
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου – Τμήμα Επιστήμης Φυτικής παραγωγής**

Εργαστήριο Οινολογίας

Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»



**«Επίδραση της άρδευσης στα φαινολικά συστατικά των φλοιών της
σταφυλής της ποικιλίας Syrah»**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Μουρτίκας Γ. Δημήτριος

Αθήνα 2014

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Γ. Κοτσερίδης

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου – Τμήμα Επιστήμης Φυτικής παραγωγής**

Εργαστήριο Οινολογίας

Δ.Π.Μ.Σ. «Αμπελουργία – Οινολογία»

**« Επίδραση της άρδευσης στα φαινολικά συστατικά των φλοιών της
σταφυλής της ποικιλίας Syrah»**

Μεταπτυχιακή διατριβή

Μουρτίκας Γ. Δημήτριος

Αθήνα 2014

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Γ. Κοτσερίδης

Μεταπτυχιακή διατριβή

«Επίδραση της άρδευσης στα φαινολικά συστατικά των φλοιών της σταφυλής της ποικιλίας Syrah»

Μουρτίκας Γ. Δημήτριος

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Γ. Κοτσερίδης

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:

ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια Αμπελουργίας, Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Περίληψη

Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (ποικιλία, καλλιεργητικές τεχνικές, εδαφοκλιματικές συνθήκες κλπ). Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της άρδευσης στα φαινολικά συστατικά της ποικιλίας *Vitis vinifera* «Syrah». Η περιοχή της μελέτης βρίσκεται στην Επανομή του Δήμου Θερμαϊκού.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ράγες που προήλθαν από την καλλιεργητική περίοδο της χρονιάς 2012, καθώς και σε εκχυλίσματα φλοιών των ραγών. Οι επεμβάσεις της άρδευσης ανέρχονται σε 3 (πλήρης άρδευση (FI): 100% της εξατμισοδιαπνοής (ETc), μέτρια άρδευση (DI): 50% της ETc και μηδενική άρδευση (NI)) και εφαρμόστηκαν από την έναρξη της ωρίμανσης έως τον τρυγητό. Τα δείγματα ελήφθησαν σε 4 χρονικές στιγμές (196^η, 211^η, 225^η, 236^η μέρα του έτους (Day Of the Year/DOY)). Για την εξασφάλιση της ακρίβειας των μετρήσεων εφαρμόστηκε τριπλή επανάληψη.

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις προσδιορισμού των ολικών ανθοκυανών και φαινολικών των ραγών, καθώς και των ολικών φαινολικών και ταννινών, των προκυανιδινών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε εκχυλίσματα φλοιών. Επίσης, εφαρμόστηκε ανάλυση HPLC για τον προσδιορισμό των επιμέρους ανθοκυανών και φαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα φλοιών των ραγών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα πρέμνα που έτυχαν περισσότερης άρδευσης έδωσαν μεγαλύτερες ράγες σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης με στατιστικά σημαντικές διαφορές. Όμως η ελλειμματική άρδευση ευνοεί το επί τοις εκατό (%) ποσοστό γιγάρτων / ράγα, το επί τοις εκατό (%) ποσοστό φλοιού / ράγα και φλοιού / σάρκα, με τις μέγιστες τιμές να παρουσιάζονται στα απότιστα πρέμνα. Έτσι, η απουσία άρδευσης αύξησε τη συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών (mg/g ράγας) και φαινολικών (au/g ράγας) των ραγών. Αντίθετα, η εφαρμογή πλήρους άρδευσης αύξησε τα ολικά φαινολικά συστατικά της ράγας όταν αυτά εκφράστηκαν σε au/ράγα. Τα αποτελέσματα στους φλοιούς ανέδειξαν μια θετική επίδραση της μηδενικής άρδευσης στις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών, των ανθοκυανών, των προκυανιδινών και των ταννινών, εκτός από το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, στις περισσότερες των περιπτώσεων. Το γενικό συμπέρασμα της παρούσας εργασίας είναι ότι η απουσία άρδευσης επιδρά θετικά στη φαινολική σύνθεση των ραγών και φλοιών της ποικιλίας Syrah αλλά αυτό επιτυγχάνεται περισσότερο με έμμεσο παρά με άμεσο τρόπο καθώς, η πιο χαρακτηριστική επίδραση της άρδευσης στην ποιότητα των ραγών ήταν αυτή που είχε να κάνει με τη μεταβολή του βάρους τους.

Τεχνολογία τροφίμων – Οινολογία – Αμπελουργία

Λέξεις κλειδιά: Ανθοκυάνες, ταννίνες, φαινολικά συστατικά, ράγες, φλοιοί, άρδευση

Abstract

“Effect of irrigation on the phenolic composition of the skin of cv. Syrah grape berries”

The concentrations of phenolic compounds are affected by various parameters (cultivar, soil and climate conditions, viticultivating techniques etc). In the current study it was investigated the possible effect of irrigation on the phenolic composition of *Vitis vinifera* var. “Syrah”. The study was carried out during 2012 growing season in a commercial vineyard in Epanomi, Northern Greece (Municipality of Thermaikos)

Three irrigation treatments were applied, starting at *Véraison* through harvest: full irrigation (FI), received 100% of crop evapotranspiration (ETc), deficit irrigation (DI) received 50% of ETc and non-irrigated (NI). Each treatment was replicated three times in a randomized block design with 10 vines per replicate. Samples of berries were taken at four different times (196th, 211th, 225th, 236th Day of the Year / DOY).

Total anthocyanins and phenolic compounds were determined in homogenized grape berries. In addition, various analytical methods (total phenolic compounds and tannin concentration, proanthocyanidin concentration, antioxidant activity) were applied to skin extracts. Individual anthocyanins and oligomeric phenolic compounds were determined by HPLC analysis.

The results of this study indicated that the most irrigated vines yielded berries with greater weight at all maturation stages with statistically significant differences. However, the deficit irrigation favors the percent (%) ratio of seeds / berry, skins / berry and skin / pulp, with peak values presented in non-irrigated vines. Thus, the absence of irrigation increased the concentration of total anthocyanins (mg / g of berry) and total phenolics (au / g of berry) of grape berries. However, implementation of full irrigation increased the total phenolic contents of grape berries when they were expressed in au / berry. The results in skin extracts indicated a positive effect of absence of irrigation on total phenolic compounds, anthocyanins, procyanidins and tannins concentrations, except of the stage of full maturity, in most of cases. The overall conclusion of this study is that the absence of irrigation has a positive effect on phenolic composition of berries and skins of *Vitis vinifera* var. “Syrah” but it is more achieved in an indirectly way than in a direct one, since the most characteristic effect of irrigation on the quality of the grapes was on the differentiation in grape berry weight.

Food technology – Enology – Viticulture

Keywords: Anthocyanins, tannins, phenolic content, grape, berries, skins, irrigation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Αμπελουργία – Οινολογία».

Για την ανάθεση του θέματος καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για τις απαραίτητες υποδείξεις θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Κοτσερίδη Γεώργιο. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τη βοήθεια ανεύρεσης και πραγματοποίησης πρακτικής εξάσκησης καθώς και για τη γενικότερη βοήθειά του σε θέματα του τομέα της Οινολογίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την Επίκουρη καθηγήτρια κα Καλλίθρακα Σταματίνα για την πολύτιμη βοήθεια κατά την εφαρμογή μεθόδων στο εργαστήριο Οινολογίας καθώς και για τις γνώσεις που προσέφερε σε θέματα χημείας και οργανοληπτικού ελέγχου οίνων. Επίσης, ευχαριστώ την Επίκουρη καθηγήτρια κα. Μπινιάρη Αικατερίνη για της γνώσεις που προσέφερε σε θέματα Αμπελουργίας.

Ακόμα, θα πρέπει να σταθώ ευγνώμων στην υποψήφια διδάκτωρ Οινολογίας κα. Κυραλέου Μαρία για τη γενικότερη καθοδήγησή της και τη βοήθεια που προσέφερε κατά την πραγματοποίηση των αναλυτικών μεθόδων της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, την Κα. Προξενιά Νίκη για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε για την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου για τη συνεργασία μας.

Τέλος, ευχαριστώ τα αγαπημένα μου πρόσωπα και ιδιαίτερα τους γονείς μου για τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Μουρτίκας Δημήτριος

Αθήνα 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	III
ABSTRACT	IV
ΜΕΡΟΣ I: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΤΑ ΜΕΡΗ ΤΗΣ ΡΑΓΑΣ & ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ	1
<i>i) Μορφολογικά χαρακτηριστικά της ράγας</i>	<i>1</i>
<i>ii) Η χημική σύσταση των μερών της ράγας</i>	<i>3</i>
<i>iii) Η ανάπτυξη της ράγας</i>	<i>4</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	6
<i>i) Τα φαινολικά συστατικά και η σημασία τους</i>	<i>6</i>
<i>ii) Η χημεία των φαινολικών συστατικών</i>	<i>7</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΤΥΠΟΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	10
<i>i) Τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους</i>	<i>10</i>
<i>ii) Τα φλαβονοειδή</i>	<i>12</i>
<i>iii) Ανθοκυανίνες (Ανθοκυάνες)</i>	<i>13</i>
<i>iv) Ταννίνες</i>	<i>16</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	21
<i>i) Βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών στη ράγα</i>	<i>21</i>
<i>ii) Μεταβολές των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση</i>	<i>25</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΡΔΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΡΑΓΩΝ	29
<i>i) Γενικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την σύνθεση των φαινολικών συστατικών των ραγών</i>	<i>29</i>
<i>ii) Η σημασία της άρδευσης στη φαινολική σύνθεση των ραγών</i>	<i>31</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ SYRAH ΚΑΙ Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	39
<i>i) Η ποικιλία Syrah</i>	<i>39</i>
<i>ii) Η περιοχή της μελέτης</i>	<i>40</i>
ΜΕΡΟΣ II: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	43
<i>i) Αναλύσεις σε ράγες</i>	<i>43</i>
<i>ii) Αναλύσεις σε φλοιούς ραγών – προσδιορισμός των ανθοκυανών με HPLC</i>	<i>45</i>
<i>iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών</i>	<i>45</i>
<i>iv) Προσδιορισμός oligομερών και πολυμερών ταννινών σε φλοιούς με HPLC</i>	<i>49</i>
<i>v) Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων</i>	<i>51</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
<i>i) Αναλύσεις σε ράγες</i>	<i>52</i>
<i>ii) Αναλύσεις σε φλοιούς</i>	<i>63</i>
<i>iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών</i>	<i>71</i>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

Μέρος I: Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: Μορφολογία, σύσταση και ανάπτυξη ράγας

i) Μορφολογικά χαρακτηριστικά της ράγας

Ο καρπός της αμπέλου είναι πραγματική ράγα γιατί αποτελείται αποκλειστικά από τους ιστούς της ωθήκης. Πρόκειται για σαρκώδη καρπό σε όλο το βάθος του ο οποίος αποτελείται από τα εξής τρία μέρη:

- ✓ Το **φλοιό**, που αποτελεί το περικάρπιο
- ✓ Τη **σάρκα**, που αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο
- ✓ Τα **γίγαρτα**, που περιβάλλονται από το ενδοκάρπιο.

Έτσι, από έξω προς τα μέσα συναντούμε: τον φλοιό (περικάρπιο), τη σάρκα (μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο) και τα γίγαρτα που περιβάλλονται από το ενδοκάρπιο (Κουράκου – Δραγώνα, 1998).

Ο **φλοιός** αποτελεί το 10-20% του συνολικού βάρους της ράγας. Είναι ένα δερματώδες σύστημα που αποτελείται από την εφυμενίδα (καλύπτεται από την κηρώδη ανθηρότητα), την εξωτερική επιδερμίδα του περικαρπίου (αποτελείται από ισοδιαμετρικά κύτταρα ίδιου μεγέθους με τα εξωτερικά κύτταρα του μεσοκαρπίου) και το κολλεγχυματικό υπόδερμα (Considine and Knox, 1979, 1981). Επίσης, αποτελείται από ιστούς που είναι πλουσιότεροι σε βιταμίνη C από τη σάρκα και που αποτελούνται από ουσίες που συνεισφέρουν σημαντικά στο χρώμα, το άρωμα και τη γεύση. (Mullins et al., 1990).

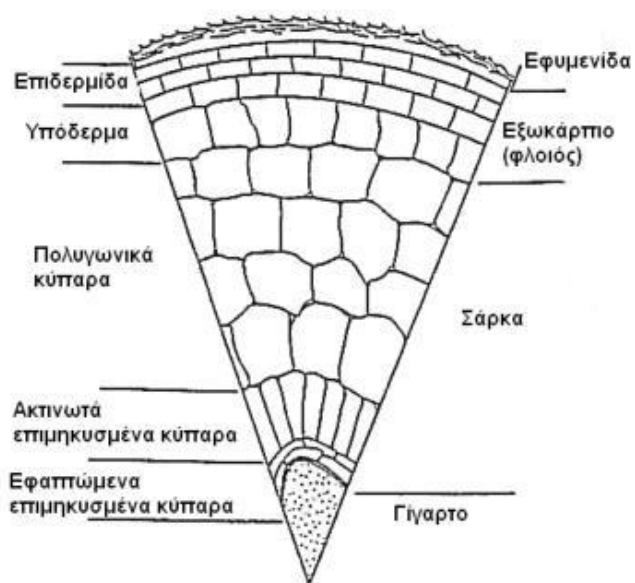
Η εφυμενίδα βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος του φλοιού και απαρτίζεται από κηρώδεις ουσίες. Οι ουσίες αυτές συμβάλουν στην παρεμπόδιση της υπερβολικής εξάτμισης του χυμού της ράγας, συντελούν στην ταχεία απομάκρυνση της βροχής και συγκρατούν τους διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταφέρονται απ' τον αέρα και είναι υπεύθυνοι για τις ζυμώσεις του γλεύκους και του οίνου. Επίσης, οι κηρώδεις ουσίες περιέχουν συστατικά με μεγάλη θρεπτική αξία για τους ζυμομύκητες.

Η επιδερμίδα αποτελείται από μια στοιβάδα κυττάρων και είναι το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματώδη έλαια, χαρακτηριστικά της ποικιλίας του σταφυλιού.

Το υπόδερμα αποτελείται από 6 – 10 στοιβάδες κυττάρων, από τις οποίες οι 2 – 3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες ή τις φλαβόνες, χρωστικές στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών και των λευκών σταφυλιών αντιστοίχως. Εξαιρέση αποτελούν ορισμένες βαφικές ποικιλίες σταφυλιών, στις οποίες οι χρωστικές ουσίες βρίσκονται επίσης στη σάρκα. Στο φλοιό βρίσκεται και μέρος από δεψικές ουσίες (ταννίνες). Περιλαμβάνει δύο ευδιάκριτες περιοχές: την εξωτερική, η οποία αποτελείται από ορθογώνια κύτταρα και εσωτερική, η οποία αποτελείται από πολυγωνικά κύτταρα.

Η **σάρκα** αποτελεί το 74-87% του συνολικού βάρους της ράγας και αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο, τα οποία αποτελούνται από περίπου 20 – 25 στοιβάδες μεγάλων πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων. Τα τοιχώματα των κυττάρων των πρώτων κύριων στοιβάδων (ποικιλίες οινοποίησης) είναι λεπτά και εύθραυστα με αποτέλεσμα να δημιουργούν κάτω από τον φλοιό μια πλήρη ζώνη υγρού, το οποίο απελευθερώνεται με την παραμικρή ρήξη του φλοιού.

Τα **γίγαρτα** αποτελούν το 3-6 % του βάρους των ραγών. Αποτελούν τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου και βρίσκονται στο ενδοκάρπιο, το οποίο δε διακρίνεται με σαφή τρόπο από τη σάρκα. Αποτελούνται από το οξύ μέρος, το οποίο καλείται ράμφος και από το ωοειδές τμήμα, το οποίο καλείται σώμα. Το σώμα διαιρείται από ένα αυλάκι σε δύο λοβούς. Κάνοντας μία τομή σε γίγαρτο παρατηρούμε ότι αποτελείται από ένα ζωντανό τμήμα, το οποίο καλείται σάρκα ή ιστός και εξωτερικά προστατεύεται από το κέλυφος. Στο εσωτερικό της σάρκας βρίσκεται το έμβρυο (Σουφλερός, 2009).



Εικόνα 1: Οι διάφοροι ιστοί της ράγας κατά την ωρίμανση (Πηγή: Ribereau-Gayon et. al., 2006)

ii) Η χημική σύσταση των μερών της ράγας

Τα διάφορα συστατικά της ράγας μεταβάλλονται ποσοτικά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Γενικά, ο **φλοιός** αποτελείται κατά το μεγαλύτερο μέρος του από νερό (75-80% κατά βάρος). Υπάρχουν επίσης ταννίνες (1-2% κ.β.), όξιμες ενώσεις (1-1,5% κ.β.), ανόργανες ενώσεις (1,5-2 % κ.β), αζωτούχες ενώσεις (1,5-2% κ.β.) λοιπές ουσίες (10-15% κ.β). Επίσης, ο φλοιός αποτελεί την κύρια πηγή αρωματικών ουσιών και πρόδρομων της γεύσης συστατικών. Στο φλοιό εμπεριέχονται φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά (ανθοκυάνες, φλαβανόλες και ταννίνες). Τα φαινολικά συστατικά του φλοιού αποτελούν το 30% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson B, 2003; Σουφλερός, 2009).

Τα κυριότερα συστατικά της **σάρκας** είναι τα εξής: νερό (60-80% κατά βάρος), σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη 10-30% κ.β.). Επίσης περιέχει άλλες ουσίες (5-6% κ.β). Τέτοιες ουσίες είναι τα οργανικά οξέα (αρχικά τρυγικό και μηλικό), τα ανόργανα συστατικά (κατιόντα μετάλλων, κυρίως καλίου), οι αζωτούχες ουσίες (διαλυτές πρωτεΐνες, αμμωνία και αμινοξέα), οι πηκτινικές ύλες (δομικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων από πολυμερή των πολυγαλακτουρονικών οξέων), οι αρωματικές ουσίες, οι χρωστικές (σε βαφικές ποικιλίες), και τα μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά (παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος). Τα φαινολικά συστατικά της σάρκας αποτελούν το 10% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson B., 2003; Σουφλερός, 2009).

Η χημική σύσταση των γιγάρτων είναι η εξής: νερό (25-45% κ.β.), υδατάνθρακες (34-35% κ.β.), ελαιώδεις ουσίες (13-20 %), ταννίνες (4-6 % κ.β.), αζωτούχες ουσίες (4-6,5 % κ.β.), ανόργανες ουσίες (2-4 % κ.β.) και λιπαρά οξέα (1% κ.β.). Πιο συγκεκριμένα, τα γίγαρτα εμπεριέχουν μη φλαβονοειδή καθώς και φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά και σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση ευρίσκονται οι ταννίνες. Αυτά τα συστατικά αποτελούν το 60% του συνόλου των φαινολικών συστατικών των ραγών (Watson B., 2003; Σουφλερός, 2009).

iii) Η ανάπτυξη της ράγας

Μετά την καρπόδεση, παρατηρούνται διάφορες μορφολογικές, βιοχημικές και ανατομικές μεταβολές που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και ωρίμανση των ραγών. Η ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από μια αύξηση του όγκου των ραγών που συνοδεύεται από την εξέλιξη των φυσικών χαρακτηριστικών (χρώμα, σφριγηλότητα) και τη μεταβολή της χημικής σύνθεσης των ραγών (σάκχαρα, οξέα, φαινολικά συστατικά). Ο αριθμός των κυττάρων κατά την πορεία ανάπτυξης της ράγας, αυξάνεται κατά 3-4 φορές ενώ ο όγκος των κυττάρων αυξάνεται κατά 3000 περίπου φορές (Mullins et al., 1990).

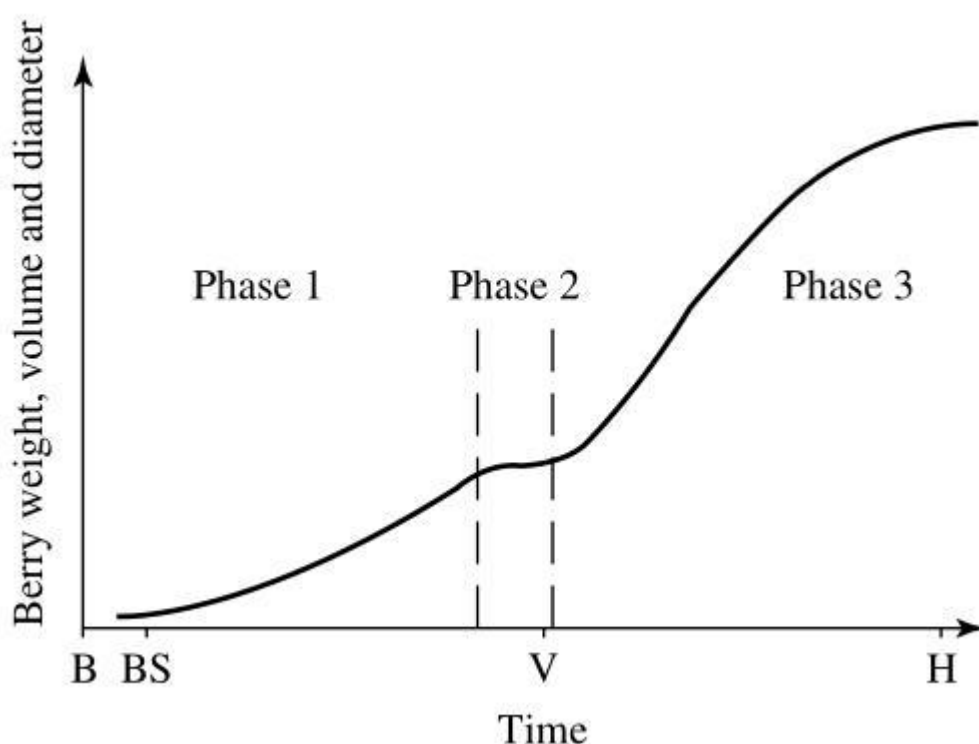
Στις εγγύαρτες ποικιλίες, ο ρυθμός ανάπτυξης των ραγών ακολουθεί μια διπλή σιγμοειδή καμπύλη (εικόνα 2), χωρίζεται δηλαδή σε τρεις φάσεις οι οποίες καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους τον όγκο ή το βάρος, τη διάμετρο και το μήκος των ραγών (Ribereau-Gayon et al, 2006). Οι τρεις φάσεις είναι οι εξής:

Η πρώτη φάση ανάπτυξης που είναι φάση ταχείας ανάπτυξης η οποία διαρκεί από 45 έως 65 ημέρες, ανάλογα με την ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις των αυξητικών ορμονών (κυτοκινίνες και γιβερριλίνες) αντιστοιχούν άμεσα στον αριθμό των γιγάρτων. Η ένταση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εξαρτάται από την παρουσία γιγάρτων. Η κυτταρική αύξηση ξεκινά 2 εβδομάδες μετά την γονιμοποίηση και συνεχίζεται μέχρι το τέλος της πρώτης φάσης.. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής η χλωροφύλλη είναι η επικρατούσα χρωστική. Στις ράγες εκδηλώνεται έντονη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη αναπνευστική δραστηριότητα και συσσώρευση οξέων (Ribereau-Gayon et al, 2006).

Η δεύτερη φάση της ανάπτυξης ονομάζεται περκασμός. Ο περκασμός σηματοδοτείται από την εμφάνιση του χρώματος στη ράγα (στις ερυθρές ποικιλίες) και τον διάφανο φλοιό στις λευκές ποικιλίες. Είναι ένα έντονο φαινόμενο που μπορεί να διαρκέσει από 8 έως 15 ημέρες ή και περισσότερο ανάλογα με το αν η άνθηση είναι αργή. Κατά τη διάρκειά της είναι χαρακτηριστική η εξάντληση των ουσιών που συντίθενται κατά την ωρίμανση και η αύξηση της συγκέντρωσης του αμπισικού οξέος (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Η τρίτη φάση αντιστοιχεί στην ωρίμανση. Η κυτταρική αύξηση συνεχίζεται και συνοδεύεται από ποικίλες φυσιολογικές μεταβολές. Η αναπνευστική ένταση μειώνεται, ενώ συγκεκριμένες ενζυματικές δράσεις αυξάνονται με ταχύ ρυθμό. Η

περίοδος αυτή διαρκεί από 35 έως 55 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων συντίθενται τα σάκχαρα, συσσωρεύονται κατιόντα όπως το κάλιο, συντίθενται αμινοξέα και φαινολικά συστατικά, ενώ η συγκέντρωση του μηλικού οξέος μειώνεται. Το μέγεθος της ράγας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις διαδικασίες αυτές. Επίσης υπάρχει σημαντικός συσχετισμός ανάμεσα στις διαστάσεις μιας ώριμης ράγας και του αριθμού των γιγάρτων που περιέχει (Ribereau-Gayon et al, 2006).



Εικόνα 2: Τα στάδια ανάπτυξης της ράγας: B, Bloom (άνθηση); BS, Berry set (καρπόδεση); V, *Véraison* (Περκασμός); H, Harvest (Τρυγητός). (Πηγή: Ribereau-Gayon et al, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: Τα φαινολικά συστατικά

ι) Τα φαινολικά συστατικά και η σημασία τους

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της οινολογίας, γιατί καθορίζουν το χρώμα και τις αποχρώσεις των έγχρωμων οίνων, αλλά και τους γευστικούς χαρακτήρες τους. Επίσης, υπεισέρχονται στους αρωματικούς χαρακτήρες των οίνων και ευθύνονται για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τη συντήρηση και παλαίωση. Τέτοιες μεταβολές είναι ο εξευγενισμός κατά την ωρίμανση υπό κατάλληλες συνθήκες, αλλά και το καφέτιασμα των λευκών οίνων και η εμφάνιση του καστανού θολώματος, που συμβαίνουν όταν δεν προστατεύονται τα φαινολικά συστατικά από τις οξειδώσεις. Οι αλλοιώσεις του χρώματος και των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων είναι αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών οξειδωτικών δράσεων στα φαινολικά συστατικά (Κουράκου - Δραγώνα , 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν σημαντική κατηγορία συστατικών του οίνου. Σε αυτές οφείλονται οι διαφορές ανάμεσα σε λευκούς και ερυθρούς οίνους, ιδιαίτερα όσον αφορά στο χρώμα και τη γεύση (Mayen et al, 1995; Sun et al, 2006). Οι ενώσεις αυτές, όμως, συνδέονται και με τις ευεργετικές ιδιότητες του οίνου. Στα φαινολικά συστατικά και συγκεκριμένα στις βακτηριοστατικές και αντιοξειωτικές τους ιδιότητες, αποδίδεται το «Γαλλικό παράδοξο», το μειωμένο δηλαδή ποσοστό θνησιμότητας λόγω καρδιαγγειακών παθήσεων παρά την πλούσια διατροφή σε κορεσμένα λίπη που παρατηρήθηκε στη Γαλλία στις αρχές της δεκαετίας του '90 (Soleas et al, 1997).

Τα φαινολικά συστατικά του οίνου προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, ενώ δευτερεύουσα πηγή τους είναι το ξύλο των βαρελιών. Τέλος, πολύ μικρές ποσότητές τους σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών. Ο ρόλος τους στο σταφύλι είναι κατά κύριο λόγο αντιμικροβιακός, αλλά σε μικρότερο βαθμό προστατεύουν από προσβολές από έντομα και από την κατανάλωση από ζώα (Jackson, 2008).

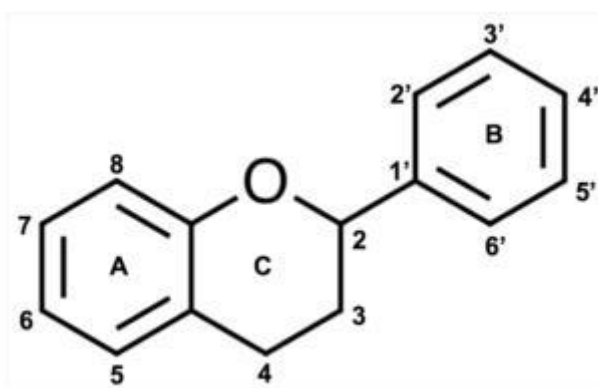
Οι σπουδαιότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων στον οίνο, είναι η συγκέντρωσή τους στο σταφύλι, η μέθοδος της οινοποίησης που εφαρμόστηκε και οι μεταβολές τους κατά την παλαίωση του οίνου

(Gomez-Plaza et al., 2000; Sun et al., 2001; Castillo-Sanchez et al, 2007). Τα μόρια αυτά προέρχονται από το φλοιό της ράγας και τα γίγαρτα και μεταφέρονται στο γλεύκος κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Η δομή τους ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες οινοποίησης και παλαίωσης των οίνων, φαινόμενα τα οποία βρίσκονται σε διαρκή μελέτη.

ii) Η χημεία των φαινολικών συστατικών

Από χημικής άποψης, φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου. Τα βενζολικά παράγωγα με υδροξύλιο σε αντικατάσταση του υδρογόνου της πλευρικής αλυσίδας ονομάζονται αρωματικές αλκοόλες και όχι φαινόλες (Κουράκου – Δραγώνα, 1998).

Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να ορισθούν ως μόρια φυσικώς προερχόμενα από τα φυτά ή τους μικροοργανισμούς. Αποτελούνται από έναν σκελετό φαινολικού δακτυλίου με μία υδροξυλομάδα ή άλλα υποκατάστατα. Τα φαινολικά συστατικά των σταφυλιών χωρίζονται σε μη φλαβονοειδή (με ένα απλό C6 σκελετό, υδρόξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκινναμωμικά οξέα, πτητικές φαινόλες και στυλβένια) και φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβαν-3-όλες και ανθοκυανίνες).



Εικόνα 3: Μορφή φαινολικού δακτυλίου (Πηγή: Teixeira et al, 2013)

Τα μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά υπάρχουν στα σταφύλια και στον κρασί, αλλά με εξαίρεση τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Kennedy at al, 2006; Conde et al, 2007). Τα φλαβονοειδή συνθέτουν

ένα σημαντικό τμήμα του φαινολικού περιεχομένου των σταφυλιών και περιλαμβάνουν διάφορες κατηγορίες (Conde et al, 2007). Είναι πολυφαινολικές ενώσεις τύπου C6-C3-C6, στις οποίες δύο υδροξυλιωμένοι βενζολικοί δακτύλιοι A και B, ενώνονται με μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα που είναι μέρος ενός ετεροκυκλικού C δακτυλίου (Εικόνα 3). Σύμφωνα με την κατάσταση οξειδωσης του C δακτυλίου, οι ενώσεις αυτές χωρίζονται σε δομικές κατηγορίες που περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες, τις φλαβαν-3-όλες (περιλαμβάνουν απλές φλαβαν-3-όλες και τις πολυμερείς μορφές των προανθοκυανιδινών τους), και τις ανθοκυανίνες (Castellarin et al, 2012).

Όπως προαναφέρθηκε, τα φαινολικά συστατικά των σταφυλιών συμβάλλουν στο χρώμα, τη γεύση, την υφή και την τραχύτητα του οίνου και των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων. Η βιοσύνθεση των διαλυτών φαινολικών συστατικών ξεκινά με το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη, που είναι προϊόν της οδού του σικιμικού οξέος. Οι πρόδρομες ενώσεις της οδού του σικιμικού οξέος είναι η 4-φωσφορική ερυθρόζη και το φωσφο-ενολο-πυρουβικό οξύ. Αυτή η οδός είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της φαινυλαλανίνης και άλλων αμινοξέων τυροσίνης και τρυπτοφάνης (Conde et al, 2007; Castellarin et al, 2012). Παρά το γεγονός ότι η βιοσύνθεση πολλών δευτερογενών ενώσεων έχει διευκρινιστεί λεπτομερώς, αναφορές σχετικά με την αναγνώριση των μεταφορέων των δευτερευόντων ενώσεων έχουν δημοσιευθεί μόλις πρόσφατα (Braidot et al, 2008; Martinoia et al, 2012) και μια σαφής και ακριβής κατανόηση των της μεταφοράς των φλαβονοειδών στα φυτά απέχει πολύ από το να διευκρινιστεί.

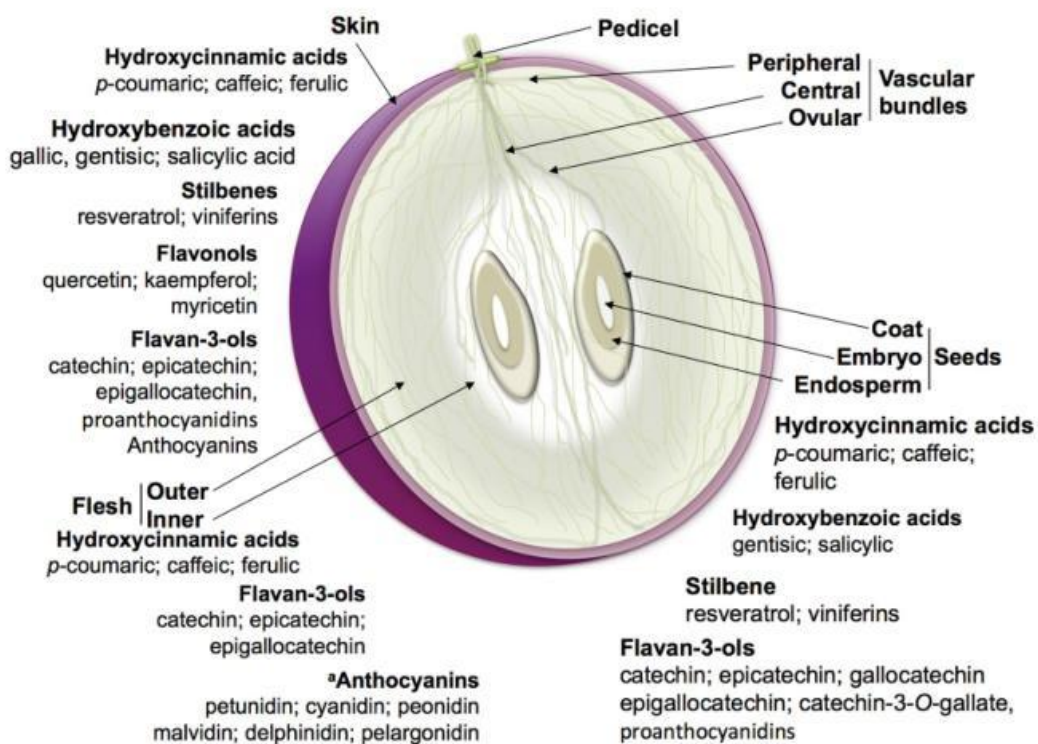
Οι δύο διακριτοί ιστοί που συνθέτουν το φλοιό των ραγών, αντιπροσωπεύονται από το υδρόφοβο φράγμα του περικαρπίου. Το εξωτερικό μέρος, η επιδερμίδα, είναι έντονα κηρώδες, ενώ τα εσωτερικά στρώματα της υποδερμίδας που έχουν χοντρά τοιχώματα (θεωρείται ότι αποτελείται από πολλά στρώματα, ανάλογα με την ποικιλία), περιέχουν τα περισσότερα από τα φλαβονοειδή συστατικά του φλοιού. Σε αυτό το μέρος του φλοιού, η κύρια κατηγορία των φλαβονοειδών αντιπροσωπεύεται από τις ανθοκυανίνες, τις προανθοκυανιδίνες και σε μικρότερο βαθμό, από απλές φλαβαν-3-όλες και φλαβονόλες (Braidot et al, 2008).

Τα κυρίαρχα φαινολικά στα γιγάρτα είναι οι φλαβαν-3-όλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, και τα πολυμερή τους οι προκυανιδίνες). Αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά στρώματα των γιγάρτων έχουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού και

περιέχουν σε μεγαλύτερη αναλογία γαλλική επκατεχίνη (ECG) από εκείνα στα εσωτερικά μέρη του γιγάρτου (Geny et al, 2003).

Μια σχηματική απεικόνιση ώριμης ράγας με την κατανομή των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ των ιστών της παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Όπως φαίνεται, ανθοκυάνες μπορούν να βρεθούν και στο εσωτερικό μέρος των βαφικών ποικιλιών.

Figure 2. Schematic structure of a ripe grape berry and pattern phenolics biosynthesis distribution between several organs and tissues (indicated by arrows). ^a Anthocyanins are synthesized also in the inner flesh of the teinturier varieties [2,6–12].



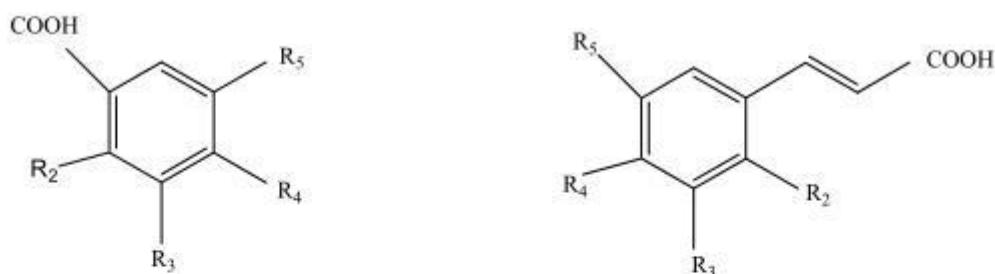
Εικόνα 4: Κατανομή των φαινολικών συστατικών σε ώριμη ράγα (Πηγή: Teixeira et al, 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: Τύποι φαινολικών συστατικών

Οι ράγες περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών συστατικών. Οι φαινόλες αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα συστατικών στις ράγες και τους οίνους, μετά τους υδατάνθρακες και τα οξέα (Singleton, 1980). Στα σταφύλια και στους οίνους απαντούν οι ακόλουθες τέσσερις κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων.

ι) Τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους

Το σταφύλι και ο οίνος περιέχουν φαινολικά οξέα τα οποία είναι παράγωγα του βενζοϊκού (C6 - C1) και του κινναμωμικού (C6 - C3) οξέος. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται μεταξύ 100-200 mg/L στους ερυθρούς οίνους και 10-20 mg/L στους λευκούς. Έχουν ταυτοποιηθεί επτά παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, είτε με τη μορφή γλυκοζιτών, είτε με τη μορφή εστέρων, είτε σε ελεύθερη κατάσταση και τέσσερα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, κυρίως με μορφή 6 εστέρων με τρυγικό οξύ, ενώ μικρές μόνο ποσότητες βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή (Εικόνα 5) (Ribéreau-Gayon et al, 2006).



(1) Παράγωγα του βενζοϊκού οξέος

	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	H	H	OH	H
Πρωτοκατεχικό οξύ	H	OH	OH	H
Βανιλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
Γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH
Συριγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Σαλικυλικό οξύ	OH	H	H	H
Γεντισικό οξύ	OH	H	H	OH

(2) Παράγωγα του κινναμωμικού οξέος

π- κουμαρικό οξύ
Καφεϊκό οξύ
Φερουλικό οξύ
Σινναπικό οξύ

Εικόνα 5: Συντακτικοί τύποι φαινολικών οξέων που απαντούν στα σταφύλια και στους οίνους (Πηγή: Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Δύο από τα επτά βενζοϊκά οξέα που έχουν ταυτοποιηθεί, το σαλικυλικό (ορθό – υδρόξυ – βενζοϊκό οξύ) και γεντισικό (2,5 – διυδρόξυ – βενζοϊκό οξύ), βρίσκονται σε ίχνη. Τα οξέα της κατηγορίας αυτής διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την υποκατάσταση του βενζολικού δακτυλίου. Στα σταφύλια βρίσκονται με την μορφή γλυκοζιτών και απελευθερώνονται με υδρόλυση σε όξινο περιβάλλον, καθώς και με την μορφή των εστέρων από όπου απελευθερώνονται με υδρόλυση σε αλκαλικό περιβάλλον. Οι ελεύθερες μορφές των συστατικών αυτών είναι πιο διαδεδομένες, ιδιαίτερα στους ερυθρούς οίνους, εξαιτίας αντιδράσεων υδρόλυσης και θερμικής αποδιοργάνωσης πιο σύνθετων μορίων, ιδιαίτερα των ανθοκυανών Ribereau – Gayon et al, 2006).

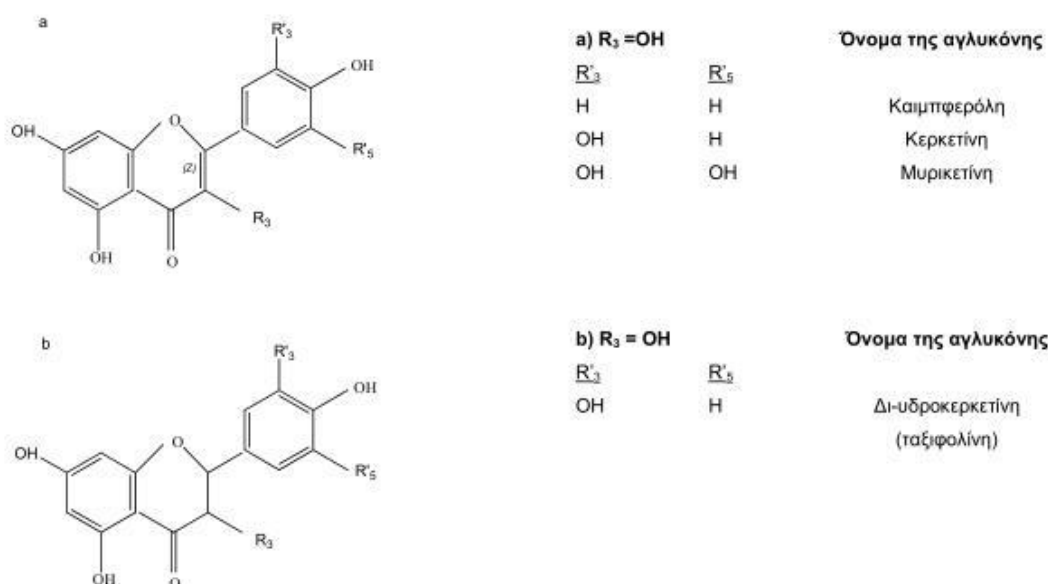
Κάποια από τα κινναμωμικά οξέα βρίσκονται τόσο στις ράγες όσο και στους οίνους. Βρίσκονται σε μικρές ποσότητες σε ελεύθερη μορφή, κυρίως όμως συναντώνται εστεροποιημένα με το τρυγικό οξύ. Ωστόσο μπορεί να βρίσκονται με την μορφή των απλών γλυκοζιτών. Οι εστέρες που σχηματίζουν με το τρυγικό οξύ, ιδιαίτερα το καφεϊκό και το π-κουμαρικό, είναι ευοξειδωτα συστατικά του γλεύκους και προκαλούν καφέτιασμα στο γλεύκος των λευκών ποικιλιών. Τα κινναμωμικά οξέα ενώνονται με τις ανθοκυάνες και οδηγούν στον σχηματισμό των ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού ή π – κουμαρικού οξέος με το γλυκοζίτη της ανθοκυάνης (Ribereau – Gayon et al, 2006).

Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά με την οξειδωσή τους προσδίδουν ένα κίτρινο χρώμα. Δεν προσδίδουν χαρακτηριστική γεύση ή άρωμα, αλλά αποτελούν πρόδρομη μορφή για πολλές πτητικές αρωματικές ουσίες μετά την δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών (ζύμες του γένους *Brettanomyces* και βακτήρια) (Ribereau – Gayon et al, 2006).

Τα στιλβένια αποτελούν μια κατηγορία φαινολικών οξέων τα οποία συναντώνται στο σταφύλι, τον οίνο και το ξύλο δρυός. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο βενζολικών δακτυλίων, οι οποίοι συνδέονται με αλυσίδα αιθανίου ή αιθυλενίου. Στην ομάδα αυτή ανήκει και η ρεσβερατρόλη, η οποία παράγεται στον φυτό της αμπέλου ως αντίδραση στην προσβολή από μύκητες. Η ρεσβερατρόλη εντοπίζεται στον φλοιό των ραγών και εκχυλίζεται κατά την οινοποίηση των ερυθρών ποικιλιών, ενώ θεωρείται ότι έχει σημαντική θετική επίδραση στην υγεία. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες βρίσκεται κυμαίνονται από 1–3 mg/L, ενώ μελέτες έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό πολλών oligομερών της ρεσβερατρόλης στις ποικιλίες *Vitis vinifera*. (Ribereau – Gayon et al, 2006).

ii) Τα φλαβονοειδή

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι κίτρινες χρωστικές των φυτών. Τα φλαβονοειδή είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, καθώς είναι δότες υδρογόνου, γεγονός που, σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να δεσμεύουν δισθενή κατιόντα (εμποδίζοντας την μετατροπή τους σε τρισθενή), έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον για την υγεία του ανθρώπου (Rice-Evans et al, 1996). Η δομή τους χαρακτηρίζεται από δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με έναν πυρανικό δακτύλιο. Πρόκειται για παράγωγα είτε της 2-φαινυλο-χρωμόνης (φλαβόνες και φλαβονόλες), είτε της 2-φαινυλο-χρωμανόνης (φλαβανόνες και διυδροφλαβονόλες) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Συντακτικοί τύποι φλαβονοειδών που απαντούν στα σταφύλια και τους οίνους α: φλαβόνη (R₃ = H) και φλαβονόλη (R₃ = OH). Β: φλαβανόνη (R₃ = H) και διυδροφλαβονόλη (R₃ = OH). (Πηγή: Ribéreau-Gayon et al, 2000).

Οι πιο διαδεδομένες φλαβονοειδείς ενώσεις στα σταφύλια και τους οίνους είναι οι φλαβονόλες, οι οποίες έχουν κίτρινο χρώμα και απαντούν στο φλοιό των ερυθρών και των λευκών ποικιλιών σταφυλής, ενώ ακολουθούν οι διυδροφλαβονόλες, με λιγότερο έντονο κίτρινο χρώμα. Στα σταφύλια, τα μόρια αυτά βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών, ενώ στους οίνους απαντούν σε ελεύθερη μορφή, σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 100mg/L και 1-3mg/L στους ερυθρούς και λευκούς οίνους, αντίστοιχα (Ribéreau-Gayon, 2006).

Οι φλαβονόλες αποτελούν μια μεγάλη υποκατηγορία των φαινολικών συστατικών, που χαρακτηρίζεται για την ύπαρξη διπλού δεσμού στη θέση 2 – 3 του C

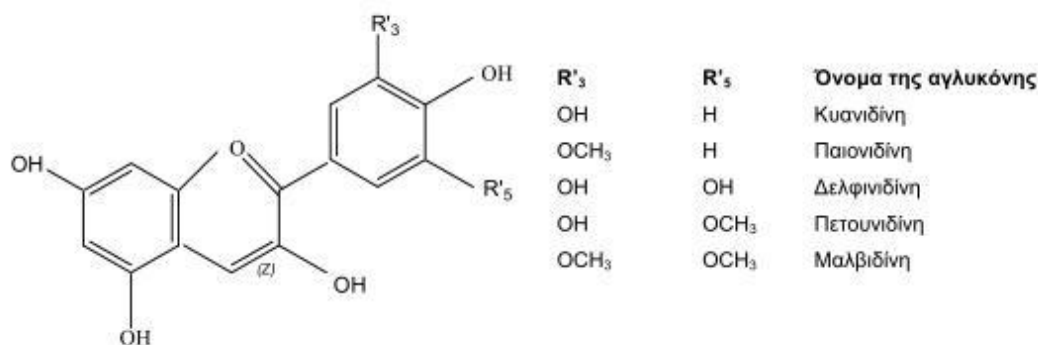
δακτυλίου. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται στον φλοιό των ραγών και ανάλογα με την χαρακτηριστική ομάδα στον πλευρικό δακτύλιο διακρίνονται σε καμπερόλη, κερκετίνη, μυρικετίνη. Όλες οι μορφές των φλαβονολών βρίσκονται στις ερυθρές ποικιλίες ενώ, μόνο η καμπερόλη και η κερκετίνη βρίσκονται στις λευκές (Ribereau-Gayon, 2006).

Οι φλαβονόλες έχουν πολλές φυσικές δράσεις, μια εκ των οποίων είναι η προστασία που παρέχουν ως προς την υπεριώδη ακτινοβολία. Άλλες λειτουργίες συμπεριλαμβάνουν την αντιοξειδωτική τους δράση (Markham et al. 1998) και την δημιουργία συμπλόκων με τις ανθοκυάνες μέσω του φαινομένου του συγχρωματισμού (Cortell, 2006).

iii) Ανθοκυανίνες (ανθοκυάνες)

Οι ανθοκυανίνες ή ανθοκυάνες είναι οι γλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών που δίνουν το κόκκινο χρώμα στα φυτά (Vande-Castele et al, 1983). Είναι οι ερυθρές χρωστικές των σταφυλιών, βρίσκονται κυρίως στο φλοιό και πιο σπάνια στη σάρκα, ενώ απαντούν σε μεγάλες ποσότητες και στα φύλλα, ιδίως προς το τέλος της παραγωγικής περιόδου του αμπελιού. Στις ελεύθερες ανθοκυάνες οφείλεται το έντονο ερυθρό-βιολετί χρώμα των φρέσκων οίνων, ενώ κατά την παλαίωση οι συζευγμένες, κυρίως με ταννίνες, μορφές τους προσδίδουν σε αυτούς κεραμιδί αποχρώσεις (Somers and Evans, 1977; McCloskey and Yengoyan 1981; Vidal et al, 2002).

Οι ανθοκυανιδίνες έχουν στο μόριο τους δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με έναν ακόρεστο, θετικά φορτισμένο πυρανικό δακτύλιο. Είναι παράγωγα του 2-φαινυλο-βενζοπυρυλίου (κατιόν φλαβυλίου). Στα σταφύλια και τον οίνο έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυρίως γλυκοζίτες ανθοκυανιδινών, που στους βενζολικούς πυρήνες τους, φέρουν τέσσερις ή πέντε συνολικά υποκαταστάτες (OH και OCH₃) (Εικόνα 7) (Ribereau-Gayon et al., 2006).



Εικόνα 7: Συντακτικοί τύποι ανθοκυανιδινών (Πηγή: Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Οι ανθοκυανιδίνες απαντούν στα σταφύλια και τους οίνους με τη μορφή γλυκοζίτη (ανθοκυανίνες), επειδή η έλλειψη ηλεκτρονίου από το κατιόν φλαβυλίου, τις καθιστά εξαιρετικά δραστικές και για το λόγο αυτό δεν απαντούν ελεύθερες στη φύση (Vande-Casteele et al, 1983; Lee and Hong 1992; Da-Costa et al, 2000). Στα ώριμα σταφύλια (περιεκτικότητα σε σάκχαρα ίση με 22%) η συγκέντρωση των ανθοκυανινών μπορεί να ξεπεράσει τα 1000 mg/kg (Revilla et al, 1998).

Το χρώμα των ανθοκυανών εξαρτάται από την μοριακή τους δομή (είδος υποκαταστατών και έκταση της υποκατάστασης) (Lee and Hong, 1992), όπως επίσης και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος μέσου (pH, θερμοκρασία, οξυγόνο, παρουσία μετάλλων και SO₂) (Revilla et al, 1998; Da-Costa et al., 2000; Castillo-Sánchez et al., 2006). Η υποκατάσταση στον πλευρικό (B) βενζολικό δακτύλιο, οδηγεί σε μετατόπιση του μήκους κύματος στη μέγιστη απορρόφηση προς το ιώδες, ενώ η γλυκοζιλίωση και η ακυλίωση μετατοπίζουν το χρώμα προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή προς το πορτοκαλί (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Το φλαβύλιο είναι ένα σταθερό κατιόν, το οποίο ανάλογα με το pH του διαλύματος μπορεί να βρίσκεται σε τέσσερις μορφές με διαφορετικό χρώμα: το κατιόν φλαβυλίου έχει χρώμα κόκκινο, η βάση της κινόνης μπλε, η άνυδρη βάση είναι άχρωμη και η χαλκόνη έχει χρώμα κίτρινο (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Όλες οι ποικιλίες *Vitis vinifera* έχουν τις ίδιες βασικές δομές ανθοκυανών, ωστόσο εντοπίζονται μικρές διαφορές σε σχέση με την σύνθεσή τους. Ανάμεσα στις 5 βασικές δομές των ανθοκυανών, η μαλβιδίνη είναι η επικρατούσα σε όλες τις ποικιλίες, αλλά η συγκέντρωσή της κυμαίνεται σημαντικά στις διάφορες ποικιλίες και χαρακτηριστικά από 90% (Grenache) έως 50% (Sangiovese). Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης προσδίδει το χαρακτηριστικό χρώμα στις ερυθρές ποικιλίες και στους

παραγόμενους οίνους, ενώ η συγκέντρωση των ακυλιωμένων ανθοκυανών εξαρτάται από την ποικιλία (Ribereau – Gayon et al, 2006).

Οι ανθοκυάνες δημιουργούν επίσης σύμπλοκα με άλλα φαινολικά συστατικά (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, κατεχίνη, επικατεχίνη) με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το χρώμα τους (copigmentation) (Boulton, 2001). Οπότε, στις ράγες των ερυθρών ποικιλιών βρίσκονται με την μορφή μικρών συμπλόκων, είτε μεταξύ τους, είτε με άλλα συστατικά. Τα σύμπλοκα των ανθοκυανών δημιουργούνται με την εκδήλωση φαινομένων συγχρωματισμού και ενώσεων μεταξύ τους. Τα δύο φαινόμενα οδηγούν στη δημιουργία μεγάλων συμπλόκων τα οποία συγκρατούνται με υδροφοβικούς δεσμούς είτε μεταξύ των ανθοκυανών ή μεταξύ των ανθοκυανών και άλλων οργανικών συστατικών (Jackson, 2008). Ο συγχρωματισμός οδηγεί σε αποχρώσεις βιολετί. Οι παράγοντες αυτοί ευθύνονται για τις διάφορες αποχρώσεις των ερυθρών ποικιλιών (Ribereau – Gayon et al, 2006).

Η θέση C – 3 στο μόριο των ανθοκυανών καθώς και το σάκχαρο στη θέση αυτή μπορεί να είναι εξίσου ακυλιωμένα. Τα σάκχαρα με τα οποία σχηματίζει δεσμούς συμπεριλαμβάνουν τη γλυκόζη, τη γαλακτόζη, τη ξυλόζη, τη ραμνόζη και την αραβινόζη. Τα οξέα με τα οποία συνήθως εστεροποιούνται οι ανθοκυάνες περιλαμβάνουν το π – κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και τα π-υδρόξυ-βενζοϊκά οξέα. Ο βαθμός υδροξυλίωσης του Β δακτυλίου είναι καθοριστικός για την απόχρωση, τη σταθερότητα και την αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου. Το κύριο μέρος των ανθοκυανών συμπεριλαμβάνει το άγλυκο (κατιόν φλαβυλίου), το οποίο έχει συζευγμένους διπλούς δεσμούς υπεύθυνους για την απορρόφηση του φάσματος στα 500 nm , που γίνεται αντιληπτό ως κόκκινο χρώμα. Το άγλυκο μέρος ονομάζεται ανθοκυανιδίνη. Οι ανθοκυάνες είναι πιο σταθερές και ευδιάλυτες συγκριτικά με τις ανθοκυανιδίνες, κάτι που οφείλεται στην γλυκοζυλίωση τους. Τα παράγωγα του άγλυκου μέρους που οι ποικιλίες *Vitis vinifera* περιλαμβάνουν είναι οι 3 – μονογλυκοζίτες, οι 3 – ακετυλογλυκοζίτες και οι 3 – π-κουμαρικό γλυκοζίτες (Cortell, 2006).

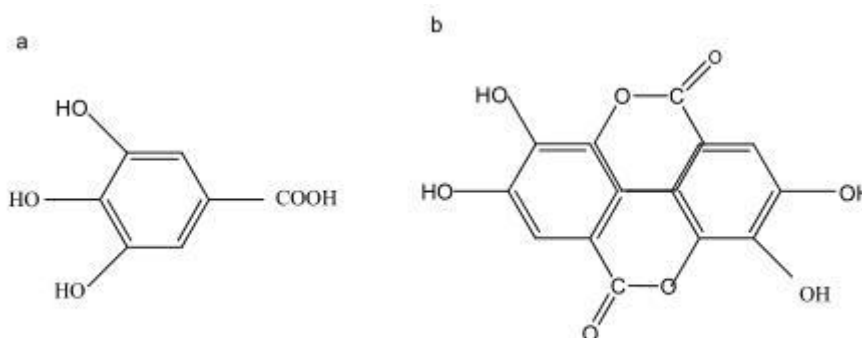
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανών έχει αποδοθεί στο άγλυκο μέρος του μορίου, κι αυτό έχει διαπιστωθεί για την κυανιδίνη και κάποιους γλυκοζίτες της (Wang et al., 1999). Ωστόσο ο αριθμός των υποκατάστατων στην θέση 3 του μορίου, ο βαθμός οξειδωσης του C δακτυλίου, ο βαθμός υδροξυλίωσης και η ακυλίωση με φαινολικά οξέα, θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες της εκδήλωσης αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών (Boonterm et al, 2011).

iv) Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι ενώσεις ικανές να παράγουν σταθερά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και άλλα φυσικά πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες. Από χημικής άποψης, είναι σχετικά ογκώδεις φαινολικές ενώσεις, που προέρχονται από τον πολυμερισμό απλών φαινολικών ενώσεων. Ο βαθμός και ο τρόπος πολυμερισμού επηρεάζουν τη δραστηριότητα του μεγαλομορίου που σχηματίζεται (Sun et al., 1998; Vidal et al., 2002). Το μοριακό τους βάρος τους κυμαίνεται από 600 έως 3500. Διακρίνονται στις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες.

1) Υδρολυόμενες ταννίνες

Στις υδρολυόμενες ταννίνες περιλαμβάνονται οι γαλλοταννίνες και οι ελλαγιταννίνες, οι οποίες μετά από όξινη υδρόλυση αποδεσμεύουν γαλλικό και ελλαγικό οξύ αντίστοιχα (Εικόνα 8).

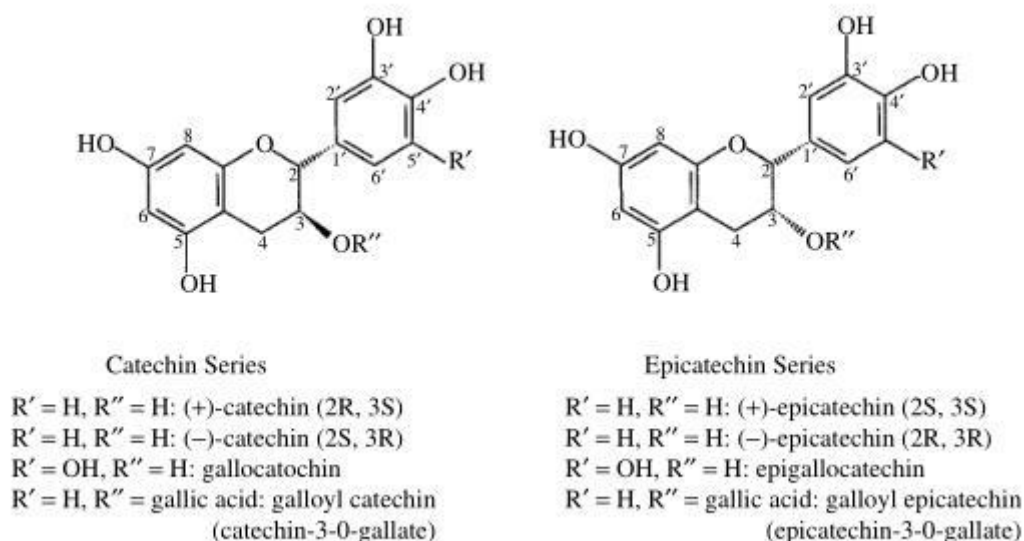


Εικόνα 8: Συντακτικοί τύποι a. γαλλικού οξέος b. ελλαγικού οξέος (Πηγή: Πηγή: Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Υδρολυόμενες ταννίνες δεν απαντούν στα σταφύλια. Περιέχονται ωστόσο στα εμπορικά σκευάσματα ταννινών που χρησιμοποιούνται ως βοηθητικά μέσα κατά την παραγωγή του οίνου (OIV, 2008). Το ελλαγικό οξύ που ανιχνεύεται στον οίνο προέρχεται είτε από τα δρύινα βαρέλια είτε από την χρήση οινολογικών ταννινών. Αντίθετα, το γαλλικό οξύ αποτελεί φυσικό συστατικό του οίνου αφού υπάρχει στο φλοιό και τα γίγαρτα του σταφυλιού (Ribereau – Gayon et al, 2006).

2) Συμπυκνωμένες ταννίνες (προκυανιδίνες)

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες στα σταφύλια και στους οίνους είναι ολιγομερή ή πολυμερή των φλαβαν-3-ολών ή κατεχινών. Οι βασικές τους δομικές μονάδες είναι η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη (Εικόνα 9) (Ribereau – Gayon et al, 2006).



Εικόνα 9: Συντακτικοί τύποι των φλαβαν-3-ολών (Πηγή: Ribereau – Gayon et al, 2006).

Οι ταννίνες της κατηγορίας αυτής, ονομάζονται έτσι γιατί με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον απελευθερώνουν ανθοκυανιδίνες. Αποτελούνται από μονάδες φλαβανολών οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς C4-C8 ή C4-C6 (B τύπος) ή συνδέονται με διπλούς δεσμούς με επιπλέον δεσμό C-2-O--C-7 (A τύπου) που στη συνέχεια υποκαθίσταται μέσω της γλυκοζυλίωσης και εστεροποίησης (Cheynier et al, 2001). Οι διμερείς προκυανιδίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής: οι τύπου B προκυανιδίνες με μοριακό τύπο ($C_{30}H_{26}O_{12}$), οι οποίες προκύπτουν από την συμπύκνωση δυο μονάδων φλαβαν-3-ολων οι οποίες συνδέονται με δεσμούς C4-C8 (B1 - B4) ή C4-C6 (B5 - B8). Οι τύπου A προκυανιδίνες με μοριακό τύπο ($C_{30}H_{24}O_{12}$) οι οποίες εκτός των δεσμών C4-C8 ή C4-C6, έχουν έναν αιθερικό δεσμό ανάμεσα στα άτομα άνθρακα C5 ή C7 του κατώτερου σκέλους και του ατόμου άνθρακα C2 του ανώτερου σκέλους του μορίου. Η μορφή B μπορεί να μετατραπεί στην A μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας (Jackson, 2008).

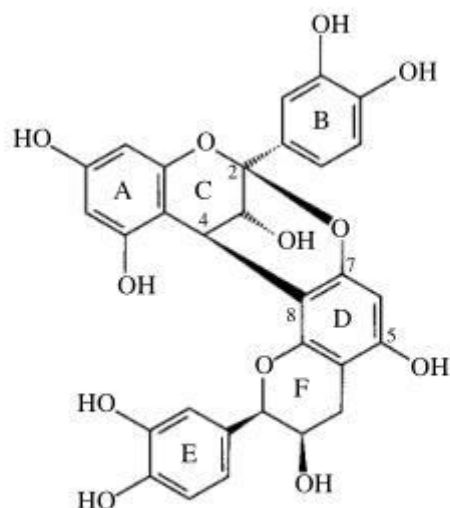
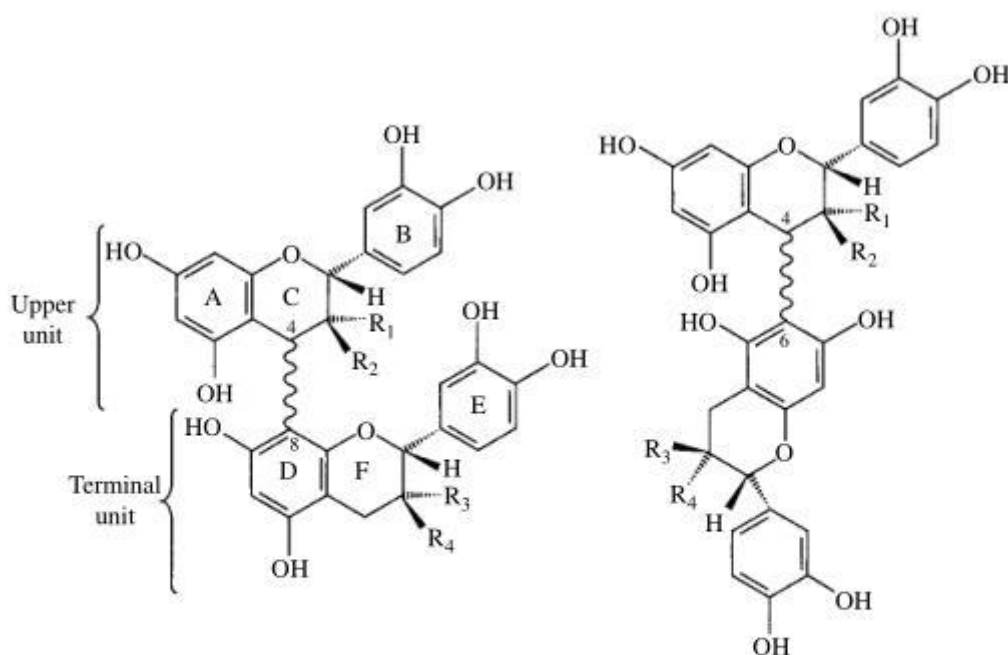


Fig. 6.16. Structure of the dimeric procyanidin A₂ (Vivas and Glories, 1996)

Εικόνα 10: Δομή διμερούς προκυανιδίνης A₂ (Πηγή: Ribereau – Gayon et al, 2006).



Type-B procyanidins

B₁ : R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = H; R₄ = OH

B₂ : R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = H; R₄ = OH

B₃ : R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = H; R₄ = OH

B₄ : R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = OH; R₄ = H

B₅ : R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = OH; R₄ = H

B₆ : R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = H; R₄ = OH

B₇ : R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = H; R₄ = OH

B₈ : R₁ = H; R₂ = OH; R₃ = OH; R₄ = H

Εικόνα 11: Δομή τύπου B διμερών προκυανιδινών (Πηγή: Ribereau – Gayon et al, 2006).

Οι τριμερείς προκυανιδίνες διακρίνονται επίσης σε δύο κατηγορίες: τύπου C όπου οι δεσμοί αντιστοιχούν σε αυτούς με τις προκυανιδίνες τύπου B, και τύπου D όπου οι δεσμοί είναι τύπου A και B. Οι προανθοκυανιδίνες (ή συμπυκνωμένες ταννίνες), είναι ολιγομερής και πολυμερής φλαβαν-3-όλες, ενωμένες μεταξύ τους. Οι

δομές των προανθοκυανιδινών διαφέρουν ως προς το βαθμό πολυμερισμού, τη θέση της σύνδεσης και τη φύση των επιμέρους μονάδων (Lorrain et al, 2011).

Οι προανθοκυανιδίνες έχουν μοριακά βάρη που ποικίλουν από 500 έως 3000 και έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν καθίζηση των πρωτεϊνών. Η δυνατότητα αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς καθορίζει την αντίληψη της στυπτικότητας στους οίνους. Οι προανθοκυανιδίνες έχουν αντιοξειδωτική δράση και άλλες θετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων αποτελούνται από προκυανιδίνες, ενώ οι υπομονάδες αποτελούνται από (+)-κατεχίνη (C), (-) επικατεχίνη (EC) και γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης, ενώ οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών συμπεριλαμβάνουν τόσο προκυανιδίνη αλλά και προδελφινιδίνη και οι υπομονάδες συμπεριλαμβάνουν επιπρόσθετα (-)-επιγαλλοκατεχίνη (EGC) (Prieur et al, 1994; Souquet et al, 1996).

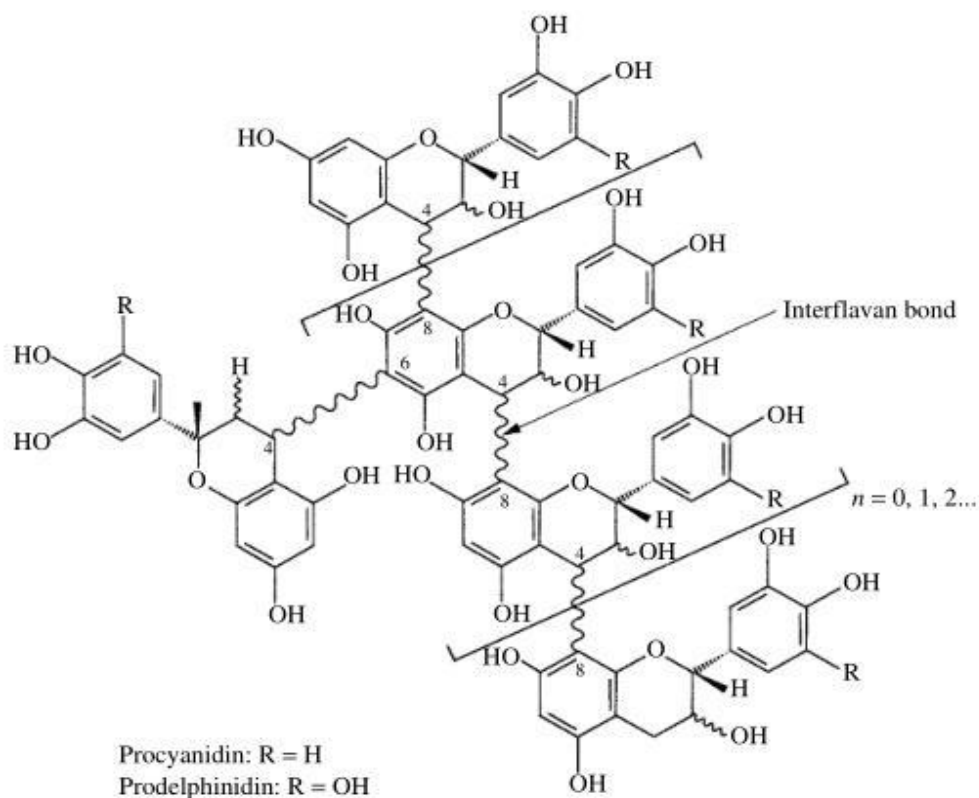
Οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού, έχουν μονομερείς φλαβαν-3-όλες σε μικρότερη συγκέντρωση και σε μικρότερο βαθμό λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις εστεροποίησης των υπομονάδων σε σχέση με τα γίγαρτα (Lorrain et al, 2011). Στη ράγα οι κύριες μονάδες που βρίσκονται είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η (-)-γαλλική επικατεχίνη και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη (Labarbe et al, 1999).

Εκτός της θετικής επίδρασής τους στην ανθρώπινη υγεία, η συμβολή τους είναι εξίσου σημαντική στον οίνο και γενικότερα στις φυτικές τροφές. Θεωρείται ότι στα γίγαρτα τα συγκεκριμένα συστατικά προσφέρουν προστασία από παθογόνους μύκητες και την κατανάλωσή τους από πτηνά. Στους φλοιούς των ραγών θεωρείται ότι προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία. Είναι σημαντική η συμβολή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων όπως η σταθεροποίηση του χρώματος έπειτα από ενώσεις με ανθοκυάνες μέσω φαινομένων συγχρωματισμού και συμπύκνωσης (Labarbe et al, 1999).

Στους οίνους οι προανθοκυανιδίνες προσδίδουν στυπτικότητα και σώμα. Το μέγεθος του μορίου της προκυανιδίνης (mDP) είναι καθοριστικής σημασίας για την πικρότητα και την στυπτικότητα που αυτές προσδίδουν (Peleg et al., 1999; Vidal et al., 2003). Τα μονομερή διακρίνονται για την πικρή τους γεύση, ενώ τα μεγάλα μοριακού βάρους συστατικά διακρίνονται για την στυπτικότητά τους.

Οι προκυανιδίνες, θεωρούνται μόρια ιδιαίτερα δραστικά και σε αντίθεση με τις ανθοκυάνες και τις φλαβονόλες δεν συναντώνται σε μορφή γλυκοζιτών (Jackson,

2008). Ωστόσο βρίσκονται συνδεδεμένες με πολυσακχαρίτες στις ράγες και εκχυλίζονται ως σύμπλοκα κατά την οινοποίηση. Στην περίπτωση των λευκών οίνων η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από την ένταση της απολάσπωσης και είναι της τάξης των 100 mg/L ή 200-300 mg/L σε μη απολασπωμένα γλεύκη (Ribéreau-Gayon et al., 2006).



Εικόνα 12: Παραδείγματα συμπυκνωμένων προανθοκυανιδινών (Πηγή: Ribereau – Gayon et al, 2006)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: Βιοσύνθεση και μεταβολές των φαινολικών συστατικών

i) Η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών στη ράγα

Η ανάπτυξη της ράγας ακολουθεί μια διπλή σιγμοειδή καμπύλη που μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις ανάπτυξης (φάση I και III). Η καμπύλη χαρακτηρίζεται από μια φάση υστέρησης (φάση II) (Coombe, 1976). Η μετάβαση από τη φάση II στη φάση III ονομάζεται περκασμός και θεωρείται ότι είναι η έναρξη της ωρίμανσης.

Η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών ξεκινάει με την έναρξη της ανάπτυξης της ράγας. Οι ουσίες αυτές αποτελούν δευτερεύοντα συστατικά του καταβολισμού των σακχάρων. Η σύνθεσή τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με την οδό των φωσφορο-πεντοζών. Στην πραγματικότητα, στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών εμπλέκονται δύο μεταβολικά μονοπάτια. Η οδός των φαινύλ-προπανοειδών και το μονοπάτι του σικιμικού οξέος, το οποίο αποτελεί μέρος της οδού των φαινύλ-προπανοειδών (Ribereau-Gayon, 2006). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαινύλ-προπανοειδών είναι γενικά αποδεκτό ότι καταλήγει στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Ωστόσο, παρακλάδια της συγκεκριμένης μεταβολικής οδού έχουν σαν αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση μιας πληθώρας φαινολικών ενώσεων (Harbone, 1967; Gerats and Martin, 1992; Hasalm, 1998).

Η έναρξη της βιοσύνθεσής τους ξεκινά από τη συμπύκνωση της 4-φωσφορο-ερυθρόζης (προϊόν της οδού των P-πεντοζών) με το φωσφορο-ενολο-πυρουβικό οξύ (προϊόν της γλυκολυτικής οδού). Το μονοπάτι αυτό είναι γνωστό ως οδός του σικιμικού οξέος και οδηγεί στο σχηματισμό του κινναμωμικού οξέως καθώς και των αρωματικών αμινοξέων (Phe, Tyr).

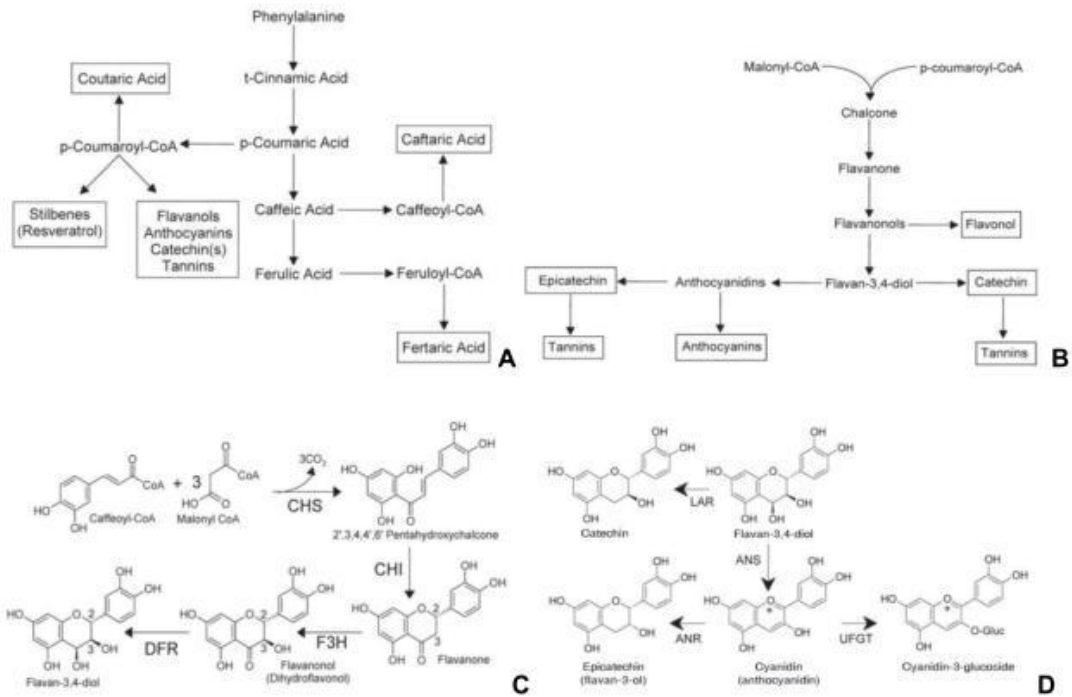
Η φαινύλ-προπανοειδής οδός θεωρείται γενικά ότι παράγει υδρόξυ-κινναμωμικά οξέα, στιλβένια, λιγνίνη, λιγνάνη, αουρόνες, φλαβόνες, ισοφλαβονοειδή καθώς και τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες, ταννίνες και ανθοκυάνες) (Harbone, 1967; Downey et al., 2006), τα οποία μοιράζονται αρκετά πρώιμα βήματα στην παραπάνω οδό. Οι ταννίνες συντίθενται πριν τον περκασμό ενώ οι ανθοκυάνες μετά.

Η οδός των φαινύλ-προπανοειδών συνθέτει φλαβονοειδή από το καρβοξυλιωμένο ακέτυλο-συνέζυμο A (αποκαρβοξυλάση Malonyl CoA) και το

αμινοξύ φαινυλαλανίνη, το οποίο παράγεται μέσω της οδού του σικιμικού οξέος (Dewick and Haslam, 1969; Downey et al., 2006) (Εικόνα 13,A). Το ένζυμο αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL) είναι συνήθως το ένζυμο κλειδί στην οδό του σικιμικού οξέος, το οποίο απομακρύνει την φαινυλαλανίνη από την πρωτεϊνοσύνθεση και την πηγαίνει προς τη σύνθεση φλαβονοειδών συστατικών και ανθοκυανών (Roubelakis-Angelakis and Kliewer, 1986). Κατά την αντίδραση της συνθετάσης της χαλκόνης, είτε το συνένζυμο p-coumaroyl-CoA (Εικόνα 13,B) είτε το caffeoyl-CoA (Εικόνα 13,C), συνδυάζεται με τρία Malonyl CoA για να δώσει ένα μόριο χαλκόνης και ένα μόριο CO₂ (Adams, 2006). Η φλαβάν-3,4-διόλη που παράγεται από τη φλαβονόλη από την αναγωγή της δι-υδροξυ-φλαβονόλης (DFR) έχει ήδη τη 2,3,- trans μορφή της κατεχίνης και μπορεί να μετατραπεί άμεσα σε κατεχίνη από την αναγωγή της λευκοανθοκυανιδίνης (LAR) (Εικόνα 13,D). Η επικατεχίνη παράγεται από την κυανιδίνη με την δράση του ενζύμου αναγωγή της ανθοκυανιδίνης (ANR) (Xie et al., 2003). Η καταλάση της ανθοκυανίνης μετατρέπει την κυανιδίνη και την δελφινιδίνη σε επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη αντίστοιχα. Το γονίδιο ANR πιστεύεται ότι εκφράζεται στο φλοιό και στα γίγαρτα των ραγών του σταφυλιού μέχρι την αρχή της ωρίμανσης, και τα δύο γονίδια LAR δείχνουν διαφορετικούς τύπους έκφρασης σε φλοιούς και τα γίγαρτα (Bogs et al, 2005). Ο συγχρονισμός και η έκφραση των γονιδίων αυτών έχει αποδειχθεί ότι είναι συνεπής με τη συσσώρευση των προανθοκυανιδινών.

Η συσσώρευση των ανθοκυανών στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών συμπίπτει με την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το τελικό βήμα στη βιοσύνθεση της ανθοκυανίνης, το ένζυμο UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UFGT) (Boss et al, 1996), το οποίο καταλύει την γλυκοζυλίωση των ασταθών άγλυκων ανθοκυανιδινών στις έγχρωμες ανθοκυανίνες. Οι δύο κύριες ανθοκυανίνες (κυανιδίνη και δελφινιδίνη) συντίθενται με UFGT στο κυτταρόπλασμα των επιδερμικών κυττάρων της ράγας. Η κυανιδίνη έχει ένα Β-δακτύλιο δι-υδροξυλιωμένο στις 3' και 4' θέσεις, ενώ η δελφινιδίνη έχει έναν τρι-υδροξυλιωμένο Β-δακτύλιο, το οποίο οφείλεται σε μια πρόσθετη ομάδα υδροξυλίου στη θέση 5'. Η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη προέρχονται από παράλληλες οδούς που προέρχονται από την κατεύθυνση των υδρολασών των φλαβονοειδών 3'- και 3, '5' (Bogs et al., 2006; Castellarin et al, 2006). Η θέση 3' της κυανιδίνης και της δελφινιδίνης και διαδοχικά η θέση 5' δελφινιδίνης μπορεί να μεθοξυλιωθούν από το OMT που δημιουργεί την παιονιδίνη, την πετουνιδίνη και την μαλβιδίνη αντίστοιχα. Ένα ή

περισσότερα μέλη από την πρωτεϊνική οικογένεια της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) συμμετέχουν στην εξαγωγή των ανθοκυανών από το κυτταρόπλασμα στα χυμοτόπια (Marrs et al, 1995;. Mueller et al, 2000).



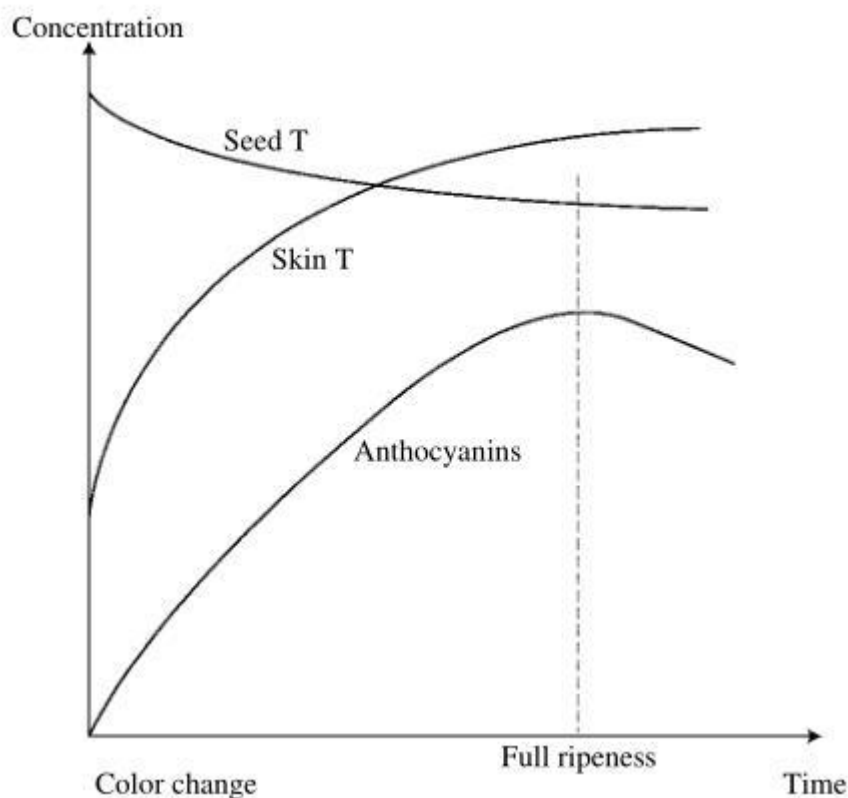
Εικόνα 13: η οδός που περιγράφει τη σύνθεση των κύριων φαινολικών συστατικών (A) φλαβονοειδή, (B) φλαβαν-3,4-διόλες (C) και κατεχίνη, ανθοκυανιδίνη (κυανιδίνη) και μονογλυκοζίτης-3 της κυανιδίνης (D) που βρίσκονται στα σταφύλια. Τα ενδιάμεσα στάδια (δεν περιγράφονται) είναι συνήθως παρούσες σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Τα οξέα Caftaric, coumaric και fertaric είναι οι εστέρες του τρυγικού του αντίστοιχου κινναμωμικού οξέος (Πηγή: Adams, 2006).

Οι Kobayashi et al (2002) έδειξαν ότι τα σχετιζόμενα myb ρυθμιστικά γονίδια, V1mybAs, συμμετείχαν στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των ανθοκυανινών μέσω της γονιδιακής έκφρασης του UFGT, καθώς και μέσω της ενισχυμένης έκφρασης άλλων ενζυμικών γονιδίων της βιοσυνθετικής οδού. Ένα ομόλογο του V1mybAs, το VnmybA1, εκφράζεται στους φλοιούς των ραγών των έγχρωμων ποικλιών του γένους *Vitis vinifera*, αλλά όχι σε λευκές ποικιλίες (Kobayashi et al., 2004). Το αμπισικό οξύ (ABA), μια ορμόνη των φυτών, είναι γνωστό ότι αυξάνει την έκφραση του VnmybA1, η οποία συμπίπτει με την αυξημένη έκφραση των γονιδίων των συνθετικών ενζύμων των ανθοκυανών όπως το PAL (λύση της φαινυλαλανίνης), το CHS (συνθετάση της χαλκόνης), το CHI (ισομεράση της χαλκόνης), το DFR (αναγωγή των δι-υδροξυφλαβονολών-3), το LDOX (leucoanthocyanidin dioxygenase) και το UFGT (UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase) (Ban et al., 2003), και τη συσσώρευση ανθοκυανινών στους

ii) Μεταβολές των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση

Γενικά, η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών ενεργοποιείται με την έναρξη της ανάπτυξης των ραγών. Συνεπώς, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών αυξάνεται κατά την διάρκεια της φάσης αυτής. Οι Considine και Knox (1979) παρατήρησαν ότι στα χυμοτόπια των κυττάρων που βρίσκονται περιφερειακά του μεσοκαρπίου, η συγκέντρωση των πολυφαινολών μειώνεται κατά την 26^η ημέρα. Από την άλλη, στα χυμοτόπια των κυττάρων που βρίσκονται στις πρώτες 6-7 στοιβάδες του φλοιού, η παρατηρούμενη σχετική μείωση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών οφείλεται στην αύξηση του όγκου των κυττάρων αυτών.

Η γρήγορη αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της ράγας συνοδεύεται από μια σταθερή μείωση της αύξησης κατά την ωρίμανση. Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στο φλοιό των έγχρωμων ποικιλιών αυξάνεται μέχρι τον περκασμό και έπειτα παρουσιάζει μικρή μείωση μέχρι τα τελευταία στάδια της ωρίμανσης.



Εικόνα 15: Μεταβολή των ταννινών και των ανθοκυανών (φλοιών και γιγάρτων) κατά την ωρίμανση των ραγών (Πηγή: Ribereau-Gayon et al, 2006).

Φαίνεται ότι η συσσώρευση των φαινολικών συστατικών να επηρεάζεται από τον ρυθμό συσσώρευσης των σακχάρων. Έρευνες των Pirie και Mullins (1980) έδειξαν ότι στην ποικιλία 'Syrah', η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του φλοιού ήταν χαμηλή 3-4 εβδομάδες πριν την έναρξη της ωρίμανσης ενώ τα επίπεδα των διαλυτών σακχάρων στο φλοιό αυξήθηκαν κατά την έναρξη της φάσης III. Τα επίπεδα των ολικών φαινολών και των ανθοκυανών αυξήθηκαν ταχέως περίπου μία εβδομάδα μετά την έναρξη της συσσώρευσης των διαλυτών σακχάρων.

1) Επίδραση στη συσσώρευση των ανθοκυανών

Η συσσώρευση των ανθοκυανινών στους φλοιούς ξεκινά κατά τον περκασμό, και οι συγκεντρώσεις τους, όπως είναι γνωστό, φτάνουν σε ένα μέγιστο σε ένα συγκεκριμένο σημείο, μετά από το οποίο μειώνονται, ακριβώς πριν από τον τρυγητό και / ή κατά το στάδιο της υπέρ-ωρίμανσης (Somers, 1976; Roggero et al 1986; Fournand et al, 2006). Αν οι ανθοκυανίνες αποικοδομούνται ή ενσωματώνονται σε άλλα μόρια δεν είναι γνωστό. Οι Keller and Hrazdina (1998) έδειξαν ότι η αποσύνθεση των ανθοκυανινών μπορεί να οφείλεται στη δράση της γλυκοζιδάσης και της υπεροξειδάσης στα χυμοτόπια των φλοιών της ράγας.

Ο μονογλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης είναι η κυρίαρχη ανθοκυανίνη του φλοιού των *Vitis vinifera* ποικιλιών (Roggero et al., 1986). Τα επίπεδα του μονογλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης και της παιονιδίνης συνήθως αυξάνονται, ενώ οι υπόλοιποι μονογλυκοζίτες τείνουν να μειώνονται κατά το τέλος της ωρίμανσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι μονογλυκοζίτες της μαλβιδίνης και της παιονιδίνης είναι τα τελικά προϊόντα της οδού βιοσύνθεσης των ανθοκυανινών (Roggero et al, 1986; Canals et al, 2005).

Οι Ryan and Revilla (2003) διαπίστωσαν ότι η σχετική περιεκτικότητα του οξικού εστέρα της μαλβιδίνης ήταν αρκετά σταθερή κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αλλά αυτή του κουμαρικού εστέρα της μαλβιδίνης συνήθως αυξάνεται στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης και μετά μειώνεται προς το τέλος (Ryan and Revilla, 2003). Η αύξηση του συνόλου των κουμαρικών εστέρων των ανθοκυανινών βρέθηκε να είναι σημαντική μόνο παρουσία αιθανόλης στο μέσο εκχύλισης (Canals et al, 2005). Οι ακυλιωμένες ανθοκυανίνες αυξάνονται κατά την ωρίμανση, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μειώνονται στο τέλος της (González-San José et al., 1990; Fernández-López et al., 1992; Canals et al., 2005).

2) Επίδραση στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

Η βιοσύνθεση των φλαβονολών στο σταφύλι εμφανίζεται μόνο στους φλοιούς των ραγών (Kennedy et al, 2002). Ωστόσο, σε αντίθεση με τη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών, υπάρχουν δύο ξεχωριστές περιόδους σύνθεσης των φλαβονολών στις ράγες, η πρώτη κατά την ανθοφορία και η δεύτερη αρχίζει μία έως δύο εβδομάδες μετά τον περκασμό και συνεχίζεται σε όλη την ωρίμανση (Downey et al., 2003b).

3) Επίδραση στη βιοσύνθεση των υδρόξυ-κινναμωμικών οξέων

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένα μέγιστο στο σύνολο των υδρόξυ-κινναμωμικών οξέων ανά ράγα πριν τον περκασμό και στη συνέχεια μια μείωση που οδηγεί σε μια σταθερή ποσότητα ανά ράγα όσο εξελίσσεται η ωρίμανση (Romeyer et al, 1983). Αυτή η μείωση ανά ράγα είναι χαρακτηριστικό αρκετών φαινολικών ενώσεων (για παράδειγμα των φλαβάν-3-ολών του φλοιού) και θα μπορούσε να οφείλεται στον καταβολισμό των ενώσεων ή στη χρησιμοποίησή τους στη βιοσύνθεση άλλων φαινολικών ενώσεων ή και στα δύο (Adams, 2006). Το πιο άφθονο υδρόξυ-κινναμωμικό οξύ που βρέθηκε κυρίως στη σάρκα αλλά και στους φλοιούς σε χαμηλές συγκεντρώσεις, είναι το καφταρικό οξύ (caftaric acid), ακολουθούμενο από το κουταρικό οξύ (coutaric acid).

4) Επίδραση στις ταννίνες και φλαβάν-3-όλες

4.1. Φλοιοί

Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι οι ταννίνες των φλοιών παράγονται πολύ νωρίς στην ανάπτυξη της ράγας και αλλάζουν ελάχιστα από τον περκασμό έως τον τρύγο (εκφραζόμενες σε ποσότητα ανά ράγα), αλλά ότι η συγκέντρωση (mg/g νωπού βάρους ή mg/L) μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ανάλογα με την ανάπτυξη της ράγας (Habertson et al, 2002). Αυτό συμφωνεί με μελέτες όπως των Fournand et al. (2006), αλλά όχι με άλλες που παρουσίασαν μείωση (Downey et al, 2003a) ή αύξηση (Kennedy et al, 2002) (mg/ράγα). Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μελέτες δεν είναι πάντα οι ίδιες.

4.2. Γίγαρτα

Μια σχετική έρευνα που διεξήχθη, έδειξε μείωση στη συγκέντρωση των ταννινών των γιγάρτων της ποικιλίας Cabernet Sauvignon κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Harbertson et al, 2002). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις παρέμειναν σταθερές κατά τη διάρκεια των τεσσάρων εβδομάδων πριν τον τρύγο (mg CE/ράγα) και συνοδεύτηκαν από αλλαγές χρώματος στα γίγαρτα (Ristic & Iland, 2005). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μείωση θα μπορούσε να συμβεί σε πιο πρώιμο στάδιο, πριν την αλλαγή του χρώματος, με τη συγκέντρωση να παραμένει σχετικά σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης (Oberholster, 2003). Τα επίπεδα της κατεχίνης και της επικατεχίνης είναι κανονικά στο μέγιστο αμέσως μετά τον περκασμό, που ακολουθείται από μια απότομη μείωση, καθώς οι ράγες συνεχίζουν να ωριμάζουν (Romeyer et al., 1983). Ωστόσο, ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των ταννινών των αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Kennedy et al., 2000a, 2000b).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V: Ο ρόλος της άρδευσης στη φαινολική σύνθεση των ραγών

i) Γενικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την σύνθεση των φαινολικών συστατικών των ραγών

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση των ραγών και κατά συνέπεια την ποιότητα των παραγόμενων οίνων ποικίλουν. Πρόκειται για μια πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων, που συνήθως αναφέρονται με το γαλλικό όρο «terroir», που επεμβαίνουν καθοριστικά στη γενικότερη σύσταση των σταφυλιών, επηρεάζοντας άμεσα ή έμμεσα και τη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών (Koundouras et al, 2006).

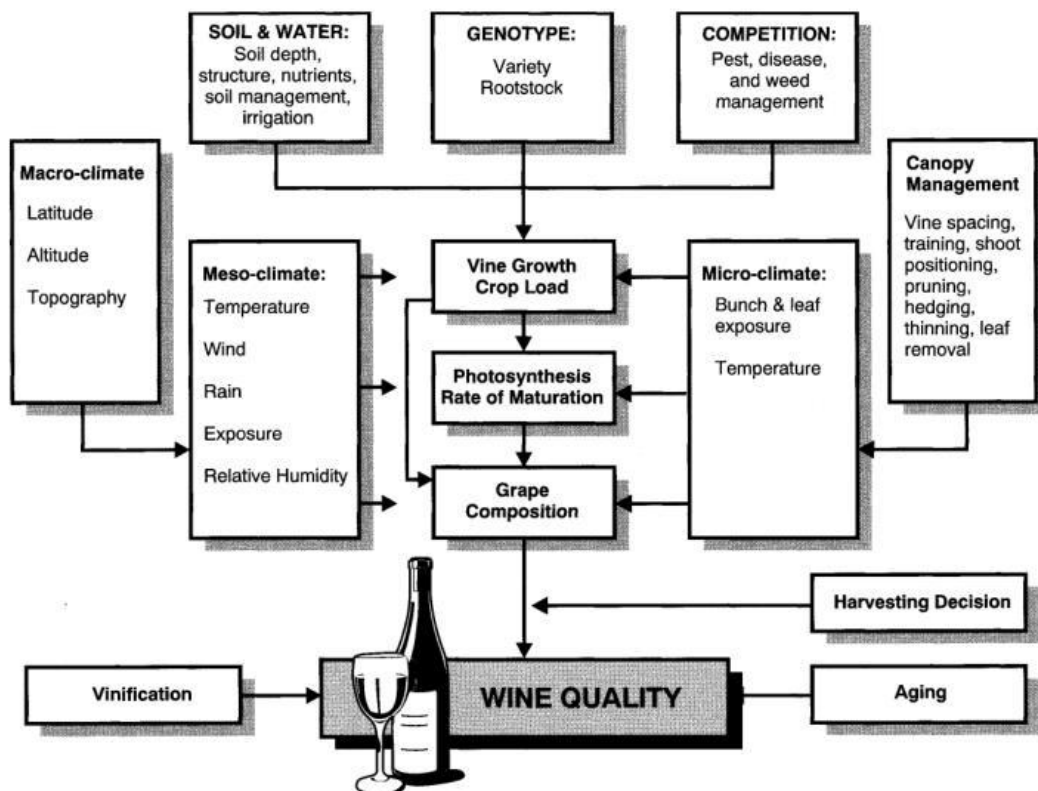
Είναι γνωστό ότι οι παράγοντες που αυξάνουν την απόδοση των πρέμων έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή χαμηλότερης ποιότητας σταφυλιών, με λιγότερο χρώμα και μικρότερο ποσοστό ταννινών. Στην περίπτωση των ερυθρών οίνων ειδικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση και συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, στην ουσία καθορίζουν την ποιότητά του και τη δυνατότητά του για παλαιώση. Οπότε, ο καθορισμός του φαινολικού δυναμικού των σταφυλιών είναι μεγάλης σημασίας (Arozarena et al, 2000).

Γενικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την φαινολική σύνθεση και ως εκ τούτου την ποιότητα των παραγόμενων σταφυλιών μπορούν να χωριστούν σε σταθερούς και μεταβλητούς παράγοντες. Στους σταθερούς παράγοντες ανήκουν η καλλιεργούμενη ποικιλία (επηρεάζει ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της), το χρησιμοποιούμενο υποκείμενο (επηρεάζει μέσω της ζωηρότητας που προσδίδει στο υπέργειο τμήμα του φυτού) η ηλικία του φυτού (η ηλικία είναι συνήθως ανάλογη της ποιότητας), το κλίμα (ως κατηγορία κλίματος π.χ. εύκρατο, ηπειρωτικό, τροπικό, θερμό, βόρειο κλπ) και το έδαφος (επίδραση στη ζωηρότητα του φυτού).

Στους μεταβλητούς παράγοντες ανήκουν οι καιρικές συνθήκες (θερμοκρασία, ηλιοφάνεια, υγρασία), οι αποστάσεις φύτευσης (επηρεάζουν μέσω της ζωηρότητας ή μη που προσδίδουν στο φυτό), οι καλλιεργητικές τεχνικές (λίπανση, κλάδευμα, πότισμα κ.α) και οι πιθανοί εχθροί και ασθένειες της αμπέλου (Σουφλερός, 2009).

Στο σχεδιάγραμμα της ακόλουθης εικόνας (εικόνα 16) απεικονίζονται όλοι οι παράγοντες που αλληλεπιδρούν στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, δηλαδή του

οίνου. Όπως φαίνεται, όλους τους παραπάνω παράγοντες συμπληρώνουν ο τρόπος οινοποίησης και παλαίωσης του οίνου.



Εικόνα 16: Περιβαλλοντικοί και αμπελοκομικοί παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση των σταφυλιών και την ποιότητα του παραγόμενου οίνου (Πηγή: Jackson and Lombard, 1993)

Από τους παραπάνω παράγοντες πολύ σημαντική είναι η συμβολή της άρδευσης, η οποία αποτελεί μια από τις εφαρμοζόμενες καλλιεργητικές τεχνικές. Η άρδευση, η οποία μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή, αναλύεται εκτενώς στην επόμενη ενότητα.

ii) Η σημασία της άρδευσης στη φαινολική σύνθεση των ραγών

Το νερό είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των πρέμνων, αφού είναι το μέσο με το οποίο τα θρεπτικά στοιχεία εισέρχονται διαμέσου των ριζών στα φυτικά όργανα. Τα πρέμνα έχουν ανάγκη ορισμένης ποσότητας νερού σε καθορισμένες περιόδους κατά τον ετήσιο κύκλο της βλάστησης. Η υδατική κατάσταση του πρέμνου επηρεάζει την σύσταση της ράγας (Roby et al., 2004).

Η επίδραση, από την άλλη, του υδατικού ελλείμματος στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος ευνοεί την ανάπτυξη των ριζών. Όταν μειωθεί το υδατικό δυναμικό στις ρίζες, τότε το ωσμωτικό τους δυναμικό προσαρμόζεται άμεσα στην νέα κατάσταση. Έτσι επέρχεται μερική αύξηση του όγκου των κυττάρων των ριζών και μείωση της σφριγηλότητας των κυτταρικών τους τοιχωμάτων. Οι μηχανισμοί αυτοί επιτρέπουν στο ριζικό σύστημα να συνεχίσει να αναπτύσσεται ακόμα και σε χαμηλό υδατικό δυναμικό. Αντιθέτως στα φύλλα η ρύθμιση του ωσμωτικού δυναμικού είναι αργή ενώ η χαλάρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων μειώνεται με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ανάπτυξη της φυλλικής επιφάνειας. Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τμημάτων των πρέμνων, οφείλεται στις διαφορετικές ζώνες ανάπτυξης τους. Η «απομόνωση» αυτή, λόγω του ηθμαγγειώδους συστήματος, προστατεύει τις ρίζες από το χαμηλό υδατικό δυναμικό εντός των ώριμων αγγείων του ξύλου και ευνοεί την ανάπτυξη των ριζών όταν βρεθούν σε υγρό έδαφος (Hsiao και Xu, 2000).

Η υδατική καταπόνηση έχει επιπτώσεις για το φυτό, η σοβαρότητα των οποίων εξαρτάται από το χρόνο εφαρμογής (ή το στάδιο ανάπτυξης των πρέμνων), τη διάρκεια και την ένταση του υδατικού ελλείμματος (Coombe, 1992; Ginestar et al, 1998; Ojeda et al, 2001; Deloire et al, 2003). Όταν επικρατούν συνθήκες υδατικού ελλείμματος μετά τον περκασμό τότε οι συνέπειες είναι πολύ μικρότερες συγκριτικά με το αν επικρατούσε πριν το στάδιο του περκασμού, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που παρουσιάζουν τα υπό ανάπτυξη άνθη και σταφυλές στο υδατικό έλλειμμα (Ginestar et al., 1998, Ojeda et al., 2001). Επίσης, στο στάδιο αυτό, επηρεάζει ελάχιστα την συσσώρευση των σακχάρων. Ωστόσο, όταν επικρατούν συνθήκες έλλειψης νερού κατά την περίοδο της κυτταρικής διαίρεσης, αλλά κυρίως κατά την περίοδο που παρατηρείται η επιμήκυνση των κυττάρων, τότε αναπτύσσονται μικρότερες ράγες (Roby et al., 2004).

Η άρδευση των πρέμων μπορεί να ελαχιστοποιήσει τις μειώσεις στη βλάστηση και στην ανάπτυξη των φυτών που σχετίζονται με το υδατικό stress, γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία των καλλιεργητικών πρακτικών στο αμπέλι για την εγγυημένη ποιότητα του παραγόμενου οίνου ή ακόμα και την επιβίωση των φυτών σε περιοχές που πλήττονται από εποχική ξηρασία (Chaves et al, 2007). Αρκετές αναφορές δείχνουν ότι οι υψηλές ποσότητες νερού δεν είναι απαραίτητες για την βέλτιστη απόδοση του φυτού για καλλιεργητικούς σκοπούς και ότι μέτρια υδατικά ελλείμματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς στην αμπελουργική παραγωγή μέσω του ελέγχου των φυσιολογικών λειτουργιών, και με αυτόν τον τρόπο να διατηρείται ή να βελτιώνεται η ποιότητα των παραγόμενων σταφυλιών (Chaves et al, 2007).

Στο στάδιο της ωρίμανσης των ραγών, ο βαθμός της επίδρασης της άρδευσης εξαρτάται από το βάθος του ριζικού συστήματος, την διαθέσιμη υγρασία του εδάφους και από τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής. Για παράδειγμα, αμπελώνες με βαθιά εδάφη και πρέμνα με εκτενή ριζικά συστήματα έχουν ικανοποιητική παραγωγή με απουσία ή με μικρό ποσοστό άρδευσης, δεδομένου ότι το έδαφος μπορεί να παρέχει ικανοποιητική υγρασία στο πρέμνο κατά την πορεία ανάπτυξης, ενώ η αναλογία των ριζικών τριχιδίων και η κατακόρυφη ανάπτυξη των ριζών αποτελούν τους κύριους παράγοντες που καθορίζουν την αντοχή των υποκειμένων στο υδατικό έλλειμμα (Coombe and Dry, 1992). Οι Coombe and Dry (1992), επισημαίνουν, εν συνεχεία, ότι η εφαρμογή μέτριας ή ελεγχόμενης υδατικής καταπόνησης κατά το στάδιο της ωρίμανσης των ραγών βελτιώνει την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το υδατικό έλλειμμα ελέγχει την βλαστική ανάπτυξη των πρέμων και προλαμβάνει την υπερβολική σκίαση και οψίμιση της παραγωγής.

Οι Chaves et al. (2007) υποστηρίζουν επίσης η επίδραση της άρδευσης στην ποιότητα μπορεί να συνδέεται με έναν περιορισμό της ζωηρότητας, η οποία οδηγεί σε μία αύξηση της έκθεσης της ζώνης των βοστρύχων στο ηλιακό φως ενώ οι Dry και Loveys (1998) υπογραμμίζουν ότι η υπερβολική ζωηρότητα οδηγεί στην παραγωγή προϊόντων χαμηλής ποιότητας.

Η καλλιέργεια των πρέμων υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης χρησιμοποιείται ως καλλιεργητική τεχνική που αποσκοπεί στην βελτίωση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών (Coombe et al., 1992, Wample, 2000, Van Leeuwen et al., 2003).

Μεταξύ των περιβαλλοντικών και των αμπελουργικών παραμέτρων που εξετάστηκαν κατά τις τελευταίες δεκαετίες για διάφορες ποικιλίες αμπέλου, είναι γνωστό ότι η υδατική κατάσταση είναι ένας πιθανός ρυθμιστής του δευτερογενούς μεταβολισμού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ράγας (Hardie and Considine, 1976; Mathews et al, 1987; McCarthy, 1997; Ojeda et al, 2001). Πολλά επιστημονικά άρθρα έχουν αναφερθεί εκτενώς στις επιπτώσεις του υδατικού ελλείμματος στη συσσώρευση των διαφόρων δευτερογενών μεταβολιτών των σταφυλιών (Εικόνα 17).

Variety	Compound	Effect of water deficit
<i>Aragonez (Tempranillo)</i>	Anthocyanins	Decreased concentration.
<i>Barbera</i>	Resveratrol	No effect.
<i>Cabernet Sauvignon</i>	<i>Trans</i> -piceid stilbene precursors	5-fold increase in concentration. Increased transcript abundance of genes involved in the biosynthesis of stilbene precursors and phenylpropanoid metabolism in general.
	Flavonols	Increased concentration in the skin and in the wine. No changes in seeds.
	Anthocyanins	Increased of concentration in the skin and in the wine. Increased expression of many genes responsible for their biosynthesis.
<i>Chardonnay</i>	Stilbene precursors	Increased concentration.
	Flavonols	Decreased transcript abundance of biosynthetic genes.
<i>Merlot</i>	Anthocyanins	Increased concentration and biosynthesis;
	Proanthocyanidins	Increased concentration in berry skin.
<i>Shiraz</i>	Anthocyanins	Increased concentration.

Εικόνα 17: Επίδραση του υδατικού ελλείμματος στον δευτερογενή μεταβολισμό των πρέμων διαφόρων ποικιλιών (Πηγή: Texeira et al, 2013)

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επίδραση της ελλειμματικής άρδευσης της αμπέλου στη συγκέντρωση των φαινολικών στις ράγες των σταφυλιών και στον οίνο που προκύπτει έχει δώσει ποικίλα αποτελέσματα. Πολλές πιθανές εξηγήσεις έχουν προταθεί για τη διακύμανση των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένου των διαφορών στις ποικιλίες (Chalmers et al, 2010; Bindon et al, 2011), στην τοποθεσία, στην εποχή, στη δειγματοληψία, στην ποιότητα του φωτός (Bindon et al, 2011), στην αναλυτική τεχνική (Bindon et al, 2008; Chalmers et al, 2010), καθώς και στις προσεγγίσεις του προγραμματισμού των αρδεύσεων, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε διάφορα επίπεδα υδατικής καταπόνησης (Koundouras et al., 2006).

Μελετώντας την επίδραση του υδατικού ελλείμματος, επίσης, αποδείχθηκε ότι είναι δύσκολη η μελέτη της, καθώς επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα των φυτικών διεργασιών, εκτός από τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων. Τέτοιες διεργασίες είναι το κλείσιμο των στοματίων, η μείωση της φωτοσύνθεσης και ως εκ τούτου η

συσσώρευση όλων των μεταβολιτών (Downey et al., 2006). Το υδατικό έλλειμμα μπορεί να επηρεάσει το βάρος των ραγών και την πυκνότητα του φυλλώματος, όπως επίσης, να μειώσει το ριζικό σύστημα και την ανάπτυξη των βλαστών (Jones, 1992) και έχει ως αποτέλεσμα τη γήρανση ορισμένων ιστών, αλλάζοντας έτσι κάποιες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού (Coombe, 1989) και το μέγεθος της έκθεσης του σταφυλιού εντός του φυτού. Ως εκ τούτου, είναι σαφές ότι δεν είναι δυνατόν να διερευνηθεί μεμονωμένα η επίδραση των επεμβάσεων της άρδευσης επί των αλλαγών της σύνθεσης των φαινολικών συστατικών στα σταφύλια.

Η εφαρμογή άρδευσης επιδρά με άμεσο και έμμεσο τρόπο στην φυσιολογία του πρέμνου και εξαρτάται από τη σχέση φυλλική επιφάνεια προς βάρος των ραγών (Lakso, 1992). Κατά άμεσο τρόπο επιδρά, επηρεάζοντας την ανάπτυξη και την πυκνότητα του φυλλώματος του πρέμνου μεταβάλλοντας έτσι τα χαρακτηριστικά του μικροκλίματος. Ο έμμεσος τρόπος έχει θετικά αποτελέσματα στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών λόγω της μείωσης του βάρους των ραγών ενώ η άμεση επίδραση στην βιοσύνθεση των φαινολικών μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική ανάλογα με τον τύπο του φαινολικού συστατικού, την περίοδο άρδευσης και το βαθμό του υδατικού ελλείμματος (Esteban et al., 2001, Ojeda et al., 2002).

Η υπερβολική άρδευση οδηγεί στην ανάπτυξη πλούσιας κόμης με αποτέλεσμα να δημιουργείται σκίαση στα σταφύλια, διαταράσσοντας τη λειτουργία της βιοσύνθεσης των ανθοκυανών, με συνέπεια τη μείωση του χρώματος των ραγών (Esteban et al, 2001; Ojeda et al, 2002). Εφαρμογή υπερβολικής άρδευσης λίγο πριν τον τρυγητό οδηγεί σε αραίωση των διαλυτών συστατικών (σάκχαρα, οξέα, ταννίνες, ανθοκυάνες) και σε σχίσιμο του φλοιού της ράγας (Conde et al, 2007).

Τα πρέμνα μπορούν να προσαρμοστούν στο υδατικό έλλειμμα αλλάζοντας τα μορφολογικά και ανατομικά τους χαρακτηριστικά. Παρατηρήσεις ερευνητικών εργασιών έδειξαν ότι, διαφοροποιείται η φυλλική επιφάνεια (Gómez et al., 2003) και η αγωγιμότητα των αγγείων του ξύλου (Lovisollo και Schubert, 1998). Η αύξηση της πυκνότητας των φυτικών ιστών αποτελεί μηχανισμό που καθιστά τα πρέμνα ικανά να μειώσουν την διαπνοή κατακρατώντας το νερό εντός του μεσόφυλλου. Έλλειψη ύδατος οδηγεί στη μείωση της φωτοσύνθεσης, του ρυθμού ανάπτυξης των διαφόρων οργάνων του πρέμνου και στον περιορισμό του μεγέθους των ραγών. Από την άλλη, προωθεί την σύνθεση των φαινολικών συστατικών ενώ ένα μέτριο υδατικό έλλειμμα αυξάνει τον ρυθμό ωρίμανσης εξαιτίας της μείωσης ανταγωνισμού μεταξύ των πόλων έλξης των θρεπτικών συστατικών και του μικρότερου όγκου των ραγών και

συνεπώς προωμίζει την παραγωγή. Επιπλέον, αυξάνεται η συγκέντρωση του αμιπισισικού οξέος (ABA), το οποίο ευνοεί την ωρίμανση των ραγών. Όμως σε έντονο υδατικό stress τα φυτά αδυνατούν να φωτοσυνθέσουν και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ωρίμανση των ραγών αδρανοποιούνται (Van Leeuwen et al, 2003).

Οι Roby et al. (2004) υποστηρίζουν ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων των ανθοκυανών και των ταννινών των φλοιών της ποικιλίας Cabernet sauvignon με την εφαρμογή υδατικού ελλείμματος οφείλεται πρωτίστως στην διαφοροποίηση του ρυθμού αύξησης του εσωτερικού μεσοκαρπίου και του φλοιού και δευτερευόντως σε κάποια άμεση διαφοροποίηση του μεταβολικού μονοπατιού της βιοσύνθεσης τους. Βέβαια, παρατήρησαν ότι σε ράγες ίδιου μεγέθους, οι οποίες δέχθηκαν διαφορετικό επίπεδο άρδευσης, εμφανίστηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανθοκυανών και ταννινών του φλοιού στις ράγες που είχαν το μεγαλύτερο υδατικό έλλειμμα. Ομοίως, οι Kennedy et al. (2002) διαπίστωσαν ότι η μικρή αύξηση των συγκεντρώσεων των ανθοκυανών, λόγω της αύξησης του υδατικού ελλείμματος, οφείλεται πρωτίστως στην αλλαγή του μεγέθους των ραγών και δευτερευόντως σε κάποια αλλαγή της βιοσύνθεσης τους.

Οι Castellarin et al. (2007b) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση των ανθοκυανών οφείλεται στην γραμμική έκφραση του γονιδίου UFGT και της συγκέντρωσης των μεταβολιτών, όταν από τον περκασμό και μετά επικρατήσουν συνθήκες υδατικού ελλείμματος. Άμεση συσχέτιση φαίνεται να έχουν και τα γονίδια CHS και F3H. Οι Koundouras et al. (2006) υποστηρίζουν ότι οι μεταβολές της συγκέντρωσης των ανθοκυανών οφείλονται πιθανότατα στην άμεση επίδραση του υδατικού ελλείμματος στην βιοσύνθεση των ανθοκυανών και μάλλον είναι ανεξάρτητη από την επίδραση της άρδευσης στο βάρος των ραγών.

Αντίθετα, οι Deloire et al. (2003), υποστηρίζουν ότι η υδατική κατάσταση των πρέμνων της ποικιλίας Grenache noir επηρεάζει στενά την βιοσύνθεση των ανθοκυανών και συγκεκριμένα το ήπιο με ισχυρό υδατικό έλλειμμα την ευνοεί. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις των Ojeda et al. (2002) η αύξηση της συγκεντρώσεως των ανθοκυανών με την μείωση του επιπέδου άρδευσης, φαίνεται να είναι ανεξάρτητη με την επίδραση του υδατικού ελλείμματος στο βάρος των ραγών. Οι παρατηρήσεις τους έδειξαν ότι η βιοσύνθεση των φλαβαν-3-ολών μειώθηκε όταν το υδατικό έλλειμμα εφαρμόστηκε στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των ραγών ενώ η βιοσύνθεση συγκεκριμένα, των προανθοκυανιδών και των ανθοκυανών αυξήθηκε μόνο όταν εφαρμόστηκε υδατικό έλλειμμα μετά τον περκασμό. Παρατήρησαν

επίσης, ότι ο λόγος βάρους φλοιών προς βάρους ραγών αυξάνεται με την αύξηση του υδατικού ελλείμματος. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η άρδευση δρα και με άμεσο και με έμμεσο τρόπο ως προς τη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών.

Οι Cortell et al. (2005) διαπίστωσαν ότι με την αύξηση της ζωηρότητας των πρέμων αυξάνεται η συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών (mg/ράγα) και των ταννινών του φλοιού των ραγών της ποικιλίας Pinot noir. Επίσης, η Cortell (2006) διαπίστωσε ότι στην ποικιλία Pinot noir, τα πρέμνα που ήταν πολύ ζωηρά είχαν χαμηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανών (mg/ράγα) ενώ οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών και η αναλογία των μονάδων της (-)-επιγαλλοκατεχίνης είχαν αυξημένες τιμές στα πρέμνα με περιορισμένη ζωηρότητα. Υπογραμμίζει, βέβαια ότι πρέπει να υπάρχει μια ισορροπία όσον αφορά την ζωηρότητα, δεδομένου ότι τα πρέμνα μέτριας ζωηρότητας είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις ανθοκυανών συγκριτικά με τα πρέμνα χαμηλής και υψηλής ζωηρότητας.

Από την μελέτη της επίδρασης της άρδευσης στο μικροκλίμα των βλαστών της ποικιλίας Moscatel, οι Pedreira dos Santos et al. (2007) συμπέραναν ότι στα πρέμνα που δεν αρδεύτηκαν, η θερμοκρασία των ραγών ήταν μεγαλύτερη από των πρέμων που είχαν πιο πυκνή κόμη, δηλαδή των πρέμων που δέχθηκαν κάποιο ποσοστό άρδευσης, γεγονός που επηρέαζε αρνητικά την συσσώρευση των φαινολικών σε πολύ ζεστά κλίματα.

Η χρονική στιγμή και η ένταση του υδατικού ελλείμματος κατά το στάδιο της πράσινης ράγας είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ράγας (Ollé et al, 2011). Είναι πιθανό ότι το υδατικό έλλειμμα που εφαρμόζεται από την άνθηση μέχρι τον περκασμό να μην επιδρά στην ανάκτηση του μεγέθους της ράγας (Ginestar et al, 1998;. Ojeda et al, 2001, 2002) και ότι, με τη μείωση της σπαργής των κυττάρων μπορεί να προκληθεί αύξηση των επιπέδων αμπισισικού οξέος (ABA), το οποίο με τη σειρά του θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την έκφραση των γονιδίων της οδού των ανθοκυανινών (Castellarin et al., 2007a). Αντίθετα, το υδατικό έλλειμμα που εφαρμόζεται από το τέλος της καρπόδεσης μέχρι τον περκασμό βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει μόνιμα το βάρος των ραγών της ποικιλίας Syrah, δεδομένου ότι η εφαρμογή της 100% της εξατμισοδιαπνοής μετά τον περκασμό επέτρεψε στις ράγες να ανακτήσουν τα ίδια βάρη όπως οι ράγες με κανονική λήψη ύδατος σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης (Ollé et al., 2011). Το υδατικό έλλειμμα μετά τον περκασμό είναι γνωστό ότι έχει μικρή μόνο επίπτωση στο βάρος της ράγας και κατά τη διάρκεια του μήνα πριν από τον τρυγητό, οι ράγες είναι ανθεκτικές στο υδατικό έλλειμμα

(McCarthy, 1999). Επίσης, βρέθηκε ότι το υδατικό stress πριν τον περκασμό αύξησε τη συσσώρευση όλων των ανθοκυανών μετά τον περκασμό, εκτός της μαλβιδίνης και όλων των κουμαρικών εστέρων των ανθοκυανών (Ollé et al., 2011).

Από την μελέτη της επίδρασης του νερού στη βιοσύνθεση των στιλβενίων στα σταφύλια, έχει διαπιστωθεί ότι το υδατικό έλλειμμα αυξάνει την έκφραση του γονιδίου STS και τον μεταβολισμό των φαινυλ-προπανοειδών γενικότερα. Η αύξηση του STS mRNA προκαλεί μια αύξηση στη συσσώρευση της ρεσβερατρόλης (Grimplet et al, 2007). Ωστόσο, αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σχετικά με τις επιπτώσεις της έλλειψης νερού στη σύνθεση της ρεσβερατρόλης. Σε έρευνα που διεξήχθη από τους Vezzuli et al (2007), παρατηρήθηκε μικρή επίδραση της ξηρασίας στις συγκεντρώσεις της ρεσβερατρόλης στους φλοιούς των ραγών. Σε μια άλλη μελέτη στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Chardonnay, που συγκομίστηκαν σε έξι και οκτώ εβδομάδες μετά τον περκασμό αντίστοιχα, οι Deluc et al (2011) απέδειξαν ότι το υδατικό έλλειμμα αύξησε τη συγκέντρωση της trans-ricoid (η γλυκοζυλιωμένη μορφή της ρεσβερατρόλης) κατά πέντε φορές στις ράγες του Cabernet Sauvignon, αλλά όχι στο Chardonnay. Ωστόσο, η αφθονία των δύο στιλβενικών παραγώγων, της trans-ricoid και της trans-ρεσβερατρόλης δεν ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των δύο ποικιλιών, όταν αρδεύονταν καλά. Παρομείως, το υδατικό έλλειμμα αύξησε σημαντικά την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των προδρόμων των στιλβενίων στην ποικιλία Cabernet Sauvignon. Αντιθέτως, η έκφραση των ίδιων γονιδίων μειώθηκε στην ποικιλία Chardonnay ως αποτέλεσμα του υδατικού ελλείμματος.

Επίσης, αυξημένη συγκέντρωση φλαβονολών, προανθοκυανιδινών που προέρχονται από το φλοιό και ανθοκυανινών έχει επίσης παρατηρηθεί σε κρασιά που προέρχονται από αμπέλια που καλλιεργούνται υπό κατάσταση μειωμένου ύδατος (Downey et al, 2006; Deluc et al, 2009). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των φλαβονολών αυξάνονται υπό stress ξηρασίας στη λευκή ποικιλία Chardonnay, αλλά όχι στην ερυθρή ποικιλία Cabernet Sauvignon (Deluc et al, 2009).

Όταν τα πρέμνα της ποικιλίας Aragonez (συνώνυμο της Tempranillo) υποβλήθηκαν σε τρεις επεμβάσεις άρδευσης (συμβατική παρατεταμένη ελλειμματική άρδευση (DI), κανονική ελλειμματική άρδευση (RDI) και μηδενική άρδευση (NI)), οι κύριες ενώσεις που επηρεάστηκαν από τη διαθεσιμότητα του νερού ήταν οι προανθοκυανιδίνες και οι φλαβονόλες που αυξήθηκαν με την άρδευση στο στάδιο του μεγέθους μπιζελιού της ράγας, στον περκασμό, στη μέση και στην πλήρη

ωρίμανση (Zarrouk et al, 2012). Οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανινών στην πλήρη ωρίμανση παρατηρήθηκε ότι είναι υψηλότερες στους φλοιούς των ραγών που ανήκουν στις επεμβάσεις DI και RDI παρά στην επέμβαση NI. Σε γενικές γραμμές, αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συσσώρευση των σακχάρων μεταξύ των επεμβάσεων άρδευσης, η μείωση στις παραμέτρους της ποιότητας στους φλοιούς των ραγών στην επέμβαση NI που παρατηρήθηκε, μπορεί να προκύπτει από την υψηλή θερμοκρασία και την υπερβολική έκθεση των σταφυλιών στο ηλιακό φως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI: Η ποικιλία Syrah και η περιοχή μελέτης

ι) Η ποικιλία Syrah

Η ποικιλία Syrah είναι μια έγχρωμη οινοποιήσιμη ποικιλία η οποία εικάζεται ότι προέρχεται από την πόλη Schiraz της Περσίας ή από τις Συρακούσες της Σικελίας χωρίς αυτό να είναι βέβαιο. Μετά από γενετικές μελέτες σε μοριακό επίπεδο, διαπιστώθηκε ότι είναι ένα φυσικό υβρίδιο, απόγονος των ποικιλιών Dureza και Mondeuse. Στην Ελλάδα καλλιεργείται στη Χαλκιδική (Σιθωνία) και δοκιμαστικά σ' άλλες περιοχές.

Οι σταφυλές είναι μετρίου μεγέθους, κυλινδρικές και οι ράγες μικρές, ωοειδείς με φλοιό κυανομέλανου χρωματισμού με άφθονη ανθηρότητα και γεύση ευχάριστη και γλυκιά. Είναι ποικιλία μέτριας ζωηρότητας και μικρής παραγωγικότητας. Χρησιμοποιείται σαν βελτιωτική ποικιλία λόγω των αρωματικών και φαινολικών χαρακτηριστικών της (Νικολάου, 2011).



Εικόνα 18: Σταφυλές της ποικιλίας Syrah
(Πηγή: <http://www.winecommanders.com>)

Πρόκειται για πολυδύναμη ερυθρή ποικιλία, η οποία δίνει ποικιλιακούς οίνους υψηλής ποιότητας, που χαρακτηρίζονται από έντονο, βαθύ ερυθρό χρώμα, πλούσιο σε σώμα, μεγάλη περιεκτικότητα σε ταννίνες, έντονα αρώματα, υψηλό αλκοολικό βαθμό και μέτρια οξύτητα (Σταυρακάκης, 2009). Επίσης παράγει κρασιά με γεμάτη γεύση-άρωμα με στοιχεία που θυμίζουν βιολέτες, σμέουρα και φραγκοστάφυλα και έχουν μια πιπεράτη επίγευση (Jackson, 2008). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι στο

γλεύκος της ποικιλίας Syrah περιέχονται πρόδρομες αρωματικές ουσίες (glucosyl-glucoses), που θεωρείται πως δε βρίσκονται στο γλεύκος άλλων ποικιλιών αμπέλου (Σταυρακάκης 2009).

Γενικά, οι οίνοι που δίνει είναι μακράς ζωής και βραδείας παλαίωσης. Σε περιπτώσεις μεγάλης παραγωγής χρειάζονται 10 – 20 χρόνια για να αποκτήσουν το βέλτιστο των ιδιοτήτων. Σε χρονιές με μικρότερη παραγωγή αρκούν 5 – 6 χρόνια για την παλαίωση. Συνοινοποιείται με επιτυχία τόσο με ερυθρές (Cabernet Sauvignon, Grenache, Mourverde, Sangiovese) όσο και με λευκές ποικιλίες (Viognier, Marsanne, Roussane) (Σταυρακάκης, 2009).

ii) Η περιοχή της μελέτης.

Ο αμπελώνας στον οποίο διεξήχθη το πείραμα βρίσκεται στο Κτήμα Γεροβασιλείου στην Επανομή. Η Επανομή βρίσκεται 25 χλμ νοτιοανατολικά της Θεσσαλονίκης. Διοικητικά ανήκει στο Δήμο Θερμαϊκού και στο νομό Θεσσαλονίκης, αποτελώντας παραθαλάσσιο προάστιό της (Πηγή: <http://www.gerovassiliou.gr>).

Ο ιδιόκτητος ενιαίος αμπελώνας του Κτήματος Γεροβασιλείου εκτείνεται σε 560 στρέμματα. Το κλίμα της περιοχής της Επανομής χαρακτηρίζεται μεσογειακό, με ήπιους χειμώνες και θερμά καλοκαίρια, που μετριάζονται από τις θαλάσσιες αύρες. Ο αμπελώνας γειτνιάζει στις τρεις πλευρές με τη θάλασσα σε απόσταση τριών περίπου χιλιομέτρων, ενώ από τη δυτική του πλευρά είναι ορατός ο Θερμαϊκός Κόλπος και ο ορεινός όγκος του Ολύμπου με τις ακτές της Πιερίας. Το έδαφος είναι κυρίως αμμώδες με κάποια πηλώδη υποστρώματα και ασβεστολιθικά πετρώματα. Είναι πλούσιο σε θαλασσινά απολιθώματα, καθώς όλη η γύρω λοφώδης έκταση σχηματίστηκε από προσχώσεις της θαλάσσιας περιοχής.



Εικόνα 19: Ο ιδιόκτητος αμπελώνας του Κτήματος Γεροβασιλείου.

Μέρος II: Υλικά & Μέθοδοι – Αποτελέσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I: Το πείραμα

Το πείραμα διεξήχθη με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της άρδευσης στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στους φλοιούς των ραγών της ποικιλίας Syrah για το έτος 2012. Το νερό είναι ο βασικότερος παράγοντας που καθορίζει την κατεύθυνση που πρόκειται να πάρει η καλλιέργεια. Υψηλές δόσεις άρδευσης οδηγούν σε υψηλή παραγωγή, ενώ οι χαμηλές δόσεις οδηγούν σε μικρότερη παραγωγή, αλλά προς την κατεύθυνση της ποιότητας.

Ο αμπελώνας στον οποίο έλαβε χώρα το πείραμα βρίσκεται στο Κτήμα Γεροβασιλείου στην Επανομή και είναι ηλικίας 15 χρονών. Τα πρέμνα είναι διαμορφωμένα με γραμμικό σύστημα υποστύλωσης (αμφίπλευρο Royat). Ο αριθμός των βραχιόνων είναι 12 ανά πρέμνο και εφαρμόζεται βραχύ κλάδεμα καρποφορίας. Οι αποστάσεις φύτευσης των πρέμνων είναι 1 x 2,4 m και είναι εμβολιασμένα στο υποκείμενο 1103 Paulsen (Berlandieri Resseguer No2 X Rupestris du Lot). Ο αμπελώνας βρίσκεται σε υψόμετρο 150 μέτρων και το έδαφος είναι βαθύ εύφορο (44% άμμο, 31% ιλύς και 25% άργιλος).

Το πείραμα ήταν ρυθμισμένο σε ένα 3x3x4 πειραματικό σχέδιο. Εφαρμόστηκαν 3 επεμβάσεις ποτίσματος από την έναρξη της ωρίμανσης έως τον τρυγητό. Η πλήρης άρδευση (FI): 100% της εξατμισοδιαπνοής της καλλιέργειας (ETc), η μέτρια άρδευση (DI): 50% της εξατμισοδιαπνοής και η μηδενική άρδευση (NI). Για κάθε επέμβαση ποτίσματος ελήφθησαν 3 δείγματα (επαναλήψεις) σε 4 χρονικές στιγμές, την 196^η, την 211^η, την 225^η και την 236^η μέρα του έτους (Day Of the Year / DOY) αντίστοιχα. Έτσι προέκυψαν 36 συνολικά δείγματα τα οποία παρουσιάζονται κωδικοποιημένα στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Η κωδικοποίηση των 36 δειγμάτων

	Δειγματοληψίες			
Επεμβάσεις	1 ^η (doy 196)	2 ^η (doy 211)	3 ^η (doy 225)	4 ^η (doy 236)
FI (Full irrigation)	FI ₁ (1)	FI ₁ (2)	FI ₁ (3)	FI ₁ (4)
	FI ₂ (1)	FI ₂ (2)	FI ₂ (3)	FI ₂ (4)
	FI ₃ (1)	FI ₃ (2)	FI ₃ (3)	FI ₃ (4)
DI (deficit irrigation)	DI ₁ (1)	DI ₁ (2)	DI ₁ (3)	DI ₁ (4)
	DI ₂ (1)	DI ₂ (2)	DI ₂ (3)	DI ₂ (4)
	DI ₃ (1)	DI ₃ (2)	DI ₃ (3)	DI ₃ (4)
NI (Non-irrigated)	NI ₁ (1)	NI ₁ (2)	NI ₁ (3)	NI ₁ (4)
	NI ₂ (1)	NI ₂ (2)	NI ₂ (3)	NI ₂ (4)
	NI ₃ (1)	NI ₃ (2)	NI ₃ (3)	NI ₃ (4)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: Μετρήσεις και αναλύσεις

i) Αναλύσεις σε ράγες

1) Μεταβολή του βάρους των ραγών

Για τη μέτρηση του βάρους των ραγών και των μερών τους, δείγμα 100 ραγών ζυγίζεται και ακολουθεί αποφλοιώση των ραγών. Στη συνέχεια λαμβάνεται το βάρος των φλοιών και των γιγάρτων. Οι μετρήσεις γίνονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας.

Επιπλέον, υπολογίζονται τα επί τοις εκατό (%) ποσοστά των:

- ✓ Φλοιών/ράγα
- ✓ Γιγάρτων/ράγα
- ✓ Φλοιών/Σάρκα

2) Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Pand et al (1996, 2000).

Για την πραγματοποίηση της μεθόδου αυτής, λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα από 50 ράγες, οι οποίες αφού ζυγισθούν, ομογενοποιούνται με τη χρήση Ultra Turrax T25. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται στις 24.000rpm έως ότου επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός πολτοποίησης. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα. Ο χρόνος πολτοποίησης επίσης παραμένει ο ίδιος για όλα τα δείγματα. Στην συνέχεια το ομογενοποιημένο δείγμα φυλάσσεται σε πλαστικούς περιέκτες.

Η μέθοδος βασίζεται στην εξαγωγή ολικών ανθοκυανών και φαινολικών σε ομογενοποιημένο δείγμα, έκφραση του χρώματός τους σε χαμηλό pH και ποσοτικοποίηση του ποσοστού τους μέσω της απορρόφησης τους στην ορατή περιοχή του φάσματος του φωτός.

Για την εξαγωγή των ανθοκυανών χρησιμοποιείται 50 % υδατικό διάλυμα αιθανόλης με pH 2 έτσι ώστε με εκχύλιση που διαρκεί 1 ώρα να εξάγεται το 94% των ανθοκυανών του δείγματος. Ο γλυκοζίτης της μαλβιδίνης θεωρείται η ανθοκυάνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στις ράγες των *Vitis vinifera* ποικιλιών. Αν και δεν είναι η μοναδική ανθοκυάνη τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράζονται σε ισοδύναμο μαλβιδίνης για συγκριτικούς σκοπούς.

Όταν η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται και στα 280 nm τότε υπάρχει μέτρηση και των ολικών φαινολικών του δείγματος. 1g πολτοποιημένου δείγματος μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 10mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50% v/v, pH 2.0 με HCl) και αφήνεται 1h για εκχύλιση, υπό ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 min, λαβάνεται 0,5mL και αραιώνεται με 10mL υδατικού διαλύματος 1M HCl και μετά το πέρας 3 ωρών λαμβάνονται οι οπτικές πυκνότητες στα 700, 520, 280 nm. Η πρώτη απορρόφηση λαμβάνεται προκειμένου για την εξασφάλιση αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων (όταν 700nm>0,01 τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο).

Οι τιμές των απορροφήσεων στα 520nm και στα 280 nm χρησιμοποιούνται στους τύπους:

$$\text{Ανθοκυάνες mg/ράγα} = \frac{A_{520}}{500} * \text{αραιώση} * \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (mg)}}{100} *$$

Βάρος 50 ραγών (g)	*1000
Βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)	50

$$\text{Ανθοκυάνες / g ράγας} = \frac{\text{ανθοκυάνες mg / ράγα}}{\text{βάρος 50 ραγών / 50}}$$

Ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα (μονάδες απορρόφησης (au)/ράγα) :

$$= A_{280} \times \text{αραιώση} \times \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (ml)}}{100} \times \frac{\text{βάρος 50 ραγών}}{\text{βάρος δείγματος που εκχυλίστηκε (g)}} \times \frac{1}{50}$$

Ολικά φαινολικά συστατικά ανά γραμμάριο ράγας (μονάδες απορρόφησης (au)/g ράγας) :

$$= \frac{\text{Ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα (μονάδες απορρόφησης (au))}}{\text{μέσο βάρος 50 ραγών (g)}}$$

ii) Αναλύσεις σε φλοιούς ραγών – προσδιορισμός των ανθοκυανών με HPLC

Αντιπροσωπευτικό δείγμα 100 ραγών διαχωρίζεται σε φλοιούς και γίγαρτα. Οι φλοιοί αφού εκπλυθούν με απεσταγμένο νερό, ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε κατάψυξη. Στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση επί 1 ημέρα. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα φλοιών αλέθονται και σε 0,5 g της σκόνης που προκύπτει, προστίθεται 20ml διαλύματος οξινισμένης μεθανόλης 0,1% HCL. Η εκχύλιση πραγματοποιείται για 2 ημέρες σε shaker, στους 20° C και το εκχύλισμα λαμβάνεται σταδιακά μετά από φυγοκεντρίσεις στις 9000rpm, στους 20° C για 15 min, στις 4, 18 και 24 h, αφού προστίθεται κάθε φορά στο στερεό υπόλειμμα 10ml μεθανόλης 0,1% HCL. Από το εκχύλισμα που συλλέγεται λαμβάνονται 5μL, φιλτράρονται από φίλτρο 0,2μm και χρησιμοποιούνται για HPLC ανάλυση με το πρόγραμμα προσδιορισμού ανθοκυανών.

Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από μια αντλία Jasco PU-980, στήλη Nova-Pack C18, 4 μm, διαστάσεων 47,6x250mm και έναν ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού. Η ανάλυση εκτελέστηκε με ρυθμό ροής 1 ml/min, με όγκο δείγματος 5 μL, στα 520 nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης (Kallithraka et al, 2005): 95% διαλύτης A για 1 min, μετά από 95% σε 50% μέσα σε 26 min, από 50% σε 5% σε 29 min, όπου και διατηρήθηκε ισοκρατικά για επιπλέον 3 min και τέλος σε 95% στα 38 min όπου και παρέμεινε μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Ο διαλύτης A ήταν 10% (v/v) φορμικό οξύ και ο διαλύτης B ήταν μεθανόλη. Η ταυτοποίηση της μαλβιδίνης βασίζεται στην σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυφές των πρότυπης ουσίας σε (UV) Vis on-line spectral data. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα μαλβιδίνης γνωστών συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα μαλβιδίνης σε mg malvidin / g νωπού βάρους φλοιών.

iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών

Για τις αναλύσεις αυτές, αντιπροσωπευτικό δείγμα 100 ραγών αποφλοιώνεται. Οι φλοιοί αφού εκπλυθούν με απεσταγμένο νερό, ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε κατάψυξη. Στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση επί 1 ημέρα. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα φλοιών αλέθονται και 3 g από τη σκόνη που προκύπτει εκχυλίζονται με 25ml διαλύματος ακετόνης – νερού (80 / 20), σε shaker, στους 25° C επί 4 h. Στη

συνέχεια και μετά τη φυγοκέντριση στις 9000rpm, για 15 min, λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και το στερεό υπόλειμμα, αφού προστεθούν 25ml διαλύματος μεθανόλης - νερού (60 / 40), εκχυλίζεται για 2,5 h. Αφού φυγοκεντριθεί το νέο εκχύλισμα στις ίδιες συνθήκες, συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα στο ίδιο μέσο με το πρώτο εκχύλισμα και φυλάσσεται σε κατάψυξη. Τα εκχυλίσματα αυτά στη συνέχεια συμπυκνώνονται υπό κενό στους 40°C σε Rotary Evaporator και στη συνέχεια λυοφιλιώνονται. Από την τελική σκόνη δημιουργούνται διαλύματα φλοιών με συγκέντρωση 5 g/L και σε model wine. Τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των μεθόδων που αναφέρονται παρακάτω.

1) Ολικές ταννίνες με τη μέθοδο του βρασμού (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των προανθοκυανιδινών να μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες σε όξινο μέσο στους 100° C (Ribereau-Gayon & Stonestreet, 1966). Για την πραγματοποίηση της μεθόδου το εκχύλισμα φυγοκεντρείται και αραιώνεται 1/10 με H₂O. Σε απλό δοκιμαστικό σωλήνα φέρονται 2ml αραιωμένου εκχυλίσματος, 1ml H₂O και 3ml πυκνού HCL 37%. Σε πλαστικό σωλήνα εφοδιασμένο με πώμα φέρονται 2ml αραιωμένου εκχυλίσματος, 1ml H₂O και 3ml πυκνού HCL 37%. Ο πλαστικός σωλήνας παραμένει σε βρασμό για 45min. Αφού ψυχθεί προστίθεται και στους δύο 500μL αιθανόλης 95% για σταθεροποίηση του χρώματος. Αφού μετρηθούν οι οπτικές πυκνότητες και των δύο στα 550 nm η σχέση που δίνει την ποσότητα των ταννινών του δείγματος είναι: **ταννίνες (g / L) = (d₂ - d₁) * 3,87**, όπου:

d₁ = απορρόφηση στα 550 nm χωρίς θέρμανση

d₂ = απορρόφηση στα 550 nm με θέρμανση

2) Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στους οίνους ή τα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάζεται διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης ελεύθερης ρίζας DPPH, σε μεθανόλη (25 mg/L). Σε 25 μL του δείγματος προστίθενται 975 μL DPPH και μετράται η απορρόφηση στα 515nm (t=0). Τα διαλύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min., και μετράται η απορρόφηση στα 515 nm με

λάμπα αλογόνου. Από τις δυο απορροφήσεις υπολογίζεται η επί τοις εκατό (%) διάφορα από τον τύπο:

$$\% \Delta A(515) = \frac{(A0) - (A30)}{A0} \times 100$$

Μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς που δημιουργήθηκε με trolox εκφράζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα σε mg/ L trolox. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mmol Trolox / g νωπού βάρους φλοιών.

3) Αντιοξειδωτική ικανότητα ανθοκυανών με DPPH

Η μέθοδος DPPH εφαρμόστηκε και στα εκχυλίσματα που προέκυψαν για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC.

4) Μέθοδος εκτίμησης των φλαβονολών και προανθοκυανιδινών με τη χρήση του αντιδραστηρίου DMAC

Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, αρχικά προετοιμάζεται το αντιδραστήριο DMAC (2%) με προσθήκη 2 g DMAC σε 100 ml διαλύματος 1/1 μεθανόλης (MeOH) και 6N H₂SO₄. Το αντιδραστήριο διατηρείται μόνο για 1 ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, λαμβάνεται δείγμα εκχυλίσματος φλοιών και αραιώνεται 1/20 με μεθανόλη MeOH. Λαμβάνονται 40μL αραιωμένου διαλύματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται 4,7ml MeOH και 200 μL αντιδραστηρίου DMAC, πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία, σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 640nm, με λάμπα αλογόνου και πλαστικές κυψελίδες. Για το κάθε δείγμα θα πρέπει να ετοιμάζεται και ένα διάλυμα ως δείγμα αναφοράς για τον μηδενισμό του φωτόμετρου, για το οποίο λαμβάνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα 40μL αραιωμένου διαλύματος του δείγματος στο οποίο προστίθενται 4,9 ml MeOH, πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία, σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Στη συνέχεια μηδενίζεται η ένδειξη του φωτόμετρου 640nm, πριν την μέτρηση του δείγματος. Μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς που δημιουργήθηκε με κατεχίνη εκφράζεται η συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών σε mg / L κατεχίνης. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg catechin / g νωπού βάρους φλοιών.

5) Μέτρηση της συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο Harbertson (BSA)

Η μέθοδος αυτή περιγράφεται από τους Harbertson et. al (2002). Η μεθοδολογία της ανάλυσης των ταννινών των ραγών και του οίνου στηρίζεται στην ταυτόχρονη καθίζηση του BSA (πρωτεϊνικού διαλύματος) και του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση, το οποίο συμμετέχει στην υδρόλυση των φωφορικών εστέρων. Ο βαθμός της δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης, που συμμετέχει στην αντίδραση, φαίνεται να είναι ανάλογος του ποσοστού των ταννινών που εμπεριέχει το εκάστοτε δείγμα. Συνεπώς, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ταννινών σε ένα άγνωστο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα μέσω του προσδιορισμού της δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης.

Για την εφαρμογή της μεθόδου, λαμβάνονται 500μl αραιωμένου δείγματος σε erppendorf και 1ml πρωτεϊνικού διαλύματος BSA, γίνεται ήπια ανάδευση για 15min και φυγοκεντρούνται για 10min στις 12000rpm υπό ψύξη. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 250μl πρωτεϊνικού διαλύματος A, όπου φυγοκεντρούνται ξανά για 5min. Στο ίζημα προστίθενται 875μl διαλύματος TEA-SDS και αφήνεται σε ηρεμία για 10min. Μετά αναδεύεται σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα. Αφού παραμείνει πάλι για 10min, μετριέται η απορρόφηση στα 510nm (A1). Τέλος, προστίθενται 125μl διαλύματος FeCl₃ και μετά από 10min μετράται ξανά η απορρόφηση (A2).

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων υπολογίζεται η διαφορά των απορροφήσεων $A = A2 - A1$. Στη συνέχεια, από την καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη διαφορά των απορροφήσεων (C1). Η τελική συγκέντρωση ταννινών είναι $C = C1 * \text{αραίωση mg/L}$ δείγματος.

6) Ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu

Για την εφαρμογή της μεθόδου, σε ογκομετρική φιάλη των 10ml προστίθεται εκχύλισμα ταννινών (100μL), 0,5mL Folin-Ciocalteu και 1,5mL Na₂CO₃ 20% και συμπληρώνεται με H₂O. Μετά από παραμονή 30min μετράται η απορρόφηση στα 765nm (μηδενισμός με Blank: 0,5mL Folin-Ciocalteu και 1,5mL Na₂CO₃ 20%).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών γίνεται μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος επί την αραιώση (Ολικά φαινολικά = C x αραιώση mg/L γαλλικού οξέος). Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg/g νωπού βάρους.

iv) Προσδιορισμός ολιγομερών και πολυμερών ταννινών σε φλοιούς με ανάλυση HPLC

Για τον προσδιορισμό αυτόν, απομονώνονται οι φλοιοί από αντιπροσωπευτικό δείγμα 100 ραγών και αφού εκπλυθούν με απεσταγμένο νερό, ζυγίζονται και αποθηκεύονται σε κατάψυξη. Στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση επί 1 ημέρα. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα των φλοιών αλέθονται και 3 g από τη σκόνη που προκύπτει εκχυλίζονται με 25ml διαλύματος ακετόνης – νερού (80 / 20), σε shaker, στους 25° C επί 4 h. Στη συνέχεια και μετά τη φυγοκέντριση στις 9000rpm, για 15 min, λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα σε vial και στο στερεό υπόλειμμα, αφού προστεθούν 25ml διαλύματος μεθανόλης - νερού (60 / 40), εκχυλίζεται για 2,5 h. Αφού φυγοκεντρηθεί το νέο εκχύλισμα στις ίδιες συνθήκες, συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα στο ίδιο vial με το πρώτο εκχύλισμα και φυλάσσεται σε κατάψυξη. Τα εκχυλίσματα αυτά στη συνέχεια συμπυκνώνονται υπό κενό στους 35°C σε Rotary Evaporator και στη συνέχεια λυοφιλιώνονται.

Από τη σκόνη που προκύπτει μετά την λυοφιλίωση λαμβάνονται 500mg σε vial και ακολουθείται η ίδια διαδικασία: Στο vial προστίθενται 10 ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης 5%. Το δείγμα αναδεύεται σε vortex για 30sec και στη συνέχεια προστίθενται 10ml χλωροφόρμιο. Μετά την προσθήκη το διάλυμα φυγοκεντρείται, στις 4000rpm για 5min, αφού αναδευθεί σε vortex για 30sec. Μετά την φυγοκέντριση λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα (η πρώτη από 2 διακριτές φάσεις του διαλύματος) σε νέο vial και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία στο εναπομείναν διάλυμα άλλες 2 φορές. Η προσθήκη του χλωροφορμίου

πραγματοποιείται για την απομάκρυνση του λιπόφιλου μέρους του δείγματος. Στο νέο διάλυμα που προκύπτει μετά τις τρεις επαναλήψεις με προσθήκη χλωροφορμίου, προστίθενται 10mL ethyl acetate, ακολουθεί ανάδευση σε vortex για 30sec και στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (οργανική φάση και υδατική φάση), από όπου λαμβάνεται η υπερκείμενη οργανική φάση σε νέο vial και στην εναπομείναν επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 2 φορές. Η χρήση του ethyl acetate γίνεται για την λήψη μικρού μοριακού βάρους προανθοκυανιδών (ολιγομερών ταννινών) στην οργανική φάση. Η οργανική φάση περιέχει κυρίως ολιγομερή ενώ η υδατική φάση περιέχει πολυμερή. Στην συνέχεια το εκχύλισμα ολιγομερών ταννινών συμπυκνώνεται σε Rotary evaporator με την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη και λυοφιλιώνεται επί 2 ημέρες.

Στη σκόνη που προκύπτει από την λυοφιλίωση αφού προστεθεί μεθανόλη MeOH δημιουργείται για κάθε δείγμα φλοιών διάλυμα με συγκέντρωση 10 g/L. Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιείται για ανάλυση HPLC είναι 50μL αφού φιλτραριστούν με φίλτρο 0,2μm. Ο εξοπλισμός της HPLC αποτελείται από μια αντλία Jasco PU-980, στήλη Lichrospher, RP-18, διαστάσεων 250 x 4,5μm και έναν ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

- ✓ Διαλύτης A: 1ml/L orthophosphoric acid (ορθοφωσφορικό οξύ) σε HPLC H₂O
- ✓ Διαλύτης B: διαλύτης A / MeCN (ακετονιτρίλιο) σε αναλογία 6/4

Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με την χρήση πρότυπων ουσιών (κατεχίνης, επικατεχίνης, γαλλικής επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης, επιγαλλοκατεχίνης, B1, B2, C1, A2 γαλλικού οξέος,), σε γνωστές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ουσίας / g νωπού βάρους φλοιών. Η ανάλυση εκτελέστηκε με όγκο δείγματος 50 μL, στα 280 nm και 360nm και με το ακόλουθο πρόγραμμα έκλουσης:

Time	A	B
0	100	0
20	100	0
100	60	40
110	60	40
130	30	70
140	30	70
145	0	100
153	0	100
156	100	0

Η ταυτοποίηση των φαινολικών βασίζεται στην σύγκριση των τιμών κατακράτησης των κορυφών που προσδιορίστηκαν με τις κορυφές των πρότυπων ουσιών στα 280nm για το γαλλικό οξύ, κατεχίνη, επικατεχίνη, B1, B2, C1, A2 και γαλλικούς εστέρες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω των πρότυπων καμπυλών.

ν) Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (one – way ANOVA) με το στατιστικό πακέτο Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) έχοντας ως παράγοντα την επέμβαση «πότισμα». Το Tukey's HSD (honest significant difference) test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των δειγμάτων, όταν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μετά τη εφαρμογή ANOVA ($p < 0.05$) στα αποτελέσματα των αναλύσεων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ: Αποτελέσματα και Συζήτηση

i) Αναλύσεις σε ράγες

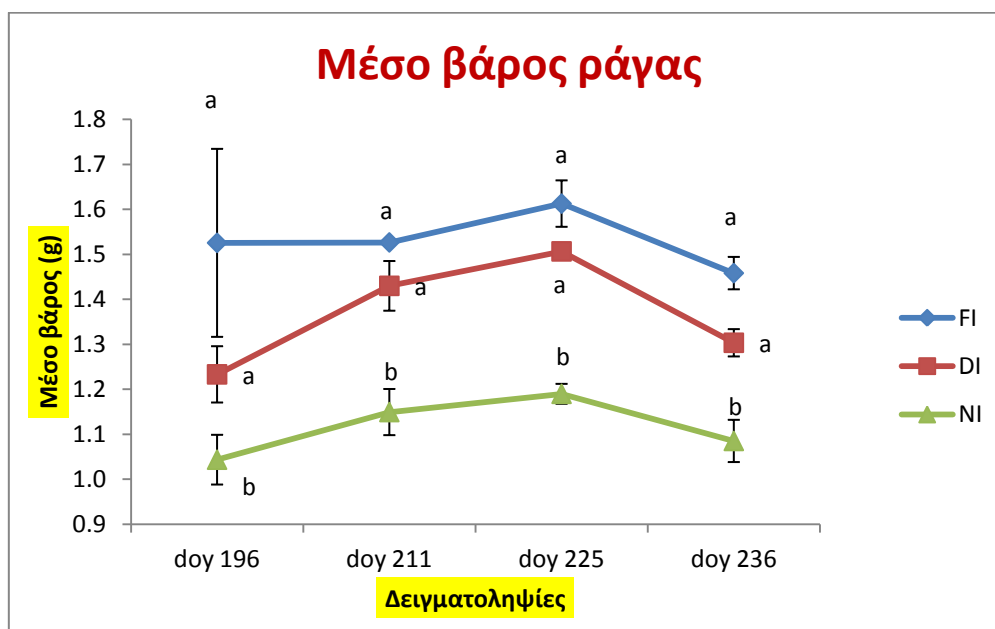
1) Μεταβολές στα βάρη των ραγών

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας (Πίνακας 2) με τα αποτελέσματα της μεταβολής του βάρους των ραγών καθώς και των επί τοις εκατό (%) ποσοστών γιγάρτων/ράγα, φλοιού/ράγα και φλοιού/σάρκα. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων για κάθε δειγματοληψία (1^η= doy 196, 2^η= doy 211, 3^η= doy 225, 4^η= doy 236).

Πίνακας 2: Οι μετρήσεις του βάρους (g) και των αντίστοιχων ποσοστών

	Επεμβάσεις ποτίσματος			N
	Μέσο βάρος ράγας (g)			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
doy 196	1,53±0,21 a	1,23±0,06 a	1,04±0,06 b	3
doy 211	1,53±0,01 a	1,43±0,06 a	1,15±0,05 b	3
doy 225	1,61±0,05 a	1,51±0,02 a	1,19±0,02 b	3
doy 236	1,46±0,04 a	1,30±0,03 a	1,09±0,05 b	3
	% γιγάρτων ανά ράγα			
doy 196	5,64±0,08 b	5,97±0,24 a,b	6,48±0,13 a	3
doy 211	4,83±0,07 a,b	4,41±0,16 b	5,67±0,31 a	3
doy 225	4,19±0,14 a	4,56±0,12 a	5,08±0,48 a	3
doy 236	4,45±0,10 b	4,38±0,29 b	5,35±0,16 a	3
	% φλοιού ανά ράγα			
doy 196	8,85±0,47 b	9,72±0,66 a	10,13±1,09 a	3
doy 211	12,29±0,58 a	11,41±0,31 a	12,14±0,34 a	3
doy 225	11,40±0,73 a	11,23±0,81 a	10,25±1,40 a	3
doy 236	9,59±1,80 b	14,13±1,48 a	15,07±1,48 a	3
	% φλοιού/σάρκα			
doy 196	10,38±1,17 a	11,61±1,15 a	12,28±1,78 a	3
doy 211	14,84±0,78 a	13,55±0,44 a	14,78±0,53 a	3
doy 225	13,53±0,98 a	13,36±1,10 a	12,14±1,79 a	3
doy 236	11,26±1,39 b	17,41±1,08 a	19,03±1,21 a	3
Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, p< 0,05), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη				

Όπως παρατηρείται, στην περίπτωση της απουσίας άρδευσης, οι ράγες έχουν μικρότερο βάρος σε σχέση με τις ράγες των πρέμνων που δέχτηκαν κάποιο επίπεδο άρδευσης. Τα πρέμνα που δέχτηκαν μηδενική άρδευση (NI) έδωσαν σταφυλές, των οποίων οι ράγες εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές βάρους. Αντίστοιχα, τα πρέμνα που δέχτηκαν 50% άρδευση (DI) έδωσαν ράγες με μεγαλύτερη τιμή βάρους από την επέμβαση NI. Τέλος, τα πρέμνα που δέχτηκαν 100% άρδευση (FI) εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές βάρους. Οι διαφορές μεταξύ της μηδενικής άρδευσης (NI) και των άλλων δύο επεμβάσεων είναι στατιστικά σημαντικές ενώ οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων 50% άρδευση (DI) και 100% άρδευση (FI) δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζονται και στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Μέσο βάρος ράγας

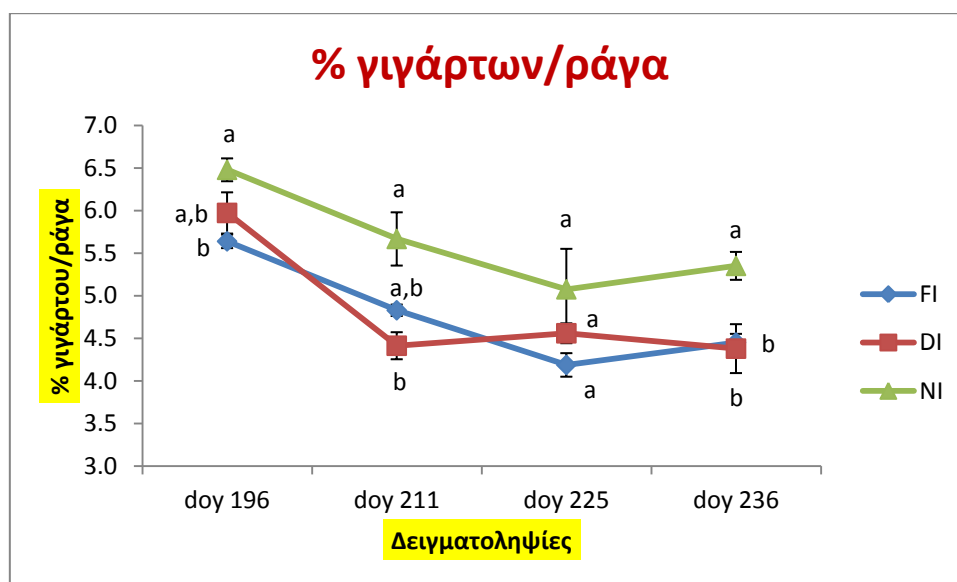
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι με αύξηση του επιπέδου άρδευσης τα πρέμνα δίνουν σταφυλές με μεγαλύτερες τιμές βάρους ραγών με διαφοροποιήσεις στατιστικά σημαντικές. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η έρευνα των Koundouras et al. (2009) στην ποικιλία Cabernet sauvignon, στην οποία διαπιστώθηκε ότι η άρδευση επηρεάζει ισχυρά το μέγεθος των ραγών. Τα πρέμνα που δεν αρδεύτηκαν έδωσαν ράγες μικρότερου βάρους, σε σχέση με αυτά που δέχτηκαν κάποιο επίπεδο άρδευσης. Παρόμοια αύξηση του μεγέθους των ραγών διαπίστωσαν και οι Esteban et al. (2001) και οι Santesteban et al. (2011) στην ποικιλία

Tempranillo, οι Reynolds et al. (2005) στις *Vitis labrusca* ποικιλίες Concord και Niagara, οι McCarthy et al. (2000) και οι Ojeda et al. (2002) στην ποικιλία Shiraz, οι Peyrot des Gachons et al. (2005) στην ποικιλία Sauvignon blanc και οι Bucchetti et al. (2011) στις ράγες της ποικιλίας Merlot.

Αντιθέτως, σε παλαιότερη έρευνα των Koundouras et al. (2006), παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή ελλειμματικής άρδευσης δεν επηρέασε ιδιαίτερα το βάρος των ραγών της ποικιλίας «Αγιωργίτικο». Επίσης, οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι το μέγεθος των ραγών δεν επηρεάζεται τόσο από την εφαρμοζόμενη άρδευση, όσο από το χρόνο εφαρμογής της. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Goodwin and Jerie, (1989), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της εφαρμογής ελλειμματικής άρδευσης επί της ποικιλίας Chardonnay.

Οι Ojeda et al. (2001) υποστηρίζουν ότι η μείωση του βάρους των ραγών λόγω της μείωσης του διαθέσιμου νερού δεν οφείλεται στην μείωση της κυτταρικής διαίρεσης αλλά στην μείωση του μεγέθους του περικαρπίου. Υπογραμμίζουν επίσης, ότι η μείωση του όγκου των κυττάρων είναι μη αναστρέψιμη ακόμα και αν τα πρέμνα αρδευτούν στο στάδιο της ωρίμανσης.

Τα αποτελέσματα της μεταβολής του επί τοις εκατό (%) ποσοστού γιγάρτων προς ράγα φαίνονται στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 2).



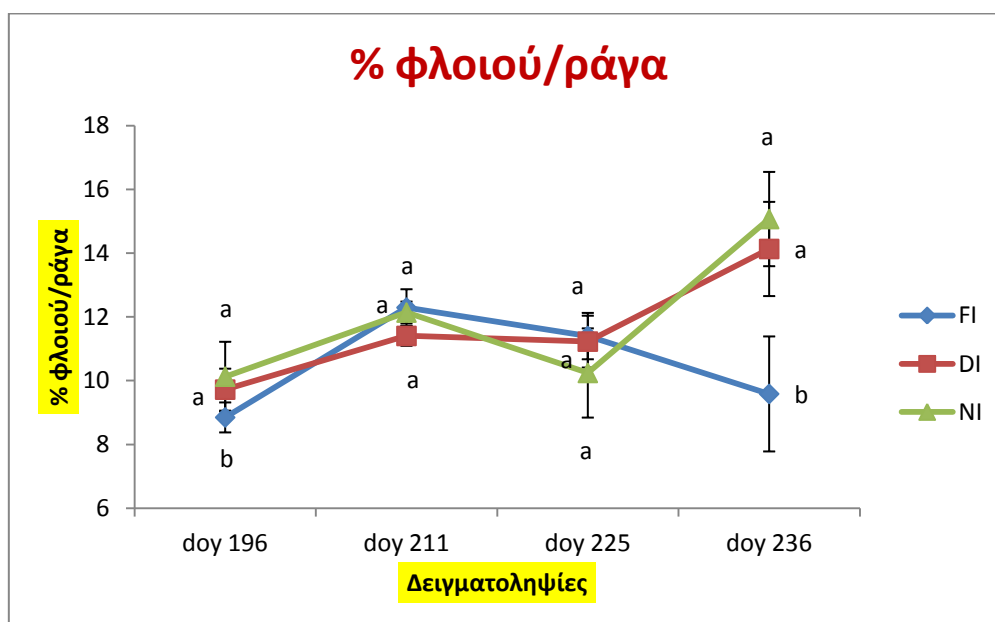
Γράφημα 2: Ποσοστό επί τοις εκατό (%) γιγάρτων/ράγα

Όπως παρατηρείται, το ποσοστό των γιγάρτων είναι μεγαλύτερο στα πρέμνα που δέχτηκαν μηδενική άρδευση (NI) από αυτά που δέχτηκαν 50% (FI) ή 100% (FI) άρδευση. Μεταξύ των επεμβάσεων FI και NI το μεγαλύτερο ποσοστό εναλλάσσεται

μεταξύ των τεσσάρων δειγματοληψιών και καταλήγει να είναι σχεδόν το ίδιο στην τελευταία. Οι διαφορές της επέμβασης NI είναι στατιστικά σημαντικές με την επέμβαση FI κατά την 1^η (doy 196) δειγματοληψία, από την επέμβαση DI κατά την 2^η (doy 211) δειγματοληψία και από τις επεμβάσεις FI και DI κατά την 4^η δειγματοληψία (doy 236). Οι διαφορές μεταξύ τους δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μηδενική άρδευση δίνει ξεκάθαρα μεγαλύτερο ποσοστό γιγάρτων ανά ράγα. Η παρατήρηση αυτή είναι χρήσιμη για το ποσοστό συμμετοχής των γιγάρτων κατά την ερυθρή οينوποίηση.

Στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 3), παρουσιάζονται οι μεταβολές του επί τοις εκατό (%) ποσοστού φλοιού προς ράγα.



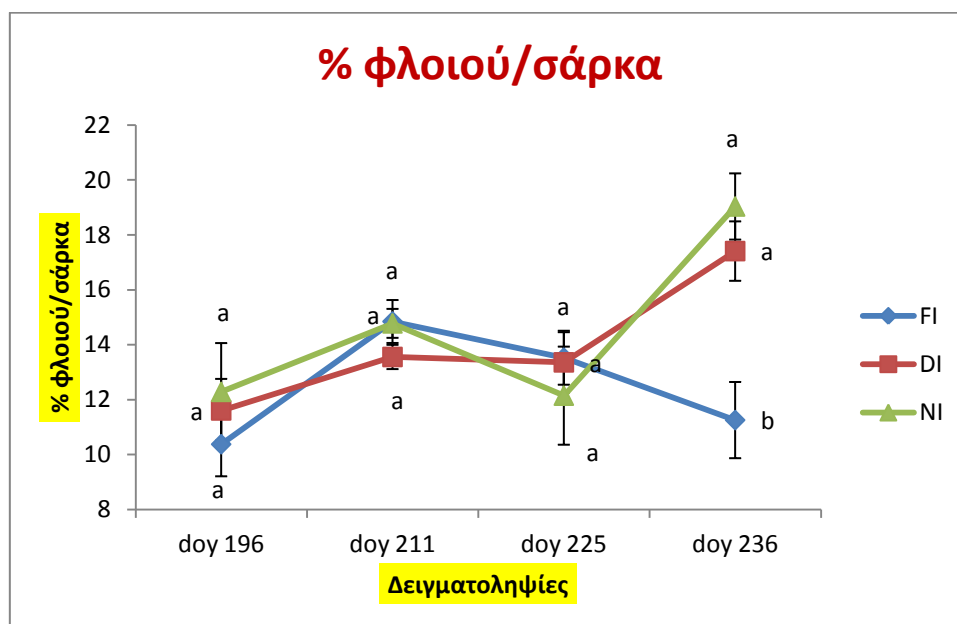
Γράφημα 3: Ποσοστό επί τοις εκατό (%) φλοιού/ράγα

Όπως παρατηρείται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων υπάρχουν μόνο στην 1^η (doy 196) και την 4^η (doy 236) δειγματοληψία, με τα μη αρδευόμενα (NI) και τα αρδευόμενα κατά 50% (DI) πρέμνα να υπερτερούν από τα πρέμνα που δέχτηκαν 100% (FI) άρδευση. Το ποσοστό είναι μεγαλύτερο στην επέμβαση NI αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική από την επέμβαση DI.

Από τις διαφορές αυτές, προκύπτει ότι η μηδενική άρδευση, όσο και το μειωμένο επίπεδο άρδευσης, δίνουν μεγαλύτερα ποσοστά φλοιού επί της ράγας κατά την πλήρη ωρίμανση των σταφυλιών. Αυτή η παρατήρηση, είναι εξίσου σημαντική αν λάβουμε υπόψη τη σημασία των φλοιών για τις μεθόδους της κλασικής ερυθής

οινοποίησης καθώς και της προζυμωτικής κρυσταλλοποίησης για λευκές όσο και για ερυθρές ποικιλίες.

Τέλος, στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 4) παρουσιάζονται οι μεταβολές του λόγου φλοιός προς σάρκα επί τοις εκατό (%). Όπως φαίνεται τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με του προηγούμενου γραφήματος (Γράφημα 3) με μόνη διαφορά στην 1^η (doy 196) δειγματοληψία στην οποία δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ωστόσο, στην 4^η (doy 236) δειγματοληψία είναι ξεκάθαρη η επίδραση του επιπέδου άρδευσης επί του λόγου φλοιός/σάρκα (%). Σε παρόμοιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν και οι Acevedo-Orpazo et al. (2010), οι οποίοι παρατήρησαν ότι το έντονο υδατικό stress οδηγεί σε μικρότερη διάμετρο ράγας και σε υψηλό λόγο φλοιού προς σάρκα.



Γράφημα 4: Λόγος φλοιός/σάρκα επί τοις εκατό (%)

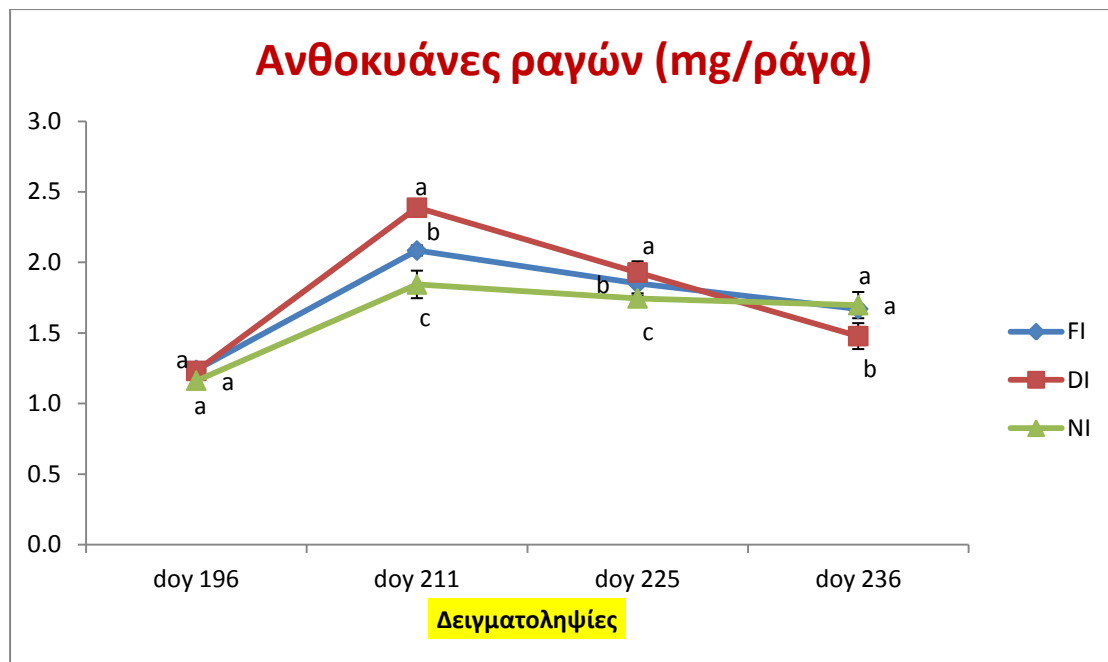
2) Ολικές ανθοκυάνες και ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Pand

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας (Πίνακας 3) με τα αποτελέσματα της μεθόδου Pand. Προσδιορίστηκαν οι ολικές ανθοκυάνες και τα ολικά φαινολικά συστατικά των ραγών. Τα διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων για κάθε δειγματοληψία (1^η= doy 196, 2^η= doy 211, 3^η= doy 225, 4^η= doy 236).

Πίνακας 3: Τα αποτελέσματα της μεθόδου Pand

	Επεμβάσεις ποτίσματος			N
	Ανθοκυάνες ράγας (mg/ράγα)			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
doy 196	1,238±0,030 a	1,251±0,054 a	1,162±0,048 a	9
doy 211	2,085±0,035 b	2,388±0,021 a	1,844±0,098 c	9
doy 225	1,850±0,086 b	1,929±0,079 a	1,745±0,036 c	9
doy 236	1,670±0,030 a	1,478±0,092 b	1,697±0,093 a	9
	Ανθοκυάνες ράγας (mg/g ράγας)			
doy 196	0,924±0,027 b	0,972±0,053 b	1,113±0,026 a	9
doy 211	1,435±0,029 b	1,772±0,039 a	1,841±0,046 a	9
doy 225	1,228±0,044 b	1,368±0,052 b	1,521±0,035 a	9
doy 236	1,151±0,027 b	1,212±0,072 b	1,634±0,097 a	9
	Ολικά φαινολικά/ράγα (au/ράγα)			
doy 196	1,755±0,062 a	1,716±0,042 a	1,748±0,035 a	9
doy 211	2,317±0,057 b	2,496±0,017 a	2,051±0,075 c	9
doy 225	2,176±0,116 a	2,066±0,092 a	1,857±0,039 b	9
doy 236	2,134±0,038 a	1,777±0,086 b	1,870±0,091 b	9
	Ολικά φαινολικά/g ράγας (au/g)			
doy 196	1,310±0,054 b	1,351±0,042 b	1,682±0,033 a	9
doy 211	1,592±0,030 c	1,853±0,039 b	2,056±0,025 a	9
doy 225	1,441±0,057 b	1,463±0,053 b	1,618±0,035 a	9
doy 236	1,469±0,017 b	1,457±0,064 b	1,791±0,079 a	9
Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, p< 0,05), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψεις (3) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη				

Ως προς τις συγκεντρώσεις των ανθοκυανών, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/ράγα, όσο και σε mg/g ράγας. Στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 5), φαίνονται οι μεταβολές στη συγκέντρωση των ανθοκυανών όταν αυτές εκφράστηκαν σε mg/ράγα.

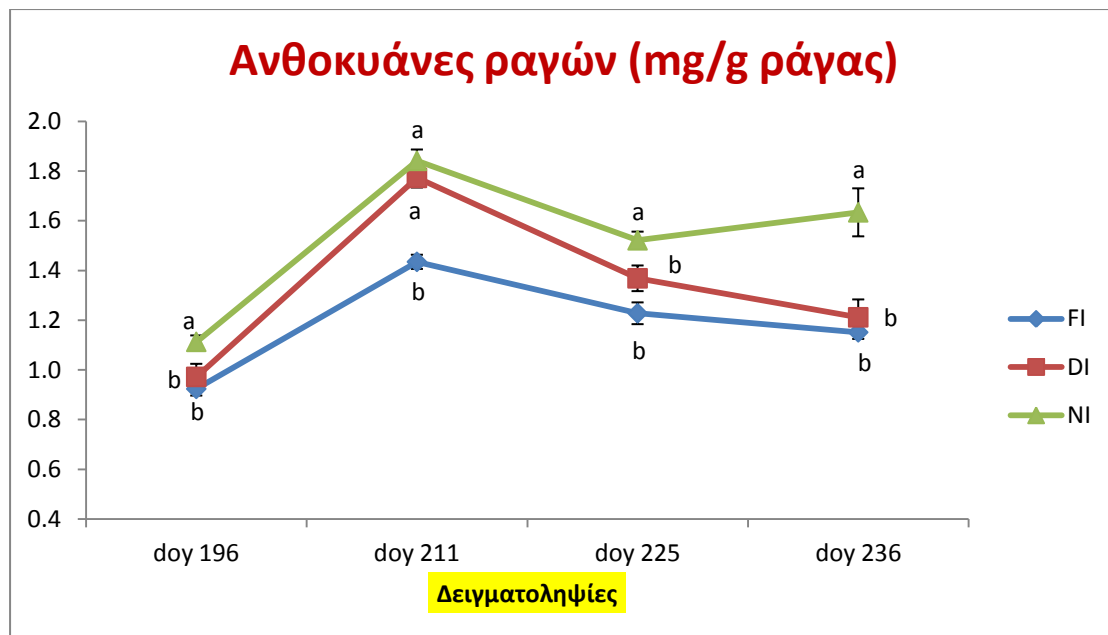


Γράφημα 5: Ανθοκυάνες ραγών σε mg/ράγα

Όπως παρατηρείται, στην 2^η (doy 211) και στην 3^η (doy 225) η συγκέντρωση των ανθοκυανών είναι μεγαλύτερη στα πρέμνα που δέχτηκαν 50% (DI) άρδευση, ακολουθούν τα πρέμνα που δέχτηκαν 100% (FI) και την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζουν τα μη αρδευόμενα (NI) πρέμνα. Οι διαφορές και στις δύο αυτές δειγματοληψίες είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, τα αποτελέσματα στην 4^η (doy 236) δειγματοληψία διαφοροποιούνται, καθώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν τα πρέμνα που δέχτηκαν μηδενική (NI) και 100% (FI) άρδευση με στατιστικά σημαντική διαφορά από τα πρέμνα που δέχτηκαν 50% (DI) άρδευση. Στην πρώτη δειγματοληψία δεν υπήρξαν διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, δεν μπορεί να βγει κάποιο σαφές συμπέρασμα για την επίδραση του επιπέδου άρδευσης στη συγκέντρωση των ανθοκυανών στα πρέμνα, όταν αυτή εκφράζεται σε mg/ράγα καθώς τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται μεταξύ των δειγματοληψιών. Η επέμβαση της 50% (DI) άρδευσης φαίνεται να δίνει καλύτερα αποτελέσματα αλλά αυτό δεν αντικατοπτρίζεται στην τελευταία δειγματοληψία που είναι στην εποχή του τρυγητού. Τα αποτελέσματα ίσως επηρεάζονται και από άλλους μη σταθερούς περιβαλλοντικούς παράγοντες εκτός του επιπέδου άρδευσης που εξετάζεται στο πείραμα.

Στο επόμενο γράφημα (Γράφημα 6) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεταβολών στη συγκέντρωση των ανθοκυανών των ραγών όταν αυτή εκφράζεται σε mg/g ράγας.

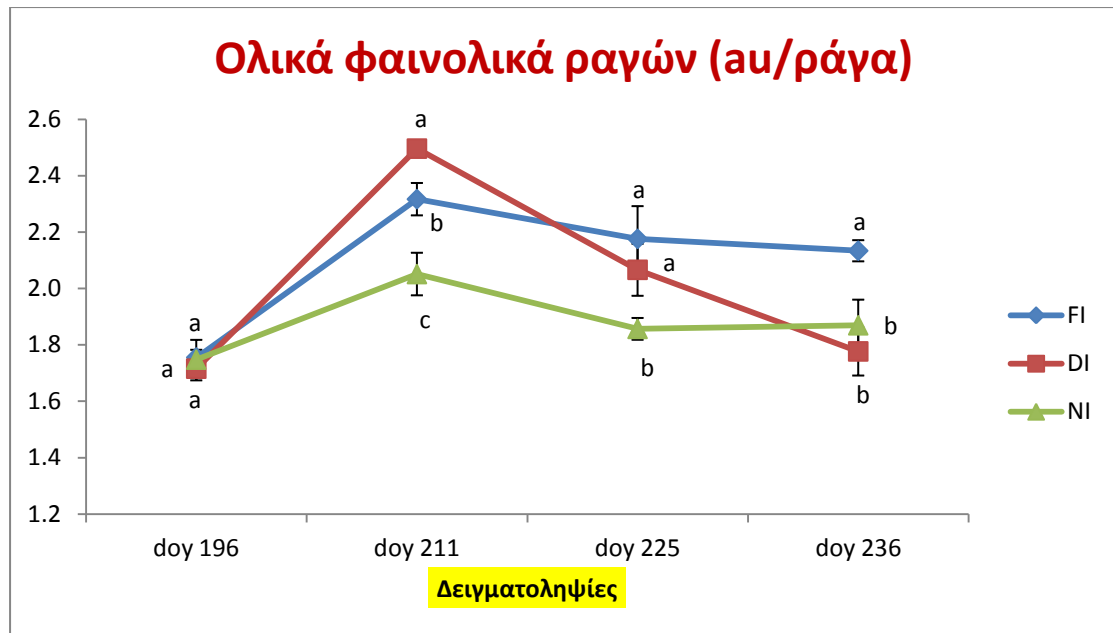


Γράφημα 6: Ανθοκυάνες ραγών σε mg/g ράγας

Όπως φαίνεται, οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών είναι μεγαλύτερες στα πρέμνα που δέχτηκαν μηδενική άρδευση (NI), ακολουθούν τα πρέμνα που δέχτηκαν 50% (DI) άρδευση και την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζουν οι ράγες των πρέμνων που δέχτηκαν 100% (FI) άρδευση. Αυτό συμβαίνει και στις τέσσερις δειγματοληψίες. Όσον αφορά τις διαφορές, στην 1^η (doy 196) δειγματοληψία είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ της επέμβασης NI και των άλλων δύο επεμβάσεων, στη 2^η (doy 211) οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων NI και DI δεν είναι σημαντικές αλλά διαφέρουν σημαντικά από την επέμβαση FI, στην 3^η (doy 225) όλες οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές και τέλος, στην 4^η (doy 236) δειγματοληψία η επέμβαση NI διαφέρει σημαντικά από τις άλλες δύο επεμβάσεις.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μπορεί να βγει ένα σαφές συμπέρασμα για την επίδραση του παράγοντα «άρδευση» στη συγκέντρωση των ανθοκυανών στις ράγες όταν αυτή εκφράζεται σε mg/g ράγας. Όσο μειώνεται το επίπεδο άρδευσης, τόσο η συγκέντρωση των ανθοκυανών στις ράγες αυξάνεται. Αυτή είναι μια έμμεση επίδραση, καθώς είναι αποτέλεσμα της διαφοροποίησης του βάρους των ραγών μεταξύ των επεμβάσεων. Δηλαδή, όσο μικρότερες είναι οι ράγες, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των ανθοκυανών.

Στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 7) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεταβολών στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών των ραγών όταν αυτή εκφράζεται σε au/ράγα.

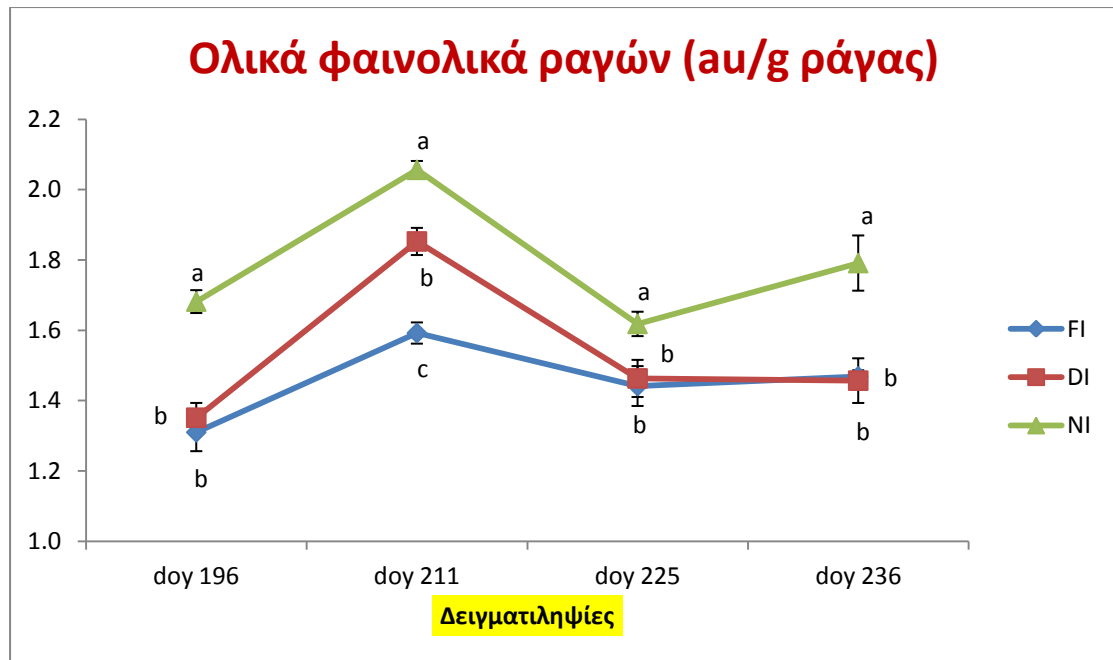


Γράφημα 7: Ολικά φαινολικά συστατικά ραγών σε au/ράγα

Όπως παρατηρείται, στην 1^η (doy 196) δειγματοληψία δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων. Στη 2^η (doy 211) δειγματοληψία μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών παρουσιάζονται στην επέμβαση 50% (DI) άρδευση, ακολουθεί η επέμβαση 100% (FI) άρδευση και η μηδενική (NI) άρδευση με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Στην 3^η (doy 225) δειγματοληψία, η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζεται στην πλήρη άρδευση (FI), ακολουθεί η 50% (DI) και η μηδενική (NI) άρδευση με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Τέλος, στην 4^η (doy 236) δειγματοληψία, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών είναι μεγαλύτερη στην άρδευση 100% (FI) και ακολουθούν οι επεμβάσεις NI και DI. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές μόνο μεταξύ της επέμβασης FI και των άλλων δύο επεμβάσεων.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, παρά τις παρουσιαζόμενες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγματοληψιών, μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι η ελλειμματική άρδευση μάλλον δεν επιδρά θετικά στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών της ράγας όταν αυτή εκφράζεται σε au/ράγα. Τα καλύτερα αποτελέσματα δίνονται από την επέμβαση της πλήρους άρδευσης η οποία δίνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις δύο τελευταίες δειγματοληψίες, χωρίς ωστόσο να υστερεί και στις δύο πρώτες. Οπότε, σε αυτή την περίπτωση έχουμε μια άμεση επίδραση του παράγοντα «άρδευση» στη σύνθεση των φαινολικών συστατικών της ράγας, η οποία αυξάνεται στην περίπτωση υψηλού επιπέδου άρδευσης.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 8) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεταβολών στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών των ραγών όταν αυτή εκφράζεται σε au/g ράγας.



Γράφημα 8: Ολικά φαινολικά συστατικά ραγών σε au/g ράγας

Όπως παρατηρείται, τα πρέμνα που δέχτηκαν μηδενική (NI) άρδευση παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών ραγών και στις τέσσερις δειγματοληψίες με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Μεταξύ των άλλων δύο επεμβάσεων, διαφορά υπάρχει μόνο στην 2^η (doy 211) δειγματοληψία, όπου τα 50% (DI) αρδευόμενα πρέμνα είχαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών από τα πλήρως (FI) αρδευόμενα με τη διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στην περίπτωση αυτή, βγαίνει το συμπέρασμα ότι η πλήρης απουσία άρδευσης ανεβάζει τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών στις ράγες όταν αυτές εκφράζονται σε au/g ράγας. Η επίδραση αυτή είναι μάλλον έμμεση, καθώς οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών παρουσιάζονται στις ράγες της επέμβασης της μηδενικής (NI) άρδευσης, οι οποίες είχαν και τα μικρότερα βάρη σε σχέση με τις άλλες δύο επεμβάσεις.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου Pand, οι ολικές ανθοκυάνες όταν εκφράζονται σε mg/ράγα φαίνεται να έχουν καλύτερα αποτελέσματα στην επέμβαση της 50% (DI) άρδευσης, χωρίς όμως αυτό να είναι ξεκάθαρο, καθώς στην τελευταία δειγματοληψία δε συμβαίνει το ίδιο. Αντίθετα, όταν οι ολικές ανθοκυάνες εκφράζονται σε mg/g ράγας το αποτέλεσμα είναι σαφές, καθώς η μηδενική (NI) άρδευση δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλες τις δειγματοληψίες. Οπότε, η

συγκέντρωση των ανθοκυανών στις ράγες επηρεάζεται περισσότερο έμμεσα, μέσω της μεταβολής του βάρους των ραγών, παρά άμεσα.

Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί ένα μέρος με την έρευνα των Esteban et al. (2001) στην οποία οι ολικές ανθοκυάνες είχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ράγες, στις περισσότερες δειγματοληψίες, στην περίπτωση του υδατικού ελλείμματος, όταν αυτή εκφράστηκε σε mg/100 ράγες. Αντίθετα, όταν εκφράστηκε σε mg/ράγα υψηλότερες συγκεντρώσεις είχαν οι ράγες των πρέμων που δέχτηκαν άρδευση. Σε άλλη παρόμοια εργασία (Chalmers, 2007), στην εφαρμογή της μεθόδου Pand. Συγκεκριμένα, για την ποικιλία Cabernet sauvignon οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών συστατικών δεν είχαν διαφορές όταν εκφράστηκαν σε mg και au/ράγα αντίστοιχα, αλλά οι διαφορές ήταν σημαντικές όταν εκφράστηκαν σε mg/g και au/g ράγας αντίστοιχα.

Επίσης, στην έρευνα των Roby et al. (2004) διαπιστώθηκε, επίσης, ότι η ελλειμματική άρδευση αύξησε τη συγκέντρωση των ανθοκυανών στις ράγες της ποικιλίας Cabernet sauvignon. Ωστόσο, συμπέραναν ότι οι αυξήσεις στις ανθοκυάνες που συνοδεύονται από ελλειμματική άρδευση, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα περισσότερο της διαφορετικής ευαισθησίας ανάπτυξης του μεσοκαρπίου και εξωκαρπίου, παρά άμεση επίδραση στη βιοσύνθεσή τους.

Σε άλλες σχετικές έρευνες, οι Bucchetti et al. (2011) διαπίστωσαν ότι το υδατικό έλλειμμα αύξησε την συγκέντρωση των ανθοκυανών κατά τον τρυγητό κατά 53-62% όταν αυτή εκφράστηκε σε mg/g ράγας, ενώ όταν εκφράστηκε σε mg/ράγα η αύξηση ήταν μικρότερη (29-34%). Επίσης, οι Castellarin et al. (2007) παρατήρησαν ότι η συνολική συγκέντρωση των ανθοκυανών ήταν μεγαλύτερη σε περιπτώσεις επικράτησης υδατικού stress, ως αποτέλεσμα της αύξησης της βιοσύνθεσής τους. Τέλος, οι Chaves et al. (2007) παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση των ανθοκυανών ήταν μεγαλύτερη στα πρέμνα της ποικιλίας Castelão που δεν αρδεύτηκαν και σε κάποια πρέμνα με μερική ξήρανση ριζών.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου Pand για τα ολικά φαινολικά συστατικά, όταν αυτά εκφράζονται σε au/ράγα, η πλήρης άρδευση (FI) φαίνεται να αυξάνει τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών της ράγας, αφού δίνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατά τις δύο τελευταίες δειγματοληψίες. Επίσης, το υδατικό έλλειμμα μειώνει τη σύνθεση. Αυτό ίσως οφείλεται στη συμμετοχή των ταννινών των γιγάρτων, οι οποίες αυξάνονται εξαιτίας της πιθανής καθυστέρησης της ωρίμανσης στην επέμβαση της πλήρους άρδευσης. Σε σχετική εργασία, οι Roby et al.

(2004), διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση των ταννινών των γιγάρτων αυξάνεται, όταν αυξάνεται το μέγεθος της ράγας και η δόση άρδευσης. Όταν όμως, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφράζεται σε au/g ράγας, η μηδενική άρδευση (NI) είναι αυτή που αυξάνει ξεκάθαρα τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών της ράγας, καθώς δίνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και στις τέσσερις δειγματοληψίες. Οπότε, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών της ράγας επηρεάζεται άμεσα και έμμεσα από το επίπεδο άρδευσης αλλά με διαφορετικά αποτελέσματα για κάθε περίπτωση.

Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με την έρευνα των Esteban et al. (2001), οι οποίοι παρατήρησαν ότι στην ποικιλία Tempranillo οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών της ράγας, ήταν πάντοτε μεγαλύτερες στα μη αρδευόμενα πρέμνα, όταν αυτές εκφράστηκαν σε mg/g 100 ραγών (οι διαφορές ήταν μη σημαντικές σε μερικές δειγματοληψίες). Όταν όμως, οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν σε mg/ράγα, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών συστατικών ράγας παρουσιάστηκαν στα αρδευόμενα πρέμνα, ειδικά για τα τελευταία στάδια ωρίμανσης. Επίσης, οι Pedreira dos Santos et al. (2007), παρατήρησαν αύξηση των ολικών φαινολικών συστατικών σε πρέμνα της ποικιλίας Moscatel υπό ελλειμματική άρδευση και μερική ξήρανση ρίζας. Τέλος, οι Romero et al. (2013), παρατήρησαν ότι η ελεγχόμενη ελλειμματική άρδευση (30% ή 20%) μετριάζει το υδατικό stress, καθώς βελτιώνει τη φαινολική σύνθεση στα σταφύλια και τον οίνο, ενώ η πλήρης απουσία άρδευσης έχει αρνητικά αποτελέσματα.

ii) Αναλύσεις σε φλοιούς

1) αποτελέσματα συγκεντρώσεων ανθοκυανών φλοιών με HPLC ανάλυση

Με τη μέθοδο ανάλυσης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι εφικτός τόσο ο ποιοτικός, όσο και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανών. Στην παρούσα εργασία, έγινε ο προσδιορισμός των μονογλυκοζιτών των ανθοκυανών, δηλαδή του μονογλυκοζίτη της, της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης. Επίσης προσδιορίστηκαν και οι ακυλιωμένες ανθοκυάνες με οξικό και π-κουμαρικό οξύ, δηλαδή οι οξικοί και οι κουμαρικοί εστέρες της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της

παιονιδίνης και της μαλβιδίνης αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα μαλβιδίνης σε mg/g νωπού βάρους (NB) φλοιών. Κατά την εφαρμογή της HPLC, αρχικά εκλούεται ο πιο πολικός μονογλυκοζίτης, δηλαδή η δελφινιδίνη και στο τέλος η λιγότερο πολική ακυλιωμένη ανθοκυάνη, δηλαδή ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης.

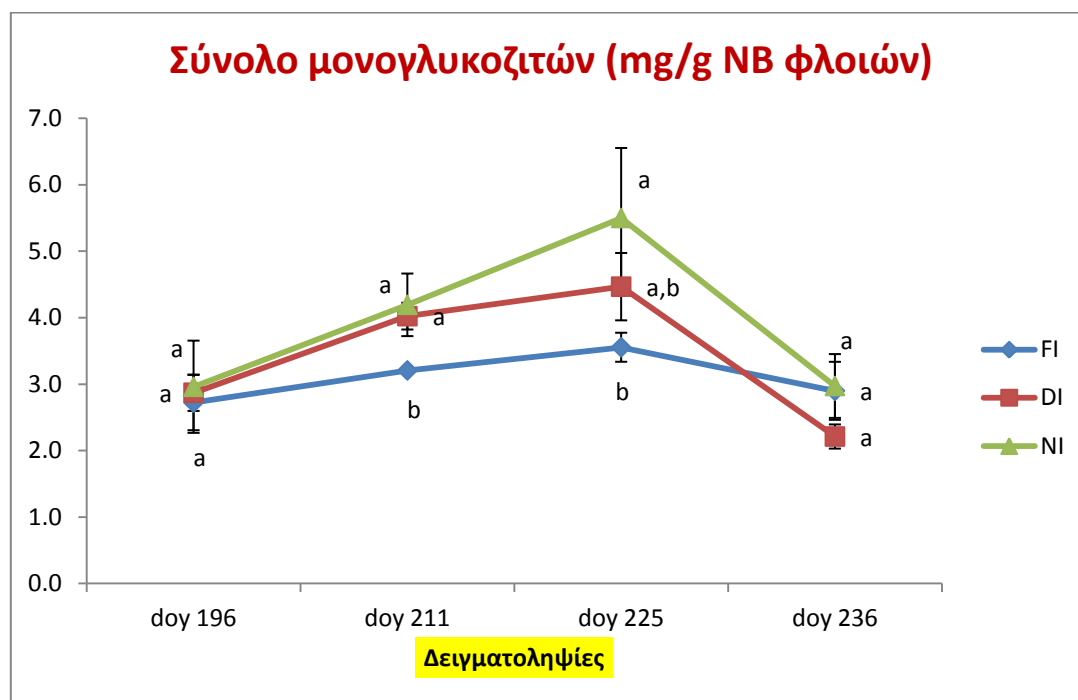
Η στατιστική ανάλυση έγινε για τα σύνολα των μονογλυκοζιτών, των οξικών και των κουμαρικών εστέρων αντίστοιχα. Επίσης έγινε στατιστική ανάλυση για τα επί της εκατό (%) ποσοστά συμμετοχής κάθε ένωσης στο σύνολο των ανθοκυανών για κάθε επέμβαση. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση HPLC στους φλοιούς των ραγών για τα σύνολα των μονογλυκοζιτών, των οξικών και κουμαρικών εστέρων.

Πίνακας 4: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC για τα σύνολα των μονογλυκοζιτών των ανθοκυανών, των οξικών και των κουμαρικών εστέρων

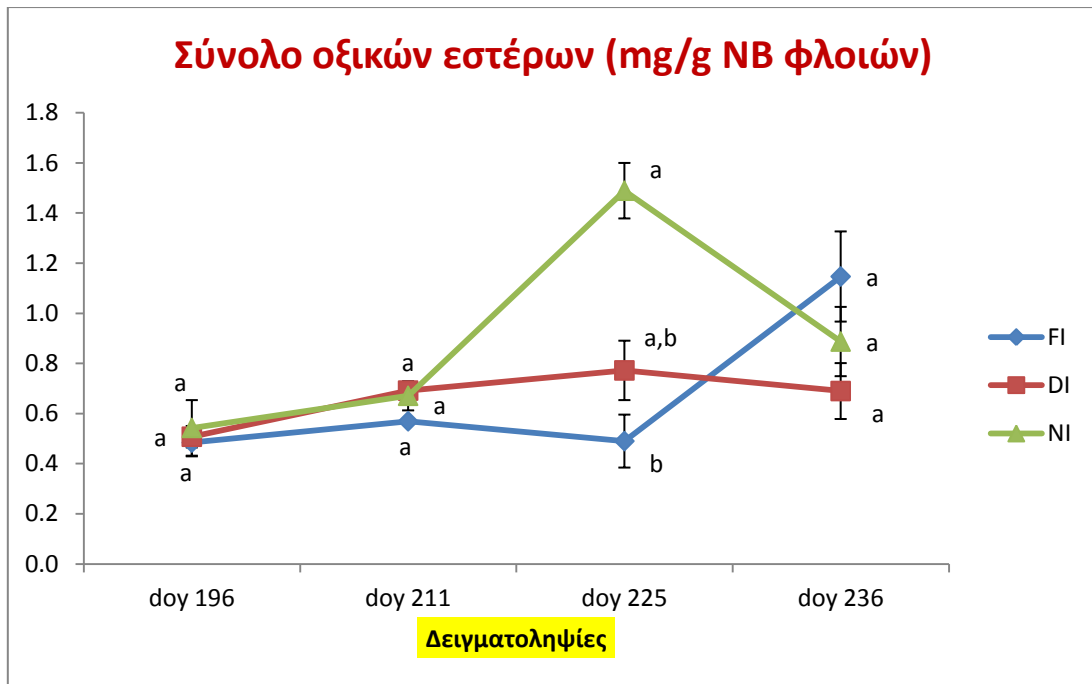
	Επεμβάσεις ποτίσματος			N
	Σύνολο μονογλυκοζιτών (mg/g NB φλοιών)			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
day 196	2,721±0,416 a	2,869±0,274 a	2,960±0,694 a	3
day 211	3,205±0,046 b	4,022±0,201 a	4,193±0,471 a	3
day 225	3,554±0,218 b	4,466±0,507 a,b	5,500±1,053 a	3
day 236	2,898±0,436 a	2,211±0,182 a	2,971±0,480 a	3
	Σύνολο οξικών εστέρων (mg/g NB φλοιών)			
day 196	0,484±0,055 a	0,508±0,043 a	0,543±0,111 a	3
day 211	0,569±0,005 a	0,692±0,010 a	0,671±0,058 a	3
day 225	0,490±0,106 b	0,772±0,119 a,b	1,489±0,111 a	3
day 236	1,147±0,180 a	0,690±0,111 a	0,887±0,138 a	3
	Σύνολο κουμαρικών εστέρων (mg/g NB φλοιών)			
day 196	1,016±0,137 a	1,107±0,114 a	1,144±0,284 a	3
day 211	1,454±0,054 a	1,652±0,095 a	1,703±0,073 a	3
day 225	1,530±0,134 b	1,797±0,058 b	2,293±0,295 a	3
day 236	2,053±0,353 a	1,435±0,169 b	1,608±0,261 b	3
<p>Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψης (1) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη</p>				

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 4, και στο παρακάτω γράφημα (γράφημα 9), για το σύνολο των μονογλυκοζιτών η επέμβαση της μηδενικής άρδευσης (NI) δίνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και στις τέσσερις δειγματοληψίες. Ωστόσο, στατιστικές διαφορές υπάρχουν μόνο στην 2^η (doy 211) και την 3^η (doy 225) δειγματοληψία, στις οποίες διαφέρει με την επέμβαση της 100% (FI) άρδευσης. Ακολουθεί η επέμβαση 50% (DI) άρδευση που δίνει μεγαλύτερες τιμές στις τρεις πρώτες δειγματοληψίες από την επέμβαση 100% (FI) άρδευση (με στατιστική διαφορά μόνο στη 2^η). Στην 4^η (doy 236), βέβαια, δειγματοληψία, τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται, με την επέμβαση FI να δίνει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την επέμβαση DI, χωρίς ωστόσο η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική.

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και για το σύνολο των οξικών εστέρων (Γράφημα 10), με τη διαφορά ότι στη 2^η (doy 211) δειγματοληψία, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση δίνει η επέμβαση DI και στην 4^η (doy 236) η επέμβαση FI. Ωστόσο, οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η μόνη στατιστική διαφορά παρουσιάζεται στην 4^η (doy 225) δειγματοληψία, μεταξύ της επέμβασης NI και FI.

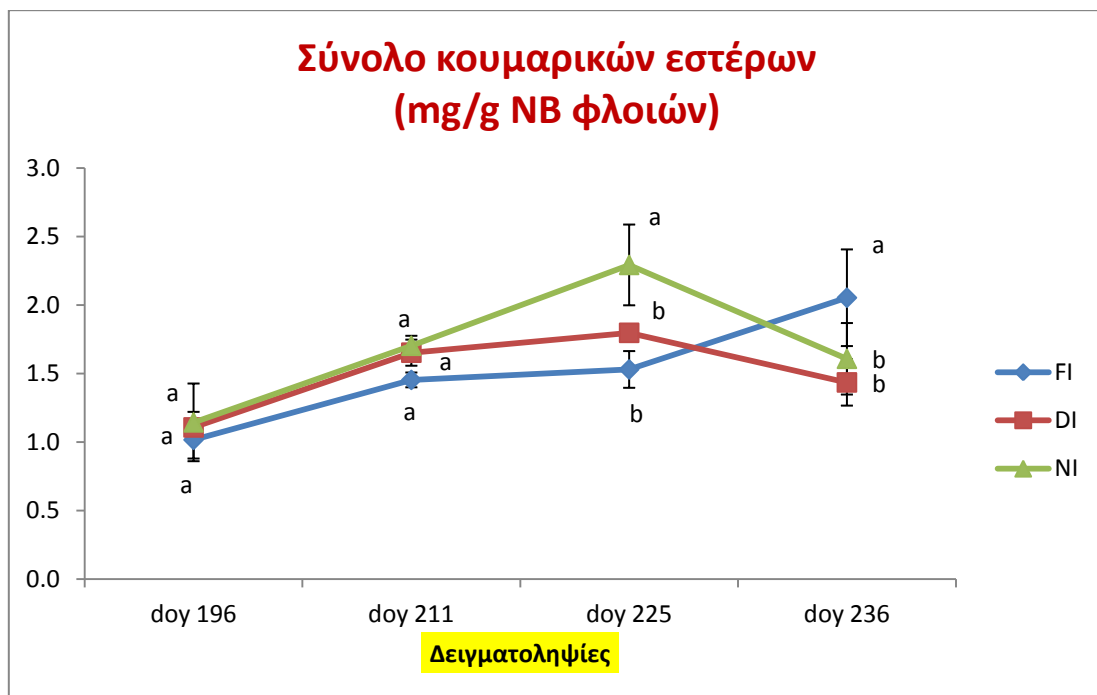


Γράφημα 9: Σύνολο μονογλυκοζιτών ανθοκυανών σε mg.g NB φλοιών



Γράφημα 10: Σύνολο οξικών εστέρων ανθοκυανών σε mg.g NB φλοιών

Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 11), και στην περίπτωση των κουμαρικών εστέρων τα αποτελέσματα είναι και πάλι παρόμοια με το σύνολο το μονογλυκοζιτών με τη διαφορά ότι στην 4^η δειγματοληψία την μεγαλύτερη συγκέντρωση δίνει η επέμβαση FI με στατιστική διαφορά από την DI και NI που ακολουθούν.



Γράφημα 11: Σύνολο κουμαρικών εστέρων ανθοκυανών σε mg.g NB φλοιών

Το γενικό συμπέρασμα σύμφωνα με τα παραπάνω είναι ότι η επέμβαση της μηδενικής άρδευσης (NI) δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε ανθοκυάνες. Αυτό όμως δεν είναι ξεκάθαρο, αφού έως την 3^η (day 225) δειγματοληψία δίνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, τα πράγματα όμως διαφοροποιούνται στην τελευταία δειγματοληψία στην οποία είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν και άλλοι ασταθείς παράγοντες στη σύνθεση των ανθοκυανών των φλοιών εκτός της άρδευσης. Γενικά, η συσσώρευση των ανθοκυανών εξαρτάται από το περιβάλλον (ειδικά από τη θερμοκρασία και την έκθεση στο ηλιακό φως). Η αποικοδόμηση ή/και η αναστολή της σύνθεσής τους αναφέρθηκε ιδιαίτερα όταν τα σταφύλια εκτέθηκαν σε υψηλή ηλιακή ακτινοβολία (Sprayd et al., 2002).

Σε σχετικές έρευνες, οι Koundouras et al. (2006) διαπίστωσαν ότι η άρδευση επηρεάζει τη συγκέντρωση και των πέντε ανθοκυανών (δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, παιονιδίνη, μαλβιδίνη) και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανθοκυανών έχουν τα πρέμνα που δεν δέχθηκαν κάποια επέμβαση άρδευσης. Ωστόσο, οι Esteban et al. (2001) παρατήρησαν ότι στην ποικιλία Tempranillo οι συγκεντρώσεις και των πέντε ανθοκυανών (mg/100g ραγών) ήταν την πρώτη χρονιά μεγαλύτερες στα μη ποτισμένα πρέμνα, ενώ τη δεύτερη χρονιά τα μη ποτισμένα πρέμνα έδωσαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην αρχή της ωρίμανσης, ενώ στο τέλος της μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έδωσαν τα ποτισμένα πρέμνα. Οι Ojeda et al. (2002) διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση των ανθοκυανών στην ποικιλία Syrah (mg/ g NB φλοιού) ήταν μεγαλύτερες σε συνθήκες υδατικού stress που εφαρμόστηκε μετά τον περκασμό. Τέλος, οι Bucchetti et al. (2011) διαπίστωσαν ότι στην ποικιλία Merlot, η συγκέντρωση (mg/g NB ράγας) ήταν αυξημένες σε πρέμνα με ελλειμματική άρδευση.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 5), παρουσιάζεται η κατανομή των ανθοκυανών (μονογλυκοζιτών, οξικών εστέρων, κουμαρικών εστέρων) ως επί τοις εκατό (%) ποσοστά για κάθε επέμβαση σε κάθε μια δειγματοληψία. Δηλαδή, το ποσοστό που καταλαμβάνει η κάθε ένωση στο σύνολο τους.

Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC για τα % ποσοστά των ανθοκυανών

	Ανθοκυανές (Ποσοστό %)											
	1η δειγματοληψία			2η δειγματοληψία			3η δειγματοληψία			4η δειγματοληψία		
Ανθοκυανές	FI	DI	NI	FI	DI	NI	FI	DI	NI	FI	DI	NI
Dlp	5,3	5,4	5,3	5,8 b	6,3 a	5,8 b	6,3	6,4	6,3	4,0	4,4	4,2
Cy	1,8	1,5	1,7	1,5	1,4	1,3	1,5	1,4	1,4	1,5	1,6	1,4
Pt	8,3	8,3	8,2	8,0	8,3	7,9	8,0	8,4	7,9	5,8	6,4	5,9
Pn	7,9	6,7	7,1	6,7	6,1	6,7	7,5	6,3	6,0	5,7	5,8	5,4
Mlv	41,1	42,1	41,3	39,2 b	41 b	42 a	40 a	41,1 a	37,9 b	30,7 c	33,1 b	37,8 a
DlpAc	1,4 a	1,1 b	1,3 a	0,9	0,8	0,8	1,0	0,9	0,9	1,4	1,4	1,1
CyAc	1,5	1,3	1,4	1,2	1,1	1,0	1,1 b	1,1 b	1,7 a	1,9	1,7	1,6
PtAc	1,6	1,3	1,4	1,0	0,8	0,9	1,1	0,9	1,0	1,4	1,4	1,1
PnAc	2,7	2,7	2,8	3,1	3,0	2,9	2,7	2,9	2,2	3,2 a	3,1 a	1,9 b
MlvAc	4,3 b	4,8 a	4,8 a	4,7 b	5,2 a	4,6 b	3,5 c	5,2 b	10,3 a	11,0 a	8,4 b	10,6 a
DlpCoum	3,7 a	3,3 b	3,1 b	2,1 a	1,7 b	1,6 b	1,7 a	1,6 a	1,3 b	2,4	2,4	2,0
CyCoum	2,1	2,0	2,1	1,9	1,7	1,7	1,9 a	1,9 a	1,4 b	2,1	2,2	1,6
PtCoum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PnCoum	3,4 b	3,4 b	3,7 a	3,6	3,6	3,5	3,3	3,4	3,3	3,7	4,0	3,3
MlvCoum	14,9	16,0	15,7	20,3	19,1	19,2	20,4 a	18,7 b	18,3 b	25,1 a	24,2 a	22,0 b

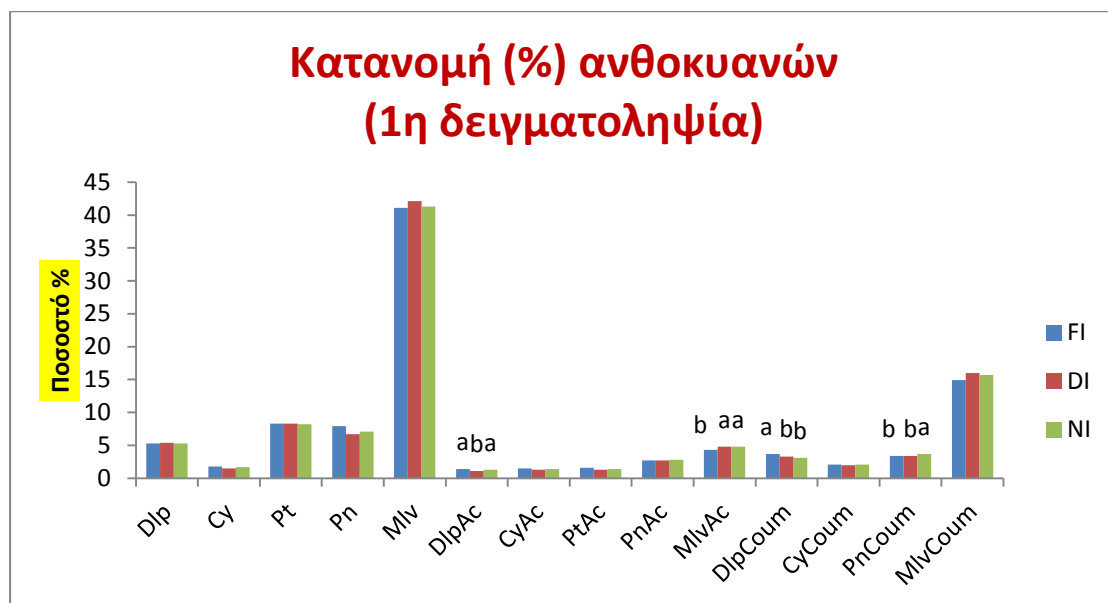
Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή και για ίδια δειγματοληψία διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζονται και στα γραφήματα που ακολουθούν. Όπως παρατηρείται, γενικά το μεγαλύτερο ποσοστό (%) σε όλες τις δειγματοληψίες καταλαμβάνει ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, ο οποίος είναι η κύρια ανθοκυάνη. Ακολουθεί ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης, ο μονογλυκοζίτης της πετουνιδίνης και της παιονιδίνης και ακολουθούν οι υπόλοιπες ενώσεις με μικρότερα ποσοστά. Στην 3^η και 4^η δειγματοληψία, μεγάλα ποσοστά παρουσιάζει και ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης. Στα δείγματα δεν βρέθηκε κουμαρικός εστέρας της πετουνιδίνης.

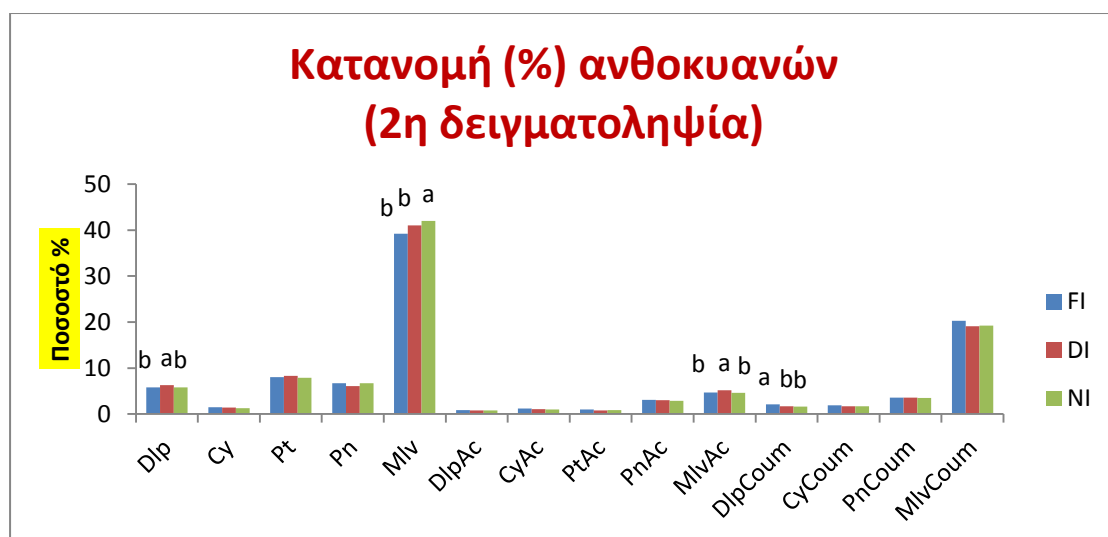
Μεταξύ των ενώσεων που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά μεταξύ των ανθοκυανών, υπάρχουν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στη 2^η δειγματοληψία (Γράφημα 13) το ποσοστό του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης είναι μεγαλύτερο στην μηδενική (NI) άρδευση. Στην 3^η δειγματοληψία (Γράφημα 14), ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης έχει το μεγαλύτερο ποσοστό στην 50% (DI) άρδευση, ενώ ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης δίνει το μεγαλύτερο ποσοστό στη μηδενική άρδευση. Ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης ευνοείται από την 100% (FI) άρδευση. Τέλος, στην 4^η δειγματοληψία (Γράφημα 15), ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης ευνοείται από την μηδενική (NI) άρδευση, ενώ ο οξικός και ο κουμαρικός

εστέρας της μαλβιδίνης ευνοούνται περισσότερο από την 100% (FI) άρδευση. Συμπερασματικά, οι κύριες ενώσεις φαίνεται να ευνοούνται από την μηδενική (NI) ή την 50% (DI) άρδευση στις περισσότερες περιπτώσεις.

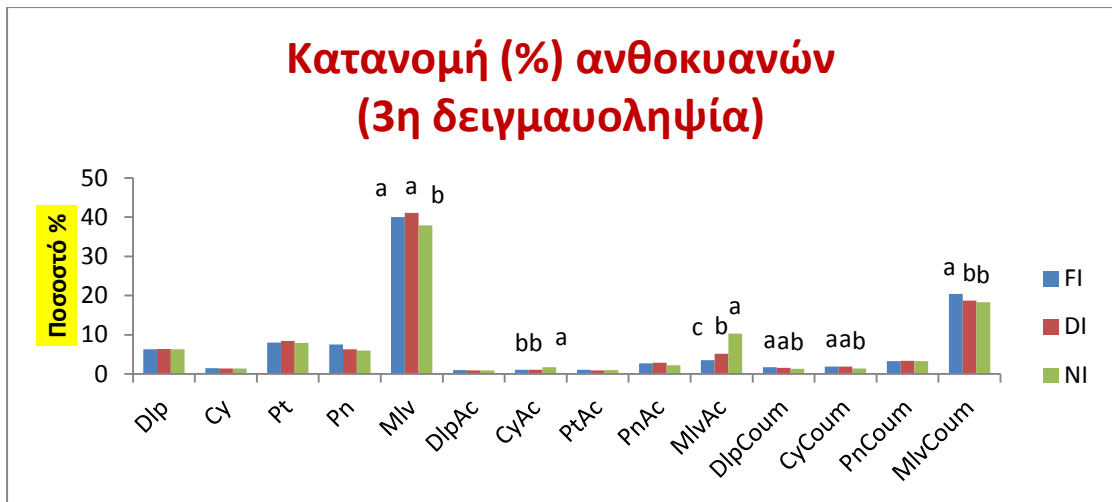
Σε σχετικές έρευνες, οι Santesteban et al. (2011) διαπίστωσαν για τα επί τοις εκατό (%) ποσοστά των πέντε μονογλυκοζιτών των ανθοκυανών ότι η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη και η πετουνιδίνη έδωσαν μεγαλύτερα ποσοστά (%) στα πλέον απότιστα πρέμνα. Αντίθετα, η μαλβιδίνη παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό (%) στα πρέμνα που δέχτηκαν άρδευση. Για την μαλβιδίνη, που είναι ο κύριος μονογλυκοζίτης, το ίδιο διαπίστωσαν και οι Castellarin et al. (2007).



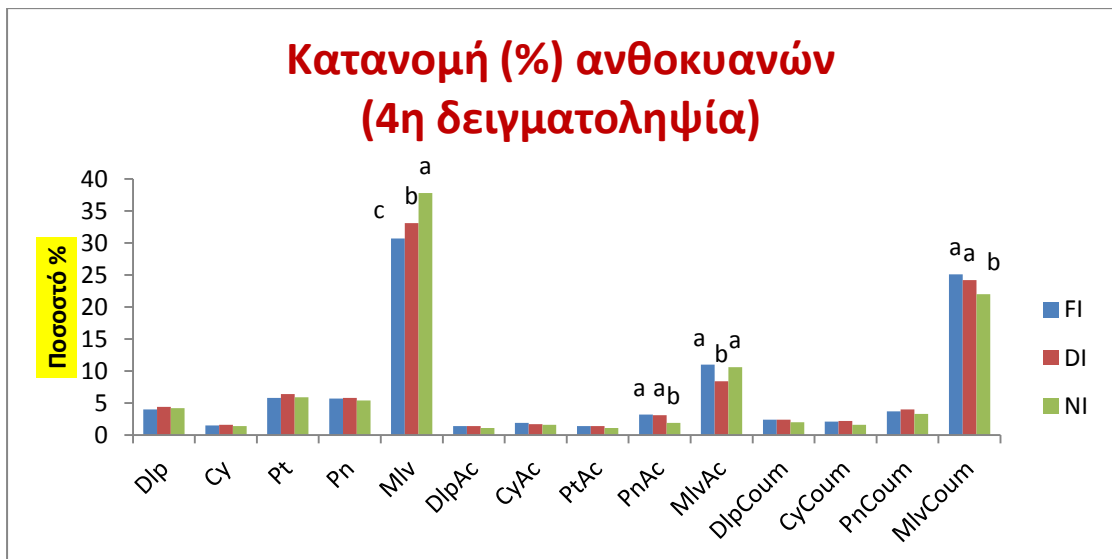
Γράφημα 12: % ποσοστά ανθοκυανών κατά την 1^η δειγματοληψία



Γράφημα 13: % ποσοστά ανθοκυανών κατά την 2^η δειγματοληψία



Γράφημα 14: % ποσοστά ανθοκυανών κατά την 3^η δειγματοληψία



Γράφημα 15: % ποσοστά ανθοκυανών κατά την 4^η δειγματοληψία

iii) Αναλύσεις σε εκχυλίσματα φλοιών

1) Αποτελέσματα της μεθόδου Folin – Ciocalteu

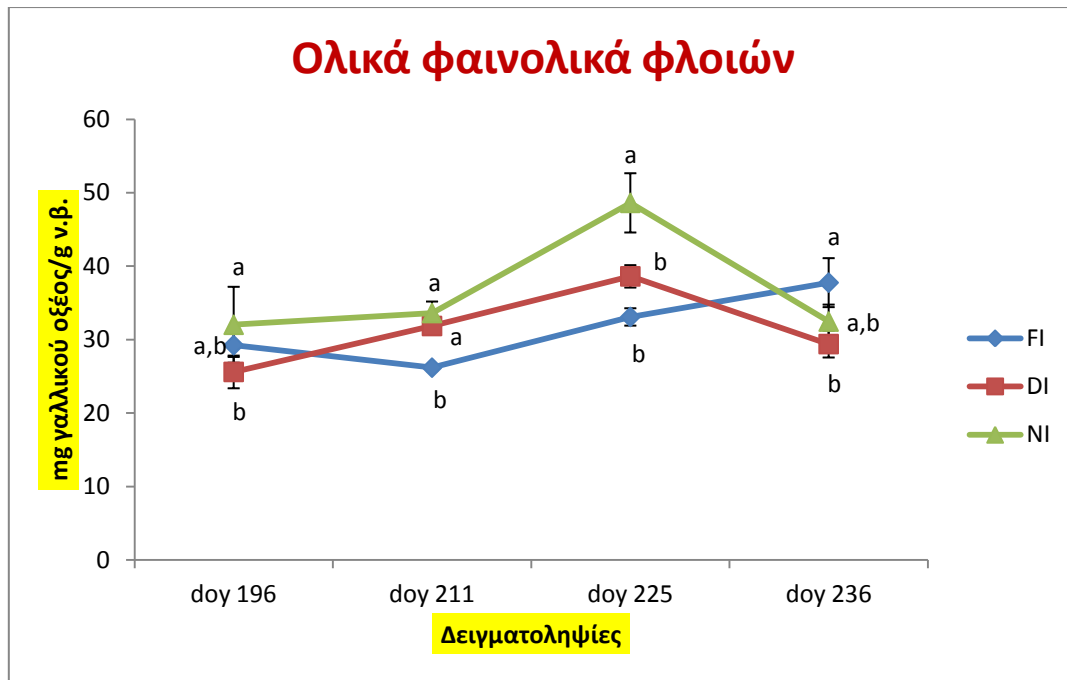
Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στους φλοιούς των ραγών της ποικιλίας Syrah. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg γαλλικού οξέος/g νωπού βάρους φλοιών και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu

	Ολικά φαινολικά (mg γαλλικού οξέος/g ν.β)			N
	Επεμβάσεις ποτίσματος			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
doy 196	29,2±1,6 a,b	25,6±2,2 b	32,0±5,2 a	6
doy 211	26,2±0,5 b	31,9±0,9 a	33,6±1,6 a	6
doy 225	33,1±1,2 b	38,6±1,5 b	48,6±4,0 a	6
doy 236	37,8±3,3 a	29,4± 1,8 b	32,5±2,3 a,b	6

Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επαναλήψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Όπως παρατηρείται, κατά την 1^η (doy 196) δειγματοληψία, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών την έχουν τα πρέμνα με μηδενική (NI) άρδευση, ακολουθούν αυτά που δέχτηκαν 100% (FI) άρδευση και την μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζουν αυτά που δέχτηκαν 50% (DI) άρδευση. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική μεταξύ της επέμβασης NI και DI. Στη 2^η (doy 211) δειγματοληψία, η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζεται στην επέμβαση NI και ακολουθούν οι επεμβάσεις DI και FI, με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ των επεμβάσεων NI και DI και της επέμβασης FI. Το ίδιο συμβαίνει και στην 3^η (doy 225) δειγματοληψία, με τη διαφορά ότι οι διαφορές στις συγκεντρώσεις είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ της επέμβασης NI και των επεμβάσεων DI και FI. Τέλος, στην 4^η (doy 236) η κατάσταση διαφοροποιείται, καθώς η επέμβαση FI δίνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με τις επεμβάσεις DI και NI να ακολουθούν. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ της επέμβασης FI και DI. Τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζονται και στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 16).



Γράφημα 16: Ολικά φαινολικά συστατικά φλοιών

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στους φλοιούς, φαίνεται να ευνοείται από την μηδενική (NI) άρδευση καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, εκτός από την τελευταία δειγματοληψία, χωρίς ωστόσο να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την επέμβαση FI που δίνει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στη δειγματοληψία αυτή. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί εν μέρει με την έρευνα των El-Ansary and Okamoto (2007), στην οποία όλες οι επεμβάσεις της ελλειμματικής άρδευσης είχαν υψηλότερα ποσοστά ολικών φαινολικών συστατικών (mg/g NB φλοιού) στα τελευταία στάδια ωρίμανσης στην ποικιλία Μοσχάτο Αλεξάνδρειας. Επίσης, οι Ozden et al. (2010), παρατήρησαν ότι τα ολικά φαινολικά συστατικά μειώθηκαν με την αύξηση του επιπέδου άρδευσης, όταν τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg/kg ράγας απαλλαγμένης γιγάρτων (δεν υπάρχει συμμετοχή των φαινολικών συστατικών των γιγάρτων).

Σε άλλη σχετική έρευνα, οι Esteban et al. (2001) παρατήρησαν ότι στην ποικιλία Tempranillo οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών, εκφραζόμενες σε mg/g 100 ραγών, ήταν πάντοτε μεγαλύτερες στα μη αρδευόμενα πρέμνα, αλλά όταν οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν σε mg/ράγα, οι μεγαλύτερες ποσότητες ολικών φαινολικών βρέθηκαν στα πρέμνα που αρδεύτηκαν. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

2) Αποτελέσματα της μεθόδου «ολικές ταννίνες με βρασμό» (μετατροπή σε ανθοκυανιδίνες) στα εκχυλίσματα των φλοιών

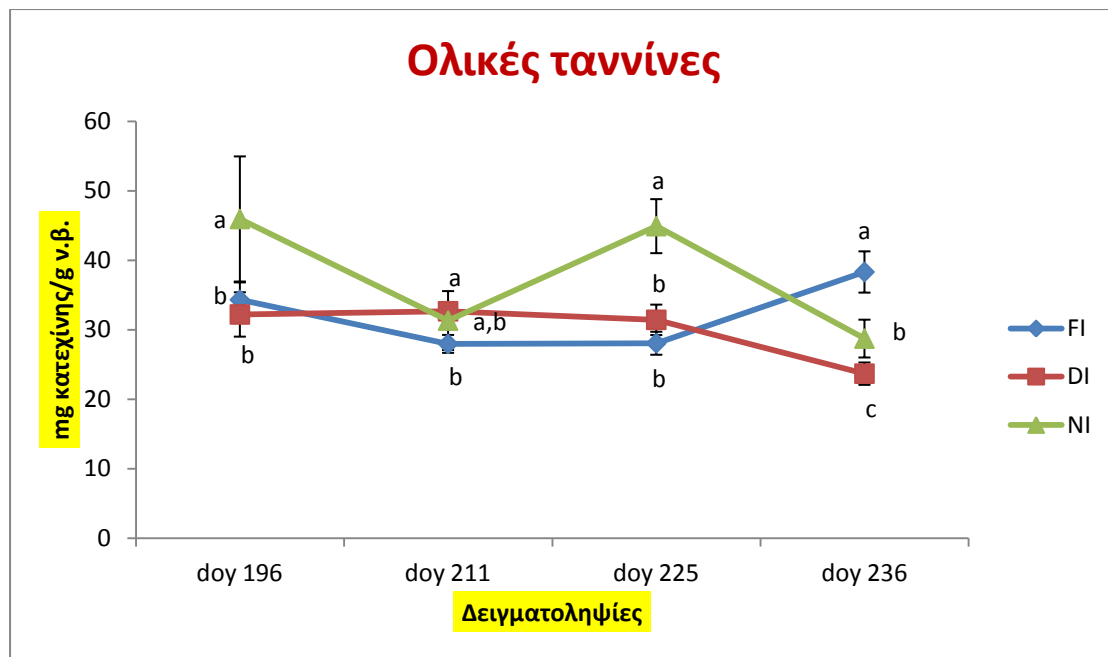
Με τη μέθοδο αυτή εκτιμήθηκαν οι ολικές ταννίνες στους φλοιούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 7). Είναι οι μέσες τιμές και εκφράζονται σε g κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών.

Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα της μεθόδου «ολικές ταννίνες με βρασμό»

Δειγματοληψίες	Ολικές ταννίνες (mg κατεχίνης/g ν.β)			N
	Επεμβάσεις ποτίσματος			
	FI	DI	NI	
doy 196	34,4±2,5 b	32,2±3,2 b	45,9±9,0 a	6
doy 211	28,0±1,3 b	32,7± 0,8 a	31,3±4,2 a,b	6
doy 225	28,1±1,7 b	31,4±2,2 b	44,9±3,9 a	6
doy 236	38,3±3,0 a	23,7±1,6 c	28,7±2,7 b	6

Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επαναλήψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Σύμφωνα με τον πίνακα οι ολικές ταννίνες των φλοιών στην 1^η (doy 196) δειγματοληψία παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στα μη αρδευόμενα (NI) πρέμνα με στατιστική διαφορά από τα 100% (FI) και 50% (DI) αρδευόμενα πρέμνα που ακολουθούν. Κατά τη 2^η (doy 211) δειγματοληψία η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζεται στα 50% (DI) αρδευόμενα πρέμνα και ακολουθούν τα πρέμνα με μηδενική (NI) άρδευση και αυτά με 100% (FI) άρδευση, η διαφορά όμως είναι σημαντική μόνο μεταξύ των επεμβάσεων NI και FI. Κατά την 3^η (doy 225) δειγματοληψία τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζουν τα μη αρδευόμενα (NI) πρέμνα με στατιστική διαφορά από τα 50% (DI) και 100% (FI) πρέμνα που ακολουθούν. Τέλος, κατά την 4^η (doy 236) δειγματοληψία, η κατάσταση αντιστρέφεται, καθώς τα 100% (FI) αρδευόμενα πρέμνα παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση με σημαντική διαφορά από τα μη αρδευόμενα (NI) και τα 50% (DI) αρδευόμενα που ακολουθούν. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική και μεταξύ των επεμβάσεων NI και DI. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 17).



Γράφημα 17: Ολικές ταννίνες φλοιών

Σύμφωνα με τα παραπάνω η συγκέντρωση των ολικών ταννινών φαίνεται να ευνοείται από τη μηδενική (NI) άρδευση. Αυτό δε συμβαίνει μόνο κατά την τελευταία (doy 236) δειγματοληψία, στην οποία τα 100% αρδευόμενα (FI) πρέμνα παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Στην δειγματοληψία αυτή, ίσως επέδρασαν και άλλοι μη σταθεροί παράγοντες στη συγκέντρωσή τους. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί εν μέρει με τη μελέτη των Esteban et al. (2001) στην ποικιλία Tempranillo, στην οποία κατέληξαν ότι οι συγκεντρώσεις των ταννινών στους φλοιούς ήταν πάντοτε μεγαλύτερες στα μη αρδευόμενα πρέμνα χωρίς, ωστόσο, οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Οι Roby et al. (2004) υποστηρίζουν ότι αυτό οφείλεται περισσότερο στη διαφοροποίηση του ρυθμού αύξησης των κυττάρων του φλοιού και λιγότερο στην άμεση διαφοροποίηση στο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης.

Σε άλλη έρευνα, οι Bucchetti et al. (2011), διαπίστωσαν ότι στην ποικιλία Merlot η ελλειμματική άρδευση προκάλεσε αύξηση στη συγκέντρωση των ταννινών των φλοιών (mg/g NB ράγας) κατά τον τρυγητό από 13% έως 17% σε σχέση με τα αρδευόμενα πρέμνα στις τρεις εκ των τεσσάρων καλλιεργητικών περιόδων που διεξήχθη η έρευνα. Η συγκέντρωση δεν επηρεάστηκε σε μια μόνο καλλιεργητική περίοδο.

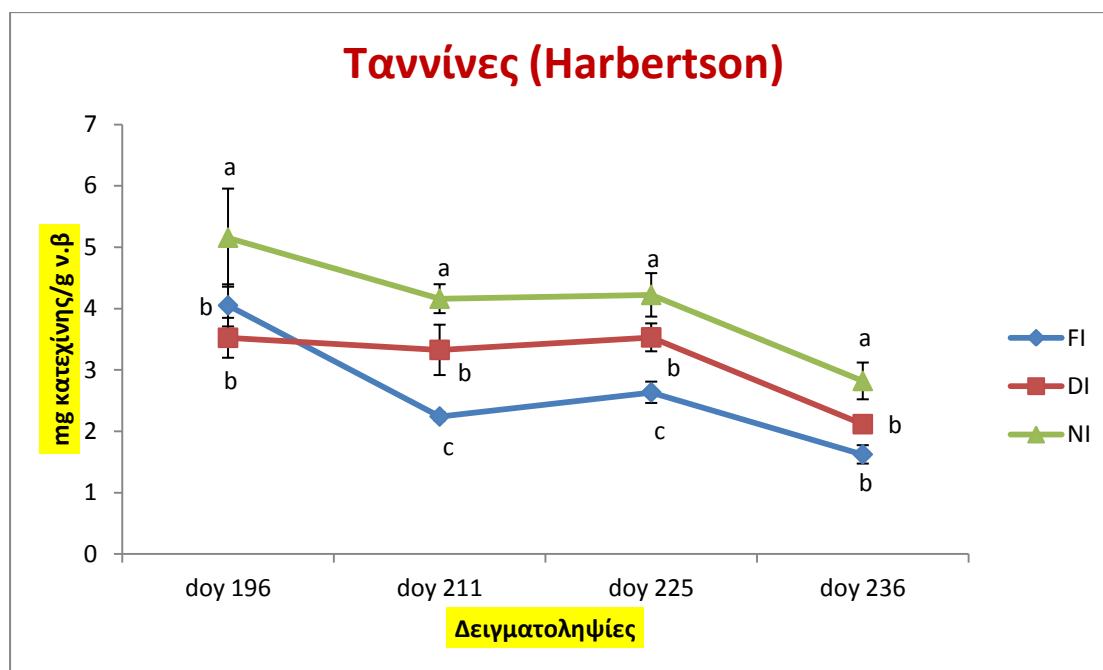
3) Αποτελέσματα της μεθόδου Harbertson (BSA) στα εκχυλίσματα των φλοιών

Με τη μέθοδο αυτή έγινε έμμεση (μέσω αντίδρασης με πρωτεΐνες) εκτίμηση των ταννινών στους φλοιούς των ραγών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα (Πίνακας 8) και στο γράφημα (Γράφημα 18) που ακολουθούν. Είναι οι μέσες τιμές και εκφράζονται σε g κατεχίνης / g νεπού βάρους φλοιών.

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα της μεθόδου ταννίνες με μέθοδο Harbertson

Δειγματοληψίες	Ταννίνες φλοιών (mg κατεχίνης/g ν.β)			N
	Επεμβάσεις ποτίσματος			
	FI	DI	NI	
doy 196	4,05±0,34 b	3,53±0,33 b	5,15±0,80 a	6
doy 211	2,24±0,07 c	3,32±0,41 b	4,16±0,24 a	6
doy 225	2,63±0,17 c	3,53±0,23 b	4,22±0,35 a	6
doy 236	1.62±0,15 b	2,11±0,10 b	2,82±0,30 a	6

Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη



Γράφημα 18: Ταννίνες φλοιών με τη μέθοδο Harbertson

Όπως παρατηρείται, η επέμβαση που ευνοεί ξεκάθαρα τη συγκέντρωση των ταννινών είναι η μηδενική (NI) άρδευση καθώς δίνει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με σημαντική στατιστική διαφορά από της επεμβάσεις 50% (DI) και 100% (FI) άρδευση

που ακολουθούν. Μεταξύ των DI και FI επεμβάσεων υπάρχει σημαντική διαφορά μόνο κατά την 2^η και 3^η δειγματοληψία. Οπότε, το συμπέρασμα που προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου, είναι ότι η συγκέντρωση των ταννινών στους φλοιούς των ραγών επηρεάζεται ξεκάθαρα από το επίπεδο άρδευσης. Όσο αυτό μειώνεται, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωσή τους. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί αρκετά με τις έρευνες των Esteban et al. (2001 και Bucchetti et al. (2011) που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

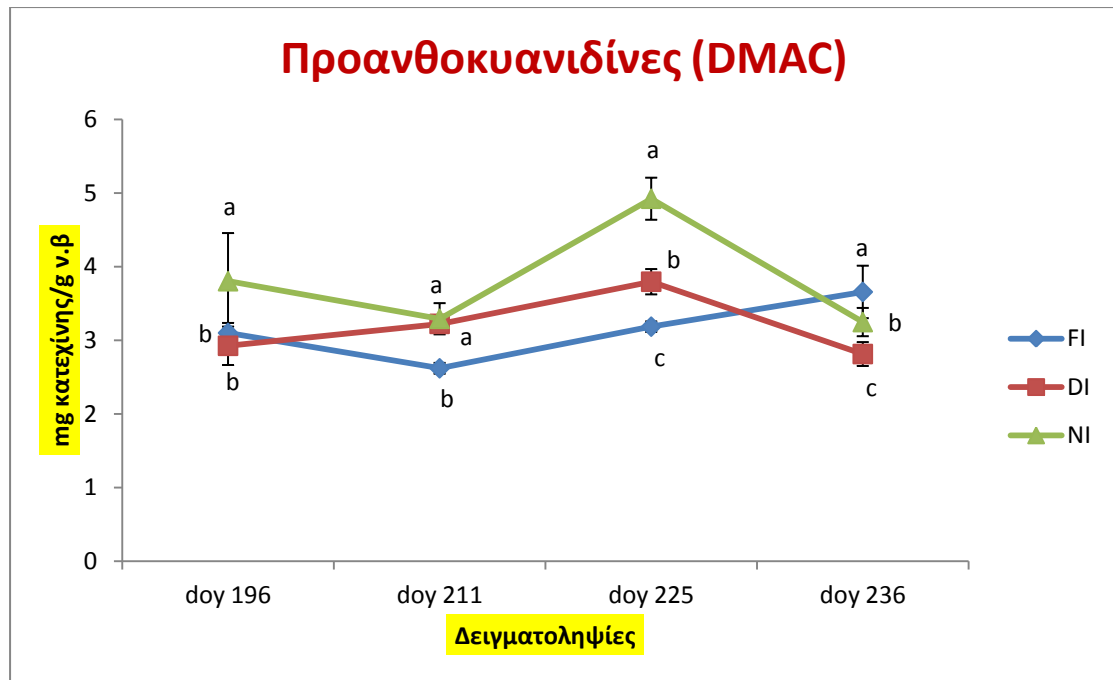
4) Αποτελέσματα της μεθόδου “DMAC” στα εκχυλίσματα των φλοιών

Με τη μέθοδο αυτή εκτιμήθηκαν οι φλαβανόλες και προκυανιδίνες στους φλοιούς των ραγών. Τα αποτελέσματα της εκφράζονται σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους φλοιών και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Τα αποτελέσματα της μεθόδου “DMAC”

	Προανθοκυανιδίνες (mg κατεχίνης/g ν.β)			N
	Επεμβάσεις ποτίσματος			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
doy 196	3,10±0,14 b	2,92±0,26 b	3,80±0,65 a	6
doy 211	2,62±0,07 b	3,22±0,11 a	3,29±0,21 a	6
doy 225	3,18±0,07 c	3,79±0,17 b	4,92±0,29 a	6
doy 236	3,66±0,36 a	2,81±0,16 c	3,25±0,19 b	6
Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, p< 0,05), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψεις (2) Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη				

Όπως παρατηρείται, η συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών παρουσιάζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στην επέμβαση της μηδενικής (NI) άρδευσης σε όλες τις δειγματοληψίες εκτός της τελευταίας (doy 236). Στην 1^η (doy 211) η διαφορά της μηδενικής (NI) άρδευσης είναι στατιστικά σημαντική από τις επεμβάσεις 100% (FI) και 50% (DI) άρδευση, που ακολουθούν. Κατά την 2^η (doy 211) δειγματοληψία η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική με την επέμβαση FI και κατά την 3^η (doy 225) και με την DI και με την FI. Τέλος, κατά τις 4^η (doy 236) οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ και των τριών επεμβάσεων. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται και στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 18).



Γράφημα 19: Προκυανιδίνες φλοιών με τη μέθοδο “DMAC”

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών στους φλοιούς φαίνεται να ευνοείται μέχρι ενός σημείου από τη μηδενική (NI) άρδευση. Δεν σημαίνει το ίδιο στο τέλος της ωρίμανσης στην οποία, ίσως, υπήρχε αλληλεπίδραση και άλλων παραγόντων στην τελική διαμόρφωση της συγκέντρωσής τους. Σύμφωνα με σχετική έρευνα των Ojeda et al. (2002), οι προκυανιδίνες (mg/g NB φλοιού) είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε πρέμνα της ποικιλίας Syrah στα οποία εφαρμόστηκε το υψηλότερη ελλειμματική άρδευση μετά τον περκασμό. Αντιθέτως, οι Zarrouk et al. (2012), διαπίστωσαν ότι τα πρέμνα της ποικιλίας Aragonéz (συνώνυμη της Tempranillo) έδωσαν αυξημένες συγκεντρώσεις προανθοκυανιδινών (mg/g NB φλοιών) με την άρδευση σε όλα τα φαινολογικά τους στάδια.

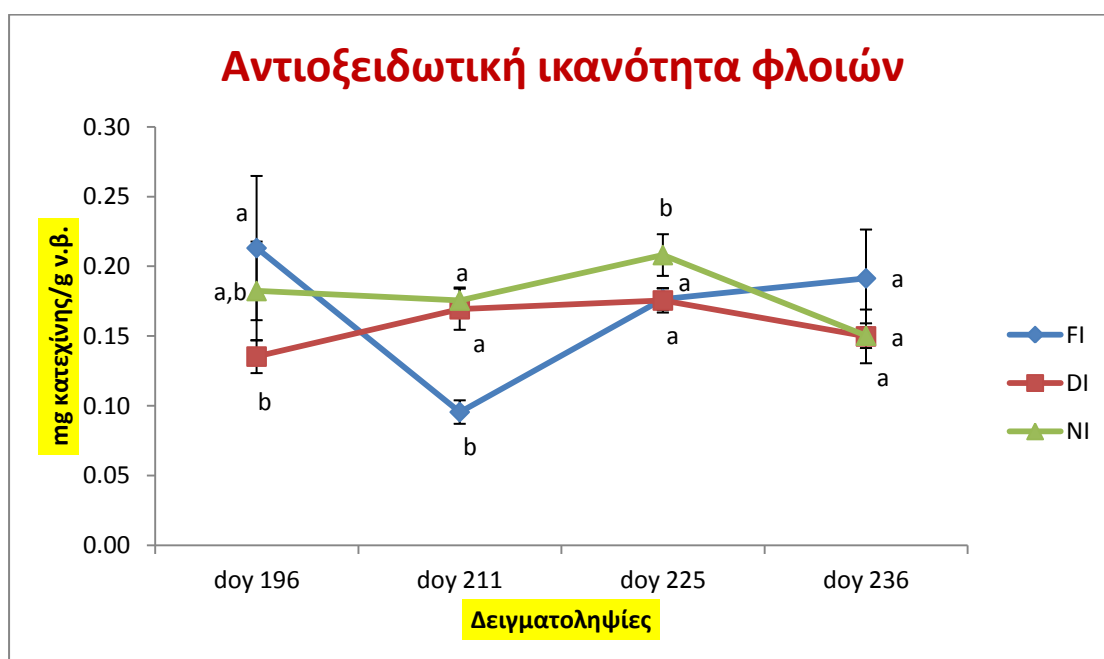
5) Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH (μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας) στα εκχυλίσματα των φλοιών

Η αντιοξειδωτική ικανότητα στα εκχυλίσματα φλοιών εκφράζεται ως mmol Trolox / g νωπού βάρους φλοιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10) και στο γράφημα (Γράφημα 20) που ακολουθεί.

Πίνακας 10: Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH στα εκχυλίσματα των φλοιών

	Αντιοξειδωτική ικανότητα (mmole trolox/g v.β)			N
	Επεμβάσεις ποτίσματος			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
doy 196	0,213±0,052 a	0,135±0,012 b	0,182±0,035 a,b	6
doy 211	0,096±0,008 b	0,169±0,015 a	0,176±0,009 a	6
doy 225	0,177±0,008 a	0,176±0,009 a	0,208±0,015 b	6
doy 236	0,191±0,035 a	0,150±0,019 a	0,150±0,009 a	6

Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επαναλήψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη



Γράφημα 20: Αντιοξειδωτική ικανότητα φλοιών με τη μέθοδο DPPH

Όπως παρατηρείται, σε κάθε δειγματοληψία διαφορετική επέμβαση καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό αντιοξειδωτικής ικανότητας. Οι πορεία που ακολουθεί κάθε επέμβαση έχει κάποιες ομοιότητες με τα αποτελέσματα των μεθόδων «ολικές ταννίνες με βρασμό» και προκυανιδίνες με “DMAC”. Μια πιο σταθερή και με υψηλά ποσοστά πορεία, φαίνεται να ακολουθεί η επέμβαση της μηδενικής (NI) άρδευσης η οποία καταλαμβάνει τα μεγαλύτερα ποσοστά κατά την 2^η (doy 211) και κατά την 3^η (doy 225) δειγματοληψία. Ωστόσο, δε συμβαίνει το ίδιο στην τελευταία (doy 236) δειγματοληψία), αλλά οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Από τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής, δεν μπορεί να βγει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.

Σε σχετική μελέτη, οι Ozden et al. (2010), διαπίστωσαν ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ράγες (διαχωρισμένες από τα γίγαρτα) της ποικιλίας Syrah είχε μεγαλύτερα ποσοστά σε επέμβαση μηδενικής και μικρής (25%) άρδευσης. Γενικά, υποστηρίζουν ότι ποικιλίες με υψηλότερο ποσοστό ολικών φαινολικών συστατικών και ολικών ανθοκυανών, έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

6) Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH (μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας) στα εκχυλίσματα των ανθοκυανών (της μεθόδου HPLC)

Η αντιοξειδωτική ικανότητα στα εκχυλίσματα των ανθοκυανών εκφράζεται ως mmol Trolox / g ξηρού εκχυλίσματος φλοιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11).

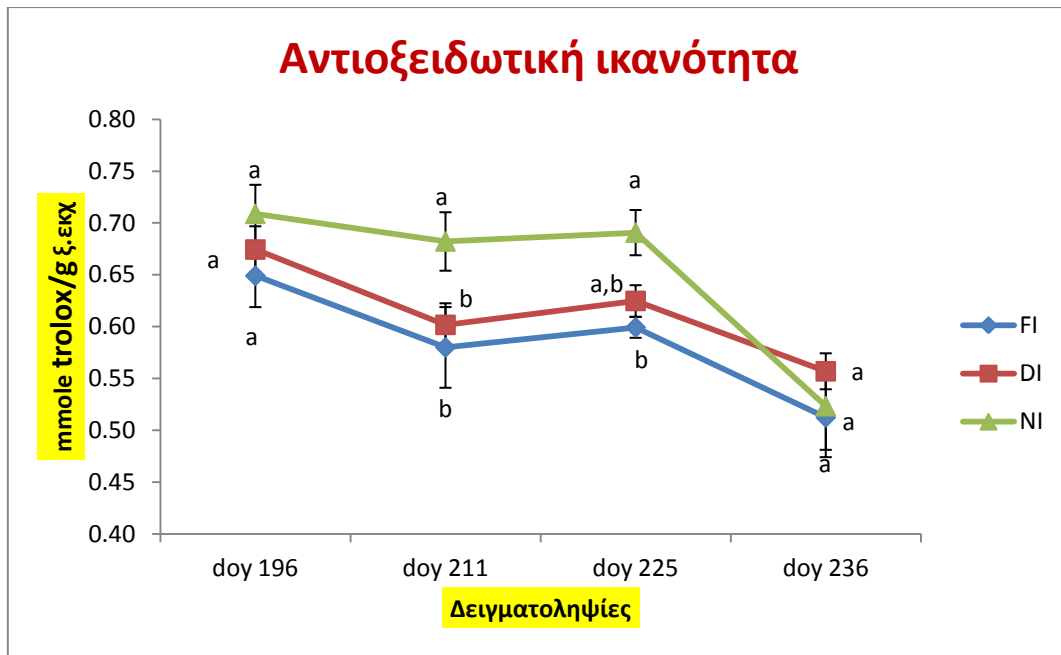
Πίνακας 11: Τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH στα εκχυλίσματα των ανθοκυανών

	Αντιοξειδωτική ικανότητα (mmole trolox/g ξ.εκχ.)			N
	Επεμβάσεις ποτίσματος			
Δειγματοληψίες	FI	DI	NI	
doy 196	0.649±0.0302 a	0.6744±0.0224 a	0.7088±0.028 a	6
doy 211	0.5799±0.0389 b	0.6017±0.0208 b	0.6821±0.0282 a	6
doy 225	0.5992±0.01 b	0.6248±0.0152 a,b	0.6907±0.0218 a	6
doy 236	0.5124±0.0384 a	0.5569±0.0174 a	0.5232±0.0421 a	6

Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), ± τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επαναλήψεις (2)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη

Όπως παρατηρείται, η επέμβαση της μηδενικής (NI) άρδευσης δίνει σταθερά το μεγαλύτερο ποσοστό αντιοξειδωτικής ικανότητας ανθοκυανών και ακολουθούν οι επεμβάσεις της 50% (DI) και της 100% (FI) άρδευσης. Αυτό δεν συμβαίνει στην τελευταία δειγματοληψία (doy 236) στην οποία το μεγαλύτερο ποσοστό δίνει η επέμβαση της 50% (DI) άρδευσης. Σημαντικές στατιστικές διαφορές υπάρχουν στην 2^η (doy 211) δειγματοληψία, μεταξύ της NI και των άλλων δύο επεμβάσεων και στην 3^η (doy 225) δειγματοληψία, μεταξύ της επέμβασης NI και FI.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής (Γράφημα 21) είναι σχεδόν αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της μεθόδου Pand για τις ανθοκυανές σε mg/g ράγας εφόσον τα οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανθοκυανών συνοδεύονται και με μεγαλύτερο ποσοστό στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα.



Γράφημα 21: Αντιοξειδωτική ικανότητα ανθοκυανών με τη μέθοδο DPPH

7) Αποτελέσματα μονομερών και ολιγομερών φλαβαν-3-ολών φλοιών με HPLC

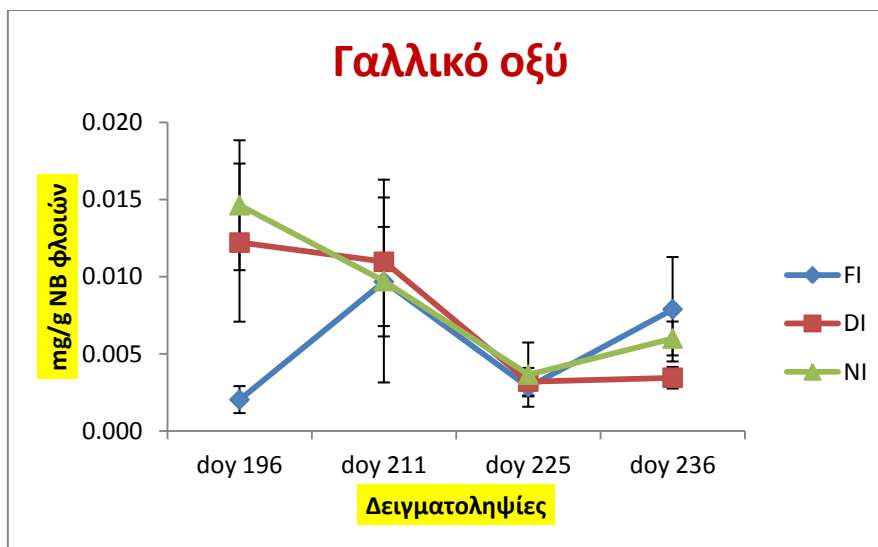
Η ανάλυση HPLC εφαρμόστηκε στα εκχυλίσματα των φλοιών για τον προσδιορισμό των μονομερών και ολιγομερών φλαβαν-3-ολών. Τα μονομερή που προσδιορίστηκαν είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη του γαλλικού εστέρα και η επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού εστέρα. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι διμερείς προκυανιδίνες B1, B2 και A2 και η τριμερής C1. Τέλος, προσδιορίστηκε και το γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg / g νωπού βάρους φλοιών. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας (Πίνακας 12) με τα αποτελέσματα από την ανάλυση HPLC στα εκχυλίσματα των φλοιών καθώς και τα αντίστοιχα γραφήματα (Γράφημα 22, 23, 24, και 25).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν μπορεί να βγει κάποιο συμπέρασμα από την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, καθώς οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εναλλάσσονται μεταξύ των επεμβάσεων σε κάθε δειγματοληψία, επίσης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μόνο στην περίπτωση του συνόλου των B1, B2, C1 και A2 φαίνεται η μηδενική άρδευση να δίνει καλά αποτελέσματα αλλά η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική μόνο στην 1^η (doy 196) δειγματοληψία.

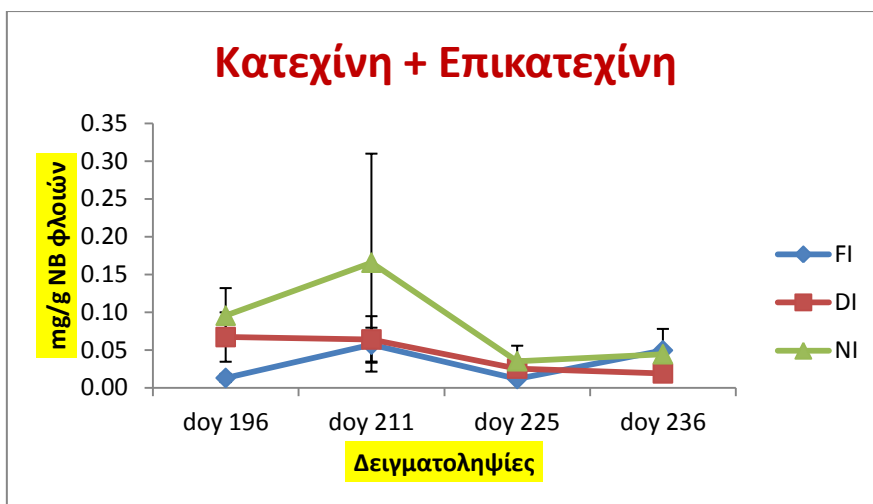
Πίνακας 12: Τα αποτελέσματα των μονομερών και oligομερών φλαβαν-3-ολων

Δειγματοληψίες	Επεμβάσεις ποτίσματος			N
	gallic acid (mg/g v.β)			
	FI	DI	NI	
day 196	0,0020±0,0009 a	0,0122±0,0051 a	0,0146±0,0042 a	3
day 211	0,0097±0,0035 a	0,0110±0,0042 a	0,0097±0,0066 a	3
day 225	0,0028±0,0006 a	0,0032±0,0009 a	0,0036±0,0021 a	3
day 236	0,0079±0,0024 a	0,0034±0,0007 a	0,0060±0,0011 a	3
	Catechin + Epicatechin (mg/g v.β)			
day 196	0,0131±0,0054 a	0,0672±0,0327 a	0,0955±0,0365 a	3
day 211	0,0572±0,0224 a	0,0641±0,0308 a	0,1657±0,1442 a	3
day 225	0,0118±0,0033 a	0,0256±0,0062 a	0,0353±0,0205 a	3
day 236	0,0497±0,0283 a	0,0192±0,0050 a	0,0445±0,0077 a	3
	EGC + EGC + EGCG (mg/g v.β)			
day 196	0,0541±0,0271 a	0,2469±0,1004 a	0,3908±0,1223 a	3
day 211	0,3061±0,1094 a	0,3391±0,1471 a	0,1803±0,0992 a	3
day 225	0,0926±0,0112 a	0,1346±0,0328 a	0,1687±0,1067 a	3
day 236	0,3006±0,1438 a	0,1239±0,0229 a	0,1687±0,0787 a	3
	B1 + B2 + C1 + A2 (mg/g v.β)			
day 196	0,0385±0,0146 b	0,1195±0,0880 a,b	0,5958±0,1976 a	3
day 211	0,2154±0,0741 a	0,2923±0,1307 a	0,1764±0,0753 a	3
day 225	0,0790±0,0103 a	0,2669±0,1200 a	0,8927±0,4341 a	3
day 236	0,2063±0,1537 a	0,0732±0,0096 a	0,1801±0,0251 a	3

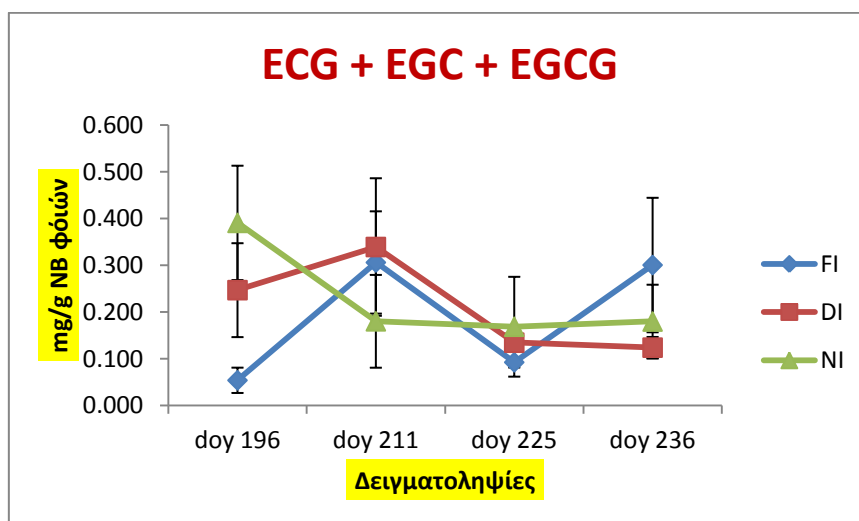
Τιμές με διαφορετικά γράμματα σε κάθε γραμμή διαφέρουν σημαντικά (Tukeys's Test, $p < 0,05$), \pm τυπικό σφάλμα, N= αριθμός δειγμάτων (3)*επανάληψεις (1)
Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι σε τριπλή επανάληψη



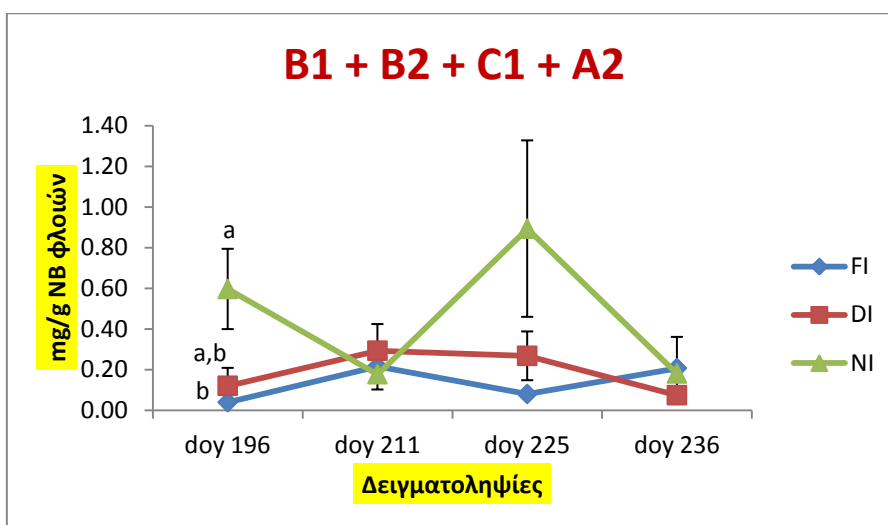
Γράφημα 22: Η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος



Γράφημα 23: Η συγκέντρωση του συνόλου κατεχίνης και επικατεχίνης



Γράφημα 24: Η συγκέντρωση του συνόλου επικατεχίνης του γαλλικού εστέρα, επιγαλλοκατεχίνης και επιγαλλοκατεχίνης του γαλλικού εστέρα



Γράφημα 25: Η συγκέντρωση του συνόλου των προκυανιδινών B1, B2, C1 και A2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης του παράγοντα «άρδευση» στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών σε ράγες και φλοιούς της ποικιλίας *Vitis vinifera* «Syrah». Το πείραμα διεξήχθη για την χρονιά 2012. Οι επεμβάσεις άρδευσης που εφαρμόστηκαν ήταν: η πλήρης άρδευση (100% της εξατμισοδιαπνοής), η ελλειμματική (50% της εξατμισοδιαπνοής) και η μηδενική (πλήρης απουσία άρδευσης). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ράγες καθώς και σε εκχυλίσματα φλοιών. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω.

Βάσει των αποτελεσμάτων φαίνεται πως τα πρέμνα που έτυχαν περισσότερης άρδευσης έδωσαν μεγαλύτερες ράγες σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης με στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως και ήταν αναμενόμενο. Όμως η ελλειμματική άρδευση δείχνει να ευνοεί το επί τοις εκατό (%) ποσοστό γιγάρτων / ράγα, το επί τοις εκατό (%) ποσοστό φλοιού / ράγα και φλοιού / σάρκα, οι δε τιμές αυτών λαμβάνουν τα μέγιστα τους στα απότιστα πρέμνα. Συνεπώς ενώ η άρδευση θα αυξήσει την παραγωγή και την απόδοση στον αμπελώνα της συγκεκριμένης περιοχής, εδάφους, κλίματος και ποικιλίας, η απουσία της θα δώσει ράγες με περισσότερα γίγαρτα και φλοιούς και θεωρητικά πιο πλούσια σε τανίνες και ανθοκυάνες.

Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα των ολικών ανθοκυανών κατά την έκφρασή τους σε mg/g ράγας, όπου παρατηρείται ότι όσο μειώνεται το επίπεδο άρδευσης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωσή των ανθοκυανών στις ράγες. Το ίδιο παρατηρείται και για τα ολικά φαινολικά των ραγών (au/g ράγας) όπου η πλήρης απουσία άρδευσης ανέβασε τις συγκεντρώσεις τους στις ράγες σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στην περίπτωση αυτή έχουμε έμμεση επίδραση του παράγοντα «άρδευση», καθώς τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καταλαμβάνουν οι ράγες με τα μικρότερα βάρη.

Αντίθετα τα ολικά φαινολικά συστατικά, όταν εκφράζονται σε au/ράγα αυξάνονται κατά την εφαρμογή της πλήρους (100%) άρδευσης. Είχαμε, έτσι, άμεση επίδραση του παράγοντα «άρδευση» στη σύνθεση των φαινολικών συστατικών της ράγας, η οποία αυξήθηκε στην περίπτωση του υψηλού επιπέδου άρδευσης. Αυτό ίσως οφείλεται στις τανίνες των γιγάρτων, που όπως είναι γνωστό μειώνονται κατά την ωρίμανση, όμως πιθανή εφαρμογή πλήρους άρδευσης καθυστερεί την ωρίμανση και συνεπώς την μείωση φαινολικών ή των τανινών των ραγών και των γιγάρτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φλοιών φαίνεται να υπάρχει μια θετική επίδραση της μηδενικής άρδευσης στις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών, των ανθοκυανών, των προκυανιδινών και των ταννινών, εκτός από το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, στις περισσότερες των περιπτώσεων.

Το παραπάνω παρατηρείται, στην περίπτωση των ανθοκυανών των φλοιών, όπου τα σύνολα των μονογλυκοζιτών, των οξικών και των κουμαρικών εστέρων των ανθοκυανών λαμβάνουν τα καλύτερα αποτελέσματα από τη μηδενική άρδευση. Αυτό δε συμβαίνει στην πλήρη ωρίμανση που στην περίπτωση των μονογλυκοζιτών δεν υπάρχει στατιστική διαφορά (αν και πάλι λαμβάνουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση), αλλά στην περίπτωση των οξικών και των κουμαρικών εστέρων η πλήρης άρδευση δίνει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επίσης, τα επί τοις εκατό (%) ποσοστά επί του συνόλου των ανθοκυανών των κύριων ενώσεων (μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης, μονογλυκοζίτης της πετουνιδίνης και παιονιδίνης), φαίνεται να ευνοούνται από την μηδενική ή την ελλειμματική (50%) άρδευση στις περισσότερες περιπτώσεις.

Το ίδιο παρατηρείται και στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών των φλοιών, η οποία αυξάνεται από την μηδενική άρδευση, εκτός από το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, στην οποία την μεγαλύτερη συγκέντρωση δίνει η πλήρης άρδευση (χωρίς να διαφέρει σημαντικά από τη μηδενική άρδευση). Παρόμοια, και η συγκέντρωση των ολικών ταννινών των φλοιών, ευνοείται από την μηδενική άρδευση εκτός από την πλήρη ωρίμανση, στην οποία μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δίνει η πλήρης άρδευση. Αντίθετα, η συγκέντρωση των ταννινών στους φλοιούς (μέθοδος Harbertson), αυξάνεται καθώς το επίπεδο άρδευσης μειώνεται, σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης.

Επίσης, η συγκέντρωση των προκυανιδινών των φλοιών, είναι μεγαλύτερη σε όλα τα στάδια ωρίμανσης στην επέμβαση της μηδενικής άρδευσης, εκτός της πλήρους ωρίμανσης, κατά την οποία η πλήρης (100%) άρδευση δίνει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανών, έχει τα μεγαλύτερα ποσοστά στη μηδενική, με την ελλειμματική (50%) και την πλήρη (100%) άρδευση να ακολουθούν, ενώ κατά την πλήρη ωρίμανση το μεγαλύτερο ποσοστό δίνει η ελλειμματική (50%) άρδευση (με μη σημαντικές διαφορές).

Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από όλα τα παραπάνω είναι ότι η απουσία άρδευσης επιδρά θετικά στη φαινολική σύνθεση των ραγών και φλοιών της ποικιλίας Syrah αλλά αυτό επιτυγχάνεται περισσότερο με έμμεσο παρά με άμεσο

τρόπο καθώς, η πιο χαρακτηριστική επίδραση της άρδευσης στην ποιότητα των ραγών ήταν αυτή που είχε να κάνει με τη μεταβολή του βάρους τους.

Όπως είναι γνωστό, οι επιδράσεις στη φαινολική σύνθεση των ραγών από την άρδευση και γενικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και καλλιεργητικές τεχνικές μπορεί να είναι είτε άμεσες, είτε έμμεσες. Η έμμεση είναι η θετική απόκριση εξαιτίας της επίδρασης του μειωμένου βάρους της ράγας (επίδραση στη συγκέντρωση). Η άμεση, αναφέρεται στην άμεση ανταπόκριση στη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών που μπορεί να είναι είτε θετική, είτε αρνητική και εξαρτάται από τον τύπο της φαινολικής ένωσης, το μέγεθος του υδατικού ελλείμματος και το χρονικό σημείο στο οποίο εφαρμόζεται.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η μελέτη της επίδρασης της ελλειμματικής άρδευσης είναι δύσκολη, καθώς επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα φυτικών διεργασιών, εκτός της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών. Τέτοιες διεργασίες είναι η φωτοσύνθεση και το κλείσιμο των στοματίων, που έχουν άμεση επίδραση στη συσσώρευση των μεταβολιτών. Έτσι, είναι δύσκολη η μεμονωμένη διερεύνηση της επίδρασης της επέμβασης της άρδευσης, κάτι το οποίο αποδεικνύεται και από τα ποικίλα αποτελέσματα που έχουν καταλήξει διάφοροι ερευνητές.

Η ελλειμματική άρδευση είναι πιθανός ρυθμιστής του δευτερογενούς μεταβολισμού κατά την ωρίμανση της ράγας. Η υδατική καταπόνηση που προκαλείται, έχει επιπτώσεις ανάλογα με το χρόνο (στάδιο) που εφαρμόζεται, τη διάρκεια και την έντασή της. Για την παρούσα εργασία, τα τελικά αποτελέσματα ίσως ήταν καλύτερα αν η ελλειμματική άρδευση εφαρμόζονταν για μικρότερη χρονική διάρκεια ή σε συγκεκριμένα μόνο στάδια της ωρίμανσης των ραγών, καθώς μόνο κατά την πλήρη ωρίμανση υπήρξαν διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια στις μετρήσεις που έγιναν σε φλοιούς. Έτσι, θα μπορούσε να ειπωθεί πως η ελλειμματική άρδευση, εκτός από έμμεσα, επηρέασε και άμεσα τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών της ράγας.

Συμπερασματικά, για την εφαρμογή της καλλιεργητικής τεχνικής της ελλειμματικής άρδευσης, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι σταθεροί και ασταθείς παράγοντες, για αποφυγή έμμεσων αρνητικών αποτελεσμάτων. Θα πρέπει να εφαρμόζεται μόνο σε περιπτώσεις που οι γενικότερες συνθήκες είναι ευνοϊκές, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι όσο το δυνατόν καλύτερα για την παραγωγή και την ποιότητα των σταφυλιών και κατά συνέπεια του παραγόμενου οίνου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acevedo-Opazo C., Ortega-Farias S., Fuentes S., (2010). Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: An irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation. *Agricultural Water Management*, 97: 956–964.
- Adams D.O., (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 249-256.
- Ban T., Ishimaru M., Kobayashi S., Shiozaki S., Goto-Yamamoto N., Horiuchi S., (2003). Abscisic acid and 2,4-dichloroethoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in ‘Kyoho’ grape berries. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78: 586-589.
- Bindon K., Myburgh P., Oberholster A., Roux K., Du Toit C., (2011). Response of grape and wine phenolic composition in *Vitis vinifera* L. cv. Merlot to variation in grapevine water status. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32: 71-88.
- Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P., (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevines leaves. *Plant Physiology*, 139: 652-663.
- Bogs J., Ebadi A., McDavid D., Robinson S.P., (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology*, 140: 279-291.
- Boonterm V., Wanapu C., Silapapum A., Boonkerd N., (2011). Effects of nitrogen, potassium fertilizer, and clusters per vine on anthocyanins content in Cabernet Sauvignon wine. *Journal of Science and Technology*, 18 (1): 41-54.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P., (1996). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology*, 32: 565-569.
- Boulton R., (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 67-87.

- Bucchetti B., Matthews M.A., Falginella L., Peterlunger E., Castellarin S.D., (2011). Effect of water deficit on Merlot grape tannins and anthocyanins across four seasons. *Scientia Horticulturae*, 128: 297–305.
- Braidot E., Zancani M., Petrusa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macrì F., (2008). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera L.*). *Plant Signaling & Behavior*, 3: 626–632.
- Canals R., Llaudy M.C., Valls J., Canals J.M., Zamora, F., (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 4019-4025.
- Castellarin S.D., Di Gaspero G., Marconi R., Nonis A., Peterlunger E., Paillard S., Adam-Blondon, A.F., Testolin R., (2006). Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera L.*): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*, 7: 12.
- Castellarin S.D., Pfeiffer A., Sivilotti P., Degan M., Peterlunger E., Di Gaspero G., (2007b). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment*, 30: 1381-1399.
- Castellarin S.D., Matthews M.A., Di Gaspero G., Gambetta G.A., (2007a). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101-112.
- Castellarin S.D., Bavaresco L., Falginella L., Gonçalves M.I.V.Z., di Gaspero G., (2012). Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants. In: *The Biochemistry of the grape berry*. Gerós, H., Chaves M., Delrot S., Eds., Bentham Science: Bussum, The Netherlands. pp: 89–110.
- Castillo-Sánchez J. X., García-Falcón M. S., Garrido J., Martínez-Carballo E., Martins-Dias L. R., Mejuto X.C., (2008). Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, 106: 18-26.
- Chalmers Y.M., (2007). Influence of sustained deficit irrigation on physiology and phenolic compounds in winegrapes and wine. Thesis. The University of Adelaide.

- Chalmers Y.M., Downey M.O., Krstic M.P., Loveys B.R., Dry P.R., (2010). Influence of sustained deficit irrigation on colour parameters of Cabernet Sauvignon and Shiraz microscale wine fermentations. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16: 301-313.
- Chaves M.M., Santos T.P., Souza C.R., Ortuño M.F., Rodrigues M.L., Lopes C.M., Maroco J.P., Pereira J.S., (2007). Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150(2): 237-252.
- Cheyrier V., Labarbe B., Moutounet M., (2001). Sources, characterization, and methods: Estimation of Procyanidin Chain Length. *Methods In Enzymology*, Vol. 335 Academic Press.
- Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A.C.P., Tavares R.M., Sousa, M.J., Agasse A., Delrot S., Gerós H., (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1(1): 1–22.
- Considine J.A., Knox R.B., (1979). Development and histochemistry of the cells, cell walls and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera L.*, *Protoplasma*, 99: 347-365.
- Coombe B., (1976). The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology*, 27: 207-228.
- Coombe B.G., (1989). The grape berry as a sink. *Acta Horticulturae*, 239: 149-158.
- Coombe, B.G., Dry P.R., (1992): *Viticulture*, Vol 2: Practices. Winetitles. Adelaide.
- Cortell J. M., (2006). Influence of Vine Vigor and Shading in Pinot noir (*Vitis vinifera L.*) on the Concentration and Composition of Phenolic Compounds in Grapes and Wine. Oregon State University.
- Cortell J.M., Halbleib M., Gallagher A.V., Righetti T.L., Kennedy L.A., (2005). Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera L.* cv. Pinot noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5798-5808.
- Da-Costa C. T., Horton D., Margolis S. A., (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 881: 403-410.

- Deloire A., Silva P., Martin-Pierrat S., (2003). Terroirs et état hydrique du Grenache noir. *Progrès Agricole et Viticole*, 120 (17): 367-373.
- Deluc L.G., Decendit A., Papastamoulis Y., Mérillon J.M., Cushman J.C., Cramer G.R., (2011). Water deficit increases stilbene metabolism in Cabernet Sauvignon berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 289–297.
- Deluc L.G., Quilici D.R., Decendit A., Grimplet J., Wheatley M.D., Schlauch K.A., Mérillon J.M., Cushman J.C., Cramer G.R., (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics*, 10: 212.
- Dewick P.M., Haslam E., (1969). Phenol biosynthesis in higher plants: gallic acid. *Biochemical Journal*, 113: 537-542.
- Downey M.O., Dokoozlian N.K., Krstic, M.P., (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 257-268.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P., (2003b). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera L.*). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 110-121.
- Dry P.R., Loveys B.R., (1998). Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4: 140-148.
- El-Ansary D. O., Okamoto G., (2007). Effects of Deficit Irrigation Strategies on Vine Water Status, Canopy and Cluster Temperatures, Fruit Total Phenolics, and the Color of Muscat of Alexandria Table Grapes. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture of Okayama University*, 96: 29-35.
- Esteban M.A., Villanueva M.J., Lissarrague J.R., (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera L.*) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 409-420.
- Fernández-López J.A., Hidalgo V., Almela L., López Roca J.M., (1992). Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis Vinifera* cv Monastrell during maturation. *Journal of Science and Food Agriculture*, 58: 153-155.

- Fournand D., Vicens A., Sidhoum L., Souquet J.M., Moutounet M., Cheynier, V., (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7331-7338.
- Geny L., Saucier C., Bracco S., Daviaud F., Glories Y. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27): 8051–8054.
- Gerats T., Martin S., (1992). Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development. *The Plant Cell*, 5 (10): 1253-1264
- Ginestar C., Eastham J., Gray S., Iland P., (1998). Use of sap-flow sensors to schedule vineyard irrigation. I. Effects of post-veraison water deficits on water relations, vine growth, and yield of Shiraz grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(4): 413-420.
- Gómez del Campo M., Ruiz C., Baeza P., Lissarrague J.R., (2003). Drought adaptation strategies of four grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L): modification of the properties of the leaf area. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 37 : 131-143.
- Gómez-Plaza E., Gil-Muñoz R., López-Roca J. M., Martínez A., (2000a). Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine- making techniques, storage temperature, and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 736-741.
- González-SanJosé M.L., Santa-Maria G., Diez C., (1990). Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3: 54-66.
- Goodwin I., Jerie P., (1989). Deficit irrigation of Chardonnay grapevines during flowering. *Acta Horticulturae*, 240: 275–278.
- Grimplet J., Deluc L.G., Tillet R.L., Wheatley M.D., Schlauch K. A., Cramer G.R., Cushman J.C.,(2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics*, 8: 187.

- Harbertson F.J., Kennedy A.J., Adams O.D., (2002). Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah and Pinot noir Berries during Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1): 54-59.
- Harbone J., (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids. London Academic Press
- Hardie W., Considine J., (1976). Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27: 55–61.
- Hasalm E., (1998). Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press.
- Hsiao T.C., Xu L.K., (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: Biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, 51 (350): 1595-1616.
- Iland P.G., Cynkar W., Francis I.L., Williams P.J., Coombe B.G., (1996). Optimisation of methods for the determination of total and red free glycosylglucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2: 171-178.
- Iland P., Ewart A., Sitters J., Markides A., Bruer N., (2000). Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown, SA.
- Jackson D.I., Lombard P.B., (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (4): 409-430.
- Jackson R.S., (2008). Wine Science, Principles and Applications, 3d Edition, Academic Press, San Diego, California.
- Jeong S.T., Goto-Yamamoto N., Kobayashi S., Esaka M., (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167: 247-252.
- Jones H.G., (1992). Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kallithraka S., Mohdaly A.A., Makris D.P., Kefalas P., (2005). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.):

- association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 375-386.
- Keller M., Hrazdina G., (1998). Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 341-349.
- Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L., (2000a). Changes in grape seed polyphenols during ripening. *Phytochemistry*, 55: 77-85.
- Kennedy J.A., Matthews M.A., Waterhouse A.L., (2002). The effect of maturity and vine water status on grape skin flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 268-274.
- Kennedy J.A., Saucier C., Glories Y., (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 3: 20–21.
- Kennedy J.A., Troup G.J., Pilbrow J.R., Hutton D.R., Hewitt D., Hunter C.R., Ristic R., Iland P.G., Jones G.P., (2000b). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera L. cv. Shiraz*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6: 244-254.
- Kobayashi S., Ishimaru M., Hiraoka K., Honda C., (2002). Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215: 924-933
- Koundouras S., Marinos V., Gkoulioti A., Kotseridis Y., Van Leeuwen C., (2006). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera L.*). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5077-5086.
- Koundouras S., Tsialtas I.T., Zioziou E., Nikolaou N., Kotseridis Y., (2009). Rootstock effects on the adaptive strategies of grapevine (*Vitis vinifera L. cv. Cabernet-Sauvignon*) under contrasting water status: Leaf physiological and structural responses. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 128: 86-96.
- Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.M., Moutounet M., (1999). Quantitative Fractionation of Grape Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2719-2723.

- Lakso A. N., (1992). Interaction of physiology with multiple environmental stresses in horticultural crops. *HortScience*, 25(11): 1365-1369.
- Lee H. S., Hong V., (1992). Chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography*, 624: 221-234.
- Lorrain B., Chira K., Teissedre P., (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry*, 126 (4): 1991–1999.
- Lovisol C., Schubert A., (1998). Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic activity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 693-700.
- Martinoia E., Meyer S., de Angeli A., Nagy R., (2012). Vacuolar transporters in their physiological context. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 183–213.
- Marrs K.A., Alfenito M.R., Lloyd A.M., Walbot V., (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene bronze-2. *Nature*, 375: 397-400.
- Mathews M.A., Anderson M.M., Schultz H., (1987). Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis*, 26: 147–160.
- Mayén M., Mérida J., Medina M., (1995). Flavonoid and non-flavonoid compounds during fermentation and post-fermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 255-261.
- McCarthy M.G., (1997). The effect of transient water deficit on berry development of cv. Shiraz (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3: 2–8.
- McCarthy M.G., (1999). Weight loss from ripening berries of Shiraz grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5: 10-16.
- McCarthy M.A., Loveys B.R., Dry P.R., Stoll M., (2000). Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines. In: Deficit irrigation practices. *Water reports*, Vol. 22. FAO, Corporate Document Repository.
- McCloskey L. P., Yengoyan L. S., (1981). Analysis of anthocyanins in *Vitis vinifera* wines and red color versus aging by HPLC and spectrophotometry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32: 257-261.

- Mueller L.A., Goodman C.D., Silady R.A., Walbot V., (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 123: 1561-1570.
- Mullins G.M., Bouguet Al., Williams E.L., (1990). *Biology of Grapevine*. Cambridge University Press, USA.
- Ojeda H., Andary C., Kraeva E., Carbonneau, A., Deloire A., (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4): 261-267.
- Ojeda H., Deloire A., Carbonneau A., (2001). Influence of water deficits on grape berry growth. *Vitis*, 40(3): 141-145.
- Ollé D., Guiraud J.L., Souquet J.M., Terrier N., Ageorges A., Cheynier V., Verries C., (2011). Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 90-100.
- Ozden M., Vardin H., Simsek M., Karaaslan M., (2010). Effects of rootstocks and irrigation levels on grape quality of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *African Journal of Biotechnology*, 9 (25): 3801-3807.
- Pedreira dos Santos T., Lopes C.M., Rodrigues L.M., de Souza C.R., Ricardo-da-Silva J.M., Maroco J.P., Pereira J.S., Chaves M.M., (2007). Effects of deficit irrigation strategies on cluster microclimate for improving fruit composition of Moscatel field-grown grapevines. *Scientia Horticulturae*, 112: 321-330.
- Peleg H., Gacon K., Schlich P., Noble A.C., (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers, and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:1123-1128.
- Peyrot des Gachons C., Van Leeuwen C., Tominaga T., Soyer J-P., Gaudillère, J-P., Dubourdieu D., (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 73-85.

- Pirie A.J.G., Mullins M.G., (1980). Concentration of phenolics in the skin of grape berries during fruit development and ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(1):34-36.
- Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M., (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 34. (3): 781-784.
- Revilla E., Ryan J. M., Martín-Ortega G., (1998). Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4592-4597.
- Reynolds A.G., Lowrey W.D., De Savigny C., (2005). Influence of irrigation and fertigation on fruit composition, vine performance and water relations of Concord and Niagara grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(2): 110-128.
- Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E., (1966). Dosage des tannins du vin rouges et détermination de leur structure (Content of tannins in red wine and determination of their structure). *Chem. Anal.*, 48: 188–196.
- Ribereau-Gayon P., Dubourdeu D., Doneche B., Lonvaud Al., (2006). Handbook of Enology, Vol 1: The Microbiology of Wine and Vinifications (2nd Edition).
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., (2006). Handbook of Enology. Vol 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments (2nd Edition).
- 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.
- Ristic R., Iland P.G., (2005). Relationships between seed and berry development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 43-58.
- Roby G., Habertson J.F., Adams D.A., Matthews M.A., (2004). Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10: 100-107.
- Roggero J.P., Coen S., Ragonnet B., (1986). High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37: 77-83.

- Romero P., Gil-Munoz R., Del Amor F. M., Valdés V., Fernández J. I., Martínez-Cutillas A., (2013). Regulated Deficit Irrigation based upon optimum water status improves phenolic composition in Monastrell grapes and wines. *Agricultural Water Management*, 121: 85– 101.
- Romeyer F.M., Macheix J.J., Goiffon J.P., Reminiac C.C., Sapis J.C., (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 346-349.
- Roubelakis-Angelakis K.A., Kliewer W.M., (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 275-280.
- Ryan J.M., Revilla E., (2003). Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3372-3378.
- Santesteban L.G, Miranda C., Royo J.B., (2011). Regulated deficit irrigation effects on growth, yield, grape quality and individual anthocyanin composition in *Vitis vinifera* L. cv. ‘Tempranillo’. *Agricultural Water Management*, 98: 1171–1179.
- Singleton V.L., (1980). Grape and wine phenolics – background and prospects. University of California, Davis.
- Somers T.C., (1976). Pigment development during the ripening of the grape. *Vitis*, 14: 269-277.
- Somers, T. C., & Evans M. E., (1977). Special evaluation of young red wines: antocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂ ,“chemical age”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 279-287.
- Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M., (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43 (2): 509-512.
- Sun B., Leandro C., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I., (1998). Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 46: 1390-1396.

- Sun B., Leandro M. C., De-Freitas V., Spranger M. I., (2006). Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1128: 27-38.
- Sun B., Spranger I., Roque-do-Vale F., Leandro C., Belchior P., (2001). Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5809-5816.
- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M., (1997). Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11: 287–313.
- Texeira A., Eiras-Dias J., Castellarin S., Geros H., (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 18711-18739.
- Van Leeuwen C., Trégoat O., Choné X., Jaeck M. E., Rabusseau S., Gaudillère, J.P., (2003). Régime hydrique, *Bulletin de l' O.I.V.* 867, 868: 367-378.
- Vidal S., Cartalade D., Souquet J. M., Fulcrand, H., Cheynier V., (2002). Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 2261-2266.
- Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Chenier V., Waters E., (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 564-573.
- Vande-Castele K., Geiger H., De-Loose R., Van-Sumere C., (1983). Separation of some proanthocyanidins and related substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 259: 291-300.
- Vezzulli S., Civardi S.F.F., Bavaresco L., (2007). Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 4: 2–5.
- Wample R.L., (2000). Regulated deficit irrigation as a water management strategy in *Vitis vinifera* production. In: Deficit irrigation practices. Water reports. Vol. 22. FAO, Corporate Document Repository. Rome.
- Watson B., (2003). Evaluation of winegrape maturity. In: E.W. Hellman (ed.). *Oregon viticulture*. Oregon State University Press. Corvallis, Oregon. Pp 235-245.

- Xie D.Y., Sharma S.B., Paiva N.L., Ferreira D., Dixon R.A., (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, 299: 396-399.
- Zarrouk O., Francisco R., Pinto-Marijuan M., Brossa R., Santos R.R., Pinheiro C., Costa J.M., Lopes C., Chaves M.M., (2012). Impact of irrigation regime on berry development and flavonoids composition in Aragonese (Syn. Tempranillo) grapevine. *Agricultural Water Management*, 114: 18–29.
- Κουράκου-Δραγώνα Σ., (1998). Θέματα Οινολογίας. Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα.
- Νικολάου Ν. Α., (2011). Αμπελουργία – Β΄ έκδοση. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη
- Σταυρακάκης Μ. Ν., (2010). Αμπελογραφία. Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα.
- Σουφλερός Ε., (2009). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία – Β έκδοση, Τόμος 1, Θεσσαλονίκη.