ουσία (I) η οποία δεν βρέθηκε στο φαινολικό προφίλ των πράσινων καρπών του 2009.

Στο **Γράφημα ΙΙΙ-41** ενδεικτικά παρουσιάζεται HPLC χρωματογράφημα πράσινων καρπών του 2008 της ποικιλίας «Λ. Κερκύρας», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλουσης των φαινολικών ουσιών. Επίσης στο **Γράφημα ΙΙΙ-42** ενδεικτικά παρουσιάζεται HPLC χρωματογράφημα πράσινων καρπών του 2009 της ποικιλίας «Λ. Κερκύρας», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλουσης των φαινολικών ουσιών. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις φαινολικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν.

Οι ουσίες ελευρωπαΐνη, ρουτίνη και βερμπασκοζίτης ήταν οι ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταξύ των φαινολικών ουσιών στους μαύρους καρπούς των ετών 2008 και 2009. Η ουσία 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης εμφάνισε υψηλές συγκεντρώσεις στους μαύρους καρπούς του 2008 αλλά δεν ανιχνεύτηκε στους μαύρους καρπούς του 2009. Στους μαύρους καρπούς του 2008 η ελευρωπαΐνη κυμάνθηκε μεταξύ 4,53 - 9,22 mg/g v.φ.ι. («Μαστοειδής» και «Μεγάρων» αντίστοιχα), η ρουτίνη μεταξύ 0,11 - 0,98 mg/g v.φ.ι. («Χαλκιδικής» και «Μεγάρων» αντίστοιχα), ο βερμπασκοζίτης μεταξύ 0,49 - 0,94 mg/g v.φ.ι. («Μαστοειδής» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα) και ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης μεταξύ 0,25 - 0,72 mg/g v.φ.ι. («Χαλκιδικής» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα). Σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν οι ουσίες γαλλικό οξύ, τυροσόλη, 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και λουτεολίνη (**Πίνακας ΙΙΙ-12**). Επίσης ανιχνεύτηκε μία ουσία (ΙΙ), με χρόνο έκλουσης τα 34,8 min και μέγιστο μήκος κύματος (λ_{\max} 250nm) που δεν κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθεί. Στους μαύρους καρπούς του 2009, η ελευρωπαΐνη κυμάνθηκε μεταξύ 1,41 - 11,15 mg/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Κορωνέικη» αντίστοιχα), ο βερμπασκοζίτης μεταξύ 0,08 - 2,40 mg/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα) και η ρουτίνη μεταξύ 0,14 - 0,91 mg/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Κορωνέικη» αντίστοιχα). Σε μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν οι ουσίες υδροξυτυροσόλη, π-κουμαρικό οξύ και 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (**Πίνακας ΙΙΙ-13**). Στις ποικιλίες «Λ. Κερκύρας», «Μαστοειδής» και «Κορωνέικη» ανιχνεύτηκε η ίδια ουσία (ΙΙ), που ανιχνεύτηκε και στους μαύρους καρπούς του 2008.

Στο **Γράφημα ΙΙΙ-43** ενδεικτικά παρουσιάζεται HPLC χρωματογράφημα μαύρων καρπών του 2008 της ποικιλίας «Μαστοειδής», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλουσης των φαινολικών ουσιών. Επίσης στο **Γράφημα ΙΙΙ-44** ενδεικτικά παρουσιάζεται HPLC χρωματογράφημα μαύρων καρπών του 2009 της ποικιλίας «Κορωνέικη», όπου απεικονίζεται η σειρά έκλουσης των φαινολικών ουσιών. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις φαινολικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν.

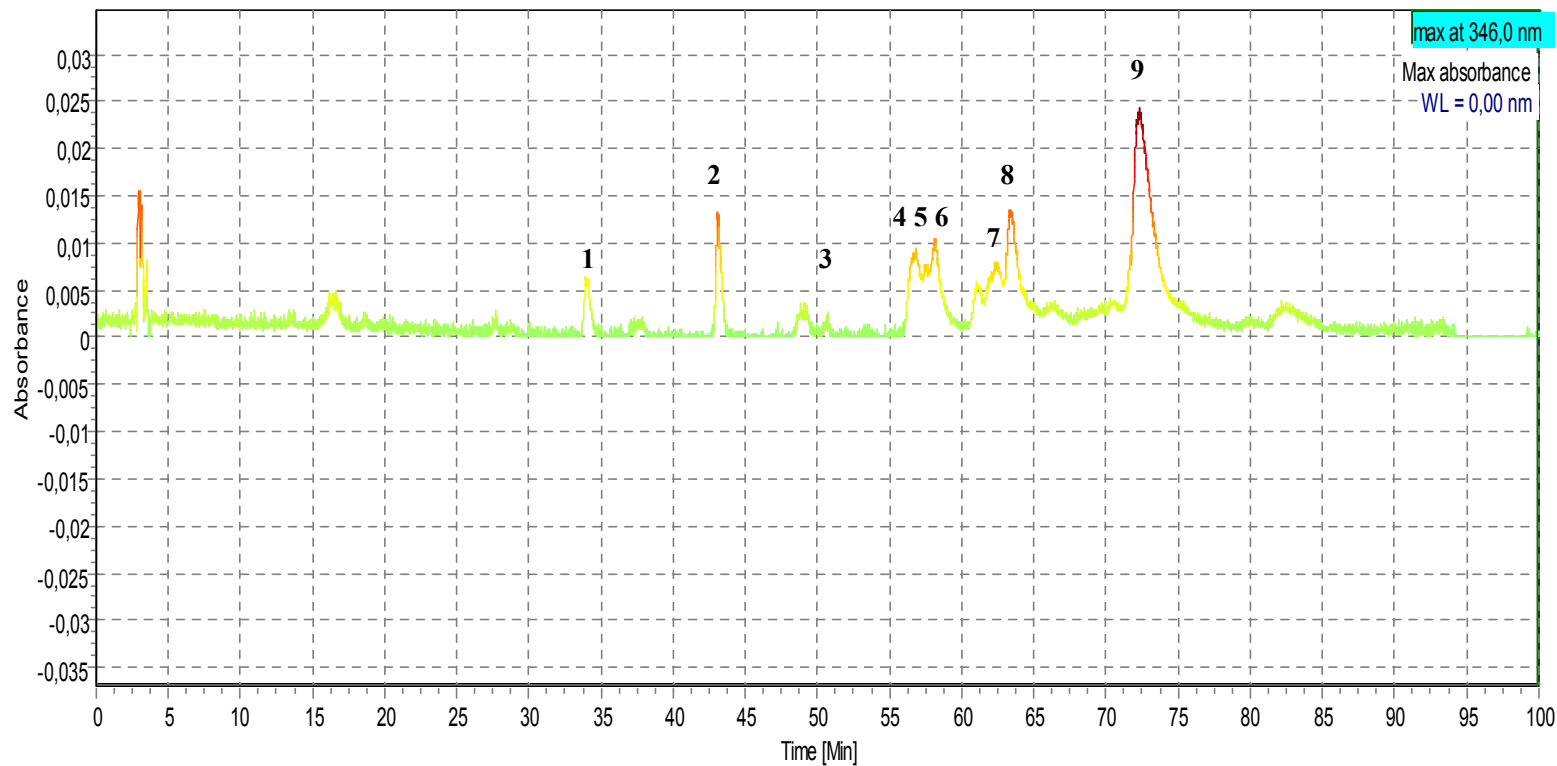
Συγκρίνοντας τους διαφορετικούς ιστούς, η ουσία βερμπασκοζίτης βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στους πράσινους και μαύρους καρπούς και στα δύο έτη ενώ ήταν απύσασα από το φαινολικό προφίλ των φύλλων σε όλες τις ποικιλίες και στα δύο έτη. Η ουσία 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φαινολικά προφίλ των φύλλων και των δύο ετών αλλά όχι στα φαινολικά προφίλ των πράσινων και μαύρων καρπών όλων των ποικιλιών και των δύο ετών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον **Πίνακα ΙΙΙ-14** παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η διακύμανση της συγκέντρωσης των κυριότερων φαινολικών συστατικών στους διαφόρους ιστούς ανάλογα το έτος και την εποχή σε mg/g ν.φ.ι..

Πίνακας ΙΙΙ-6: Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα, παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

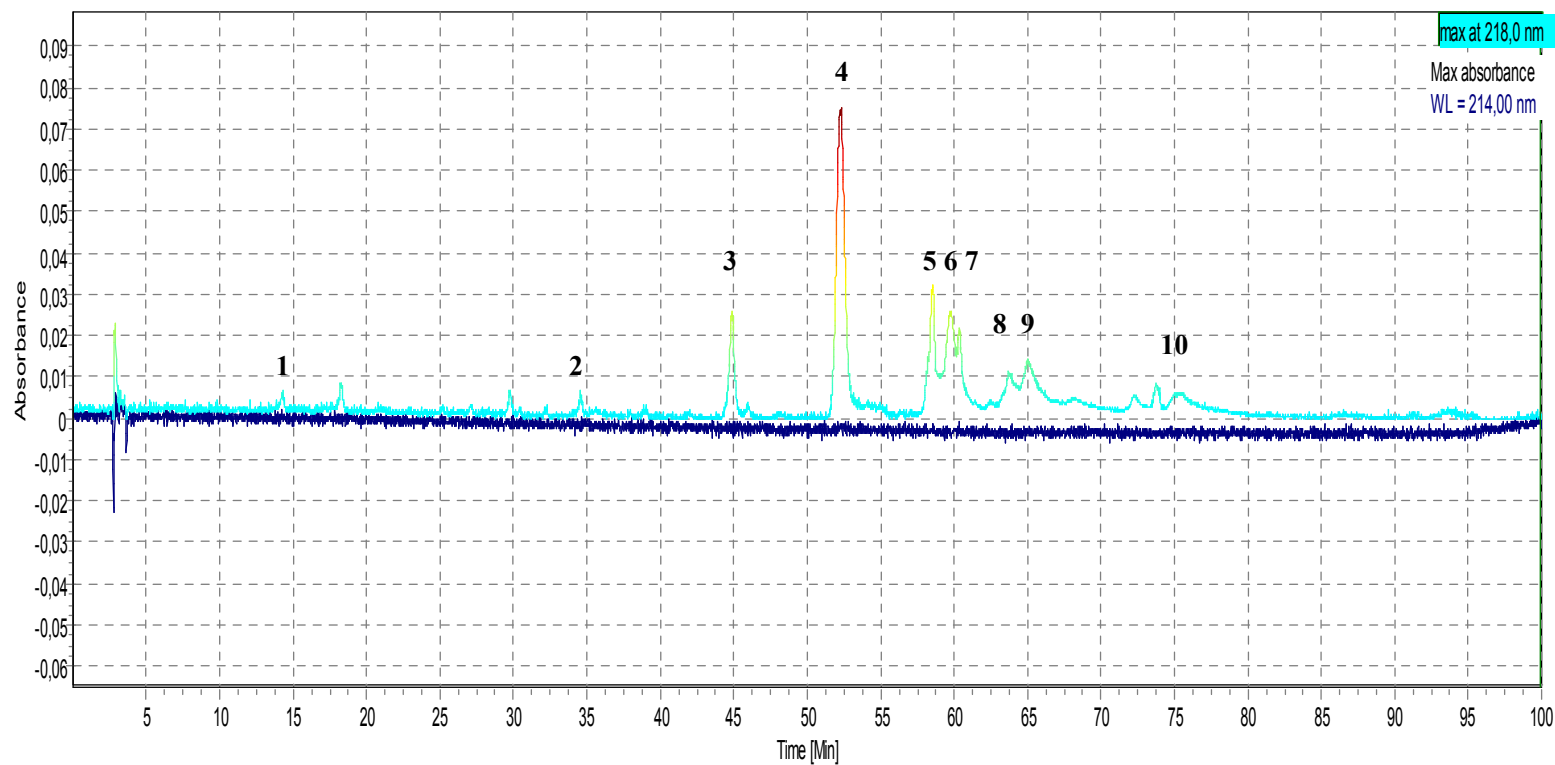
ΝΕΑ ΦΥΛΛΑ 2008																				
Φαινολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																			
	Κονσερβολιά		Μαστοειδής		Καλαμών		Χαλκιδικής		Λ. Κερκύρας		Γαϊδουρελιά		Κορωνέικη		«Arbequina»		Μεγάφων		Αδραμυτινή	
	M.O	S.D.	M.O	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O	S.D.	M.O	S.D.	M.O	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
χλωρογενικό οξύ	0,33	± 0,03	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	0,08	± 0,01	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	0,10	± 0,02	0,13	± 0,02	Δ.Α.	-
μ-κουμαρικό οξύ	0,55	± 0,04	0,17	± 0,03	0,15	± 0,03	0,32	± 0,06	0,12	± 0,03	0,39	± 0,05	0,05	± 0,01	0,07	± 0,01	0,15	± 0,02	0,23	± 0,03
άγνωστη ουσία (I)	√		√		√		√		√		√		√		√		√		√	
ελευρωπαΐνη	4,76	± 0,25	2,42	± 0,17	2,33	± 0,18	3,66	± 0,21	2,22	± 0,17	0,94	± 0,08	2,36	± 0,16	1,50	± 0,07	0,31	± 0,09	0,37	± 0,07
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1,82	± 0,12	0,79	± 0,09	0,70	± 0,09	0,84	± 0,07	0,71	± 0,09	Δ.Α.	-	1,13	± 0,08	0,84	± 0,07	0,26	± 0,05	0,19	± 0,02
ρουτίνη	1,20	± 0,11	1,14	± 0,10	0,54	± 0,07	0,85	± 0,08	0,96	± 0,09	Δ.Α.	-	1,41	± 0,08	0,65	± 0,06	0,14	± 0,02	0,14	± 0,02
7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης	Δ.Α.	-	0,19	± 0,03	0,32	± 0,06	0,33	± 0,06	0,38	± 0,05	0,28	± 0,03	0,20	± 0,04	0,23	± 0,03	0,09	± 0,01	0,08	± 0,01
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	Δ.Α.	-	0,43	± 0,05	0,53	± 0,08	0,55	± 0,07	0,49	± 0,04	0,30	± 0,03	0,65	± 0,07	0,63	± 0,05	0,30	± 0,04	0,24	± 0,03
λουτεολίνη	0,42	± 0,06	0,25	± 0,04	0,50	± 0,07	0,55	± 0,06	0,36	± 0,03	0,18	± 0,02	0,22	± 0,02	0,32	± 0,02	0,34	± 0,03	0,36	± 0,03



Γράφημα ΙΙΙ-37 : HPLC χρωματογράφημα σε νέα φύλλα Απριλίου του 2008 ποικιλίας «Μεγάρων». Κορυφή: **1.** χλωρογενικό οξύ, **2.** μ-κουμαρικό οξύ, **3.** άγνωστη ουσία (I), **4.** ελευρωπαΐνη, **5.** 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **6.** ρουτίνη, **7.** 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, **8.** 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **9.** λουτεολίνη.

Πίνακας ΙΙΙ-7: Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

ΝΕΑ ΦΥΛΛΑ 2009																				
Φαινολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																			
	Κονσερβολιά		Μαστοειδής		Καλαμών		Χαλκιδικός		Λ. Κερύρας		Γαϊδουρελιά		Κορωνέικη		Αιβεκίνα		Μεγάφων		Αδραμυττή	
	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
υδροξυτυροσόλη	ίχνη	-	0,08	± 0,01	ίχνη	-	0,07	± 0,01	0,08	± 0,01	ίχνη	-	0,14	± 0,02	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	0,48	± 0,02
χλωρογενικό οξύ	0,18	± 0,01	ίχνη	-	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	0,14	± 0,01	Δ.Α.	-	0,14	± 0,01	0,26	± 0,02	Δ.Α.	-
μ-κουμαρικό οξύ	0,39	± 0,03	0,11	± 0,02	0,21	± 0,02	0,11	± 0,02	0,12	± 0,02	0,27	± 0,03	ίχνη	-	0,07	± 0,01	0,19	± 0,01	0,31	± 0,04
άγνωστη ουσία (I)	√		√		√		√		√		√		√		√		√		√	
ελευρωπαΐνη	2,51	± 0,13	2,87	± 0,14	4,07	± 0,23	1,27	± 0,08	1,52	± 0,09	6,46	± 0,38	2,02	± 0,13	9,39	± 0,48	1,94	± 0,13	0,59	± 0,07
7-Ο-γλυκοζιτής της λουτεολίνης	0,71	± 0,04	0,59	± 0,03	0,61	± 0,03	0,87	± 0,04	0,58	± 0,03	0,54	± 0,03	0,69	± 0,03	0,33	± 0,04	0,17	± 0,02	0,46	± 0,05
ρουτίνη	0,74	± 0,03	1,18	± 0,06	1,08	± 0,05	1,10	± 0,05	1,55	± 0,08	0,79	± 0,04	1,70	± 0,09	1,02	± 0,05	0,11	± 0,01	0,29	± 0,02
7-Ο-γλυκοζιτής της απιγενίνης	1,10	± 0,06	0,19	± 0,01	0,72	± 0,04	0,31	± 0,02	0,43	± 0,03	0,15	± 0,01	0,19	± 0,01	0,25	± 0,02	0,30	± 0,03	0,12	± 0,01
4-Ο-γλυκοζιτής της λουτεολίνης	1,41	± 0,07	0,60	± 0,03	0,89	± 0,05	0,71	± 0,04	0,59	± 0,04	0,30	± 0,04	0,73	± 0,05	0,86	± 0,04	0,64	± 0,05	0,30	± 0,03
λουτεολίνη	0,59	± 0,03	0,24	± 0,02	0,19	± 0,02	0,25	± 0,02	0,31	± 0,03	ίχνη	-	0,23	± 0,01	ίχνη	-	0,22	± 0,02	0,16	± 0,02

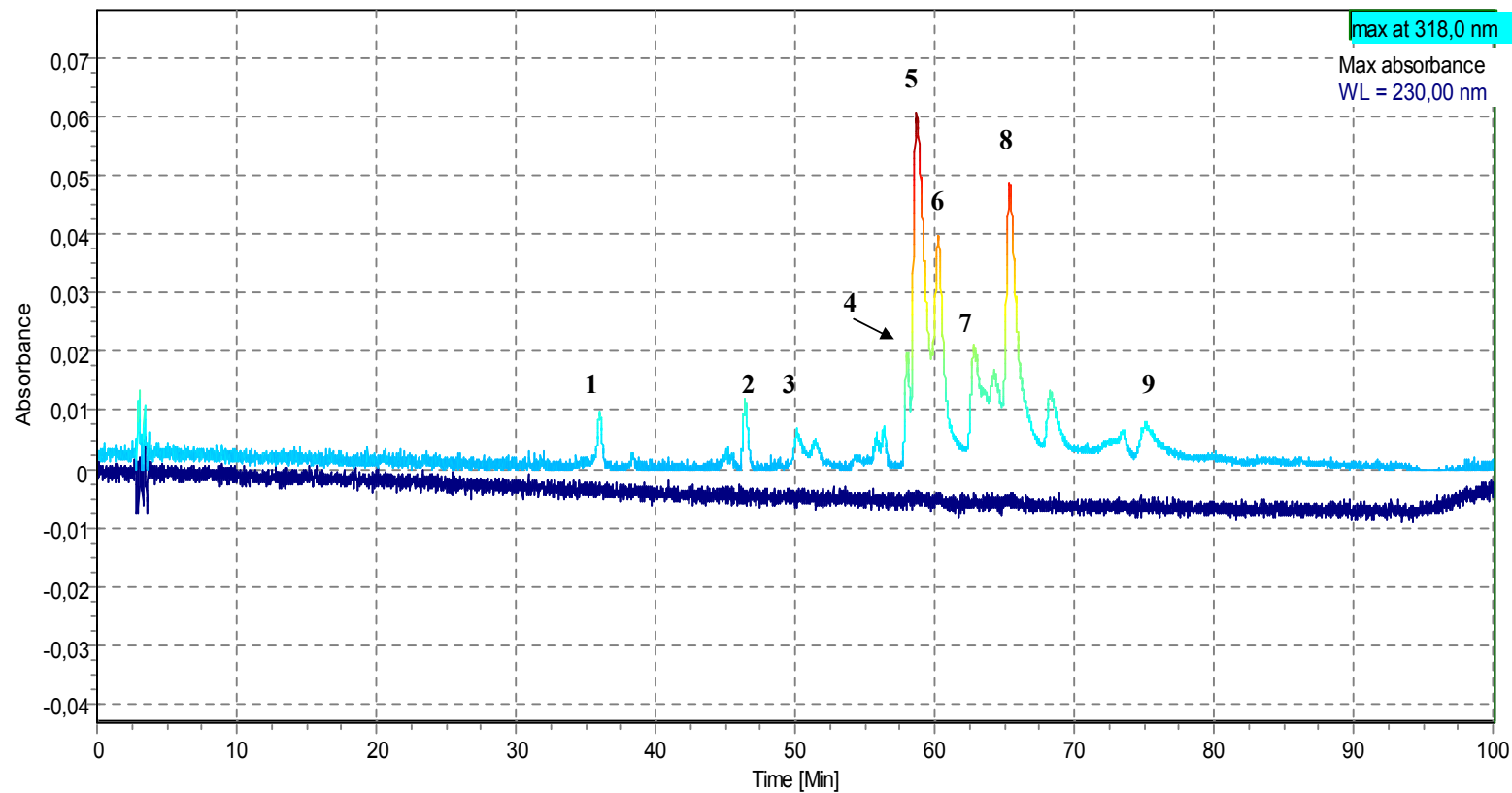


Γράφημα ΙΙΙ-38 : HPLC χρωματογράφημα σε νέα φύλλα Απριλίου του 2009 ποικιλίας «Γαϊδουρελιά». Κορυφή: **1.** υδροξυτυροσόλη, **2.** χλωρογενικό οξύ, **3.** μ-κουμαρικό οξύ, **4.** άγνωστη ουσία (I), **5.** ελευρωπαΐνη, **6.** 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **7.** ρουτίνη, **8.** 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, **9.** 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **10.** λουτεολίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας ΙΙΙ-8: Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

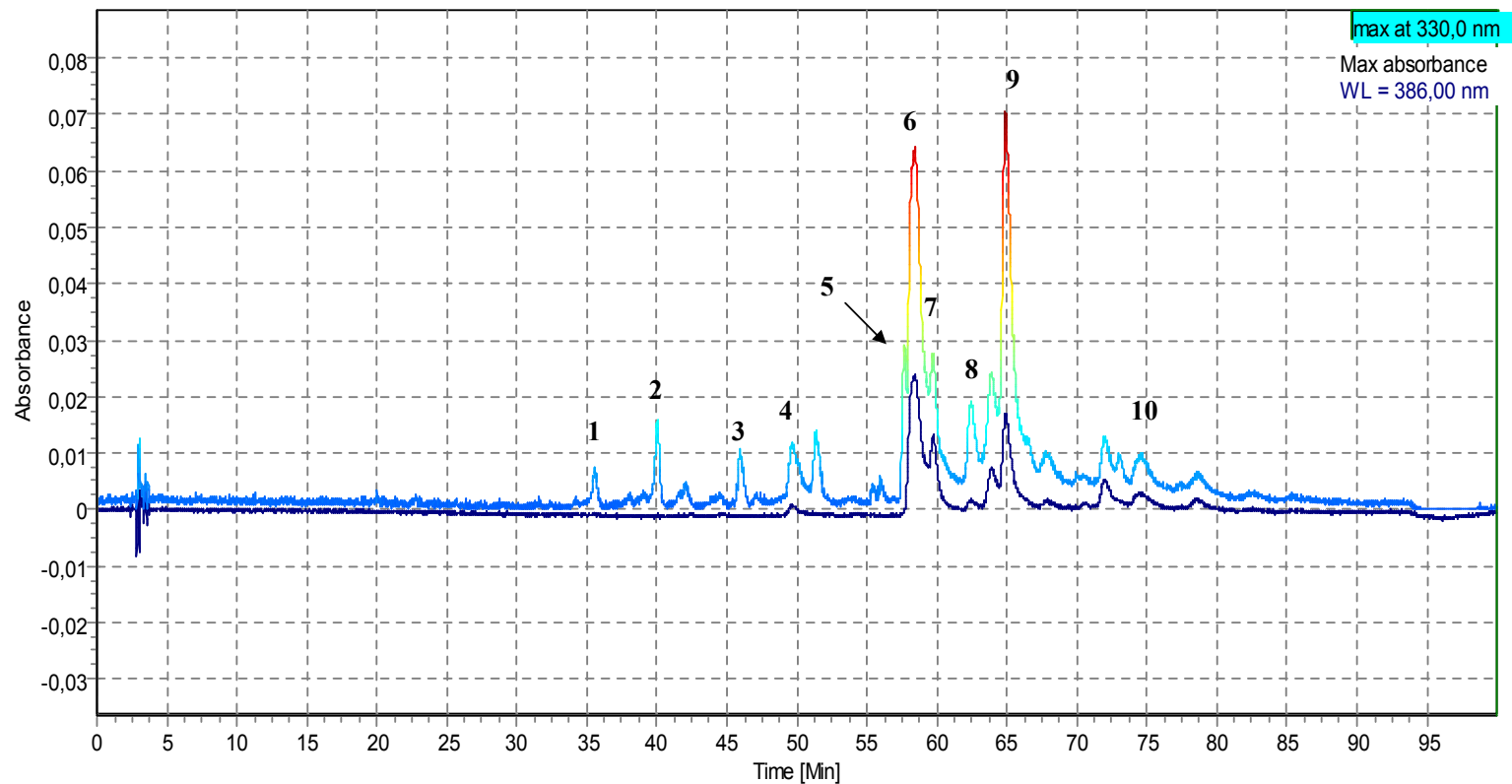
ΦΥΛΛΑ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2009																				
Φαινολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																			
	Κονσερβολιά		Μαστοαδής		Καλαμών		Χαλκιδικής		Λ. Κερκύρας»		Γαϊδουριά		Κορονέικη		Arbequina		Μεγάρον		Αδραμωτινή	
	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
βανίλιο οξύ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	± 0,02	-	-	-	-
χλωρογενικό οξύ	-	-	0,15	± 0,02	-	-	-	-	0,12	± 0,02	-	-	-	-	0,08	± 0,01	0,11	± 0,02	-	-
π-κουμαρικό οξύ	ίχνη	-	-	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-
μ-κουμαρικό οξύ	ίχνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ίχνη	-
φερουλικό οξύ	-	-	ίχνη	-	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-	ίχνη	-	ίχνη	-	-	-	-	-
ο-κουμαρικό οξύ	0,09	± 0,02	0,09	± 0,02	ίχνη	-	ίχνη	-	-	-	ίχνη	-	0,12	± 0,02	0,21	± 0,02	0,08	± 0,02	0,10	± 0,02
ελευρωπαΐνη	5,67	± 0,31	4,47	± 0,25	9,38	± 0,47	1,23	± 0,06	2,36	± 0,15	2,55	± 0,14	10,0	± 0,63	20,31	± 0,98	4,75	± 0,25	1,90	± 0,11
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1,46	± 0,08	1,65	± 0,07	2,01	± 0,11	1,55	± 0,08	1,99	± 0,12	0,95	± 0,06	1,93	± 0,09	1,77	± 0,09	1,11	± 0,06	1,44	± 0,08
ρουτίνη	0,71	± 0,05	1,32	± 0,09	0,61	± 0,05	0,53	± 0,03	1,42	± 0,09	0,64	± 0,03	1,53	± 0,09	0,77	± 0,05	0,54	± 0,03	0,73	± 0,04
7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης	0,13	± 0,02	0,24	± 0,03	0,14	± 0,02	0,27	± 0,02	0,32	± 0,03	0,14	± 0,02	0,23	± 0,02	0,18	± 0,02	0,15	± 0,02	0,24	± 0,03
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,97	± 0,06	1,01	± 0,06	1,39	± 0,08	1,05	± 0,05	0,90	± 0,02	0,66	± 0,04	1,20	± 0,07	1,14	± 0,06	0,66	± 0,04	0,88	± 0,05
λουτεολίνη	0,10	± 0,06	0,11	± 0,01	0,08	± 0,01	0,12	± 0,02	0,08	± 0,01	ίχνη	-	-	-	0,08	± 0,01	0,08	± 0,01	0,09	± 0,02



Γράφημα ΙΙΙ-39 : HPLC χρωματογράφημα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 ποικιλίας «Μαστοιειδής». Κορυφή: **1.** χλωρογενικό οξύ, **2.** φερουλικό οξύ, **3.** ο-κουμαρικό οξύ, **4.** ελευρωπαΐνη, **5.** 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **6.** ρουτίνη, **7.** 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, **8.** 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **9.** λουτεολίνη.

Πίνακας ΙΙΙ-9: Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε φύλλα Δεκεμβρίου του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

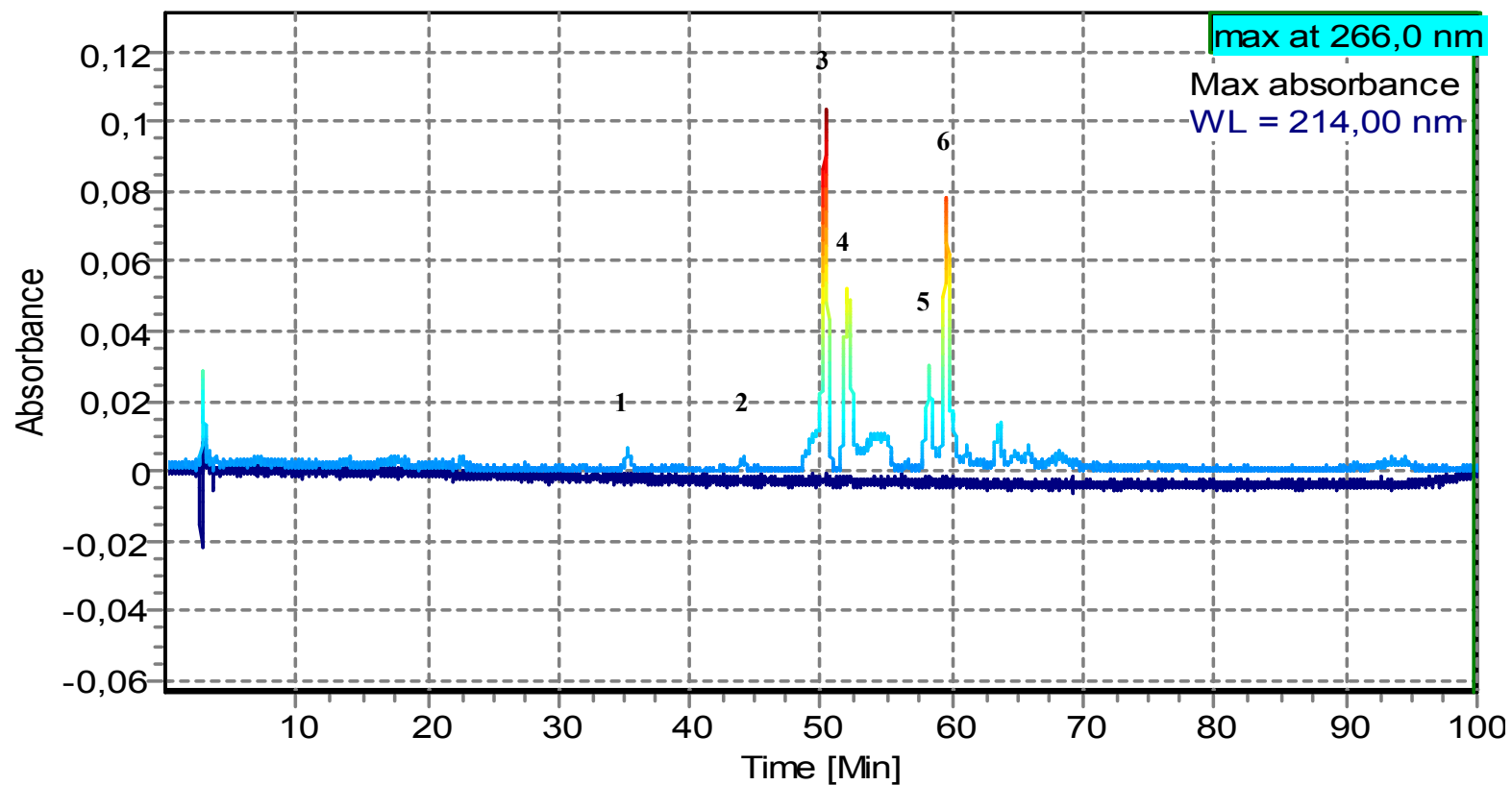
ΦΥΛΛΑ ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΥ 2009																				
Φαινολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																			
	Κονσερβολιά		Μαστοιδιάς		Κολαμιόν		Χαλκιδιόκης		Λ. Κερύρας		Γαΐδουρελιά		Κορονέικη		Arbequina		Μεγάρον		Αδραμυτινή	
	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
χλωρογενικό οξύ	-	-	0,43	± 0,03	0,08	± 0,01	-	-	0,14	± 0,01	-	-	-	-	0,13	± 0,02	-	-	-	-
π-κουμαρικό οξύ	ίχνη	-	-	-	0,08	± 0,02	0,08	± 0,02	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	0,08	± 0,01	ίχνη	-	ίχνη	-
φερουλικό οξύ	-	-	0,08	± 0,01	-	-	ίχνη	-	-	-	-	-	ίχνη	-	ίχνη	-	-	-	-	-
ο-κουμαρικό οξύ	0,08	± 0,01	0,15	± 0,02	0,29	± 0,03	0,08	± 0,01	-	-	0,20	± 0,02	0,09	± 0,02	0,58	± 0,03	0,12	± 0,01	ίχνη	-
ελευρωπαΐνη	0,49	± 0,03	1,94	± 0,11	4,02	± 0,29	1,58	± 0,08	0,25	± 0,02	0,33	± 0,03	2,25	± 0,13	8,91	± 0,66	1,86	± 0,11	0,92	± 0,05
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	1,22	± 0,06	1,58	± 0,09	2,03	± 0,17	2,02	± 0,12	1,16	± 0,06	1,19	± 0,07	1,37	± 0,07	2,01	± 0,13	1,79	± 0,09	1,26	± 0,07
ρουτίνη	0,40	± 0,02	1,10	± 0,07	0,61	± 0,05	0,58	± 0,04	0,60	± 0,04	0,57	± 0,05	1,05	± 0,06	0,62	± 0,04	0,43	± 0,03	0,60	± 0,04
7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης	0,15	± 0,01	0,17	± 0,03	0,16	± 0,02	0,39	± 0,03	0,26	± 0,02	0,22	± 0,01	0,29	± 0,03	0,19	± 0,03	0,22	± 0,02	0,33	± 0,03
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,88	± 0,05	1,03	± 0,04	1,60	± 0,09	1,48	± 0,10	0,73	± 0,04	1,01	± 0,07	0,87	± 0,05	1,41	± 0,07	1,21	± 0,06	0,91	± 0,05
λουτεολίνη	0,1	± 0,02	0,1	± 0,01	ίχνη	-	0,11	± 0,02	0,08	± 0,02	ίχνη	-	0,08	± 0,02	0,09	± 0,02	0,12	± 0,02	0,13	± 0,02



Γράφημα ΙΙΙ-40 : HPLC χρωματογράφημα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 ποικιλίας «Arbequina». Κορυφή: **1.** χλωρογενικό οξύ, **2.** π-κουμαρικό οξύ, **3.** φερουλικό οξύ, **4.** ο-κουμαρικό οξύ, **5.** ελευρωπαΐνη, **6.** 7-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **7.** ρουτίνη, **8.** 7-O- γλυκοζίτης της απιγενίνης, **9.** 4-O- γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **10.** λουτεολίνη.

Πίνακας ΙΙΙ-10: Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε πράσινους καρπούς του 2008. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαινολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

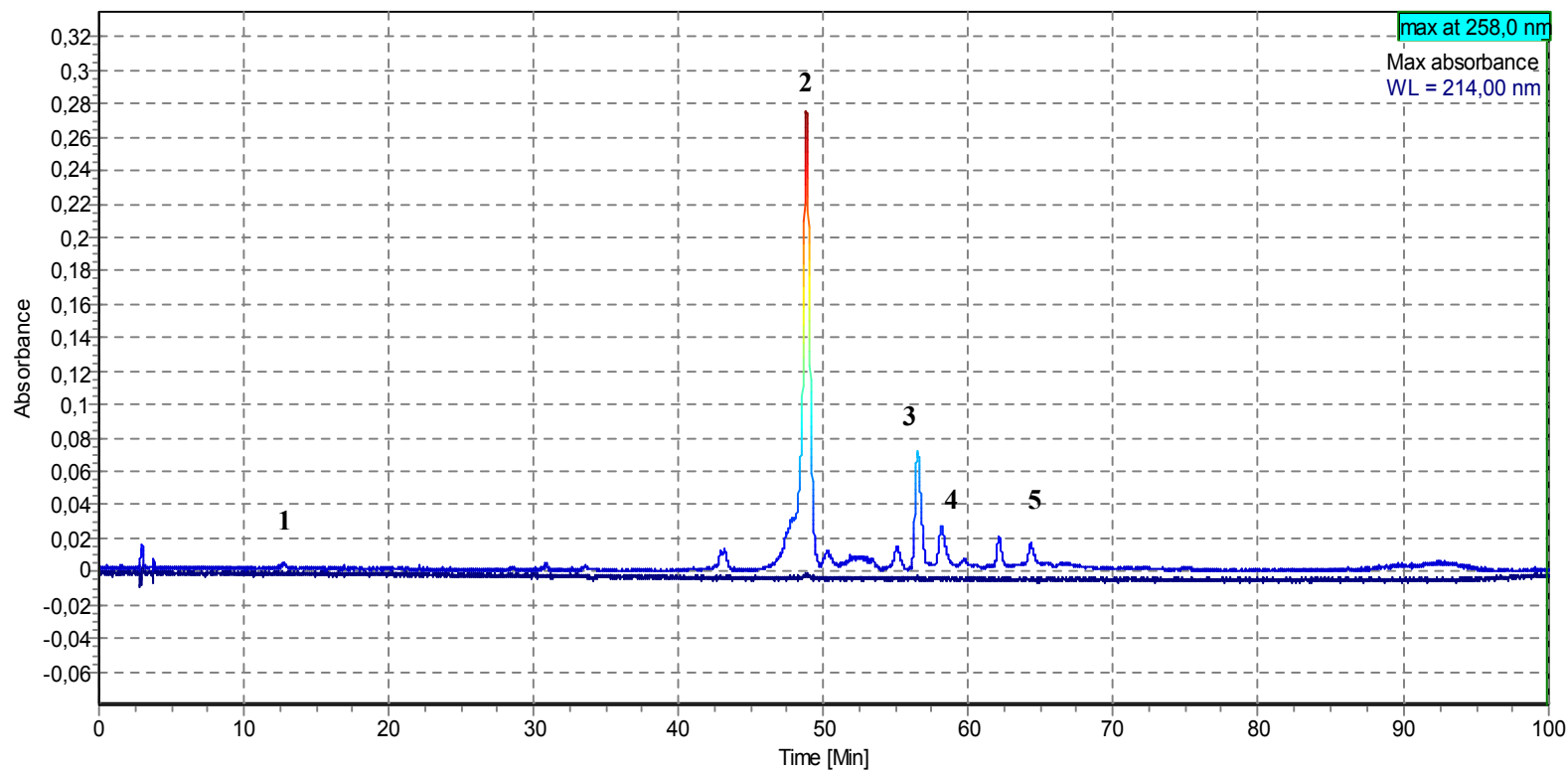
ΠΡΑΣΙΝΟΙ ΚΑΡΠΟΙ 2008																				
Φαινολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ																			
	Κονσερβολιά		Μαστοειδής		Καλαμών		Χαλκιδιώτης		Λ. Κερύρας		Γαϊδουρελιά		Κορονέικη		Arbequina		Μεγάφων		Αδραμυτανή	
	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
γαλλικό οξύ	0,61	± 0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46	± 0,04	-	-	-	-	0,77	± 0,04	-	-
υδροξυτυροσόλη	-	-	0,41	± 0,03	-	-	ίχνη	-	0,22	± 0,03	0,33	± 0,03	0,20	± 0,01	-	-	-	-	-	-
χλωρογενικό οξύ	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	± 0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
π-κουμαρικό οξύ	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	-	-	ίχνη	-
βερμπασκοζίτης	-	-	3,90	± 0,21	-	-	-	-	1,02	± 0,05	0,19	± 0,01	0,27	± 0,02	0,32	± 0,02	-	-	0,27	± 0,02
άγνωστη ουσία (I)	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,11	± 0,01	-	-	0,34	± 0,02	0,30	± 0,02	0,36	± 0,03	0,33	± 0,02	ίχνη	-	0,19	± 0,01	-	-	0,24	± 0,01
ελευρωπαΐνη	1,38	± 0,07	2,68	± 0,14	5,68	± 0,28	1,47	± 0,09	4,81	± 0,26	2,42	± 0,12	1,26	± 0,07	0,87	± 0,05	1,28	± 0,07	0,88	± 0,05
ρουτίνη	0,36	± 0,02	0,59	± 0,03	1,28	± 0,07	0,61	± 0,04	1,51	± 0,09	0,40	± 0,02	0,63	± 0,03	0,63	± 0,03	0,35	± 0,02	0,78	± 0,04
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
λουτεολίνη	0,09	± 0,01	ίχνη	-	-	-	0,09	± 0,01	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-	ίχνη	-	-	-



Γράφημα ΙΙΙ-41 : HPLC χρωματογράφημα πράσινων καρπών του 2008 ποικιλίας «Λ. Κερκύρας». Κορυφή: **1.** γλωρογενικό οξύ, **2.** π-κουμαρικό οξύ, **3.** βερμπασκοζίτης, **4.** άγνωστη ουσία (I), **5.** ελευρωπαΐνη, **6.** ρουτίνη.

Πίνακας ΙΙΙ-11: Συγκεντρώσεις φαιολικών συστατικών σε πράσινους καρπούς του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαιολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

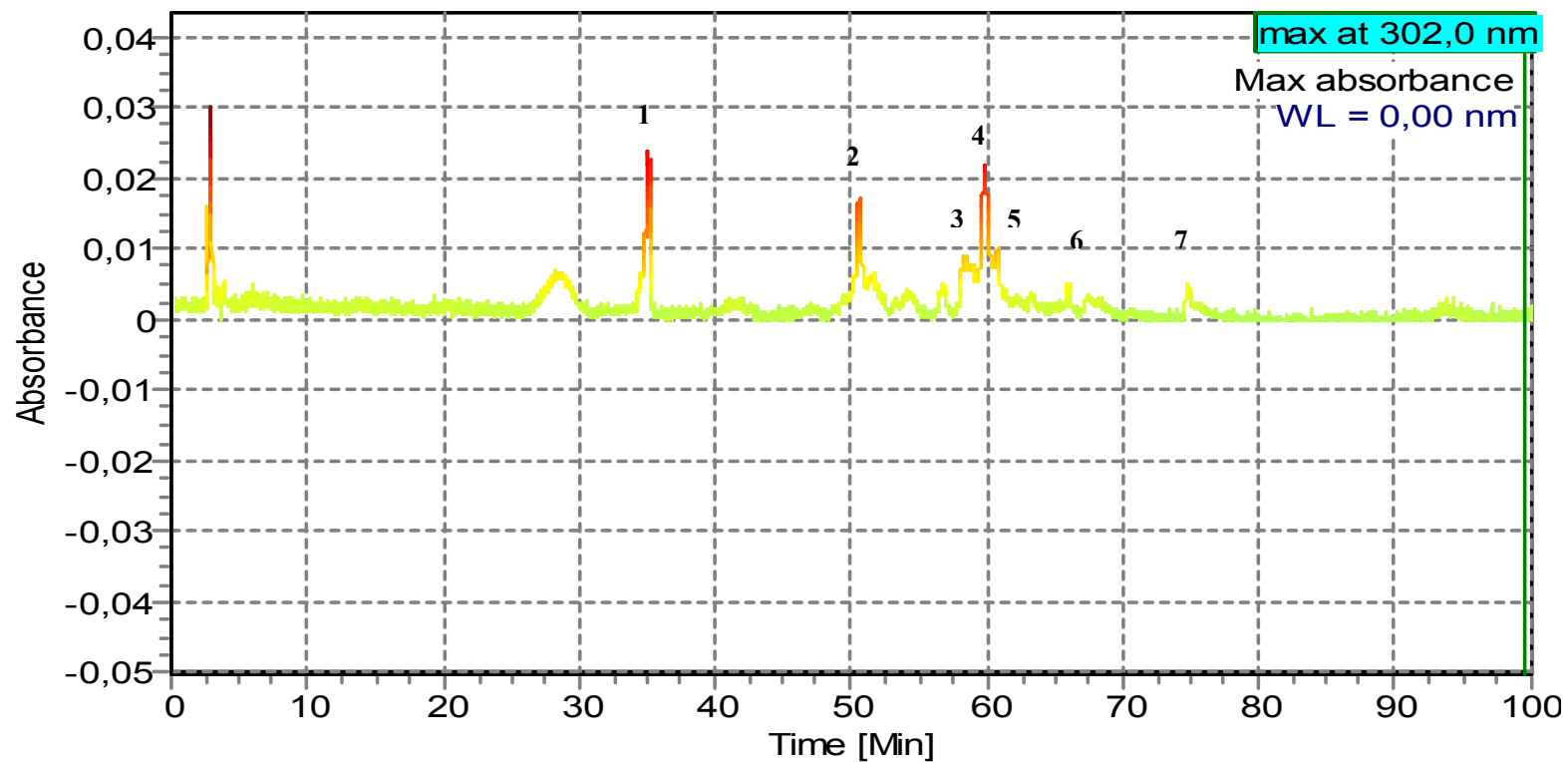
ΠΡΑΣΙΝΟΙ ΚΑΡΠΟΙ 2009										
Φαιολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
	Λ. Κερκύρας		Αδραμυτινή		Κονσερβολιά		Κορωνέικη		Μαστοειδής	
	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
υδροξυτυροσόλη	0,32	± 0,02	0,29	± 0,03	ίχνη	-	0,31	± 0,03	0,28	± 0,04
χλωρογενικό οξύ	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-	-	-
π-κουμαρικό οξύ	-	-	-	-	ίχνη	-	-	-	-	-
βερμπασκοζίτης	3,18	± 0,16	0,56	± 0,04	-	-	0,65	± 0,05	2,83	± 0,14
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,23	± 0,02	0,33	± 0,03	-	-	0,25	± 0,02	0,26	± 0,02
ελευρωπαΐνη	12,23	± 0,93	3,09	± 0,17	0,39	± 0,04	4,13	± 0,24	1,10	± 0,05
ρουτίνη	0,72	± 0,04	0,74	± 0,05	0,14	± 0,02	0,44	± 0,03	0,33	± 0,03
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,20	± 0,01	0,20	± 0,01	ίχνη	-	0,33	± 0,02	0,12	± 0,02
λουτεολίνη	ίχνη	-	ίχνη	-	-	-	0,10	± 0,02	0,09	± 0,01



Γράφημα ΙΙΙ-42: HPLC χρωματογράφημα πράσινων καρπών του 2009 ποικιλίας «Λ. Κερκύρας». Κορυφή: **1.** υδροξυτυροσόλη, **2.** βερμπασκοζίτης, **3.** ελευρωπαΐνη, **4.** ρουτίνη, **5.** 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης.

Πίνακας ΙΙΙ-12: Συγκεντρώσεις φαιολικών συστατικών σε μαύρους καρπούς του 2008. Μ. Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαιολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

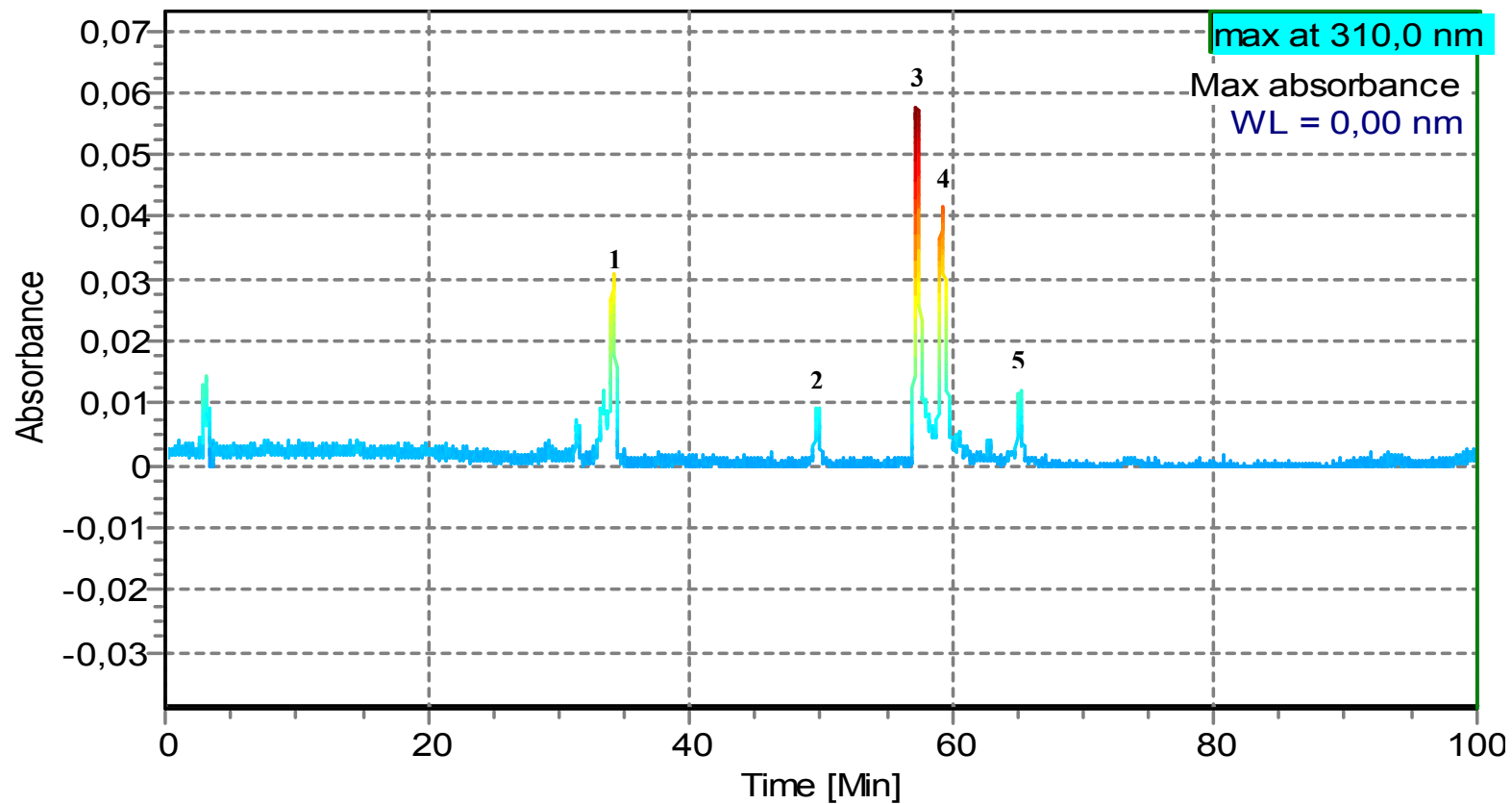
ΜΑΥΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ 2008										
Φαιολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ									
	Μαστοειδής		Χαλκιδικής		Γαϊδουρελιά		Λ. Κερκύρας		Μεγάρων	
	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.	M.O.	S.D.
γαλλικό οξύ	Δ.Α.	-	0,16	± 0,02	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	0,45	± 0,03
τυροσόλη	Δ.Α.	-	0,45	± 0,04	Δ.Α.	-	0,64	± 0,04	0,15	± 0,01
άγνωστη ουσία (II)	√	-	√	-	√	-	√	-	√	-
βερμπασκοζίτης	0,49	± 0,04	ίχνη	-	ίχνη	-	0,94	± 0,04	ίχνη	-
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,72	± 0,05	0,25	± 0,03	ίχνη	-	0,26	± 0,02	0,32	± 0,02
ελευρωπαΐνη	4,53	± 0,28	5,24	± 0,28	4,85	± 0,24	6,78	± 0,17	9,22	± 0,48
ρουτίνη	0,17	± 0,01	0,11	± 0,01	0,15	± 0,02	0,90	± 0,06	0,98	± 0,06
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	ίχνη	-	ίχνη	-	0,08	± 0,01	0,16	± 0,02	0,20	± 0,02
λουτεολίνη	ίχνη	-	ίχνη	-	ίχνη	-	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-



Γράφημα ΙΙΙ-43 : HPLC χρωματογράφημα μαύρων καρπών του 2008 ποικιλίας «Μαστοειδής». Κορυφή: **1.** άγνωστη ουσία (ΙΙ), **2.** βερμπασκοζίτης, **3.** ελευρωπαΐνη, **4.** 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **5.** ρουτίνη, **6.** 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, **7.** λουτεολίνη.

Πίνακας ΙΙΙ-13: Συγκεντρώσεις φαιολικών συστατικών σε μαύρους καρπούς του 2009. Μ.Ο.: Μέσος Όρος (mg/g φρέσκου ιστού), S.D.: Standard Deviation. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι φαιολικές ουσίες που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

ΜΑΥΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ 2009								
Φαιολικά Συστατικά	ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ							
	Λ. Κερκύρας		Μαστοειδής		Κορωνέκη		Κονσερβολία	
	Μ.Ο.	S.D.	Μ.Ο.	S.D.	Μ.Ο.	S.D.	Μ.Ο.	S.D.
υδροξυτυροσόλη	0,83	± 0,06	Δ.Α.	-	Δ.Α.	-	0,12	± 0,01
άγνωστη ουσία (ΙΙ)	ίχνη	-	√	-	√	-	Δ.Α.	-
π-κουμαρικό	Δ.Α.	-	ίχνη	-	Δ.Α.	-	ίχνη	-
βερμπασκοζίτης	2,40	± 0,12	1,75	± 0,09	0,11	± 0,01	0,08	± 0,01
ελευρωπαΐνη	1,76	± 0,09	1,56	± 0,07	11,15	± 0,64	1,41	± 0,08
ρουτίνη	0,34	± 0,03	0,51	± 0,03	0,91	± 0,06	0,14	± 0,02
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,08	± 0,01	Δ.Α.	-	0,12	± 0,01	Δ.Α.	-



Γράφημα ΙΙΙ-44 : HPLC χρωματογράφημα μαύρων καρπών του 2009 ποικιλίας «Κορωνέικη». Κορυφή: **1.** άγνωστη ουσία (ΙΙ), **2.** βερμπασκοζίτης, **3.** ελευρωπαΐνη, **4.** ρουτίνη, **5.** 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης.

Πίνακας ΙΙΙ-14: Διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στους διαφόρους ιστούς ανάλογα το έτος και την εποχή σε mg/g ν.φ.ι. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται η διακύμανση της συγκέντρωσης των κυριότερων φαινολικών συστατικών στους διαφόρους ιστούς ανάλογα το έτος και την εποχή.

Φαινολικά Συστατικά	Νέα Φύλλα Απριλίου 2008	Νέα Φύλλα Απριλίου 2009	Φύλλα Σεπτεμβρίου 2009	Φύλλα Δεκεμβρίου 2009	Πράσινοι καρποί 2008	Πράσινοι καρποί 2009	Μαύροι καρποί 2008	Μαύροι καρποί 2009
βερμπασκοζίτης	-	-	-	-	0,19-3,90	0,56-3,18	0,49-0,94	0,08-2,40
7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,19-1,82	0,17-0,87	0,95-2,01	1,16-2,03	0,11-0,36	0,23-0,33	0,25-0,72	-
ελευρωπαΐνη	0,31-4,76	0,59-9,39	1,23-20,31	0,25-8,91	0,87-5,68	0,39-12,23	4,53-9,22	1,41-11,15
ρουτίνη	0,14-1,41	0,11-1,55	0,54-1,32	0,40-1,10	0,35-1,51	0,14-0,74	0,11-0,98	0,14-0,91
7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης	0,08-0,38	0,12-1,10	0,13-0,32	0,15-0,39	-	-	-	-
4-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	0,24-0,65	0,30-1,41	0,66-1,39	0,87-1,60	0,21	0,12-0,33	0,08-0,20	0,08-0,12

ΙΙΙ.25. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία, δέκα ποικιλίες ελιάς μελετήθηκαν ως προς τη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών καθώς επίσης και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση σε φύλλα και καρπούς σε διαφορετικές εποχές και κατά τη διάρκεια δύο καλλιεργητικών περιόδων (έτη 2008 και 2009). Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών που ήταν παρούσες στους διαφόρους ιστούς σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Πέραν της συνεισφοράς τους στην αντιοξειδωτική ικανότητα, οι φαινολικές ουσίες επηρεάζουν και τα οργανοληπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου ελαιόλαδου. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας ελευρωπαΐνης σε διαφορετικές ποικιλίες κατά την περίοδο συλλογής των ελαιόκαρπων, μπορούν να εξηγήσουν τις διαφορές στην πικρή – πικάντικη γεύση στο παραγόμενο από αυτές τις ποικιλίες λάδι (**Briante et al., 2002**). Επίσης ποικιλίες με υψηλά επίπεδα υδροξυτυροσόλης και ελευρωπαΐνης προσδίδουν στα παραγόμενα ελαιόλαδα ισχυρή προστασία απέναντι στην αυτοοξειδωση και θερμοοξειδωση (**Papadopoulos & Boskou, 1999**).

Η παρούσα μελέτη έδειξε διαφορές στη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών τόσο μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών, όσο και μεταξύ των διαφορετικών ιστών μέσα στην ίδια ποικιλία καθώς, και επίδραση του χρόνου συλλογής των υπό μελέτη ιστών. Οι διαφορετικές ποικιλίες παρουσίασαν διαφορετική συγκέντρωση συνολικών φαινολικών.

Για τις ποικιλίες που μελετήθηκαν, και για τα δύο έτη, τα νέα φύλλα Απριλίου παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών ακολουθούμενα από τους πράσινους καρπούς και τους μαύρους καρπούς. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 10,1 - 20,6 mg GAE/g v.φ.ι. ενώ στους πράσινους και μαύρους καρπούς του ίδιου έτους κυμάνθηκε μεταξύ 5,9 - 19,8 mg GAE/g v.φ.ι. και 5,4 - 9,9 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι. ενώ στους πράσινους και μαύρους καρπούς κυμάνθηκε μεταξύ 4,1 - 13,9 mg GAE/g v.φ.ι. και 5,6 - 10,1 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα. Εξαιρέση αποτέλεσαν, το 2008, οι ποικιλίες «Λ. Κερκύρας»

και «Μαστοειδής», όπου οι πράσινοι καρποί παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα νέα φύλλα Απριλίου και η ποικιλία «Μεγάρων» όπου οι μαύροι καρποί παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τους πράσινους καρπούς της ίδιας ποικιλίας. Το έτος 2009, εξαίρεση αποτέλεσαν οι ποικιλίες «Arbequina» και «Μεγάρων» όπου τα φύλλα Δεκεμβρίου 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με αυτό των νέων φύλλων και η ποικιλία «Αδραμυττινή» όπου τα φύλλα Σεπτεμβρίου 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με αυτό των νέων φύλλων. Οι μαύροι καρποί παρουσίασαν το χαμηλότερο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο σε σύγκριση με τους πράσινους καρπούς και τα φύλλα, εκτός της ποικιλίας «Κονσερβολιά» όπου οι μαύροι καρποί παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με τους πράσινους καρπούς του έτους. Οι **Silva et al., (2006)** μελετώντας καρπούς και φύλλα δέκα Πορτογαλικών ποικιλιών αναφέρουν ότι τα συνολικά φαινολικά στους καρπούς κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών 13,9 – 30,5 mg/g D.W. ενώ στα φύλλα μεταξύ 11,6 – 17,4 mg/g D.W..

Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών κατά την διάρκεια ανάπτυξης των φύλλων και ωρίμανσης των καρπών. Στις περισσότερες ποικιλίες τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι.) από τα φύλλα Σεπτεμβρίου (10,6 - 15,3 mg GAE/g v.φ.ι.) και Δεκεμβρίου (10,3 - 17,0 mg GAE/g v.φ.ι.) του ίδιου έτους. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ποικιλίες «Arbequina» και «Μεγάρων» όπου τα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με αυτό των νέων φύλλων Απριλίου και η ποικιλία «Αδραμυττινή» όπου τα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών σε σχέση με αυτό των νέων φύλλων Απριλίου. Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών των πράσινων καρπών ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από την συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών των μαύρων καρπών και στα δύο έτη με εξαίρεση την ποικιλία «Μεγάρων» το 2008 και την ποικιλία «Κονσερβολιά» το 2009. Οι **Morello et al., (2004)** μελέτησαν την επίδραση της διαδικασίας ωρίμανσης στο φαινολικό περιεχόμενο των καρπών των ποικιλιών «Arbequina» «Farga» και «Morrut», και παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών μειώθηκε κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των καρπών κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα

εργασία. Την επίδραση της ωρίμανσης στο φαινολικό περιεχόμενο των καρπών δύο ιταλικών ποικιλιών (*Ascolana Tenera* και *Frantoio Seedling no.17*) μελέτησαν οι **Briante et al., (2002)**. Και αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών μειώθηκε κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των καρπών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι **Fernandez-Orozco et al., (2011)** οι οποίοι μελέτησαν τη μεταβολή του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των καρπών της ποικιλίας «Arbequina» κατά την διάρκεια ωρίμανσής τους, σε συμβατικές και βιολογικές καλλιέργειες. Τόσο για τις βιολογικές όσο και τις συμβατικές καλλιέργειες παρατηρήθηκε, αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου κατά την διάρκεια των τριών πρώτων εβδομάδων της περιόδου ωρίμανσης και στη συνέχεια σταδιακή μείωση του με την πάροδο του χρόνου. Ανάλογες παρατηρήσεις σχετικά τόσο με τη μείωση του φαινολικού περιεχομένου κατά την ωρίμανση έχουν αναφερθεί και από τους **Amiot et al., (1986 & 1989)** και **Ryan et al., (1999)**. Αντίθετα, οι **Bouaziz et al., (2010)** παρατήρησαν αύξηση της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών κατά την διάρκεια της ωρίμανσης των καρπών.

Συγκρίνοντας τις διαφορετικές ποικιλίες, η ποικιλία «Κονσερβολιά» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (20,6 mg GAE/g v.φ.ι.) στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 και η ποικιλία «Καλαμών» (18,7 mg GAE/g v.φ.ι.) στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009. Στα φύλλα Σεπτεμβρίου και Δεκεμβρίου του 2009 η ποικιλία «Arbequina» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (15,3 και 17 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα). Ως προς τους πράσινους καρπούς, η ποικιλία «Μαστοειδής» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (19,8 mg GAE/g v.φ.ι.) το 2008 και η ποικιλία «Λ. Κερκύρας» (9,9 mg GAE/g v.φ.ι.) το 2009. Στους μαύρους καρπούς η ποικιλία «Λ. Κερκύρας» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (9,9 mg GAE/g v.φ.ι.) το 2008 και η ποικιλία «Μαστοειδής» (10,1 mg GAE/g v.φ.ι.) το 2009. Οι **Kiritsakis et al., (2010)** αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών στα φύλλα της ποικιλίας «Καλαμών» (5,57 mg GAE/g D.W) ήταν χαμηλότερη από τις ποικιλίες «Μεγάρων» και «Κορωνέικη» (6,09 και 6,19 mg GAE/g D.W. αντίστοιχα). Οι **Blekas et al., (2002)** μελέτησαν τις διαφορές στη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών σε επεξεργασμένους καρπούς εμπορίου, των ποικιλιών: «Νυχάτη Καλαμάτας», «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδικής». Η «Νυχάτη Καλαμάτας» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (1,05 mg caffeic acid Equiv./g D.W.) ακολουθούμενη από τις ποικιλίες

«Χαλκιδικής» (0,79 mg caffeic acid Equiv./g D.W.) και «Κονσερβολιά» (0,59 mg caffeic acid Equiv./g D.W.). Επίσης, οι **Boskou et al., (2006)**, εξέτασαν τη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών σε επεξεργασμένους καρπούς εμπορίου, των ποικιλιών: «Καλαμών», «Τσακιστές», «Κρήτης», «Κονσερβολιά» και «Θρούμπα Κρήτης». Η «θρούμπα Κρήτης» παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (1,71 mg caffeic acid/g D.W.) ακολουθούμενη από τις ποικιλίες «Καλαμών» (1,55 mg caffeic acid/g D.W.), «Τσακιστές» (1,45 mg caffeic acid/g D.W.), «Κρήτης» (1,30 mg caffeic acid/g D.W.) και «Κονσερβολιά» (0,82 mg caffeic acid/g D.W.). Οι **Bouaziz et al., (2010)** αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών, κατά την περίοδο συλλογής των καρπών, κυμάνθηκε για την ποικιλία Chemlali μεταξύ των τιμών 4.30 - 11.52 g G.A.E. kg⁻¹ F.W.. Χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην ποικιλία Zalmati όπου τα συνολικά φαινολικά κυμάνθηκαν από 3.69 έως 8.71 g G.A.E. kg⁻¹ F.W..

Συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές χρονιές, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 [10,1 - 20,6 mg GAE/g v.φ.ι. («Αδραμυτινή» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα)] ήταν αυξημένη σε σχέση με το έτος 2009 [12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι. («Αδραμυτινή» και «Καλαμών» αντίστοιχα)]. Στους πράσινους καρπούς, η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών παρουσιάζεται αυξημένη το έτος 2008 [5,9 - 19,8 mg GAE/g v.φ.ι. («Μεγάρων» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα)] σε σχέση με το έτος 2009 [4,1 - 13,9 mg GAE/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα)] ενώ στους μαύρους καρπούς δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών μεταξύ των ετών 2008 [5,4 - 9,9 mg GAE/g v.φ.ι. («Γαϊδουρελιά» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα)] και 2009 [5,6 - 10,1 mg GAE/g v.φ.ι. («Κονσερβολιά» και «Μαστοειδής» αντίστοιχα)].

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι οι διαφορετικές ποικιλίες παρουσίασαν διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν και για τα δύο έτη. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008, η αντιοξειδωτική ικανότητα κυμάνθηκε μεταξύ 157,64 - 285,80 ppm («Κονσερβολιά» και «Αδραμυτινή» αντίστοιχα), στους πράσινους καρπούς του 2008, μεταξύ 119,66 - 496,45 ppm («Λιανολιά Κερκύρας» και «Μεγάρων» αντίστοιχα), στους μαύρους καρπούς του 2008 μεταξύ 284,23 - 886,36 ppm («Λ. Κερκύρας» και «Χαλκιδικής» αντίστοιχα), στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 μεταξύ 121,0 - 339,28 ppm («Γαϊδουρελιά» και «Αδραμυτινή» αντίστοιχα), στα φύλλα Σεπτεμβρίου του 2009

μεταξύ 235,9 - 494,77 ppm («Κορωνέικη» και «Γαϊδουρελιά» αντίστοιχα), στα φύλλα Δεκεμβρίου του 2009 μεταξύ 229,5 - 530,9 ppm («Χαλκιδικής» και «Λ. Κερκύρας» αντίστοιχα), στους πράσινους καρπούς του 2009 μεταξύ 199,46 - 757,45 ppm («Λ. Κερκύρας» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα) και στους μαύρους καρπούς του 2009 μεταξύ 356,1 - 559,34 ppm («Λ. Κερκύρας» και «Κονσερβολιά» αντίστοιχα). Τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 των ποικιλιών «Μεγάρων», «Γαϊδουρελιά», «Χαλκιδικής» και «Κονσερβολιά» παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με αυτή των πράσινων καρπών τους. Οι Μαύροι καρποί των ποικιλιών «Μαστοειδής», «Χαλκιδικής» και «Γαϊδουρελιά» είχαν στατιστικώς σημαντικά την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα νέα φύλλα Απριλίου και τους πράσινους καρπούς. Οι **Boskou et al., (2006)**, αναφέρουν ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, εμφάνισε η ποικιλία «Τσακιστές» ακολουθούμενη από τις ποικιλίες «Κονσερβολιά», «Καλαμών», «Κρήτης» και «Θρούμπα Κρήτης». Οι **Kiritsakis et al., (2010)**, δεν παρατήρησαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ποικιλιών «Καλαμών», «Μεγάρων» και «Κορωνέικη» που μελέτησαν σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να οφείλεται στη μεγάλη ποικιλομορφία και την πολυπλοκότητα των μειγμάτων των φαινολικών συστατικών στις διαφορετικές ποικιλίες καθώς επίσης και στις μικρές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών σε ότι αφορά το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Στην παρούσα διατριβή, για όλους τους ιστούς και για τα δύο έτη βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας. Υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συνοδεύτηκε από υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι **Bouaziz et al., (2010)**, **Pereira et al., (2006)** και **Fernandez-Orozco et al., (2011)** όπου και αυτοί αναφέρουν θετική συσχέτιση μεταξύ αντιοξειδωτικής ικανότητας και συγκέντρωσης συνολικών φαινολικών διαφόρων ποικιλιών.

Το σύνολο των φαινολικών ουσιών που είναι παρούσες σε κάθε ιστό δρουν αθροιστικά για τη διαμόρφωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συγκεκριμένου ιστού. Οι **Benavente-Garcia et al., 2000**, μελέτησαν την συμβολή της κάθε μιας από της ουσίες αυτές, στην αντιοξειδωτική ικανότητα των φύλλων της ελιάς. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε μιας από τις φαινολικές ενώσεις που απαρτίζουν το φαινολικό προφίλ, καθορίζεται από την δομή τους. Σύμφωνα με τους ερευνητές η ρουτίνη παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ακολουθούμενη από

τις ουσίες κατεχίνη, λουτεολίνη, υδροξυτυροσόλη, διοσμετίνη καφεϊκό οξύ, βερμπασκοζίτης, ελευρωπαΐνη, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, βανιλικό οξύ, 7-γλυκοζίτης της διοσμετίνης, 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, τυροσόλη και βανιλίνη.

Στην παρούσα διατριβή, στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008, οι κύριες φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν καθώς και το εύρος των συγκεντρώσεών τους ήταν οι εξής: ελευρωπαΐνη (0,31 - 4,76 mg/g v.φ.ι.), 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (0,19 - 1,82 mg/g v.φ.ι.), και η ρουτίνη (0,14 - 1,41 mg/g v.φ.ι.). Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 οι κύριες φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν: ελευρωπαΐνη (0,59 - 9,39 mg/g v.φ.ι.), ρουτίνη (0,11 - 1,55 mg/g v.φ.ι.), 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (0,30 - 1,41 mg/g v.φ.ι.) και 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης (0,12 - 1,10 mg/g v.φ.ι.). Στα φύλλα Σεπτεμβρίου - Δεκεμβρίου 2009 οι φαινολικές ουσίες που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν: ελευρωπαΐνη (1,23 - 20,31 mg/g v.φ.ι. και 0,25 - 8,91 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα), 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (0,95 - 2,01 mg/g v.φ.ι. και 1,16 - 2,03 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα), 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (0,66 - 1,39 mg/g v.φ.ι. και 0,87 - 1,60 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα) και ρουτίνη (0,54 - 1,32 mg/g v.φ.ι. και 0,40 - 1,10 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα). Στους πράσινους καρπούς και των δύο ετών (2008 και 2009) οι φαινολικές ουσίες που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν: ελευρωπαΐνη (0,87 - 5,68 mg/g v.φ.ι. και 0,39 - 12,23 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα), βερμπασκοζίτης (0,19 - 3,90 mg/g v.φ.ι. και 0,56 - 3,18 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα) και ρουτίνη (0,35 - 1,51 mg/g v.φ.ι. και 0,14 - 0,74 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα). Οι ίδιες κύριες φαινολικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν στους πράσινους καρπούς, ταυτοποιήθηκαν και στους μαύρους καρπούς και των δύο ετών. Στους μαύρους καρπούς και των δύο ετών (2008 και 2009) η ελευρωπαΐνη κυμάνθηκε μεταξύ 4,53 - 9,22 mg/g v.φ.ι. και 1,41 - 11,15 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα, η ρουτίνη μεταξύ 0,11 - 0,98 mg/g v.φ.ι. και 0,14 - 0,91 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα και ο βερμπασκοζίτης μεταξύ 0,49 - 0,94 mg/g v.φ.ι. και 0,08 - 2,40 mg/g v.φ.ι. αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία η ουσία βερμπασκοζίτης βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στους πράσινους και μαύρους καρπούς και στα δύο έτη ενώ ήταν απύσα από το φαινολικό προφίλ των φύλλων σε όλες τις ποικιλίες και στα δύο έτη. Η ουσία 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φαινολικά προφίλ των φύλλων και των δύο ετών αλλά όχι στα φαινολικά προφίλ των πράσινων και μαύρων καρπών όλων των ποικιλιών και των δύο ετών. Επίσης το φαινολικό προφίλ όλων των ποικιλιών για κάθε έναν από τους προς μελέτη ιστούς και

για τα δύο έτη ήταν παραπλήσιο. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι **Boskou et al., (2006)**, καθώς και οι πέντε ποικιλίες («Τσακιστές» «Κονσερβολιά», «Καλαμών», «Κρήτης» «Θρούμπα Κρήτης») που μελέτησαν παρουσίασαν παραπλήσιο φαινολικό προφίλ στη σάρκα των καρπών. Επίσης, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, βρήκαν ότι η κύρια διαφοροποίηση του φαινολικού προφίλ των φύλλων σε σχέση με αυτό των καρπών συνίσταται στην ύπαρξη της ουσίας βερμπασκοζίτης ως μιας από τις κύριες φαινολικές ουσίες των καρπών και στην ταυτόχρονη απουσία της από το φαινολικό προφίλ των φύλλων. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν ~~και~~ οι **Ryan et al., (2002 & 2003)** και η Γιαννακοπούλου, (2010). Αντίθετα, οι **Silva et al., (2006)**, ταυτοποίησαν την ουσία βερμπασκοζίτης και στο φαινολικό προφίλ των φύλλων.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών ανάλογα την ποικιλία σε όλους τους ιστούς. Επίσης, η συγκέντρωση της ουσίας βερμπασκοζίτης τόσο στους πράσινους [0,19 - 3,90 mg/g v.φ.ι. (2008) και 0,56 - 3,18 mg/g v.φ.ι. (2009)] όσο και στου μαύρους καρπούς [0,49 - 0,94 mg/g v.φ.ι. (2008) και 0,08 - 2,40 mg/g v.φ.ι. (2009)] ήταν χαμηλότερη από αυτήν της ουσίας ελευρωπαΐνης στους πράσινους [0,87 - 5,68 mg/g v.φ.ι. (2008) και 0,39 - 12,23 mg/g v.φ.ι. (2009)] και μαύρους καρπούς [4,53 - 9,22 mg/g v.φ.ι. (2008) και 1,41 - 11,15 mg/g v.φ.ι. (2009)]. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι **Romani et al., (1999)**, οι οποίοι μελετώντας τα φαινολικά συστατικά των καρπών πέντε Ιταλικών ποικιλιών ελιάς, βρήκαν μεγάλες διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών ανάλογα την ποικιλία. Από τις ουσίες που ταυτοποίησαν αυτές που παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η ελευρωπαΐνη (0,035-2,4 mg/g F.W.), ο βερμπασκοζίτης (0,16-3,20 mg/g F.W.), η ρουτίνη (0,11-0,27 mg/g F.W.) και η υδροξυτυροσόλη (0,56-4,13 mg/g F.W.). Επιπλέον, βρήκαν τον 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, τον 7-O-γλυκοζίτη της απιγενίνης και τον 3-γλυκοζίτη της κυανιδίνης. Πάνω στο ίδιο θέμα, οι **Vinha et al., (2002)**, μελετώντας καρπούς των ποικιλιών Cobrancosa, Madural και Verdeal συλλογής Νοεμβρίου, επίσης παρατήρησαν μεγάλες διακυμάνσεις σε ότι αφορά την ποσότητα της κάθε φαινολικής ουσίας μεταξύ των τριών ποικιλιών. Αναφορικά με τις σημαντικότερες φαινολικές ουσίες που ανιχνεύτηκαν στους συγκεκριμένους καρπούς, τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι ήταν κατά σειρά η ελευρωπαΐνη (2,57 – 36,83 mg/g D.W.), η υδροξυτυροσόλη (0,55-44,68 mg/g D.W.), η ρουτίνη (0,15-0,95 mg/g D.W.) και ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (0,036-0,84 mg/g D.W.). Από τις υπόλοιπες ουσίες

που ανιχνεύτηκαν σε μικρότερες ποσότητες, ο βερμπασκοζίτης ήταν παρών μόνο στις δύο εκ των τριών ποικιλιών. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ως προς τις κυριότερες φαινολικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν και διαφοροποιούνται μόνο ως προς την συγκέντρωση της ουσίας υδροξυτυροσόλης, η συγκέντρωση της οποίας στην παρούσα διατριβή κυμάνθηκε σε χαμηλότερα από την βιβλιογραφία επίπεδα (0,12 – 0,83 mg/g v.φ.ι.).

Στην παρούσα μελέτη, το φαινολικό προφίλ τόσο των νέων και των παλαιών φύλλων όσο και αυτό των πράσινων και μαύρων καρπών ήταν παραπλήσιο και για τα δύο έτη. Επίσης στο φαινολικό προφίλ των φύλλων ανεξαρτήτου εποχής και έτους ταυτοποιήθηκαν περισσότερες φαινολικές ουσίες σε σύγκριση με το φαινολικό προφίλ των πράσινων και μαύρων καρπών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι **Ryan et al., (2002)** οι οποίοι μελέτησαν το φαινολικό προφίλ τεσσάρων ποικιλιών σε νέα και παλαιά φύλλα καθώς επίσης και στη σάρκα του καρπού. Η έρευνά τους έδειξε ότι το φαινολικό προφίλ των διαφορετικών ιστών ήταν παραπλήσιο. Ταυτόχρονα, η ηλικία των φύλλων δεν επηρέασε το φαινολικό προφίλ. Η ίδια ερευνητική ομάδα (**Ryan et al., 2003**) και πάνω στο ίδιο θέμα, μελέτησε το φαινολικό προφίλ σε καρπούς, νέα και παλαιά φύλλα της ποικιλίας Hardy Mammoth, κατά την διάρκεια 2 συνεχόμενων ετών. Στα νέα και στα παλαιά φύλλα βρήκαν περισσότερες φαινολικές ουσίες (10 από τις συνολικά 12 που ταυτοποιήθηκαν) από ότι στον καρπό (7 από τις 12). Οι **Esti et al., (1998)** μελέτησαν το φαινολικό προφίλ των καρπών οκτώ Ιταλικών ποικιλιών για 2 συνεχόμενα έτη. Το φαινολικό προφίλ των καρπών για τα δύο έτη ήταν παραπλήσιο.

Στην παρούσα διατριβή, η ποσότητα της σημαντικότερης φαινολικής ουσίας ελευρωπαΐνης, στους ιστούς και τις χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις, τόσο μεταξύ των διαφορετικών ιστών όσο και μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών στους ίδιους ιστούς. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της ελευρωπαΐνης κατά την διάρκεια ωρίμανσης των φύλλων Σεπτεμβρίου - Δεκεμβρίου του 2009, ενώ δεν παρατηρήθηκε μείωσή της κατά την διάρκεια ωρίμανσης των καρπών και για τα δύο έτη. Επίσης η ουσία υδροξυτυροσόλη εμφάνισε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές της ελευρωπαΐνης. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 η ελευρωπαΐνη κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0,31-4,76 mg/g v.φ.ι., στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 μεταξύ των τιμών 0,59-9,39 mg/g v.φ.ι., στα φύλλα Σεπτεμβρίου 2009 μεταξύ των τιμών 1,23-20,31 mg/g v.φ.ι., στα φύλλα Δεκεμβρίου 2009 μεταξύ των τιμών 0,25 – 8,91 mg/g v.φ.ι., στους πράσινους καρπούς του 2008 μεταξύ των

τιμών 0,87 – 5,68 mg/g ν.φ.ι., στους πράσινους καρπούς του 2009 μεταξύ των τιμών 0,39 – 12,23 mg/g ν.φ.ι., στους μαύρους καρπούς του 2008 μεταξύ των τιμών 2,71 – 9,22 mg/g ν.φ.ι. και στους μαύρους καρπούς του 2009 μεταξύ των τιμών 1,41 και 11,15 mg/g ν.φ.ι.. Οι **Bouaziz et al., (2010)** μελετώντας την ποιοτική και ποσοτική μεταβολή των φαινολικών ενώσεων σε καρπούς ποικιλιών προέλευσης Τυνησίας αναφέρουν ότι η ποσότητα της ελευρωπαΐνης διέφερε ανάλογα με την ποικιλία. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι **Ryan et al., 2002** οι οποίοι αναφέρουν ότι βρήκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των ποικιλιών που μελετήθηκαν σε ότι αφορά τις συγκεντρώσεις των διαφόρων φαινολικών ουσιών, π.χ. η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης για την ποικιλία «Roupruda» ήταν σχεδόν δεκαπλάσια (4365 mg/kg D.W.) από τη συγκέντρωσή της στην ποικιλία «Galega» (479 mg/kg D.W.). Οι **Amiot et al., (1986 & 1989)**, **Ryan et al., (1999)** και **Soler-Rivas et al., (2000)** αναφέρουν μείωσης της συγκέντρωσης της ελευρωπαΐνης κατά την διάρκεια ωρίμανσης των καρπών και ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της υδροξυτυροσόλης.

ΙΙΙ.26. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών διέφερε τόσο μεταξύ των ποικιλιών όσο και μεταξύ των ιστών ανά ποικιλία.

Οι διαφορετικές ποικιλίες παρουσίασαν διαφορετική συγκέντρωση συνολικών φαινολικών. Και για τις δύο χρονιές, 2008 - 2009, οι περισσότερες ποικιλίες παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών στα νέα φύλλα από ότι στους πράσινους και μαύρους καρπούς. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 10,1 - 20,6 mg GAE/g v.φ.ι. ενώ στους πράσινους και μαύρους καρπούς του ίδιου έτους κυμάνθηκε μεταξύ 5,9 - 19,8 mg GAE/g v.φ.ι. και 5,4 - 9,9 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών κυμάνθηκε μεταξύ 12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι. ενώ στους πράσινους και μαύρους καρπούς κυμάνθηκε μεταξύ 4,1 - 13,9 mg GAE/g v.φ.ι. και 5,6 - 10,1 mg GAE/g v.φ.ι. αντίστοιχα.

Τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών (12,5 - 18,7 mg GAE/g v.φ.ι.) από τα φύλλα Σεπτεμβρίου (10,6 και 15,3 mg GAE/g v.φ.ι.) – Δεκεμβρίου (10,3 και 17,0 mg GAE/g v.φ.ι.) του ίδιου έτους. Συγκρίνοντας τις δύο χρονιές, 2008 – 2009, για τις περισσότερες ποικιλίες, τα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών από τα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 ενώ οι πράσινοι καρποί, για τις περισσότερες ποικιλίες, παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών το 2008 από ότι το 2009.

Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Το φαινολικό προφίλ ήταν παρόμοιο μεταξύ των ποικιλιών διέφερε όμως ως προς τις συγκεντρώσεις της κάθε φαινολικής ουσίας.

Ως προς το φαινολικό προφίλ, οι κυριότερες φαινολικές ουσίες στα φύλλα ήταν η ελευρωπαΐνη, η ρουτίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο 4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και ο 7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης, ενώ στους πράσινους και στους μαύρους καρπούς η ελευρωπαΐνη, η ρουτίνη, ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης και ο βερμπασκοζίτης. Η ποσότητα της ελευρωπαΐνης, παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις,

τόσο μεταξύ των διαφορετικών ιστών όσο και μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών στους ίδιους ιστούς. Παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της ελευρωπαΐνης κατά την διάρκεια ωρίμανσης των φύλλων στο διάστημα Σεπτεμβρίου (1,23-20,31 mg/g v.φ.ι.) – Δεκεμβρίου (0,25 – 8,91 mg/g v.φ.ι.) του 2009, ενώ δεν παρατηρήθηκε μείωσή της κατά την διάρκεια ωρίμανσης των καρπών και για τα δύο έτη. Το 2009 η συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης ήταν αυξημένη σε φύλλα και καρπούς σε σύγκριση με το 2008. Στα νέα φύλλα Απριλίου του 2008 η ελευρωπαΐνη κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0,31-4,76 mg/g F.W., στα νέα φύλλα Απριλίου του 2009 μεταξύ των τιμών 0,59-9,39 mg/g F.W., στους πράσινους καρπούς του 2008 μεταξύ των τιμών 0,87 – 5,68 mg/g F.W., στους πράσινους καρπούς του 2009 μεταξύ των τιμών 0,39 – 12,23 mg/g F.W., στους μαύρους καρπούς του 2008 μεταξύ των τιμών 2,71 – 9,22 mg/g F.W. και στους μαύρους καρπούς του 2009 μεταξύ των τιμών 1,41 και 11,15 mg/g F.W.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Πηκτή Αγαρόζης 2% & 2,5% w/v

Σε κωνική φιάλη που περιείχε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X προστέθηκαν 2 και 2,5g αγαρόζης, αντίστοιχα. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων όπου το περιεχόμενό της, ενώ βράζει, ανακινείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Μετά τη διάλυση, το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει μέχρι να γίνει ανεκτό στο ανθρώπινο χέρι και στη συνέχεια τοποθετήθηκε με προσοχή στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου επίσης τοποθετήθηκε και το ειδικό κτενάκι για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.

Διάλυμα Καυστικού Νατρίου (NaOH) 4M

Για τη δημιουργία διαλύματος NaOH 4M τελικού όγκου 100mL, 16g στερεού NaOH ζυγίστηκαν σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο προστέθηκε μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού ώστε να διαλυθεί η στερεά ουσία. Ακολούθως, το περιεχόμενο του ποτηριού μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100mL με τη βοήθεια χωνιού διήθησης. Το ποτήρι ξεπλύθηκε (δυο φορές) με απεσταγμένο νερό, που επίσης μεταφέρθηκε στη φιάλη, η οποία ακολούθως γεμίστηκε προσεκτικά μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό, πωματίστηκε και ανακινήθηκε για να διαλυθεί πλήρως η ουσία και να προκύψει ομοιογενές διάλυμα.

Διάλυμα Υδροχλωρικού οξέος (HCl) 1M

Για τη δημιουργία διαλύματος HCl 1M τελικού όγκου 100mL, 10mL πυκνού διαλύματος HCl 10M μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια σιφωνίου σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Στη συνέχεια, η φιάλη γεμίστηκε προσεκτικά μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό, πωματίστηκε και ανακινήθηκε για να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.

Διάλυμα Tris-HCl 1M (pH 7.5)

Για τη δημιουργία διαλύματος Tris-HCl 1M τελικού όγκου 100mL, 12,11g TRIS METHYLAMINE ή TRIS BASE διαλύθηκαν σε περίπου 80mL απεσταγμένου νερού. Κατόπιν προστέθηκαν περίπου 4mL πυκνό διάλυμα HCl (10M). Το διάλυμα

αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα και κατόπιν με τη βοήθεια pHμέτρου το pH ρυθμίστηκε στο 7,5 ($\pm 0,1-0,2$) με τη χρήση είτε πυκνού HCl είτε του λιγότερο πυκνού διαλύματος HCl 1M. Ακολούθως το διάλυμα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι του ζητούμενου τελικού όγκου των 100mL.

Διάλυμα αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) 0.5 M (pH 8)

Για τη δημιουργία διαλύματος EDTA 0,5 M τελικού όγκου 100mL, 18,61g EDTA προστέθηκαν σε περίπου 75mL απεσταγμένο νερό ακολουθούμενα από περίπου 1,7 – 2g NaOH. Υπό συνεχή ανάδευση, το pH ρυθμίστηκε στο 8 χρησιμοποιώντας στερεό NaOH. Ακολούθησε προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι του τελικού επιθυμητού όγκου των 100mL.

Διάλυμα TAE 50X (Trizma Base)

Για τη δημιουργία διαλύματος TAE 50X τελικού όγκου 500mL προστέθηκαν 121g TAE (Trizma base) σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε περίπου 200mL απεσταγμένο νερό. Το περιεχόμενο αναδεύτηκε μέχρι πλήρους διάλυσης με μαγνητικό αναδευτήρα και ακολούθως προστέθηκαν 50mL EDTA 0,5 M και 28,55mL παγόμορφο οξικό οξύ (Glacial Acetic Acid). Μετά από ανάδευση, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 500mL στην οποία προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι χαραγής και το διάλυμα αναδεύτηκε ξανά.

Διάλυμα TAE 1X

Τόσο για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης όσο και για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση απαιτείται διάλυμα TAE 1X. Για την παρασκευή 1L διαλύματος TAE 1X, 20mL διαλύματος TAE 50X μεταφέρθηκαν με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη του 1L, η οποία συμπληρώθηκε μέχρι χαραγής με απεσταγμένο νερό, πωματίστηκε και αναδεύτηκε για πλήρη ομογενοποίηση.

Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa) 0,5 M

Για τη δημιουργία διαλύματος οξικού νατρίου τελικού όγκου 100mL, 40,8g οξικού νατρίου ζυγίστηκαν σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο προστέθηκε μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού ώστε να διαλυθεί η στερεά ουσία. Ακολούθως, το περιεχόμενο του ποτηριού μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100mL με τη βοήθεια χωνιού

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

διήθησης. Το ποτήρι ξεπλύθηκε (δυο φορές) με απεσταγμένο νερό, που επίσης μεταφέρθηκε στη φιάλη, η οποία ακολούθως γεμίστηκε προσεκτικά μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό, πωματίστηκε και ανακινήθηκε για να διαλυθεί πλήρως η ουσία και να προκύψει ομοιογενές διάλυμα.

Διαλύματα CTAB 2% & 5% w/v

Για τη δημιουργία των διαλυμάτων CTAB πρέπει όλα τα αντιδραστήρια και σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν να είναι αποστειρωμένα. Ο χρόνος αποστείρωσης είναι περίπου 45 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα αποστειρώνονται τα παρακάτω:

- Διαλύματα EDTA 0,5 M, Tris-HCl 1 M, NaOH 4 M, HCl 1 M και TAE 50X
- Περίπου 700 mL απεσταγμένο νερό
- Όλα τα μπουκαλάκια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή και αποθήκευση του κάθε διαλύματος CTAB

Το CTAB προκειμένου να διαλυθεί πρέπει να θερμανθεί στους 65⁰C (±1) και να είναι υπό ανάδευση. Οι Πίνακες που ακολουθούν περιγράφουν ποια συστατικά και σε ποια ποσότητα πρέπει να αναμιχθούν ώστε να παρασκευαστούν διάφοροι τελικοί όγκοι για κάθε μία από τις 2 συγκεντρώσεις διαλύματος CTAB. Τα διαλύματα δημιουργούν αφρό. Κατά την μεταφορά των διαλυμάτων πρέπει να μεταφέρεται όλος ο αφρός.

CTAB 2% (w/v)		
Για τελικό όγκο 100 mL	Για τελικό όγκο 350 mL	Για τελικό όγκο 700 mL
2 g CTAB	7 g CTAB	14 g CTAB
10 mL Tris-HCl 1M	35 mL Tris-HCl 1M	70 mL Tris-HCl 1M
4 mL EDTA 0,5 M	14 mL EDTA 0,5 M	28 mL EDTA 0,5 M
28 mL NaCl 5M	98 mL NaCl 5M	196 mL NaCl 5 M
1 g PVP	3,5 g PVP	7 g PVP

CTAB 5% (w/v)	
Για τελικό όγκο 100 mL	Για τελικό όγκο 200 mL
5 g CTAB	10 g CTAB
7 mL NaCl 5M	14 mL NaCl 5M

Διάλυμα TE

Για τη δημιουργία διαλύματος TE τελικού όγκου 100mL προστέθηκαν 0,2mL EDTA 0,5 M και 0,5mL διαλύματος Tris HCL 1 M σε ποτήρι ζέσεως με λίγο απεσταγμένο νερό. Το περιεχόμενο αναδεύτηκε και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Ακολούθως, προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 100mL.

Διάλυμα Χλωροφορμίου - Ισοαμλικής αλκοόλης (Chloroform - Iso Amyl Alcohol) 24:1

Για τη δημιουργία του συγκεκριμένου διαλύματος σε τελικό όγκο 250mL αναμιγνύονται 240mL χλωροφόρμιου με 10mL ισοαμλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

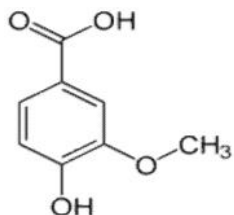
a/a	Πρότυπες Ουσίες	Χρόνος Εμφάνισης	Μήκος Κύματος	Εξίσωση	r ²	Προμηθευτής - Καθαρότητα
1	Γαλλικό οξύ	7,55 min	290 nm	y=12161x-7,7277	0,9877	SIGMA, 100%
2	Υδροξυτυροσόλη	14,03 min	290 nm	y=15621x-31,435	0,9982	EXTRASYNTHESE, 100%
3	Γεντισικό οξύ	19,99 min	330 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		SIGMA, 100%
4	Τυροσόλη	22,05 min	286 nm	y=14683x-28,439	0,9934	SIGMA, 100%
5	2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ	25,81 min	258 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		ALFA AESAR, 97%
6	Κατεχίνη	29,00 min	282 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		SIGMA, 98%
7	Βανιλικό οξύ	32,26 min	258 nm	y=3551,2x-7,1587	0,9895	SIGMA, 100%
8	Καφεϊκό οξύ	34,28 min	334 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		SIGMA, 100%
9	Χλωρογενικό οξύ	34,49 min	334 nm	y=4081,9x-2,118	0,9856	SIGMA, 95%
10	Συριγικό οξύ	36,73 min	290 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		SIGMA, 100%
11	Επικατεχίνη	37,89 min	286 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		SIGMA, 100%
12	π-κουμαρικό οξύ	42,53 min	326 nm	y=1413,5x-6,7964	0,9968	SIGMA, 100%
13	μ-κουμαρικό οξύ	45,90 min	290 nm	y=2496,1x-13,139	0,9842	FLUKA, 98%
14	Φερουλικό οξύ	46,53 min	334 nm	y=1280,4x-3,9726	0,9982	SIGMA, 100%
15	ο-κουμαρικό οξύ	50,08 min	330 nm	y=3110,8x-1,6069	0,9998	SIGMA, 100%
16	Βερμπασκοζίτης	51,30 min	334-338 nm	y=2557,1x-12,589	0,9975	EXTRASYNTHESE, 100%
17	Ελευρωπαΐνη	58,69 min	254-258 nm	y=48117x-106,97	0,9864	EXTRASYNTHESE, 100%
18	7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	59,53 min	358-378nm	y=3358,8x-121,8	0,9908	EXTRASYNTHESE, 100%
19	Ρουτίνη	60,69 min	366-374 nm	y=4160,9x-67,164	0,9849	SIGMA, 95%
20	7-O-γλυκοζίτης της απιγενίνης	62,88 min	360 nm	Y=2142,1x-5,679	0,9814	SIGMA, 98%
21	Ναριγκενίνη	65,16 min	294 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		ALFA AESAR, 97%
22	4-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης	66,39 min	346-350 nm	y=2604,8x-2,2094	0,9999	EXTRASYNTHESE, 100%
23	Κερκετίνη	71,64 min	378 nm	Δεν ανιχνεύτηκε		SIGMA-ALDRICH, 100%
24	Λουτεολίνη	76,27 min	370 nm	Y=1220,2x-3,248	0,9855	EXTRASYNTHESE, 100%

ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ: ΦΑΣΜΑΤΑ – ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ

ΒΑΝΙΛΛΙΚΟ ΟΞΥ

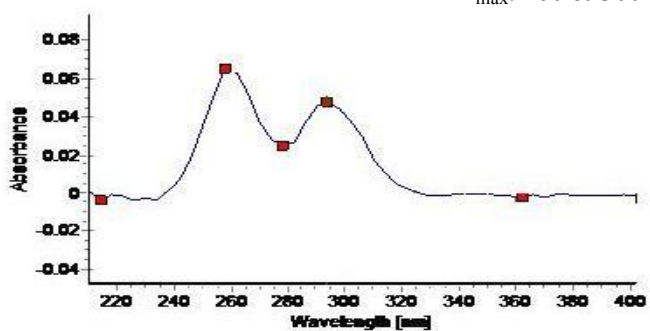
Μοριακός Τύπος : C₈H₇O₄

Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

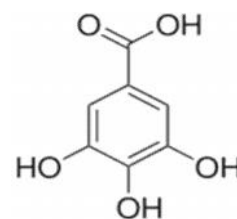
t_R: 32.26 min
λ_{max}: 260 & 300 nm



ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ

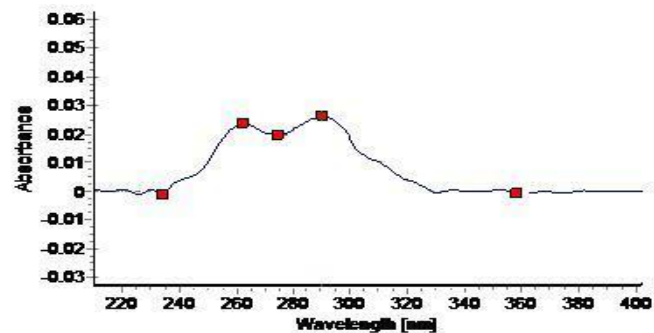
Μοριακός Τύπος : C₇H₆O₅

Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

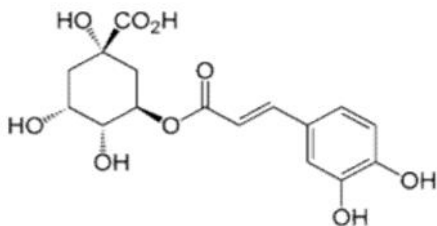
t_R: 7.55 min
λ_{max}: 260 & 300 nm



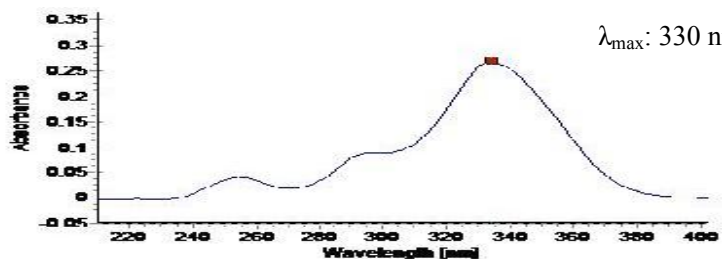
ΧΛΩΡΟΓΕΝΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₁₆H₁₈O₉

Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ



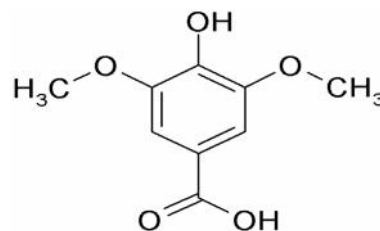
t_R: 34.49min

λ_{max}: 330 nm

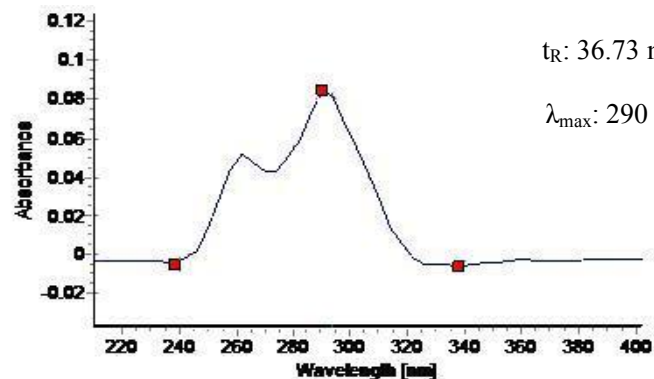
ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₉H₁₀O₅

Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ



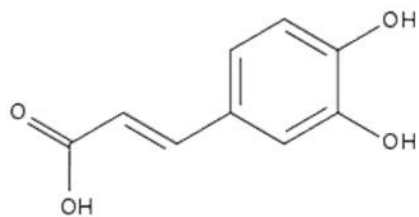
t_R: 36.73 min

λ_{max}: 290 nm

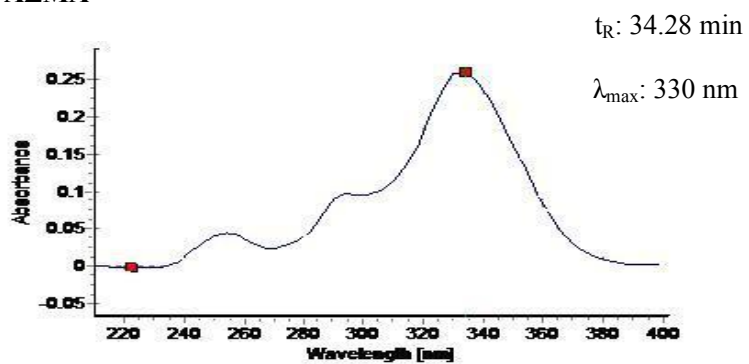
ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₉H₇O₄

Χημική δομή:



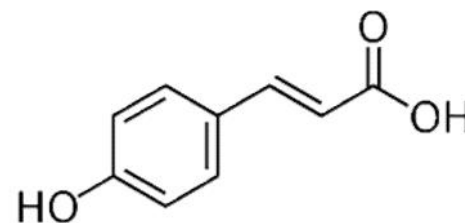
ΦΑΣΜΑ



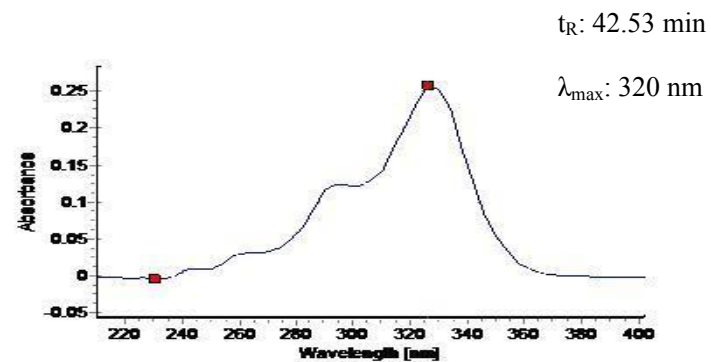
π-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₉H₇O₃

Χημική δομή:



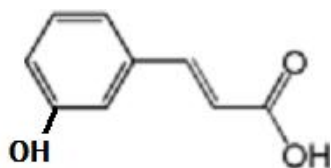
ΦΑΣΜΑ



μ-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₉H₇O₃

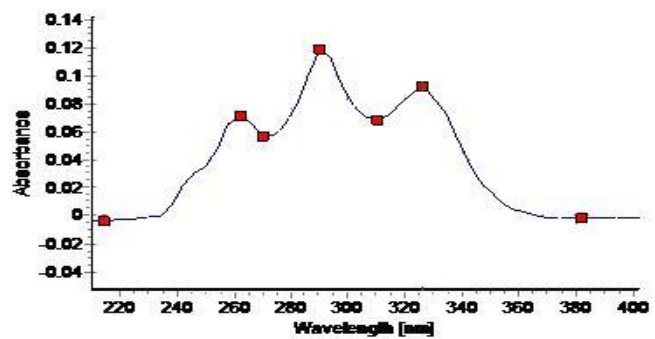
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 45.90 min

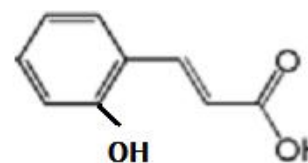
λ_{max}: 260, 290 & 320 nm



ο-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₉H₇O₃

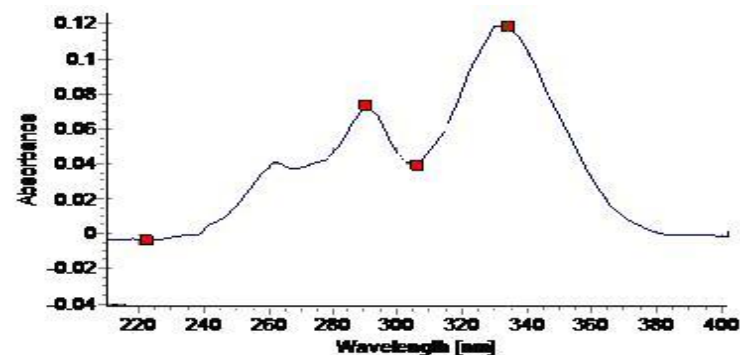
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 50.08 min

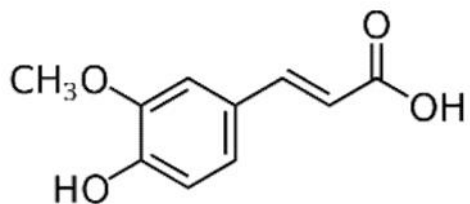
λ_{max}: 290 & 340 nm



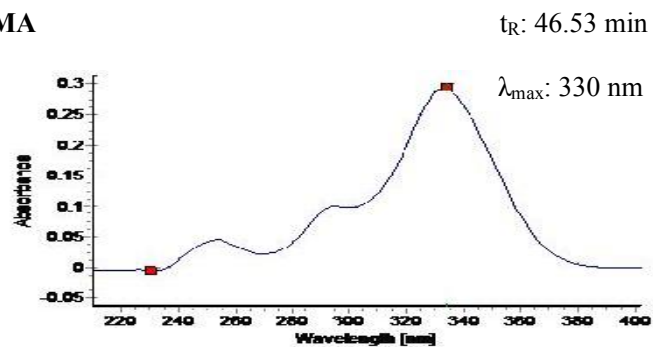
ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₁₀H₁₀O₄

Χημική δομή:



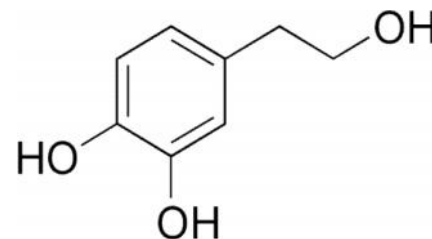
ΦΑΣΜΑ



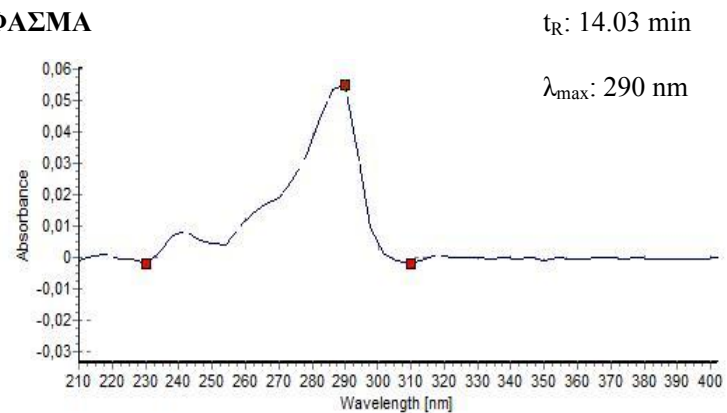
ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ

Μοριακός Τύπος : C₈H₈O₃

Χημική δομή:



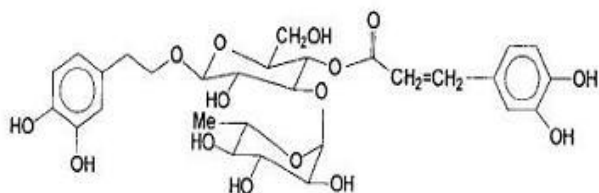
ΦΑΣΜΑ



ΒΕΡΜΠΑΣΚΟΖΙΤΗΣ

Μοριακός Τύπος : C₂₉H₃₆O₁₅

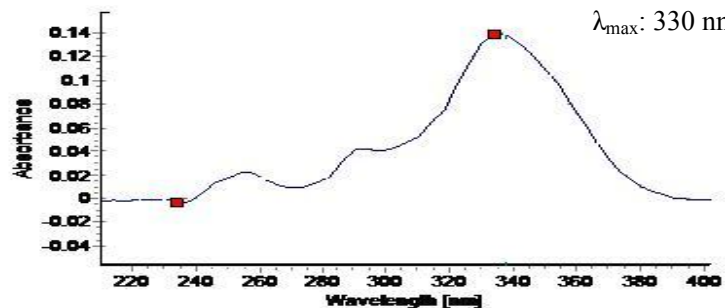
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 51.30 min

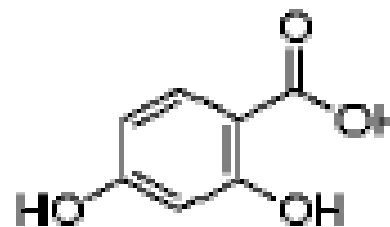
λ_{max}: 330 nm



2,4-ΔΙΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος : C₇H₆O₄

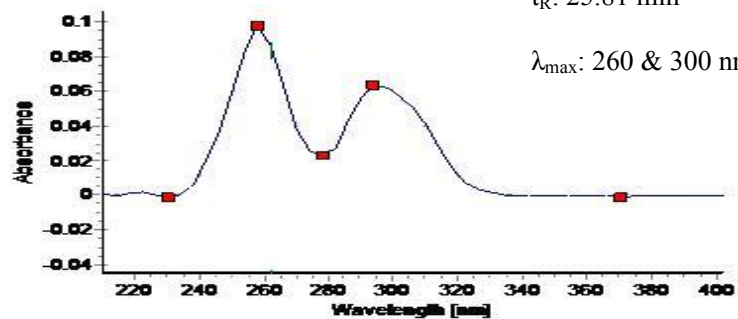
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 25.81 min

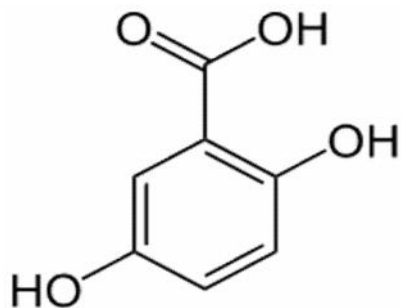
λ_{max}: 260 & 300 nm



ΓΕΝΤΙΣΙΚΟ ΟΞΥ

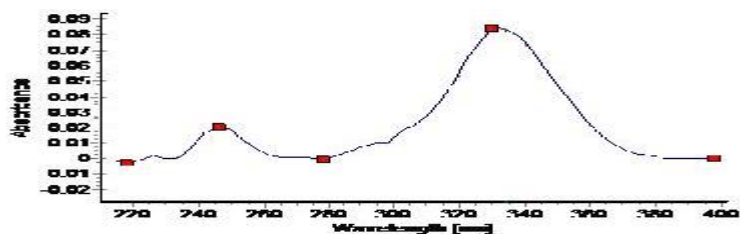
Μοριακός Τύπος : C₄H₆O₄

Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

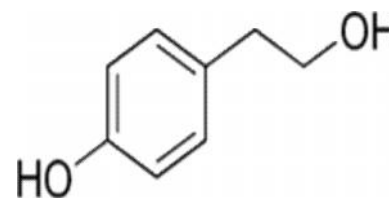
t_R: 19.99 min
λ_{max}: 240 & 330 nm



ΤΥΡΟΣΟΛΗ

Μοριακός Τύπος : C₈H₁₀O₂

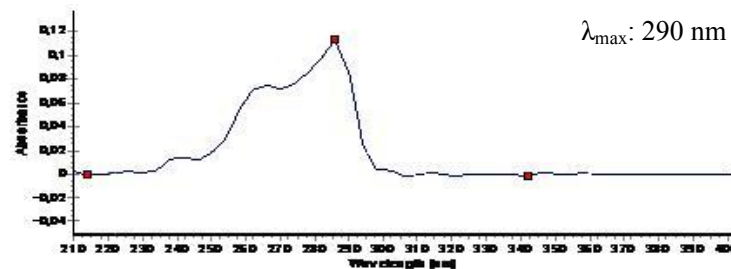
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 22.05 min

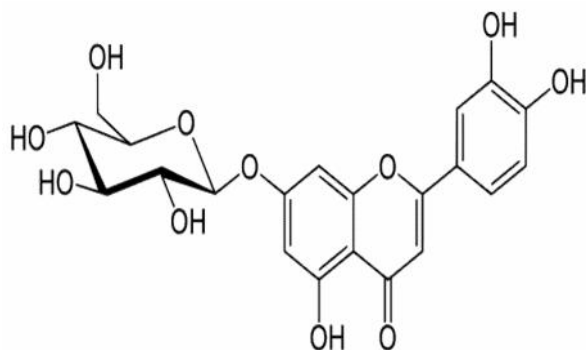
λ_{max}: 290 nm



7-Ο-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ της ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗΣ

Μοριακός Τύπος : C₂₁H₂₀O₁₁

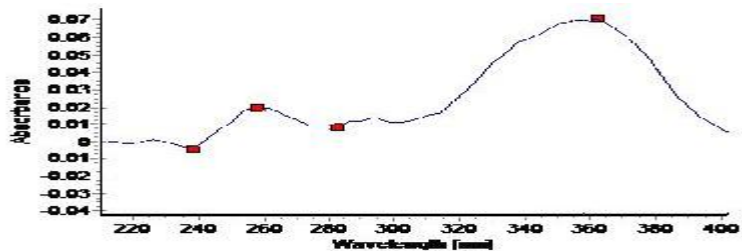
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 59.53 min

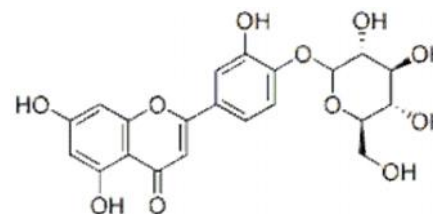
λ_{max}: 360 nm



4-Ο-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ της ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗΣ

Μοριακός Τύπος : C₂₁H₂₀O₁₁

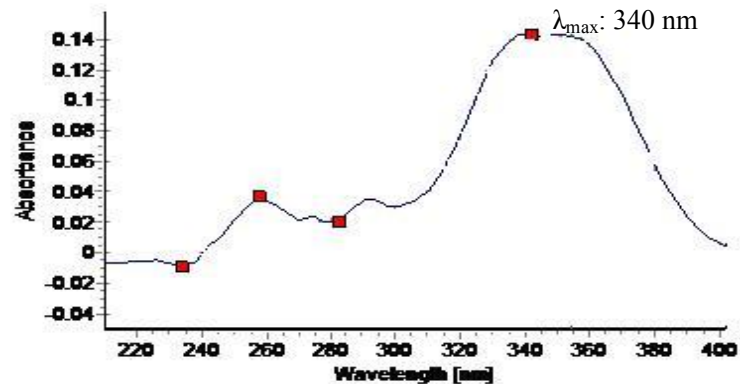
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 66.39 min

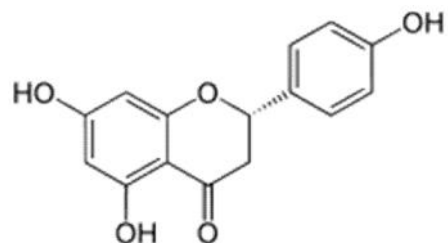
λ_{max}: 340 nm



ΝΑΡΙΓΚΕΝΙΝΗ

Μοριακός Τύπος : C₁₅H₁₂O₅

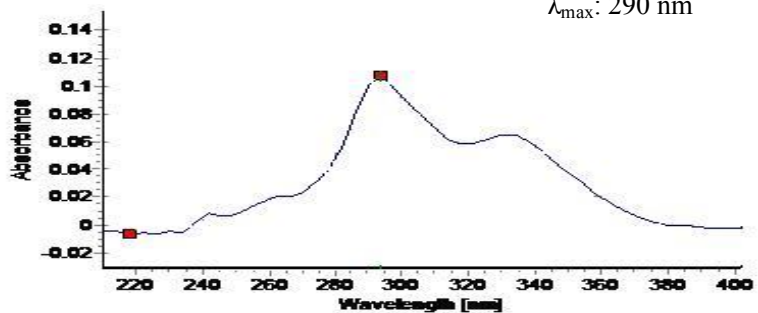
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 65.16 min

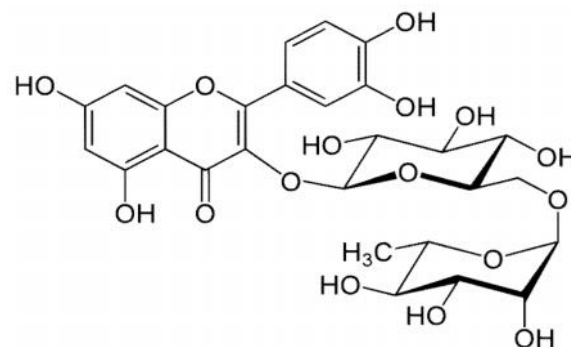
λ_{max}: 290 nm



ΡΟΥΤΙΝΗ

Μοριακός Τύπος : C₂₇H₃₀O₁₆

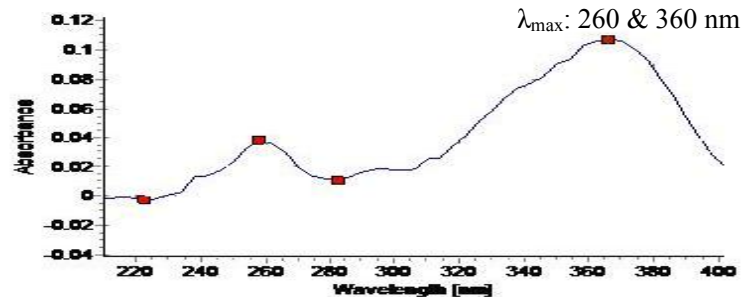
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 60.69 min

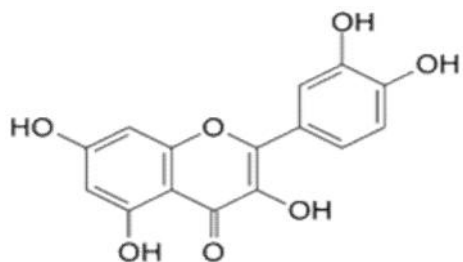
λ_{max}: 260 & 360 nm



ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ

Μοριακός Τύπος : C₁₅H₁₀O₇

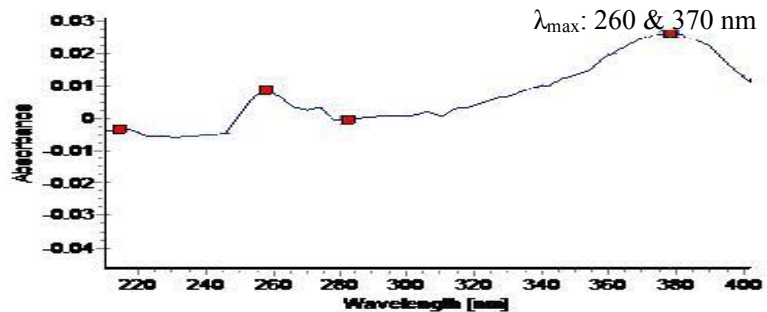
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 71.64 min

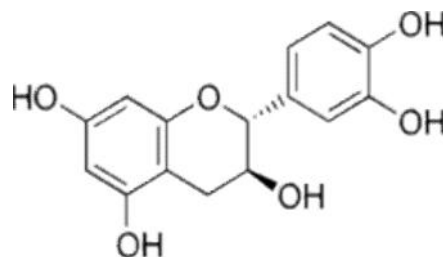
λ_{max}: 260 & 370 nm



ΚΑΤΕΧΙΝΗ

Μοριακός Τύπος : C₁₅H₁₄O₆

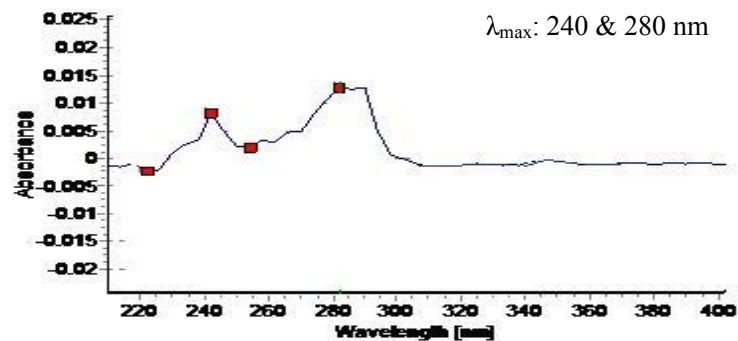
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 29.00 min

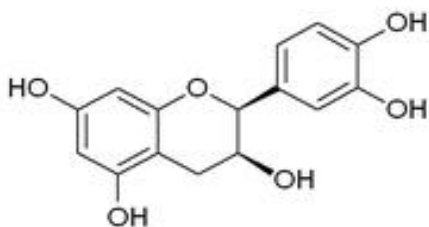
λ_{max}: 240 & 280 nm



ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ

Μοριακός Τύπος : C₁₅H₁₄O₆

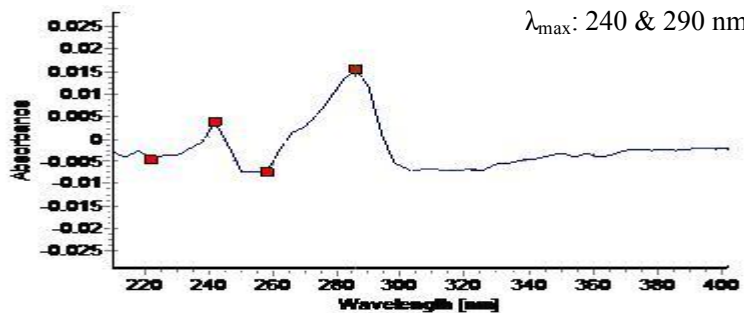
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 37.89 min

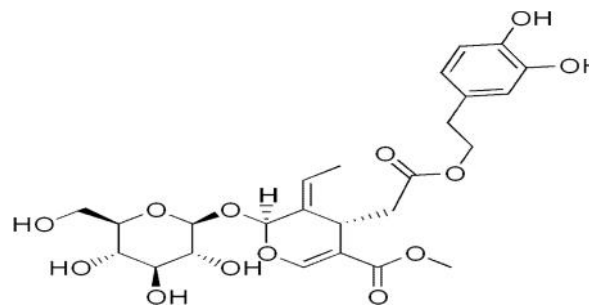
λ_{max}: 240 & 290 nm



ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ

Μοριακός Τύπος : C₂₅H₃₂O₁₃

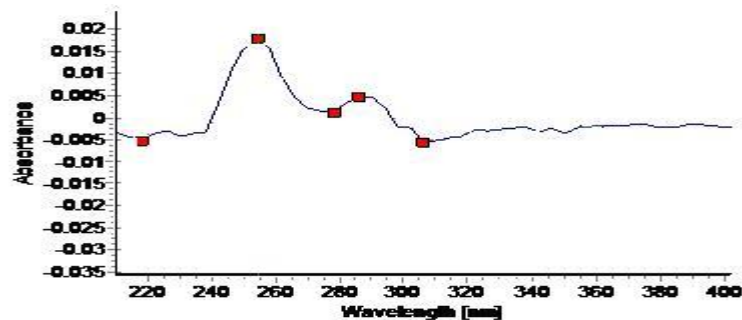
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 58.69 min

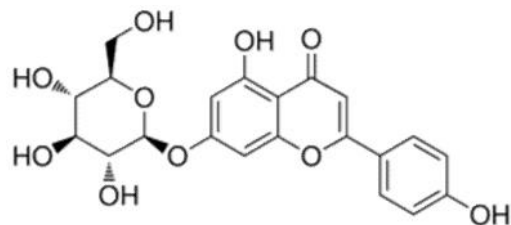
λ_{max}: 260 nm



7-Ο-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ της ΑΠΙΓΕΝΙΝΗΣ

Μοριακός Τύπος: C₂₁H₂₀O₁₀

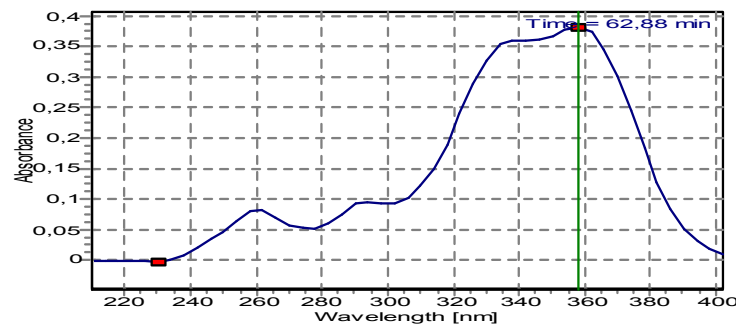
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 62,88

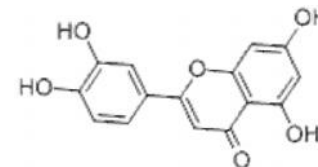
λ_{max}: 360 nm



ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: C₁₅H₁₀O₆

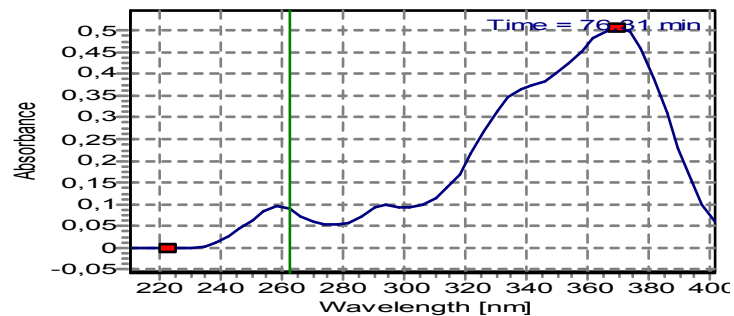
Χημική δομή:



ΦΑΣΜΑ

t_R: 76,27

λ_{max}: 360 nm



ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afanas, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., and Potapovitch, A.I. (1989).** Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38, 1763-1769.
- Amiot, M.J., Fleuriet, A., Macheix, J.J. (1989).** Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-70.
- Amiot, M.J., Fleuriet, A., Macheix, J.J. (1986).** Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 823-826.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L. (1999).** Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 411-421.
- Appel, H.M. (1993).** Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 1521-1551.
- Arnao, M.B. (2000).** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 419-421.
- Aruoma, I.O. (1998).** Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75: 199-212.
- Ayed, R.B., Grati-Kamoun, N., Moreau, F., Reba, A. (2009).** Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *European Food and Research Technology*, 229:757-762.
- Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A., Abo-Zaid, M.A. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93: 43-54.
- Backmann, K. (1994).** Molecular markers in plant ecology. *New Phytologist*, 126: 403-418.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C.M. (1997).** The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 693-704.
- Banilas, G., Minas, J., Gregoriou, C., Demoliou, C., Kourti, A. Hatzopoulos, P. (2003).** Genetic diversity among accessions of an ancient olive variety of Cyprus. *Genome*, 46: 370-376.
- Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, C., Menini, U.G. (1998):** Olive Germplasm. Cultivars and World-wide Collections - FAO, Rome.

- Bautista, R., Crespillo, R., Cánovas, F.M., Claros, M.G. (2002).** Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica*, 129: 33-41.
- Bautista, R., Canovas, F.M., Claros, M.G. (2003).** Genomic evidence for a repetitive nature of the RAPD polymorphisms in *Olea europaea* (olive-tree). *Euphytica*, 130: 185-190.
- Bebeli, P.J. & Kaltsikes P.J. (1993).** New developments in varietal identification. In: *Seed Science and Technology*, Ed.: A.J.G. van Gastel, M.A. Pagnotta and E. Porceddu. ICCARDA, pp: 161-172.
- Belaj, A., Caballero, J.M., Barranco, D., Rallo, L., Trujillo, I., (2003a).** Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers. *Euphytica*, 134: 261-268.
- Belaj, A., Satovic, Z., Ismaili, H., Panajoti, D., Rallo, L., Trujillo, I. (2003b).** RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. *Euphytica*, 130: 387–395.
- Belaj, A., Cipriani, G., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I. (2004a).** Characterization and identification of the main Spanish and Italian cultivars by simple sequence repeat markers. *HortScience*, 39, 1557–1561.
- Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., Baldoni, L., (2004b).** Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of «Arbequina» and Manzanilla de Sevilla olive. *HortScience*, 39: 1566–1570.
- Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L., Trujillo, I. (2002).** Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 638–644.
- Belaj, A., Trujillo, I., de la Rosa, R., Rallo, L. & Giménez, M.J. (2001).** Polymorphism and discriminating capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 64–71.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (2000).** Antioxidant activity of phenolic extracted from *Olea europae* L. leaves. *Food Chemistry*, 68: 457-462.
- Benter, T., Papadopoulos, S., Pape, M., Manns, M., Poliwoda H. (1995).** Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. *Anal. Biochem.*, 230(1): 92-100.
- Besnard, G., Bervillé, A. (2000).** Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 323: 173-181.
- Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., Bervillé, A. (2001a).** Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 126: 668–675.

- Besnard, G., Baradat, P., Berville, A. (2001b).** Genetic relationship in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 251–258.
- Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., Boskou, D.G. (2002).** Biophenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3688-3692.
- Blois, M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Bogani, P., Cavalieri, D., Petrucelli, R., Polsinelli, L., Roselli, G. (1994).** Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.*, 356: 98–101.
- Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., Andrikopoulos, N.K. (2006).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94: 558-564.
- Botia, J.M., Ortuño, A., Benavente-García, O., Baidez, A.G., Frias, J., Marcos, D., Del Río, J.A. (2001).** Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: Their influence on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 355–358.
- Botstein, D., White, K. L., Skolnick M., Davis, R. W. (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.
- Bouaziz, M., Jemai, H., Khabou, W., Sayadi, S. (2010).** Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1750-1758.
- Bourquelot, E., Vintilesco, J. (1938).** “Oleuropein”, a new glucoside from *Olea Europaea* L. *J. Pharm. Chem.*, 28: 303-314.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., Trujillo, I. (2009).** SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 122: 209-215.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie (Food Science and Technology)*, 28: 25-30.
- Branen, A. (1975).** Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, 52: 59-63.
- Bravo, L. (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317–33.

- Bray, T.M. (1999).** *Antioxidant and oxidative stress in health and disease: Introduction.* Proceedings of the Society for experimental biology and Medicine, 222(3):195.
- Brenes, M., Rejano, L., Garcia, P., Sanchez, H., Garrida, A. (1995).** Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2702–2706.
- Bretting, P.K. & Widrechner, M.P. (1995).** Genetic markers and plant genetic resource management. In: *Plant Breeding Reviews*, Ed: Jules Janink John Wiley & Sons. Inc, 13, pp: 11-86.
- Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F., Nucci, R. (2002).** Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, 162: 791–798.
- Bronzini de Caraffa, V., Giannettini, J., Gambotti, C., Maury, J. (2002).** Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica*, 123: 263–271.
- Bruford, M.W. & Wayne, R.K. (1993).** Microsatellites and their applications to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 939-943.
- Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorno, C., Cattapan, F., Fogher, C. (2003).** DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chemistry*, 83:127–134.
- Busconi, M., Sebastiani, L., Fogher, C. (2006).** Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europaea* L). *Molecular Breeding*, 17: 59–68.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74: 2157-2184.
- Cantini, C., Cimato A., Sani, G. (1999).** Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*, 109: 173–181.
- Caponio, F., Gomes, T., Pasqualone, A. (2001).** Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *European Food Research and Technology*, 212: 329–333.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. (2002).** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104: 301–307.
- Chen, J., Geissler, C., Parpia, B., Li J., Campbell, T.C. (1992).** Antioxidant Status and Cancer Mortality in China. *International Journal of Epidemiology*, 21(4): 625-635.

- Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A., Testolin, R. (2002).** Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea L.*). *Theor Appl Genet.*, 104: 223–228.
- Cirico, T.L. & Omaye, S.T. (2006).** Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food and Chemistry Toxicology*, 44: 510-516.
- Cook, N.C. & Samman, S. (1996).** Flavonoids: Chemistry, metabolism cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.
- Cresti, M., Linskens, H.F., Mulcahy, D.L., Bush, S., Distillio, V., Xu, M.Y., Vignani, R., Cimato, A. (1996).** Preliminary communication about the identification of DNA in leaves and oil of *Olea europaea*. *Advances in Horticultural Science*, 10: 105–107.
- Crozier, A., Burns, J., Aziz, A.A., Stewart, A.J., Rabiasz, H.S., Jenkins, G.I., Edwards, C.A., Lean, M.E.J. (2000).** Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research*, 33: 79-88.
- Damania, A.B. (1995).** Olive, the plant of peace, reigns throughout Mediterranean. *Diversity*, 11: 131-132.
- Deidda, P., Nieddu, G., Spano, D., Bandino, G., Orrù, V., Solinas, M., Serraiocco, A. (1994).** Olive oil quality in relation to environmental conditions. *Acta Horticulturae*, 356: 354-357.
- De la Torre, F., Bautista, R., Cánovas, F.M., Claros, G. (2004).** Isolation of DNA from olive oil and oil sediments: application in oil fingerprinting. *Food Agriculture and Environment*, 2(1): 84–89.
- Despotaki, E., Linos, A., Hagidimitriou, M. (2011).** Studying the genetic variation among clones of 'Kalamon' and 'Koroneiki' using molecular techniques. *Acta Hort. (ISHS)*, 924: 335-339.
- Díaz, A., Martín, A., Rallo, P., De la Rosa, R. (2006).** Self- and cross incompatibility mechanisms: a strategy to ensure a great variability in olive (*Olea europaea L.*) populations. *Olea*, 25: 29-33.
- D'Imperio, M., Viscosi, V., Scarano, M.T., D'Andrea, M., Zullo, B.A., Pilla, F. (2011).** Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*). *Scientia Horticulturae*, 130: 229-240.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995).** Stress – induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1085–1097.

- Dorsey, J.G., Cooper, W.T., Wheeler, J.F., Barth, H.G., Foley, J.P. (1994).** Retention Mechanism of Bonded-Phase Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66: 857A - 867A.
- Doyle, J. J. & Doyle J. L. (1987).** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bulletin*, 19: 11-15.
- Essadki, M., Ouazzani, N., Lumaret, R., Moumni, M. (2006).** ISSR variation in olive-tree cultivars from Morocco and other western countries of the Mediterranean Basin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 475-482.
- Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E. (1998).** Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 32-35.
- Fabbri, A., Hormaza, J.I., Polito, V.S. (1995).** Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(3): 538-542.
- Fanourakis, N., Pavlikaki, H., Navarro, C.P. (2004).** Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding*, 136: 143-147.
- Fernandez-Orozco, R., Roca, M., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L. (2011).** DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (cv Arbequina) during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 858-864.
- Field, T.S., Lee, D.W., Holbrook, N.M. (2001).** Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red – osier dogwood. *Plant Physiology*, 127: 566-574.
- Figueiredo, C.A., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.C. (2008).** Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23: 213-226.
- Folin, O. (1927).** Tyrosin and tryptofan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 649-672.
- Fooks, R. (1995).** *To βιβλίο της ελιάς*. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα.
- Friedrich, W.L. & Velitzelos, E. (1986).** Bemerkungen zur spatquartaren flora von Santorin (Griechenland). *Cour. Forsch. Inst. Senckenberg*, 86: 387-395. Frankfurt.
- Fritsch, P. & Rieseberg, L.H. (1996).** *The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics*. In: Smith T.B. and Wayne R.K. (eds.), in Conservation. Oxford University Press, London, pp. 54-73.
- Ganino, T., Beghè, D., Valenti, S., Nisi, R., Fabbri, A. (2007).** RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of *Olea europaea* L. in the Emilia region, Northern Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 54: 1531-1540.

- Gemas, V.J.V., Almadanim, M.C., Tenreiro, R., Martins, A., Fevereiro P. (2004).** Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 501–511.
- Gemas, V.J.V., Rijo-Johansen, M.J., Tenreiro, R. Fevereiro, P. (2000).** Inter- and intra-variatal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. *J. Hort.Sc. & Biotech.*, 75 (3): 312-319.
- Gershenson, J. (1984).** Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 18:273-320. Plenum Press, New York 1984.
- Ghisalberti, E.L. (1998).** Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, 5 (2): 147-163.
- Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J. & Osuna, I. (1992).** Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*, 58: 513-515.
- Gordon, M.H. (1990).** *The mechanism of antioxidant action in vitro*. (In) Food Antioxidant. Editor: B.J.F. Hudson. Elsevier Applied Science, New York.
- Green, P.S. (2002).** Arevision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 57: 91–140.
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L. (1994).** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 998-1006.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (1994).** Antioxidants in nutrition, health and disease. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992).** Applications of random amplified polymorphic DNA in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1: 55-63.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L. (1998).** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887–1892.
- Hagidimitriou, M., Katsiotis, A., Menexes, G., Pontikis, C., Loukas, M. (2005).** Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLP and RAPDs) markers and morphological traits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130(2): 211-217.
- Halliwell, B. (2008).** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 107-112.
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H., Berenbaum, M.R. (2001).** The carbon – nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*, 4: 86-95.

- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles S.L., (1992).** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95–124.
- Harborne, J.B. (1980).** *Plant phenolics*. In: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) Encyclopedia of Plant Physiology, volume 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. pp:329-395.
- Harborne, J.B. (1993).** Advances in chemical ecology. *Natural Product Reports*, 327–348.
- Harnly, J.M., Bhagwat, S., Lin, L.Z. (2007).** Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (1): 47-61.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., Todd, J.A. (1992).** Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 8:288–294.
- Heim, K.E., Tagliafero, A.R., Bobilya, D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Heimler, D., Pieroni, A., Cimato, A., Sani, G., Tannini, M. (1994).** Seasonal trend of flavonoids, flavonoids glycosides and biflavonoids in ten olive cultivars. *Acta horticulture*, 356: 372-374.
- Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Martín, A., Dorado, G. (2001).** First evidence of a retrotransposon-like element in olive (*Olea europaea*): implications in plant variety identification by SCAR-marker development. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 1082-1087.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S. (1995).** Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155: 381-386.
- Hess, J., Kadereit, J.W., Vargas, P. (2000).** The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and inter simple sequence repeats (ISSR). *Mol. Ecol.*, 9: 857–867.
- Horiuchi, Y., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T. (1992).** Protective activity of tea and catechins against *Bordetella Pertussis*. *Kansenshogaku Zasshi.*, 66: 599–605.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- Ionita, P. (2003).** Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species? *Chemical Papers*, 59 (1): 11—16.

- Ipek, A., Barut, E., Gulen, H., Oz, A.T., Tangu, N.A. Ipek, M. (2009).** SSR analysis demonstrates that olive production in the southern Marmara region in Turkey uses a single genotype. *Genetics and Molecular Research* 8: 1264-1272.
- Iqbal, S., Bhanger, M.I. (2007).** Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100: 246-254.
- Ishii, T. (1997).** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 12: 111-127.
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Osigo, T. (1983).** Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70: 343-347.
- Jacob, R.A. (1995).** The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15: 755-766.
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., Madhavi, D.L. (1996).** Lipid oxidation in 16 biological and food systems. (In) *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health 17 Perspectives*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. (1996).** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology and Evolution*, 11: 424-429.
- Jetter, R., Schaffer, S. Riederer, M. (2000).** Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell and Environment*, 23: 619-628.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vázquez A., Karp, A. (1997).** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding*, 3: 381-390.
- Jordan, S.A. & Humphries, P. (1994).** Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1915.
- Juven, B. & Henys, Y. (1972).** Studies on the mechanism of the anti-microbial action of oleuropein. *Journal of Applied Bacteriology*, 35: 559 - 567.
- Karabourniotis, G., Kofidis, G., Fasseas, C., Liakoura, V., Drossopoulos, I. (1998).** Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 85: 1007-1012.
- Karakaya, S., Nehir, El. S. (1999).** Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chemistry*, 66: 289-292.

- Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Douka, A., Hatzopoulos, P. (1998).** Genomic organization, sequence interrelationship, and physical localization using in situ hybridization of two tandemly repeated DNA sequences in the genus *Olea*. *Genome*, 41: 527-534.
- Khadari, B., Breton, C., Moutier, N., Roger, P.J., Besnard, G., Berville, A., Dosba F. (2003).** The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 521–529.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., Kiritsakis, A. (2010).** Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87: 369-376.
- Kolattukudy, P.E. (1996).** *Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses*. In: Plant cuticles, G Kerstiens (ed), Oxford: Bios Scientific Publishers.
- Kolattukudy, P.E. (1980).** Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, 208: 990–999.
- Kolattukudy, P.E. (1981).** Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Physiology*, 32: 539–567.
- Kubasek, W.L., Ausubel, F.M., Shirley, B.W. (1998).** A light-independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Molecular Biology*, 37: 217–223.
- Koutsoumanis, K., Tassou, C.C., Taoukis, P.S., Nychas, G.J. (1998).** Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 981-987.
- Landegren, U., Nilsson, M., Kwok, P.Y. (1998).** Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res*, 8: 769–776.
- Lee, H.S., Widmer, B.W. (1996).** Phenolic compounds, in *Handbook of Food Analysis*, Volume 1, L.M.L. Nollet (ed), Marcel Dekker, New York. 821-894.
- Le Tutour, B., Guedon, D. (1992).** Antioxidative activities of *Olea Europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31(4): 1173-1178.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., Que'me'ner, B., Thibault, J.F. (2004).** Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. *Carbohydrate Research*, 339: 2315-2319.
- Linderschmidt, R., Trylka, A., Goad, M., Witschi, H. (1986).** The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, 38: 151–160.

- Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., Ames, B.N. (2000).** Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of Applied Physiology*, 89: 21-28.
- Loukas, M. & Pontikis, C.A., (1979).** Pollen isoenzyme polymorphism in types of *Pistacia vera* and related species as an aid in taxonomy. *The Journal of Horticultural Science*, 54(2): 95-102.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990).** Fruit phenolics. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 1-126.
- Maillard, M.N., Berset, C. (1995).** Evolution of antioxidant activity during kilning, role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1789-1793.
- Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognmiglio, A., Galetti, P., Chiariello, M., Zappia, V. (2004).** Oleuropein prevents oxidative myocardial injury by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 461-468.
- Markham, K.R., Ryan, K.G., Gould, K.S., Rickards, G.K. (2000a).** Cell wall sited flavonoids in *Lisianthus* flower petals. *Phytochemistry*, 54: 681-687.
- Markham, K.R., Gould, K.S., Winefield, C.S., Mitchell, K.A., Bloor, S.J., Boase, M.R. (2000b).** Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55: 327-336.
- Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L., Guedes-Pinto, H. (2007).** RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 117-128.
- Martins-Lopes, P., Gomes, S., Lima-Brito, J., Lopes, J., Guedes-Pinto, H. (2009).** Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. ‘Cobrançosa’ by molecular markers. *Sc. Hort.*, 123: 82-89.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Van, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005).** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione - related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 577-586.
- Mazza, G. & Miniati, E. (1993).** *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains* Boca Raton, FL: CRC Press, pp 64-67.
- McMaster, M. C., (1994).** *HPLC: A practical User's Guide*, VCH Publishers Inc, New York, pp1-211.
- Mekuria, G.T., Collins, G.G., Sedgley, M. (1999).** Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 74: 309-314.

- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K.R. (2002).** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36: 1199-1208.
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26: 211-219.
- Montemurro, C., Pasqualone, A., Simeone, R., Sabetta W., Blanco A. (2008).** AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *European Food Research and Technology*, 226: 1439–1444.
- Montemurro, C., Simeone, R., Pasqualone, A., Ferrara, E., (2005).** Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Hortic. Sci. Biotech.*, 80: 105-110.
- Morell, M.K., Peakall, R., Appels, R., Preston, L.R., Lloyd, H.L. (1995).** DNA profiling techniques for plant variety identification. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35: 807-819.
- Morello, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2004).** Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6002-6009.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M. (1993).** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3:175–182.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002).** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30: 194–200.
- Morris, P. & Robbins, M. (1997).** Manipulating the chemical composition of plants. *In Manipulating Plant Chemistry*. Iger Innovations.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sincero, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145–171.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- Muzzalupo, I. & Perri, E. (2002).** Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. *European Food Research and Technology*, 214: 528-531.
- Muzzalupo, I., Lombardo, N., Musacchio, A., Noce, M.E., Pellegrino, G., Perri, E. (2006).** DNA sequence analysis of microsatellite markers enhances their efficiency for germplasm management in an Italian olive collection. *J. Am. Soc. Hortic.*, 131: 352–359.

- Muzzalupo, I., Pellegrino, M., Perri, E. (2007).** Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *European Food Research and Technology*, 224: 469-475.
- Muzzalupo, I., Lombardo, N., Salimonti, A., Perri, E. (2008).** Molecular characterization of Italian olive cultivars by microsatellite markers. *Adv. Hortic. Sci.*, 22: 142-148.
- Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Salimonti, A., Falabella, R., Perri, E. (2009).** Microsatellite markers for identification of a group of Italian olive accessions. *Sci. Agric.*, 66: 685-690.
- Natella, F., Nardini, M., di Felice, M., Scaccini, C., (1999).** Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 47: 1453-1459.
- Neill, S., Gould, K.S., (1999).** Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Canadian Journal of Botany*, 77: 1777-1782.
- Ong, E.S. (2004).** Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B*, 812: 23-33.
- Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P. (1995).** Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Agronomie*, 15: 31-37.
- Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P. (1996).** Genetic variation in the olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica*, 91: 9-20.
- Ouazzani N., Lumaret, R., Villemur, P., Di Giusto, F. (1993).** Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive tree (*Olea europaea* L.). *J. Heredity*, 84: 34-42.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., (2000).** The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36: 1235-1247.
- Owen, C.A., Bitá, E.C., Banilas, G., Hajjar, S.E., Sellianakis, V., Aksoy, U., Hepaksoy, S., Chamoun, R., Talhook, S.N., Metzidakis, I., Hatzopoulos, P., Kalaitzis, P. (2005).** AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.*, 110: 1169-1176.
- Pafundo, S., Agrimonti, C., Marmiroli, N. (2005).** Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6995-7002.
- Pafundo, S., Agrimonti, C., Maestri, E., Marmiroli, N. (2007).** Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6052-6059.

- Papadopoulos, G., Boskou, D., (1999).** Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *JAOCS*, 68: 669–671.
- Paran, I. & Michelmore, R.W. (1993).** Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985–993.
- Pasqualone, A., Caponio, F., Blanco, A. (2001).** Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur. Food Res. Technol.*, 213: 240–243.
- Pasqualone, A., Montemurro, C., Caponio, F., Blanco, A. (2004).** Identification of Virgin Olive Oil from Different Cultivars by Analysis of DNA Microsatellites. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1068–1071.
- Patterson, H.D. & Weatherup, S.T.C. (1984).** Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops. *J. agric. Sci., Camb.*, 102: 59–68.
- Penner, G.A. (1996).** *RAPD analysis of plant genomes*. In: Jauhar P.P. (ed.), *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 251–268.
- Percival, M., (1998).** Anti-oxidants. *Clinical Nutrition Insight*, 31: 1–4.
- Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. (2006).** Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8425–8431.
- Perri, E., Muzzalupo, I., Sirianni, R. (2002).** RAPD-PCR amplification of DNA from virgin olive oil. *Acta Hort.*, 586: 583–586.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001).** *Antioxidants in Food: Practical Applications*, Woodhead Publishing Limited.
- Pontikis, C., Loukas, M., Kousounis, G. (1980).** The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *J. Hort. Sci.*, 54: 333–343.
- Pontikis, C. (2000).** *Subtropical and tropical fruits: Olive* (in Greek). Stamoulis Publ., Athens, Greece.
- Potes, M.F., Leitao, F., Serrano, J.F., Ivone Clara, M. (1999).** Preliminary studies on isoenzyme polymorphism in cvs of *Olea Europaea* and *Olea Oleaster*. *Acta Hort.*, 474: 499–504.
- Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290–4302.

- Rajalakshmi, D., Narasimhan, S. (1996).** *Food antioxidants: source and methods of evaluation. Food antioxidants – Technological, toxicological and health perspectives.* Marcel Dekker Inc. New York.
- Rallo, P., Dorado, G., Martín, A. (2000).** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 984–989.
- Rallo, P., Tenzer, I., Gessler, C., Baldoni, L., Dorado, G., Martín, A. (2003).** Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 940-946.
- Ratty, A.K., Das, N.P. (1988).** Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 39: 69-79.
- Rekik, I., Salimonti, A., Grati-Kammoun, N., Muzzalupo, I., Lepais, O., Gerber, S., Perri, E., Rebai, A. (2008).** Characterisation and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. *Hortscience*, 43: 1371-1376.
- Rice-Evans, C. & Miller, J.N. (1995).** Antioxidants-the case for fruits and vegetables in the diet. *British Food Journal*, 97: 35-40.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996).** Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 933-956.
- Rice-Evans, CA, Miller, N.J., Pananga, G. (1997).** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- Riley, R.G. & Kolattukudy, P.E. (1975).** Evidence for covalently attached p–coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiology*, 56: 650–654.
- Rizner Hras, A., Hadolin, M., Knez, Z., Bauman, D., (2000).** Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71: 229-233.
- Robbins, R.J. (2003).** Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.
- Roberfroid, M. & Calderon, P. (1995).** *Free Radicals and Oxidation: Phenomena in Biological Systems.* Marcel Dekker, New York.
- Roche, H.M., Gibney, M.J., Kafatos, A., Zampelas, A., Williams, C.M. (2000).** Beneficial properties of olive oil. *Food Res. Inter.*, 33: 227-231.
- Roginsky, V., Lissi, E.A. (2004).** Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.

- Rohlf, M. (1998).** NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02i. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Setauket, NY.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Cimato, A. (1999).** Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 964–967.
- Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A. (2002).** Hydroxytyrosol 4-β-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3835-3839.
- Romero, M. P., Tovar, M. J., Girona, J., Motilva, M. J. (2002).** Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5349-5354.
- Roselli, G., Petruccioli, L., Polsinelli, L., Cavalieri, D. (2002).** Variability in five Tuscan olive cultivars (*Olea europaea* L.). *J. Genet. Breed*, 56: 51–60.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F. (1992).** Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, 17: 37–45.
- Rotondi, A., Magli, M., Ricciolini, C., Baldolini, L., (2003).** Morphological and molecular analysis for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica*, 132: 129–137.
- Roubos, K., Moustakas, M., Aravanopoulos, F.A. (2010).** Molecular identification of Greek olive (*Olea europaea*) cultivars based on microsatellite loci. *Genetics and Molecular Research*, 9: 1865-1876.
- Rubio de Casas, R., Balaguer, L., Manrique, E., Pérez-Corona, M.E., Vargas, P. (2002).** On the historical presence of the wild olive *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Miller) Leh. in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Anales de Jardín Botánico*, 59: 342–344.
- Rugini, E., Pannelli, G., Ceccarelli, M., Muganu, M. (1996)** Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea*) plants from mixoploid cvs “Frantoio” and “Leccino” mutants by in vivo and in vitro selection. *Plant Breeding*, 155: 23-27.
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P.D., Lavee, S., Robards, K. (2002).** Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy’s Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6716–6724.
- Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. (2003).** Quantitative Changes in Phenolic Content during Physiological Development of the Olive (*Olea europaea*) Cultivar Hardy’s Mammoth. *Journal Of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2532-2538.

- Ryan, D. & Robards, K. (1998).** Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123: 31–44.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. (1999).** Changes in the phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 265–274.
- Saffari, Y., Sadrzadeh, S.M. (2004).** Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sciences*, 74 (12): 1513–1518.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing filogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270–276.
- Sanz-Corte´s, F., Badenes, M.L., Paz, S., Inˆiguez, A., Llacer G. (2001).** Molecular characterisation of olive cultivars using RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 126: 7–12.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi A. (2006).** RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Sci. Hortic.*, 111: 24–29.
- Sarri, V., Baldoni, L., Porceddu, A., Cultrera, N.G. Contento, A., Frediani, M., Belaj, A., Trujillo, I., Cionini, P.G. (2006).** Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*, 49: 1606–1615.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of nutrition*, 130: 2073–2085.
- Schierwater B. & Ender A. (1993).** Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res.*, 21: 4647–4648.
- Scott, I.M., Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H. (1999).** Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signalling in plants. *Plant Physiology*, 39: 13–17.
- Seigler, D.S. (1998).** *Plant secondary metabolism*, Kluwer Academic Publishers: Norwell.
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., Montedoro, G. (1999).** Phenolic compounds of olive fruits: One and two dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 12–18.
- Shahidi, F. & Nack, M. (1995).** *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc..

- Shahidi, F. (2000).** Antioxidants in food and food antioxidants. *Die nahrung*, 44(3): 158-163.
- Shahidi, F. & Wanasundara, J. (1992).** Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32: 67-103.
- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A.V., Vilas Boas, L. (2006).** Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Sci. Tech Int.*, 12(5): 385-396.
- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. (2007).** Electrochemical behaviour and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12: 2327-2340.
- Skoog, D.A. (1985).** *Principles of Instrumental analysis*. Saunders College Publishing, pp. 784-824.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973).** *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sofa, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., Masia, A. (2005).** Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32: 45-53.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J. (2000).** Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1013-1023.
- Spooner, D., Treuren, R., Vicente, M.C. (2005).** Molecular markers for Genebank management. *IPGRI Technical Bulletin* No 10: 136.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M. (1996).** Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *Hort. Science*, 31: 729-741.
- Stebbins G.L. (1971).** *Chromosomal evolution in higher plants*. Arnold, London: 85-86
- Stergiou, G., Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Loukas, M. (2002).** Genomic and Chromosomal organization of Tyl-copia-like sequences in *Olea europea* and evolutionary relationships of *Olea* retroelements. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 926-933.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., Jacobs, G. (2002).** Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349-361.
- Strack, D. (1997).** *Phenolic metabolism*. In: *Plant Biochemistry*, Eds Dey, P.M., Harborne, J.B. Academic Press, London, pp. 387-416.
- Taamalli, W., Geuna, F., Banfi, R., Bassi, D., Daoud D., Zarrouk, M. (2006).** Agronomic and Molecular analyses for the characterization of accessions in Tunisian olive germplasm collection. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 467-481.

- Tappel, A., (1995).** Antioxidants protection against peroxidation. *INFORM*, 6: 780-783.
- Tassou, C.C. & Nychas, G.J. (1995).** Inhibition of Salmonella enteriditis by oleuropein in broth and in a model food system. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 120-124.
- Terzopoulos, P.J., Kolano, B., Bebeli, P.J., Kaltsikes, P.J., Metzidakis, I. (2005).** Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 105: 45–51.
- Testolin, R. & Lain, O. (2005).** DNA extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers. *Journal of Food Science*, 70:108–112.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., La Guardia, G.M. (2005).** The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18: 98.
- Trujillo, I., Rallo, L., Arus, P. (1995).** Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 120: 318–324.
- Urquiaga, I. & Leighton, F. (2000).** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*, 33(2): 55-64.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2008).** Phenolic compound biochemistry. *Springer Science & Business U.S.A.*
- Vinha, F.A., Ferreres, F., Silva, M.B., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, A.J., Oliveira, B.M. Seabra, P., Andrade, B.P. (2005).** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89: 561-568.
- Vinha A.F., Silva B.M., Andrade P.B., Seabra R.M., Pereira J.A., Oliveira M.B. (2002).** Development and evaluation of an HPLC/DAD method for the analysis of phenolic compounds from olive fruits. *Liq. Chrom. & Rel. Technology*, 25(1): 151–160.
- Vinson, J.A. (1998).** *Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants. Flavonoids in the Living System.* Plenum Press, New York, 151-164.
- Visioli, F. & Galli, C. (1994).** Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, 55(24): 1965-1971.
- Visioli, F. & Galli, C. (1998).** The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings *Nutr Rev.*, 56(5): 142-147.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995).** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407–4414.

- Vroh, Bi I., Harvengt, L., Chandelier, A., Mergeai, G., Du Jardin, P. (1996).** Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*, 115: 205–206.
- Walter Jr, W.M., Fleming, H.P., Etchells, J.L. (1973).** Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology*, 26(5): 773-776.
- Wallace, G. & Fry, S.C. (1994).** Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151: 229–267.
- Wang, G., Mahalingan, R., Knap, H.T. (1998).** (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 1086-1096.
- Wang, S.Y. & Lin, H.S. (2000).** Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48 (2): 140-146.
- Wang, S.Y., Stretch, A.W. (2001).** Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(2): 969-974.
- Ward, J.H. (1963).** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 48: 236-244.
- Waterman, P.G. & Mole, S. (1994).** *Analysis of phenolic plant metabolites*. Bluckwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 238.
- Welsh, J., McClelland, M., (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18: 7213–7218.
- Whetten, R., Sederoff, R. (1995).** Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 1001–1013.
- Wiesman, Z., Avidan, N., Lavee, S., Quebedeaux B. (1998).** Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 123: 837–841.
- Williams, J.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531–6535.
- Wilson, I.G. (1997).** Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3741-3751.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001).** Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6): 1173–1183.

- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I. (1998).** Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*, 56: 213-222.
- Young, I.S. & Woodside, J.V. (2001).** Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186.
- Zarzuelo, A., Duarte, J., Jimenez, J., Gonzales, M., Utrilla, P. (1991).** Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica*, 57: 417-419.
- Zhu, N., Wang, M., Wei, G.J., Lin, J.K., Yang, C.S., Ho, C.T. (2001).** Identification of reaction products of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate and pyrogallol with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Food Chemistry*, 73: 345-349.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183
- Ziyyat, A., Leggsyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W. (1997).** Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 58: 45-54.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αναγνωστόπουλος, Π. (1939). *Αι ποικιλίαι και η οικολογία της Ελληνικής Ελαιάς.* Εκδόσεις Λαμπρόπουλος, Αθήνα.

Βαφοπούλου – Μαστρογιαννάκη, Α. (2003). *Βιοχημεία τροφίμων.* Εκδόσεις ΖΗΤΗ. Θεσσαλονίκη.

Γαλάρης, Δ. & Δούλιας, Π.Θ. (2001). Βιολογικά Αντιοξειδωτικά. *Χημικά Χρονικά*, 2: 49-50.

Γιαννακοπούλου Ευαγγελία (2010). Επίδραση του γονοτύπου, του περιβάλλοντος και του χρόνου συλλογής των δειγμάτων στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα φύλλα και τους καρπούς δύο Ελληνικών ποικυλίων ελιάς. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: Έντονα

Θεριός, Ι.Ν., (2005). *Ελαιοκομία,* Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.

Καραμπουρνιώτης, Γ. (2002). *Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών,* Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Λίνος, Α. & Χατζηδημητρίου, Μ. (2007). Μελέτη της παραλλακτικότητας των μητρικών φυτών ελιάς σε φυτώρια της περιοχής Ξυλοκάστρου. 23^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Χανιά, 23-26 Οκτωβρίου. Πρακτικά συνεδρίου, Τόμος 13, τεύχος Α, σελ. 247.

Μπαλατσούρας, Γ.Δ. (1994). *Το ελαιόδενδρο.* Τόμος Ι, Εκδόσεις Πελεκάνος. Αθήνα.

Μπόσκου, Δ., (1997). *Χημεία Τροφίμων.* Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη.

Παπαδογιάννης, Ι. Ν., Σαμανίδου, Β. Φ., (2000). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση,* Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

Ποντίκης, Κ. (2000). *Ειδική Δενδροκομία-Ελαιοκομία.* Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

Στεφανάκη-Νικηφοράκη, Μ. (1999). *Συστηματική Βοτανική.* Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα.

Τουλουμενίδου Τ., Κατσιώτης, Α., Χατζηδημητρίου Μ., Καλτσίκης, Π. (2005). Γενετική ποικιλομορφία της ποικιλίας «Καλαμών» (*Olea Europaea*). 22^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, Πάτρα, 19-21 Οκτωβρίου. Περιλήψεις ανακοινώσεων σελ. 253.

Τριχόπουλος, Δ., Καλαποθάκη, Β., Πετρίδου, Ε. (2000). *Προληπτική ιατρική και δημόσια υγεία.* Εκδόσεις ΖΗΤΑ, Αθήνα, 408-409.

ΒΒΑΙΟΓΡΑΦΙΑ

http://www.minagric.gr/greek/agro_pol/ladi.htm

<http://www2.ucy.ac.cy/~koutenti/TEACHING/lectures/IMAGES%20OC%20III/NAH/NAH%20041-051.pdf>

<http://www.agrolive.com.au/olivetreedetail.asp?Tree=1>

http://www.easreth.gr/politismos-perivallon/Pikilies_elias.htm

http://www.lesvosonline.gr/lesvos_gr/Olives/tree.htm

<http://www.fileos.gr/tableolive-geo-representation.dhtml>

<http://www.agrool.gr/files/molmar.pdf>

<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>