

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Πτυχιακή διατριβή

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ  
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΚΑΙ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΠΟΡΙΚΑ  
ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

ΠΑΝΤΕΛΗΣ ΧΑΛΛΟΥΜΑ

Λεμεσός 2012



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## **Πτυχιακή διατριβή**

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ  
ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΛΥΚΟΠΕΝΙΟΥ ΚΑΙ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΜΠΟΡΙΚΑ  
ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

ΠΑΝΤΕΛΗΣ ΧΑΛΛΟΥΜΑ

Επιβλέπων: Δρ. Βασίλειος Φωτόπουλος

Συνεπιβλέπων: Δρ. Παναγιώτα Φιλίππου

Λεμεσός 2012

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Παντελής Χαλλούμα, 2012

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

*Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Φυτικής Παραγωγής του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων.*

*Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Βασίλη Φωτόπουλο ο οποίος στάθηκε δίπλα μου με ιδιαίτερη προσοχή και συμπαράσταση, με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια του πειράματος και συνέβαλλε τα μέγιστα ώστε η παρούσα πτυχιακή διατριβή να είναι πλήρης και άρτια. Παράλληλα τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική του ομάδα για ένα μακρύ χρονικό διάστημα.*

*Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Παναγιώτα Φιλίππου, η οποία με καθοδήγησε με ιδιαίτερη φροντίδα κατά τη διάρκεια των δύο περίπου ετών που εργάστηκα κοντά της στο εργαστήριο καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές. Το ενδιαφέρον και οι παρατηρήσεις της τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα.*

*Ευχαριστώ γενικότερα όλους όσους μοιράστηκαν μαζί μου όλο αυτό τον καιρό τον εργαστηριακό χώρο, συνεργάστηκαν μαζί μου και με βοήθησαν. Ευχαριστώ την Αίγλη Γεωργιάδου (MSc) για τη βοήθεια της στις πειραματικές διαδικασίες. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στη συμφοιτήτρια μου Χρυστάλλα Αντωνίου για την πολύτιμη βοήθεια της σε θεωρητικά και πρακτικά προβλήματα που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.*

*Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, αφιερώνοντας της την εν λόγω πτυχιακή διατριβή, για την όλη υποστήριξη, συμπαράσταση τους προς εμένα και την πίστη τους ως προς τις δυνατότητες μου.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum*) είναι το δεύτερο πιο σημαντικό λαχανικό στον κόσμο μετά την πατάτα και αναμφισβήτητα η πιο δημοφιλής καλλιέργεια κηπευτικών αφού θεωρείται ως η πλέον συμφέρουσα από οικονομικής απόψεως καλλιέργεια λαχανικών. Ο καρπός όταν είναι ώριμος έχει έντονο κόκκινο χρώμα, το οποίο οφείλεται στο ότι περιέχει τη χρωστική λυκοπένιο που αποτελεί περίπου το 60-74% της ολικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή στις τομάτες και θεωρείται ως το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό μεταξύ των καροτενοειδών μέσω της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του λυκοπενίου έχουν πλέον κεντρίσει το ενδιαφέρον στη μελέτη της τομάτας ως τρόφιμο με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τομάτας από τρεις εμπορεύσιμες ποικιλίες (Hellfrucht, Brillante Fa 179 και HA34449 F1 υβρίδιο – cherry) και από τρία στάδια ωρίμανσης του καρπού (ανώριμη, μεσοώριμη και ώριμη). Οι φρέσκες αυτές τομάτες χρησιμοποιήθηκαν για αναλυτικές τεχνικές μέσω των οποίων έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του λυκοπενίου όπου παρατηρήσαμε ότι η περιεκτικότητα καρπών τομάτας σε λυκοπένιο αυξάνεται κατά την ωρίμανση από το ανώριμο πράσινο στάδιο στο ώριμο κόκκινο, ενώ συγκεκριμένα από τα τρία είδη ιστού που έγιναν μεμονωμένες αναλύσεις (σάρκα, σπόροι και επιδερμίδα) λαμβάνουμε υψηλότερο ποσοστό λυκοπενίου στην επιδερμίδα της τομάτας. Κατόπιν, εστιάζοντας στο ώριμο κόκκινο στάδιο όπου ανιχνεύθηκε μέγιστη συγκέντρωση λυκοπενίου, έγινε προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις μεθόδους TEAC και FRAP όπου και στις τρεις ποικιλίες παρατηρούμε μείωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας όσο περνάμε από τα εξωτερικά στρώματα του καρπού προς τα εσωτερικά. Η ποικιλία τομάτας με τη υψηλότερη περιεκτικότητα λυκοπενίου (HA34449 F1 υβρίδιο – cherry) είχε και το υψηλότερο ποσοστό αντιοξειδωτικής ικανότητας. Κατόπιν πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις όπως η απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος με τη χρήση τριζόλης και η ποσοτικοποίηση του, καθώς και η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής με την οποία επαληθεύτηκε η λειτουργικότητα του απομονωμένου mRNA με την πραγματοποίηση σύνθεσης συμπληρωματικού DNA (complementary DNA - cDNA). Κατόπιν ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των cDNAs και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με την οποία εξετάστηκαν τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων από το

βιοσυνθετικό μονοπάτι του λυκοπενίου ενώ χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *GAPD* ως δομικό γονίδιο αναφοράς.

## ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is the second most important vegetable crop in the world after potato and undoubtedly the most popular vegetable crop since it is considered to be the most economically advantageous growing vegetable. The ripe fruit has an intense red color, because it contains the pigment lycopene, which accounts for approximately 60-74% of the total content of carotenoids in tomatoes and is considered to be the most effective antioxidant among the carotenoids through reactive oxygen species (ROS) scavenging. The antioxidant properties of lycopene contribute greatly to the fruit's potential anticancer properties. In the current study we examined samples from three commercial tomato varieties (Hellfrucht, Brillante Fa 179 and HA34449 F1 hybrid - cherry) in three developmental/ripening stages of each fruit (immature, breaker and ripe). Using fresh tomatoes and following an analytical approach an increase in lycopene content was observed in tomatoes correlating with the transition from the immature green stage to the mature red with the highest lycopene content being quantified in the skin of tomatoes. Having focused on the red ripe stage, we determined the total antioxidant capacity with two different antioxidant capacity quantification approaches: FRAP and TEAC methods. As expected, the three varieties demonstrate lower antioxidant activity progressing from the outer layers of the fruit to the inside (highest antioxidant activity in the skin), a result strongly correlating with high lycopene content. In addition, the tomato variety with the highest lycopene content (HA34449 F1 hybrid – cherry) also demonstrated the highest antioxidant capacity.

Fresh tomatoes were used for molecular analysis too, such as RNA isolation using Trizol protocol and quantification and complementary DNA (cDNA) synthesis using the reaction of reverse transcription. PCR analysis using the house-keeping gene *GAPD* verified the cDNA synthesis of each tested sample functioning as an indicator of high RNA quality. Furthermore, real-time RT-PCR analysis indicated the differential expression of two highly important genes (*SIZDS* and *SibLCY*) involved in lycopene biosynthesis keeping the housekeeping gene *GAPD* as a reference gene.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	xi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 Περιγραφή του φυτού.....	1
1.2 Σημασία της καλλιέργειας.....	3
1.3 Χρωστικές της τομάτας.....	7
1.4 Διατροφική αξία της τομάτας.....	7
1.4.1 Καροτενοειδή .....	8
1.4.2 Λυκοπένιο.....	10
1.4.2.1 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του λυκοπενίου.....	13
1.4.2.2 Λυκοπένιο και Καρκίνος.....	14
1.4.2.3 Λυκοπένιο και καρδιαγγειακά νοσήματα .....	17
1.4.2.4 Λυκοπένιο και χοληστερόλη.....	18
1.4.2.5 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.....	19
1.5 Η εξέλιξη των ποικιλιών.....	19
1.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες .....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	23
2.1 Συνθήκες ανάπτυξης των πειραματικών φυτών τομάτας ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	23
2.2 Αναλυτικές τεχνικές .....	23
2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του λυκοπενίου.....	23

2.2.2	Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας .....	24
2.2.2.1	Μέθοδος FRAP .....	24
2.2.2.2	Μέθοδος TEAC.....	25
2.3	Μοριακές τεχνικές ανάλυσης .....	27
2.3.1	Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) .....	27
2.3.2	Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος του ριβονουκλεϊκού οξέος.....	28
2.3.3	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-Reverse Transcription) .....	29
2.3.4	Ηλεκτροφόρηση τμημάτων RNA και προϊόντων της PCR από cDNA σε πηκτική αгарόζης .....	30
2.3.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	31
2.3.6	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time RT-PCR).....	32
2.3.7	Στατιστική ανάλυση .....	33
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1	Ποσοτικός προσδιορισμός του λυκοπενίου.....	34
3.2	Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ποικιλιών τομάτας σε διάφορους ιστούς της τομάτας.....	37
3.2.1	Αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο FRAP.....	38
3.2.2	Αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο TEAC .....	39
3.3	Απομόνωση RNA από διάφορες ποικιλίες τομάτας σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.....	40
3.4	Έλεγχος και επιλογή λειτουργικών cDNA για έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των διαφόρων ποικιλιών .....	42
3.5	Έλεγχος των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης σημαντικών γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού του λυκοπενίου .....	42
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	45

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Αντίστροφη Μεταγραφή – Στάδιο 1 <sup>ο</sup> .....	29
Πίνακας 2. Αντίστροφη Μεταγραφή – Στάδιο 2 <sup>ο</sup> .....	29
Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση βιοσυνθετικών γονιδίων λυκοπενίου.....	33
Πίνακας 4. Η συγκέντρωση του RNA (ng/μl) και οι λόγοι A260/A280 και A260/A230.....	40

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Φωτοπροστατευτικά καροτενοειδή στις μεμβράνες των χλωροπλαστών και των πρωτεϊνών.....	10
Εικόνα 2. Αναπαράσταση των πιο συχνών μορφών ισομερών του λυκοπενίου.....	11
Εικόνα 3. Βιοσυνθετικό μονοπάτι σχηματισμού λυκοπενίου και καροτενίου.....	12
Εικόνα 4. Μηχανισμοί του λυκοπενίου όσον αφορά την πρόληψη χρόνιων ασθενειών. ....	14
Εικόνα 5. Αναπαράσταση διαδικασίας ποσοτικού προσδιορισμού του λυκοπενίου .....	24
Εικόνα 6. Αναπαράσταση της μεθόδου FRAP.....	25
Εικόνα 7. Αναπαράσταση της μεθόδου TEAC .....	27
Εικόνα 8. Απομόνωση ολικού RNA από διάφορα μέρη του φυτού σε τρία αναπτυξιακά στάδια .....	42
Εικόνα 9. Έλεγχος προϊόντων PCR του δομικού γονιδίου GAPD σε διάφορα μέρη του φυτού στα τρία αναπτυξιακά στάδια.....	42
Εικόνα 10. Μονοπάτι βιοσύνθεσης των καροτενοειδών όπως απαντάται στα ανώτερα φυτά. .....	44
Εικόνα 11. Επίπεδα σχετικής έκφρασης γονιδίων αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	44

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Η παγκόσμια κατανομή της έκτασης.....	4
Σχήμα 2. Η παγκόσμια κατανομή της παραγωγής.....	4
Σχήμα 3. Η παγκόσμια κατανομή της απόδοσης για την καλλιέργεια τομάτας σε σύγκριση με τα κυριότερα λαχανοκομικά είδη για τα έτη 1961-2010.....	4
Σχήμα 4. Η κατανομή της έκτασης της Κύπρου και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης όσον αφορά την καλλιέργεια για τα έτη 1961-2010.....	6
Σχήμα 5. Η κατανομή της παραγωγής της Κύπρου και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης όσον αφορά την καλλιέργεια τομάτας για τα έτη 1961-2010.....	6
Σχήμα 6. Η κατανομή της απόδοσης της Κύπρου και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης όσον αφορά την καλλιέργεια τομάτας για τα έτη 1961-2010.....	6
Σχήμα 7. Περιεκτικότητα λυκοπενίου σε ανθρώπινους ιστούς.....	19
Σχήμα 8. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου από κάθε στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα). Ποικιλία HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry).....	35
Σχήμα 9. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου από κάθε στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα). Ποικιλία Brillante Fa 179.....	35
Σχήμα 10. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου από κάθε στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα). Ποικιλία Hellfrucht.....	36
Σχήμα 11. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου στο ώριμο στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα).....	37
Σχήμα 12. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης στο ώριμο στάδιο στα τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα) με τη μέθοδο FRAP.....	38
Σχήμα 13. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης στο ώριμο στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα) με τη μέθοδο TEAC.....	39

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ε-LCY:	ε-κυκλάση του λυκοπενίου
Στρ.:	Στρέμμα
cDNA:	Complementary DNA
DNA:	Deoxyribonucleic acid
FRAP:	Ferric reducing antioxidant power
GAPD:	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Kg:	Κιλά
PCR:	Polymerase chain reaction
qRT-PCR:	Real Time PCR
RNA:	Ribonucleic acid
ROS:	Reactive Oxygen Species
RT:	Reverse Transcription
β-LCY:	β-κυκλάση του λυκοπενίου
SIZDS:	ζ-carotene desaturase
TEAC:	Trolox equivalent antioxidant capacity

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Περιγραφή του φυτού

Η τομάτα, αλλιώς και ντομάτα, (*Solanum lycopersicum* L.) είναι ένα δικοτυλήδονο φυτό της οικογένειας των Σολανοειδών (Solanaceae). Είναι ενδογενές φυτό της ΝΑ Αμερικής, με την άγρια μορφή του όμως (*Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*) να απαντάται στο Μεξικό, την Κεντρική Αμερική και άλλες περιοχές της Ν. Αμερικής. Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι η χώρα καταγωγής της είναι το Περού. Έπειτα όμως έγινε δεκτό ότι η καλλιεργούμενη τομάτα έχει ως καταγωγή της το Μεξικό (περιοχή Vera Cruz-Puebla) από όπου και μεταφέρθηκε κατά το 16<sup>ο</sup> αιώνα στην Ευρώπη και ακολούθως εξαπλώθηκε σε διάφορες περιοχές της γης. Έχει διάρκεια ζωής μόνο μερικά χρόνια και συνήθως καλλιεργείται ως μονοετές φυτό. (Ολύμπιος, 2001).

Η τομάτα καλλιεργείται σχεδόν σε κάθε γωνιά του κόσμου, από τις τροπικές περιοχές μέχρι και λίγο πιο πάνω από τον Αρκτικό Κύκλο (Foolad & Panthee, 2012). Μπορεί να φυτευτεί οποιαδήποτε χρονική περίοδο, ενώ οι συνθήκες παραγωγής και εμπορίας επέβαλαν ουσιαστικά δύο περιόδους φύτευσης (στα θερμοκήπια). Κατά την πρώτη περίοδο η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων γίνεται γύρω στα μέσα Σεπτεμβρίου με μέσα Νοεμβρίου και η συγκομιδή από τα μέσα Δεκεμβρίου μέχρι και το τέλος Ιουνίου (6,5 μήνες περίπου). Κατά τη δεύτερη περίοδο η μεταφύτευση γίνεται γύρω στα μέσα Ιανουαρίου με μέσα Φεβρουαρίου και η συγκομιδή αρχές Απριλίου μέχρι και το τέλος Ιουνίου (3 μήνες περίπου) (Ολύμπιος, 2001).

Η τομάτα αναπτύσσει κεντρική ευδιάκριτη ρίζα η οποία δίνει αρκετές δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια. Κατά τη μεταφύτευση του φυτού επικρατεί η πρακτική η κεντρική ρίζα να κόβεται. Έτσι το φυτό παράγει εύκολα πολλές δευτερεύουσες πλευρικές ρίζες. Το χαρακτηριστικό αυτό του φυτού το κάνει να είναι ικανό να μεταφυτεύεται εύκολα αφού ακόμα και με τραυματισμένο ριζικό σύστημα απορροφά νερό και θρεπτικά συστατικά και αναλαμβάνει ταχέως (Ολύμπιος, 2001).

Είναι ποώδες φυτό το οποίο μπορεί να φτάσει σε ύψος 1-3 μ. (μέγιστο μέχρι 10μ). Ο βλαστός του είναι κυλινδρικός, εσωτερικά πλήρης και φέρει σύνθετα φύλλα, από τις μασχάλες των οποίων δίνει πλευρικούς βλαστούς, οι οποίοι ορισμένες φορές είναι τόσο ζωηροί που μπορεί κάποιος να μην μπορεί να τους ξεχωρίσει από τον κεντρικό βλαστό. Έτσι πρέπει το κλάδεμα να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Ο βλαστός αρχικά είναι χυμώδης, μαλακός και εύθραυστος. Αργότερα όμως σταδιακά γίνεται πιο σκληρός χωρίς όμως να ξυλοποιείται παραμένοντας έτσι εύθραυστος. Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα την ανάγκη υποστύλωσης του φυτού, ιδιαίτερα όταν κλαδεύεται και αναπτύσσεται σε μονοστέλεχο σύστημα (Ολύμπιος, 2001).

Τα πραγματικά φύλλα της τομάτας έχουν μήκος 10-25 εκ. και είναι σύνθετα, αποτελούμενα από 5-9 φυλλάρια το καθένα μέχρι και 8 εκ. μακρύ με προιονοειδή περιφέρεια, και εμφανίζονται σε ελικοειδή διάταξη πάνω στο βλαστό. Το μήκος και πλάτος των φύλλων είναι χαρακτηριστικό της κάθε ποικιλίας και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για τον καθορισμό των αποστάσεων φύτευσης. Τόσο τα φύλλα όσο και ο βλαστός του φυτού φέρουν τρίχωμα (Ολύμπιος, 2001).

Τα άνθη έχουν διάμετρο 1-2 εκ., έχουν κίτρινη στεφάνη με πέντε ενωμένους μυτερούς λοβούς, πράσινο δερματώδη κάλυκα με 5 σέπαλα και 5 στήμονες οι οποίοι ενώνονται στη βάση τους με τη στεφάνη αλλά και κατά μήκος μεταξύ τους, σχηματίζοντας έτσι κώνο γύρω από το στύλο. Τα άνθη, τα οποία φέρουν πολύχρωρη ωοθήκη, μεγαλώνουν σε ομάδες αποτελούμενες από 2-20. Ο καρπός που επίσης λέγεται τομάτα είναι πολύχωρος ράγα, σφαιρικός ή μακρόστενος με 3-5 ή περισσότερα χωρίσματα (ανάλογα της ποικιλίας), είναι εδώδιμος, και όταν είναι ώριμος είναι ζουμερός έχει έντονο κόκκινο χρώμα (Ολύμπιος, 2001).

Το κόκκινο χρώμα του οφείλεται στο ότι περιέχει τη χρωστική λυκοπένιο, ένα από τα σημαντικότερα και πιο άφθονα καροτενοειδή στις ώριμες τομάτες (Agarwal & Rao, 2000). Προκαταρκτικές μελέτες έχουν δείξει έντονη συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης τομάτας και μειωμένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, με αποτέλεσμα η χρωστική αυτή να θεωρείται ένας πιθανός παράγοντας πρόληψης μερικών τύπων καρκίνου και ειδικά καρκίνου του προστάτη (Bramely, 2000).

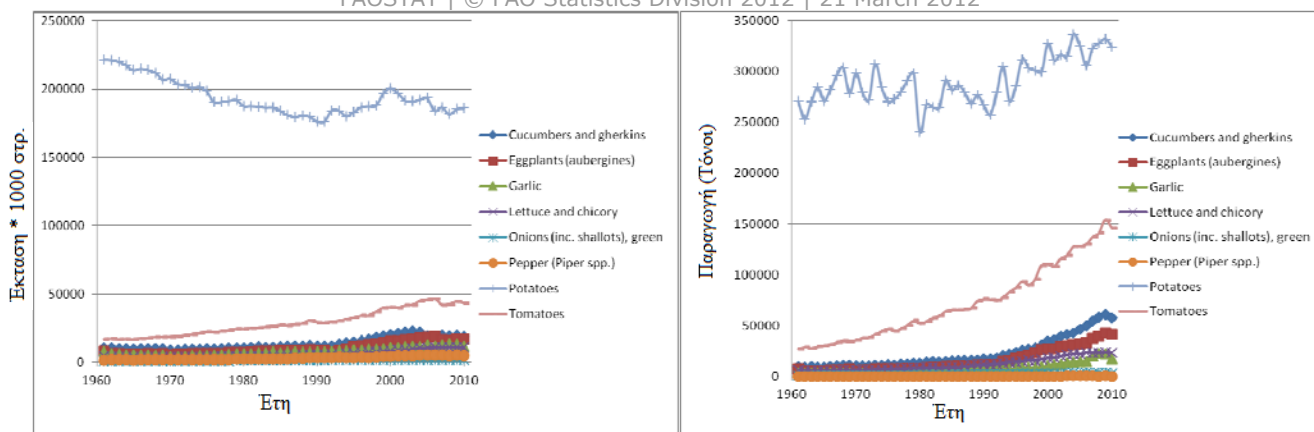
Πριν ωριμάσει, η τομάτα έχει πράσινο χρώμα. Στα φυτά αγρίου τύπου ο καρπός έχει διάμετρο 1-2 εκ., αλλά στις περισσότερες καλλιεργήσιμες ποικιλίες είναι αρκετά μεγαλύτερος (5-10 εκ.). Ο σπόρος είναι πεπλατυσμένος, ωοειδής κιτρινοκαφέ και καλύπτεται από τριχοειδείς αποφύσεις. Εσωτερικά φέρει ένα σπειροειδές έμβρυο το οποίο περιβάλλεται από ένα μικρό ενδοσπέρμιο. Έχει την ικανότητα να διατηρεί τη βλαστικότητα του για 4 χρόνια (υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης), ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 10 χρόνια αν αποθηκευτεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και οι σπόροι έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Κατά τη φύτευσή του (ενδεδειγμένος τρόπος πολλαπλασιασμού της τομάτας) επικρατεί η πρακτική της απολύμανσης του με εμβάπτιση του σε νερό θερμοκρασίας 50°C για 25 λεπτά και 15-20 λεπτά σε διάλυμα 10% τριφωσφορικού νατρίου ώστε να αποφεύγεται η μετάδοση ασθενειών και παθογόνων (Ολύμπιος, 2001)

## **1.2 Σημασία της καλλιέργειας**

Η έναρξη των προσπαθειών για συστηματοποίηση της παραγωγή της τομάτας και για βελτίωση των συνολικών κηπευτικών χαρακτηριστικών της χρονολογείται πίσω στη δεκαετία του 1930. Ενώ η ζήτηση της αυξανόταν από το 1950 και μετά απαιτήθηκαν πιο ειδικά επιθυμητά χαρακτηριστικά όσον αφορά τις τομάτες νωπής κατανάλωσης αλλά και αυτές που θα παρέχονταν στη βιομηχανία για μεταποίηση. Ωστόσο, μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, σχεδόν όλα τα προγράμματα αναπαραγωγής στηρίχθηκαν μόνο στην φαινοτυπική επιλογή. Ενώ η φαινοτυπική επιλογή εξακολουθεί να είναι μια ισχυρή συνιστώσα των περισσότερων προγραμμάτων αναπαραγωγής στην τομάτα, προκαλεί πολλές δυσκολίες, συμπεριλαμβανομένων του περιορισμένου ελέγχου όσον αφορά τη διαθεσιμότητα των χώρων, τη μειωμένη ανταπόκριση στην επιλογή για τα χαρακτηριστικά με χαμηλή κληρονομικότητα ή υπολειπόμενης έκφρασης, και τις ανησυχίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις από το περιβάλλον. Μεταγενέστερα με την έλευση των μοριακών δεικτών, υπήρξε αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση των δεικτών της τεχνολογίας για τη διευκόλυνση της βελτίωσης των καλλιεργειών. Η τομάτα ήταν μεταξύ των πρώτων καλλιεργούμενων ειδών για τα οποία οι γενετικοί δείκτες αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για σκοπούς αναπαραγωγής. Έτσι μπόρεσαν να ξεπεράσουν δυνητικά τουλάχιστον κάποιους από τους περιορισμούς που συνδέονται με την φαινοτυπική επιλογή. Σήμερα, οι περισσότεροι από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη γενετική χαρτογράφηση της τομάτας και σκοπούς αναπαραγωγής είναι βασισμένες στην τεχνική της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) (Foolad & Panthee, 2012).

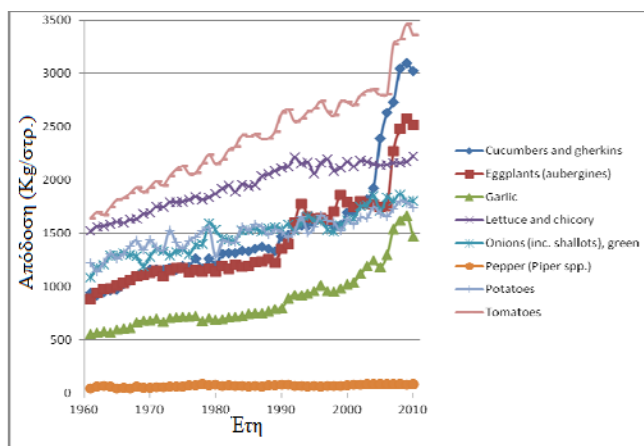
Η τομάτα είναι το δεύτερο πιο σημαντικό λαχανικό στον κόσμο μετά την πατάτα και αναμφισβήτητα η πιο δημοφιλής καλλιέργεια κηπευτικών. Ανάμεσα στις κηπευτικές καλλιέργειες, στην τομάτα υπάρχει ο μεγαλύτερος αριθμός ποικιλιών που παράγονται και πωλούνται σε όλο τον κόσμο. Θεωρείται ως η πλέον συμφέρουσα από οικονομικής απόψεως καλλιέργεια λαχανικών (Foolad & Panthee, 2012). Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η έκταση, η παραγωγή και η απόδοση της καλλιέργειας της τομάτας για τα έτη 1961 μέχρι και το 2010 σε σύγκριση με την καλλιέργεια αγγουριού, μελιτζάνας, σκόρδου, μαρουλιού και ραδικιού, νωπής κατανάλωσης κρεμμυδιού, του πράσινου πιπεριού και της πατάτας σε παγκόσμιο επίπεδο (FAOSTAT, 2012).

FAOSTAT | © FAO Statistics Division 2012 | 21 March 2012



**Σχήμα 1.** Η παγκόσμια κατανομή της έκτασης για την καλλιέργεια τομάτας σε σύγκριση με τα κυριότερα λαχανοκομικά είδη για τα έτη 1961-2010

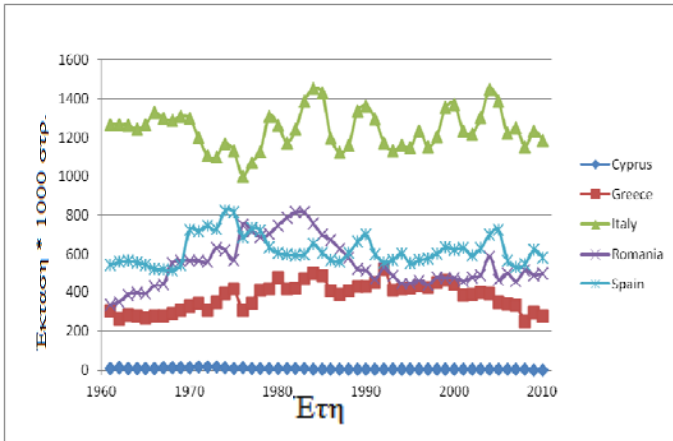
**Σχήμα 2.** Η παγκόσμια κατανομή της παραγωγής για την καλλιέργεια τομάτας σε σύγκριση με τα κυριότερα λαχανοκομικά είδη για τα έτη 1961-2010



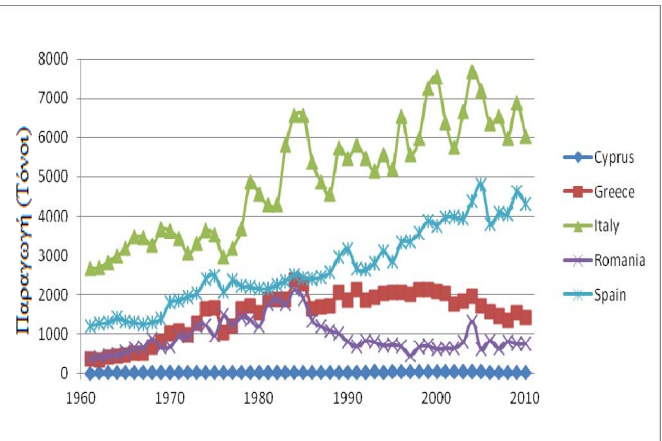
**Σχήμα 3.** Η παγκόσμια κατανομή της απόδοσης για την καλλιέργεια τομάτας σε σύγκριση με τα κυριότερα λαχανοκομικά είδη για τα έτη 1961-2010

Παρατηρούμε ότι η καλλιέργεια της τομάτας σύμφωνα με το Σχήμα 1 είναι η δεύτερη σε έκταση καλλιέργεια λαχανοκομικών ειδών με συνολική μέση έκταση, κατά τα έτη 1961 – 2010,  $28.717,827 * 1000$  στρ. ακολουθώντας την καλλιέργεια της πατάτας που για τα ίδια έτη είχε μέσο όρο έκτασης  $193.886,32 * 1000$  στρ., έκταση κατά πολύ μεγαλύτερη. Τρίτη στη σειρά καλλιέργεια είναι αυτή του αγγουριού με μέσο όρο  $13.447,888 * 1000$  στρ. Όσον αφορά την παραγωγή σύμφωνα με το Σχήμα 2 έρχεται δεύτερη σε σειρά με μέσο όρο  $72.633,7184$  τόνους (1961-2010) μετά από την πατάτα με  $290.121,793$  τόνους (1961-2010) ενώ κατά την πάροδο των ετών αυξάνεται σταδιακά όλο και περισσότερο. Τα υπόλοιπα λαχανοκομικά είδη βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα με τρίτη στη σειρά να είναι η καλλιέργεια αγγουριού με  $22.198,588$  τόνους (1961-2010), ποσοστό πέραν του υποτριπλασίου της παραγωγής της τομάτας. Ανατροπή έχουμε στα δεδομένα της στρεμματικής απόδοσης αφού σύμφωνα με το Σχήμα 3 η καλλιέργεια της τομάτας είναι πρώτη με συνεχώς αυξανόμενες τιμές κατά την πάροδο των ετών και ιδιαίτερα κατά την τελευταία πενταετία. Κατά τη διάρκεια των ετών 1961 με 2010 η μέση στρεμματική απόδοση ανέρχεται σε  $2.392,466$  kg/στρ. Αλματώδης αύξηση της στρεμματικής απόδοσης κατά την τελευταία πενταετία παρατηρείται επίσης και για την καλλιέργεια του αγγουριού και την καλλιέργεια της μελιτζάνας. Μπορούμε να πούμε λοιπόν ότι η αύξηση αυτή οφείλεται στην εντατικοποίηση των καλλιεργειών αλλά και την εφαρμογή τους στα θερμοκήπια τα οποία επιτρέπουν καλύτερο έλεγχο των κλιματολογικών παραγόντων αλλά και εχθρών και ασθενειών. Μία άλλη πιθανή ερμηνεία είναι η καλλιέργεια σε υδροπονικά συστήματα τα οποία επιτρέπουν τον πλήρη έλεγχο της θρέψης των φυτών μεγιστοποιώντας έτσι την απόδοση τους.

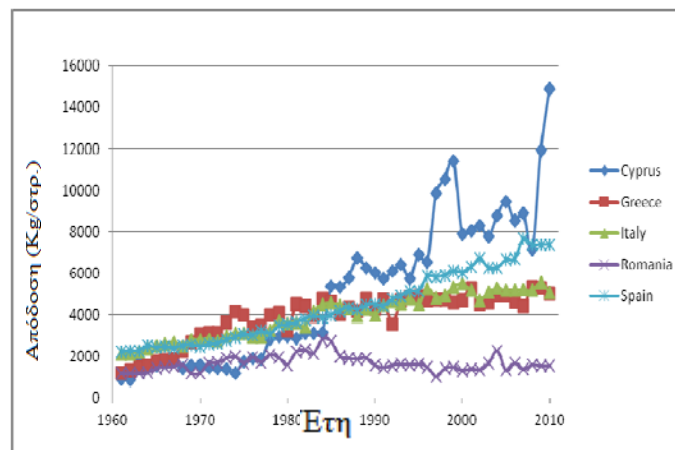
Ακολουθώντας μέσω πληροφοριών και πάλι από τη FAOSTAT για τις χρονολογίες 1961 με 2010 παρίστανται μέσω πινάκων πληροφορίες για την έκταση, την παραγωγή και την απόδοση της καλλιέργειας της τομάτας για τα δεδομένα της Κύπρου αλλά και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης που ασχολούνται με την καλλιέργεια, δηλαδή την Ιταλία, την Ισπανία, τη Ρουμανία και την Ελλάδα.



**Σχήμα 4. Η κατανομή της έκτασης της Κύπρου και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης όσον αφορά την καλλιέργεια για τα έτη 1961-2010**



**Σχήμα 5. Η κατανομή της παραγωγής της Κύπρου και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης όσον αφορά την καλλιέργεια τομάτας για τα έτη 1961-2010**



**Σχήμα 6. Η κατανομή της απόδοσης της Κύπρου και των τεσσάρων πρώτων χωρών της Ευρώπης όσον αφορά την καλλιέργεια τομάτας για τα έτη 1961-2010**

Αυτό που παρατηρείται στο Σχήμα 4 είναι ότι η καλλιέργεια της τομάτας στην Κύπρο είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα όσον αφορά το μέσο όρο της έκτασης (7,5076 \* 1000 στρ.), κάτι το οποίο οφείλεται πιθανώς στη μικρή έκταση του νησιού. Πρώτη σε έκταση κατά μέσο όρο για τα έτη 1961-2010 είναι η Ιταλία με 1.241,775 \*1000 στρ. Δεύτερη η Ισπανία με 619,0518 \* 1000 στρ., τρίτη η Ρουμανία με 547,903 \*1000 στρ. και τέταρτη η Ελλάδα με 377,1834 \*1000 στρ. Όσον αφορά την παραγωγή σύμφωνα με τον Σχήμα 5 η Κύπρος έχει μέσο όρο 26,0744 τόνους ανά έτος (1961-2010). Πρώτη είναι και πάλι η Ιταλία με μέση ετήσια παραγωγή 4.940,0906 τόνους. Ακολουθεί η Ισπανία με 2.689,0056 τόνους, η

Ελλάδα με 1.514,1543 τόνους και τέλος η Ρουμανία με 952,0855 τόνους. Ανατροπή έχουμε στα δεδομένα της στρεμματικής απόδοσης αφού σύμφωνα με το Σχήμα 6 η καλλιέργεια της τομάτας είναι πρώτη για τα δεδομένα της Κύπρου με συνεχώς αυξανόμενες τιμές κατά την πάροδο των ετών και ιδιαίτερα κατά την τελευταία πενταετία. Κατά τη διάρκεια των ετών 1961 με 2010 η μέση στρεμματική απόδοση για την Κύπρο είναι 5.066,389 kg/στρ. Δεύτερη έρχεται η Ισπανία με 4.371,076 kg/στρ., τρίτη η Ιταλία με 3.962,425 kg/στρ., τέταρτη η Ελλάδα με 3.896,233 kg/στρ. και τέλος η Ρουμανία με 1.672,372 kg/στρ.

### **1.3 Χρωστικές της τομάτας**

Το χρώμα της τομάτας οφείλεται σε δυο κυρίως χρωστικές, τη λυκοπίνη (λυκοπένιο) και την καροτίνη (καροτένιο). Για να μπορέσουν οι δύο αυτές ουσίες να συντεθούν από τον καρπό πρέπει να επικρατούν συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού. Σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες το βέλτιστο επίπεδο θερμοκρασίας είναι γύρω στους 21-22°C. Παρατηρήθηκε ότι όταν η θερμοκρασία είναι κάτω από 13°C το χρώμα είναι πολύ φτωχό ενώ όταν ανέρχεται πάνω από 24°C η διαδικασία βιοσύνθεσης των χρωστικών περιορίζεται. Όσον αφορά το λυκοπένιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κόκκινη χρώση του καρπού, η σύνθεση του μπορεί να επιτευχθεί από τους 10-30 °C. Οι επιθυμητές συνθήκες φωτός για να έχουμε βιοσύνθεση λυκοπενίου είναι μέσω της επίδρασης του διάχυτου φωτός υπό σκιά.

Το καροτένιο είναι υπεύθυνο για το κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα του καρπού και η σύνθεση του επιτυγχάνεται επίσης στους 10-30°C. Για να συντεθεί όμως είναι απαραίτητη η άμεση ακτινοβολία. Σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C οι δύο χρωστικές δε συντίθενται, έτσι οι καρποί παραμένουν πράσινοι (Ολύμπιος, 2001). Το γεγονός υποδηλώνει ότι οι κόκκινες τομάτες έχουν ανεπαρκή δραστηριότητα της κυκλάσης του λυκοπενίου ώστε να μετατραπεί το λυκοπένιο σε β-καροτένιο και γ-καροτένιο αποτελεσματικά. Επομένως οι κίτρινες-πορτοκαλί τομάτες είναι σχετικά χαμηλές σε λυκοπένιο (Giovannucci, 1999).

### **1.4 Διατροφική αξία της τομάτας**

Αν και η τομάτα δεν μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα πλούσια όσον αφορά τη συνολική διατροφική αξία, βρίσκεται όμως σε υψηλή θέση στη διατροφική συμβολή στη δίαιτα των ανθρώπων παγκοσμίως λόγω του μεγάλου όγκου των νωπών τοματών αλλά και των

μεταποιημένων προϊόντων τους που καταναλώνονται (Foolad & Panthee, 2012). Έτσι μπορούμε να πούμε ότι αποτελεί μια εξαιρετική πηγή της βελτίωσης της υγείας που οφείλεται στο ισορροπημένο μείγμα μετάλλων και αντιοξειδωτικών συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών C και E, λυκοπένιο, β-καροτένιο, λουτεΐνη και φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη (Dorais et al., 2008). Αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη πηγή βιταμίνης C, την τέταρτη για την προβιταμίνη A και την ένατη για το κάλιο στη διατροφή του πληθυσμού. Αν και οι τομάτες έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε β-καροτένιο είναι μακράν η σημαντικότερη πηγή των υπόλοιπων καροτενοειδών. Συνολικά, οι τομάτες αποτελούν μια πολύ σημαντική πηγή πολλών θρεπτικών συστατικών και ιδιαίτερα του λυκοπενίου (Giovannucci, 1999).

#### **1.4.1 Καροτενοειδή**

Τα καροτενοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων που παρέχουν πρόδρομες ουσίες για πολλές απαραίτητες βιταμίνες και αντιοξειδωτικά. Επειδή η τομάτα, όπως προαναφέρθηκε, είναι το δεύτερο σημαντικότερο λαχανικό στον κόσμο, αποτελεί ουσιαστικά την κύρια πηγή των καροτενοειδών. Περισσότερα από 600 καροτενοειδή βρίσκονται στη φύση, ενώ από τα 40 που εντοπίστηκαν στη διατροφή του ανθρώπου, μόνο 20 έχουν εντοπιστεί στο ανθρώπινο αίμα λόγω της επιλεκτικής απορρόφησής τους από το πεπτικό σύστημα. Από αυτόν τον αριθμό, τα 9-20 προέρχονται από τα νωπές και μεταποιημένες τομάτες (Rao et al., 2006).

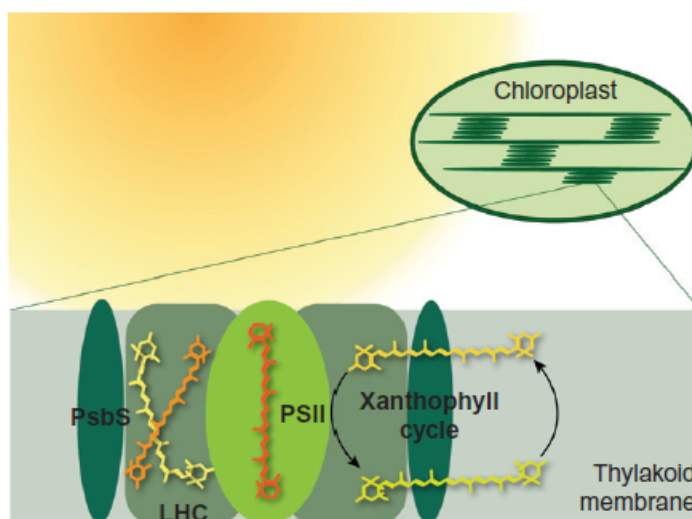
Το λυκοπένιο στις κόκκινες τομάτες, το οποίο αποτελεί περίπου το 80-90% του συνόλου της περιεκτικότητας σε καροτενοειδή στις τομάτες θεωρείται ότι είναι το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό μεταξύ των καροτενοειδών μέσω της δέσμευσης των ROS. Από την άλλη πλευρά, το β-καροτένιο, αποτελεί το πρόδρομο μόριο της βιταμίνης A με μεγάλη διατροφική αξία και αντιπροσωπεύει περίπου το 7% της τομάτας σε περιεκτικότητα καροτενοειδών. Όσον αφορά το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), πιστεύεται ότι είναι το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό στα φυτά (Dorais et al., 2008).

Η γενική αντιοξειδωτική ικανότητα ενός οργανισμού εξαρτάται από τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στο αίμα. Έχει αποδειχθεί ότι διάφορες παθολογικές παθήσεις όπως είναι ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, ο διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η υπέρταση, οι καρδιοπάθειες, ακόμα και η γήρανση συσχετίζονται με τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών στο αίμα και τους ιστούς. Υπό διερεύνηση όμως είναι το κατά πόσο τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της νόσου ή αν είναι ένα

από τα αποτελέσματα αυτής. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών στο αίμα ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού έναντι διαφόρων εκφυλιστικών νόσων. Λόγω του ότι οι διάφορες τροφές μπορούν να περιέχουν ένα μεγάλο συνδυασμό αντιοξειδωτικών ουσιών με διαφορετικό αντιοξειδωτικό δυναμικό η κάθε μία η λήψη τους κατά τη διατροφή επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα (Λυμπεράκη et al., 2010). Είναι γνωστό ότι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά απαιτούν εκτεταμένες και δαπανηρές δοκιμές για να διαπιστωθεί η ασφάλειά τους για την πιθανή χρήση ως συμπληρώματα διατροφής, και για το λόγο αυτό, υπάρχει ενδιαφέρον για τη χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών (Valverde et al. 2002).

Όσον αφορά τη συμβολή τους στο φυτό, τα καροτενοειδή παίζουν πολλούς ρόλους ζωτικής σημασίας στη φωτοσύνθεση. Τα καροτενοειδή εμπλέκονται στα φωτοσυστήματα όπου συμβάλλουν στη συλλογή του φωτός σε ένα ευρύτερο φάσμα των μηκών κύματος της μπλε περιοχής του ορατού φάσματος και στη συνέχεια μεταφέρουν την ενέργεια στη χλωροφύλλη. Το χρώμα των καροτενοειδών συνήθως κυμαίνεται από απαλό κίτρινο έως κόκκινο. Τα καροτενοειδή παρέχουν επίσης προστασία από το υπερβολικό φως μέσω της πρόσληψης της φωτεινής ενέργειας, η οποία περιορίζει τις βλάβες στις μεμβράνες και στις πρωτεΐνες. Τα φυτά πρέπει να διατηρούν μια ισορροπία μεταξύ της απορρόφησης αρκετού φωτός για τις διαδικασίες φωτοσύνθεσης και την αποφυγή οξειδωτικών βλαβών που προκαλούνται από την υψηλή απορρόφηση φωτός (Cuttriss et al., 2011).

## CAROTENOIDS



**Εικόνα 1. Φωτοπροστατευτικά καροτενοειδή στις μεμβράνες των χλωροπλαστών και των πρωτεϊνών.**

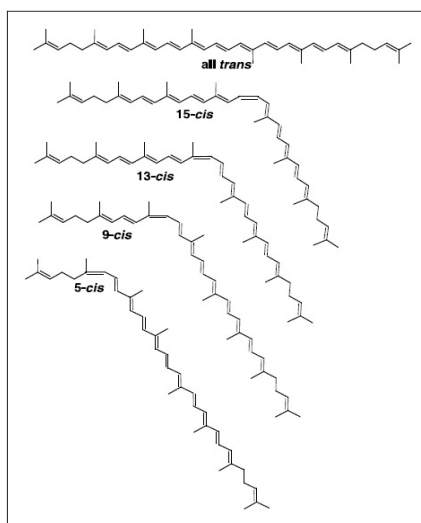
Όπως υποδεικνύεται από αυτό το απλοποιημένο σχήμα τα καροτενοειδή συσσωρεύονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών. Οι ξανθοφύλλες, όπως η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη, συσσωρεύονται σε συμπλέγματα πρωτεϊνών (LHC) έχοντας σημαντικό δομικό ρόλο και συμβάλλοντας στη συγκομιδή του φωτός. Μόρια καροτενίου βρίσκονται στο φωτοσύστημα II (PSII) και δραστηριοποιούμενα θα μπορούσαν να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή ενδεχομένως να έχουν κάποιο ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Cuttriss et al., 2011).

### 1.4.2 Λυκοπένιο

Το λυκοπένιο, ως καροτενοειδές, υπάρχει στις ντομάτες, στα μεταποιημένα προϊόντα της τομάτας αλλά και σε άλλα φρούτα. Είναι ένα από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά μεταξύ των διατροφικά εκλαμβανόμενων καροτενοειδών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσιαστικά προστατευτικά μόρια που δεσμεύουν και αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ως εκ τούτου καθυστερούν σημαντικά ή αποτρέπουν την οξειδωτική βλάβη. Το λυκοπένιο είναι μια φυσική χρωστική ουσία που συντίθεται από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, αλλά όχι από τα ζώα (Agarwal & Rao, 2000).

Το λυκοπένιο είναι ένα ένα άκυκλο ισομερές της β-καροτίνης, ένας πολύ ακόρεστος υδρογονάνθρακας ανοικτής αλυσίδας που περιέχει 11 συζευγμένους και 2 μη συζευγμένους διπλούς δεσμούς. Από τις φυσικές φυτικές πηγές του, υπάρχει κυρίως σε μια *trans* διαμόρφωση (Εικόνα 2). Όπως και τα άλλα καροτενοειδή είναι η θερμοδυναμικά σταθερότερη μορφή. Στο ανθρώπινο πλάσμα, το λυκοπένιο είναι παρόν ως ισομερές μίγμα, με το 50% να έχει τη *cis* ισομερή διαμόρφωση. Μπορεί να υποβληθεί σε *cis-trans* ισομερισμό, ο οποίος προκαλείται από το φως, τη θερμική ενέργεια και τις χημικές

αντιδράσεις. Οι πιο συχνές μορφές ισομερών του λυκοπενίου που εντοπίζονται είναι η *trans* μορφή, η *5-cis*, η *9-cis*, η *13-cis*, και η *15-cis* διαμόρφωση (Rao et al., 1999).



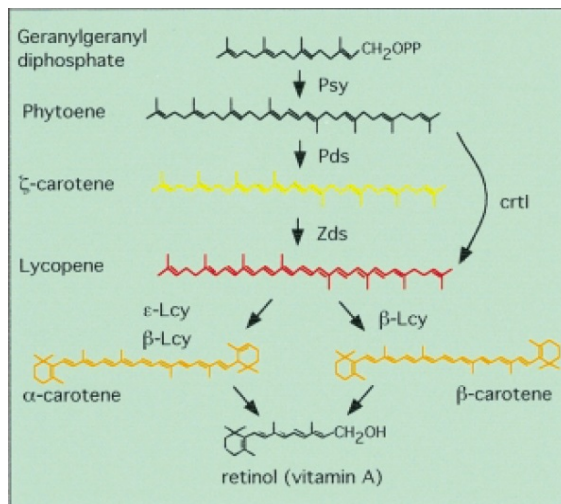
**Εικόνα 2. Αναπαράσταση των πιο συχνών μορφών ισομερών του λυκοπενίου.**

Η *trans* μορφή, η *15-cis*, η *13-cis*, η *9-cis*, και η *5-cis* διαμόρφωση (Agarwal & Rao, 2000).

Στα μεταποιημένα προϊόντα τομάτας, όπως είναι η πάστα τομάτας, το κέτσαπ και ο τοματοχυμός, φάνηκε να υπάρχει μια παρόμοια κατανομή των *cis* και *trans* ισομερών μορφών του λυκοπενίου. Ωστόσο, όταν ο τοματοχυμός υποβλήθηκε σε θερμοκρασίες μαγειρέματος με την παρουσία ελαιόλαδου, παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη αύξηση στο σχηματισμό των *cis* ισομερών. Η μετατροπή του *trans* λυκοπενίου στην *cis* ισομερή μορφή του είναι σήμερα αρκετά σημαντική, νοουμένου ότι οι μορφές *cis* γενικά θεωρούνται πιο βιοδιαθέσιμες. Η *5-cis* μορφή βρέθηκε να είναι η πιο σταθερή και ακολουθείται από τη συνολική *trans* διαμόρφωση με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ακολουθούμενη από την *9-cis* μορφή (Rao et al., 1999). Η περιεκτικότητα του λυκοπενίου όμως διαφέρει σημαντικά στις διάφορες ποικιλίες της τομάτας αλλά και στα διάφορα αναπτυξιακά της στάδια (Valverde et al., 2002).

Το λυκοπένιο είναι ουσιαστικά το κυριότερο καροτενοειδές που συσσωρεύεται στα ώριμα φρούτα ντομάτας. Το καροτενοειδές αυτό συντίθεται στα φυτά μέσω ενός μονοπατιού που αρχίζει από το διφωσφορικό γεραγυλγερανύλιο που είναι η πρόδρομη ένωση της βιοσύνθεσης των κυκλικών καροτενοειδών, όπως είναι το β-καροτένιο. Το λυκοπένιο μετατρέπεται σε β-καροτένιο μέσω της δράσης της β-κυκλάσης του λυκοπενίου (β-LCY), εισάγοντας ένα ένζυμο βήτα-ιονone δακτυλίου και στα δύο άκρα του μορίου. Μια

ανταγωνιστική, ε-κυκλάση (ε-LCY) μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση β-καροτενίου στα φρούτα αφού παρεμποδίζει την κωδικοποίηση της β-LCY και την έκφραση του β-γονιδίου LCY (Rosati et al., 2000)



**Εικόνα 3. Βιοσυνθετικό μονοπάτι σχηματισμού λυκοπενίου και καροτενίου**

(Rosati et al., 2000)

Το β-καροτένιο είναι το σημαντικότερο διατροφικό πρόδρομο μόριο της βιταμίνης Α, μαζί με άλλα καροτενοειδή. Η ανεπάρκεια βιταμίνης Α, είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας σε περισσότερες από 75 χώρες, με τα περισσότερα από αυτά να εντοπίζονται στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Όταν το β-καροτένιο συμπληρώνεται στις απαιτούμενες ποσότητες του μέσω της διατροφής σε περιοχές που διατρέχουν κίνδυνο ανεπάρκειας βιταμίνης Α, μειώνεται η νοσηρότητα και η θνησιμότητα που συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (ΣΗΠ) είναι 1 mg / ημέρα ισοδύναμα ρετινόλης (περίπου 6 mg β-καροτίνη). Αν και το λυκοπένιο δεν έχει κάποια σχέση με τη δραστηριοποίηση της προβιταμίνης Α καθ' αυτών, αποτελεί μια καλή διατροφική πηγή αντιοξειδωτικών (Rosati et al., 2000). Όταν η ποσότητα αυτή προέρχεται από μεταποιημένα προϊόντα τομάτας φαίνεται να είναι πιο βιοδιαθέσιμο από ότι από τον καρπό τομάτας ως φρούτο. Η απελευθέρωση του λυκοπενίου από τη μήτρα των τροφίμων οφείλεται στην επεξεργασία του. Η παρουσία των διαιτητικών λιπιδίων και η θερμότητα που προκαλείται από ισομερισμό από ένα συνολικό *trans* σε *cis* ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα του λυκοπενίου. Η βιοδιαθεσιμότητα του επηρεάζεται επίσης από τη δόση και την παρουσία άλλων καροτενοειδών, όπως το β-καροτένιο. Διαπιστώθηκε ότι η βιοδιαθεσιμότητα του

λυκοπενίου ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν προσλαμβάνεται μαζί με β-καροτίνη από ότι όταν λαμβάνεται μόνη της (Agarwal & Rao, 2000).

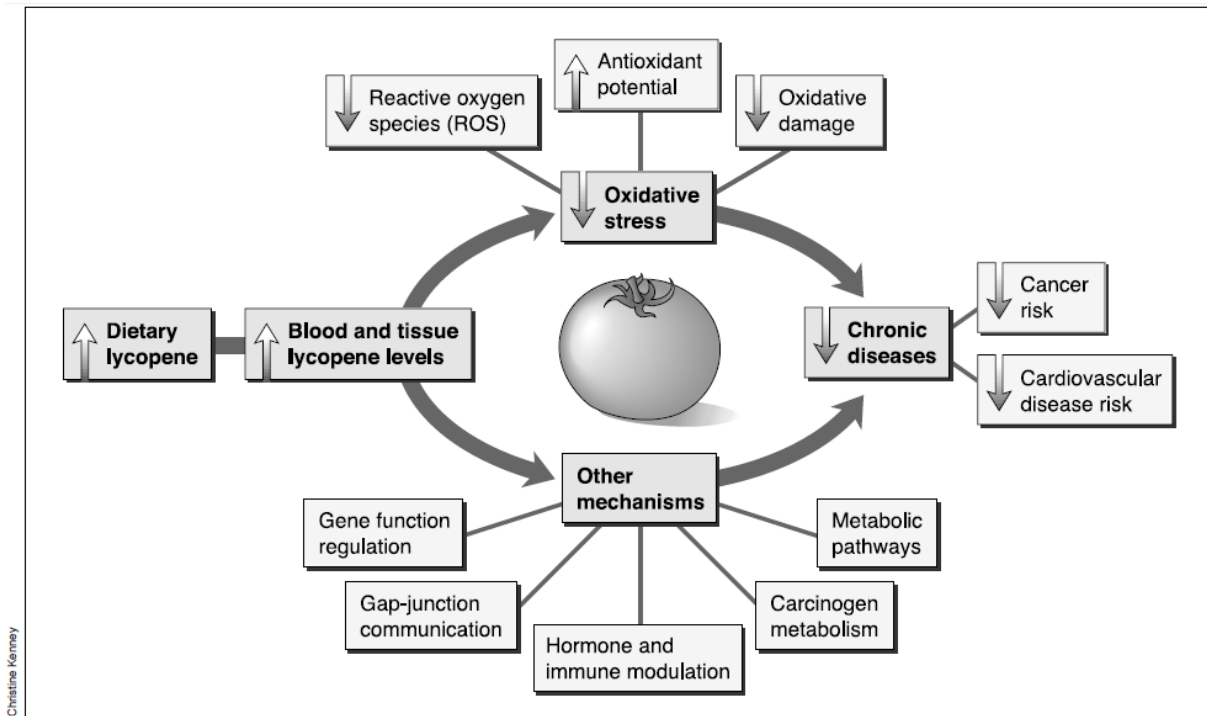
#### **1.4.2.1 Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του λυκοπενίου**

Τα γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση του λυκοπενίου στην τομάτα αυξάνουν τη συγκέντρωση του κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των φρούτων, ενώ αυτά που ελέγχουν την κυκλοποίηση του, όπως η β-LCY ή η ε-LCY είναι καταβολικά στελέχη του μονοπατιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το β-καροτένιο σε ώριμους καρπούς τομάτας να μην υπερβαίνει το 15% του συνόλου των καροτενοειδών. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να βιοσυντίθενται υψηλότερα επίπεδα λυκοπενίου στον καρπό της τομάτας, αλλά κανένα από αυτά δεν έχει στεφθεί με επιτυχία. Σε μία από αυτές τις προσπάθειες, μια βακτηριακή αποσατουράση του φυτοενίου (phytoene desaturase) έχει συντηχθεί με συγκεκριμένο πεπτιδίο μεταφοράς και εισήχθη σε φυτά τομάτας υπό τον έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S (35S/tp/crtI). Αυτό το πείραμα είχε γίνει με στόχο την αύξηση των επιπέδων λυκοπενίου, με το ανεπάντεχο αποτέλεσμα την τριπλάσια αύξηση σε β-καροτένιο, αλλά καμία αύξηση στο λυκοπένιο. Τα συνολικά επίπεδα καροτενοειδών στην πραγματικότητα μειώθηκαν στα μετασχηματισμένα προϊόντα, με αδιευκρίνιστους λόγους (Rosati et al., 2000).

Διάφοροι οργανισμοί, όπως το Εθνικό Συμβούλιο Ερευνών της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών, το Εθνικό Ίδρυμα Καρκίνου και το Αμερικανικό Ινστιτούτο για την Έρευνα του Καρκίνου, δίνουν διάφορες διατροφικές συστάσεις για αύξηση της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε βιταμίνες Α και C ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου λόγω του ότι οι διατροφικοί παράγοντες πιστεύεται ευρέως ότι είναι κρίσιμης σημασίας για καρκινογένεση. Ωστόσο, υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με τα όσα αντιπροσωπεύουν το όφελος αυτό. Παλαιότερα τα θέματα υγείας γύρω από την τομάτα είχαν λάβει σχετικά μικρή προσοχή.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του λυκοπενίου έχουν όμως πλέον κεντρίσει το ενδιαφέρον στο θέμα τομάτα ως τρόφιμο με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες. Η μεγαλύτερη κατανάλωση τομάτας ήδη προωθείται με τις τρέχουσες γενικές συστάσεις που αποσκοπούν στην αύξηση της πρόσληψης φρούτων και λαχανικών. Παρ' όλα αυτά δεν είναι αναγκαστικό να καταναλώνεται η τομάτα νωπή ως φρούτο για να παίρνουμε το λυκοπένιο αφού οι τομάτες μπορούν να λαμβάνονται και ως επεξεργασμένα τρόφιμα. Τα μεταποιημένα τρόφιμα αυτά περιλαμβάνουν σάλτσα για μακαρόνια, σούπα τομάτας, σάλτσα, κέτσαπ, και

πάστα τομάτας. Επιπλέον, πολλά από αυτά τα επεξεργασμένα τρόφιμα είναι καλύτερες πηγές αφού το λυκοπένιο είναι περισσότερο βιοδιαθέσιμο από ότι είναι στις φρέσκες τομάτες (Giovannucci, 1999).



**Εικόνα 4. Μηχανισμοί του λυκοπενίου όσον αφορά την πρόληψη χρόνιων ασθενειών.**

Η πρόσληψη λυκοπενίου, η αύξηση της συγκέντρωσης του στο σώμα και η δραστηριοποίηση του ως αντιοξειδωτικό οδηγεί στην παγίδευση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, αυξάνοντας έτσι το συνολικό δυναμικό τους και μειώνοντας την οξειδωτική βλάβη που προκαλούν. Αυτή η μείωση της οξειδωτικής καταπόνησης μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο και καρδιαγγειακές νόσους. Εναλλακτικά, η αυξημένη συγκέντρωση λυκοπενίου στον οργανισμό μπορεί να ρυθμίσει τις λειτουργίες των γονιδίων, να βελτιώσει τη διακυτταρική επικοινωνία, να ρυθμίσει την ορμονική έκκριση και την ανοσολογική απόκριση (Agarwal & Rao, 2000).

### 1.4.2.2 Λυκοπένιο και Καρκίνος

Ο καρκίνος των πνευμόνων είναι μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Αρχικά ευρήματα οδήγησαν τους ερευνητές να επικεντρωθούν στη β-καροτίνη και έδωσαν το έναυσμα για να εξετασθεί συμπληρωματικά το β-καροτένιο σε σχέση με τον κίνδυνο καρκίνου των πνευμόνων σε μελέτες παρέμβασης. Δυστυχώς, τα αποτελέσματα από διάφορες μελέτες, είτε ήταν ασαφή αφού σύμφωνα με κράτη μέλη που συμμετείχαν υπήρξαν αναφορές ότι οι καπνιστές οι οποίοι τυχαιοποιημένα έλαβαν β-καροτένιο ήταν σε υψηλότερο

κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα (Gilbert et al., 1996). Όσον αφορά την κατανάλωση της τομάτας σε σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα υπήρξαν στατιστικά σημαντικές αποδείξεις που έδειχναν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των δύο. Για να υπάρχει ακρίβεια στις αποδείξεις αυτές χρειάστηκε να προσαρμοστούν κατάλληλα σύμφωνα με το ιστορικό του καπνίσματος, δηλαδή το πιο σημαντικό δυναμικό αίτιο για τον καρκίνο του πνεύμονα (Giovannucci, 1999). Ωστόσο, μερικά χρόνια αργότερα έγινε μία μελέτη σχετικά με την πρόσληψη λυκοπενίου και αναφέρθηκε μόνο μια μικρή αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης λυκοπενίου και κινδύνου καρκίνου του πνεύμονα που δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Κατά τη διεκπεραίωση της έρευνας αυτής, οι τομάτες αντιπροσώπευαν μόνο το 29% της προσληφθείσας ποσότητας λυκοπενίου, κάτι που δείχνει ότι πιθανόν το όφελος από τις τομάτες σχετίζεται με άλλες ενώσεις πέραν του λυκοπενίου ή ότι το λυκοπένιο από άλλες πηγές εκτός της τομάτας δεν είναι άμεσα διαθέσιμο (Marchand et al., 1993).

Αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης τομάτας παρατηρήθηκε επίσης σε μία μελέτη και για τον κίνδυνο του γαστρικού καρκίνου (Vecchia et al., 1987). Διαπίστωσε ότι σε περιοχές όπου τα άτομα λάμβαναν υψηλή ποσότητα λυκοπενίου, είχαν τα χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου του στομάχου ενώ σε αυτούς που λάμβαναν χαμηλή, είχαν υψηλότερα ποσοστά. Υπάρχουν και άλλα φρούτα και λαχανικά που δίνουν αντίστροφη συσχέτιση με τον καρκίνο του στομάχου. Η αντίστροφη όμως αυτή σχέση με τις τομάτες ήταν από τις πιο ισχυρές κάτι το οποίο δείχνει καθαρά μια προστατευτική επίδραση της κατανάλωσης τομάτας ή λυκοπενίου στο γαστρικό καρκίνο (Buiatti et al., 1987). Σε μια άλλη έρευνα που έγινε στην Ισπανία όμως παρατηρήθηκε ότι δεν ισχύει η αντίστροφη αυτή συσχέτιση (Ramon et al., 1992).

Στις οικονομικά ανεπτυγμένες περιοχές ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ευρέως διαδεδομένος. Μία μελέτη αναφέρθηκε σε στατιστικά σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ της κατανάλωσης τομάτας και του κινδύνου καρκίνου του παχέος εντέρου (Franceschi et al., 1994). Άλλες μελέτες ασθενών-μαρτύρων που έγιναν στην Ιταλία ανέφεραν περίπου 60% μείωση του κινδύνου καρκίνου τόσο του παχέος εντέρου και του ορθού που συνδέονται με την υψηλότερη κατανάλωση ντομάτας (Franceschi et al., 1997).

Για τον καρκίνο του οισοφάγου υπάρχουν λίγες μελέτες που συσχετίζονται με τις τομάτες και το λυκοπένιο. Σε μια μελέτη όπου εμπλέκηκαν άτομα με εξαιρετικά υψηλά ποσοστά καρκίνου του οισοφάγου (ιδιαίτερα άνδρες), βρέθηκε ότι σε ένα ποσοστό 39% (στατιστικά σημαντικό) μειωνόταν ο κίνδυνος για τους άνδρες που κατανάλωναν συχνά

τομάτες, αλλά η συσχέτιση αυτή δεν ήταν προφανής για τις γυναίκες (Giovannucci, 1999). Σε μια τράπεζα αίματος με βάση μια μελέτη αναφέρθηκε ότι οι ασθενείς καρκίνου στόματος, λάρυγγα και οισοφάγου είχαν κατά 5% χαμηλότερες μέσες τιμές επίπεδου λυκοπενίου από ότι τα άτομα της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, από τους 28 ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του οισοφάγου, παρατηρήθηκε ότι περιείχαν 16,4% χαμηλότερο επίπεδο λυκοπενίου στο αίμα (Nomura et al., 1997).

Στις περιπτώσεις όπου εξετάστηκε η τομάτα ή το λυκοπένιο σε σχέση με τον κίνδυνο του καρκίνου του παγκρέατος υποστηρίχθηκε αντίστροφη συσχέτιση και πάλι. Το μέγεθος του σχετικού κινδύνου βρέθηκε να είναι πενταπλάσιο όσον αφορά την αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του παγκρέατος στους καταναλωτές με χαμηλή κατανάλωση ντομάτας (Mesquita et al., 1991). Σε μία άλλη μελέτη που έγινε με βάση τον ορό του αίματος που αφορούσε μόνο 22 ασθενείς, τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά. Καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε με το σύνολο των καροτενοειδών ή το β-καροτένιο (Burney et al., 1989). Είναι απίθανο τα χαμηλά επίπεδα λυκοπενίου να επέρχονταν ως αποτέλεσμα του καρκίνου, διότι η σχέση αυτή ήταν εμφανής σε διαγνωσμένους καρκίνους 9-12 έτη μετά τη συλλογή του αίματος και του παγκρέατος. Επίσης, υποδηλώνεται μια συγκεκριμένη επίδραση του λυκοπενίου μεταξύ των καροτενοειδών, δεν αποδείχτηκε όμως κάποιο όφελος από τα καρότα, μια σημαντική πηγή β-καροτένιου και α-καροτένιου (Mesquita et al., 1991).

Σε μια μελέτη διατροφής, η πρόσληψη των καροτενοειδών, β-καροτένιου, λουτεΐνης και β-κρυπτοξανθίνης δεν αποδείχτηκε συσχέτιση με τον κίνδυνο του καρκίνου του προστάτη, αλλά η υψηλή πρόσληψη λυκοπενίου ήταν συνδεδεμένη με μια στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου στο ποσοστό του 21%. Η υψηλή πρόσληψη τομάτας και των προϊόντων της, η οποία αντιπροσώπευε το 82% του λυκοπενίου, μείωσε τον κίνδυνο του καρκίνου του προστάτη σύνολο κατά 35% και τον επιθετικό καρκίνο του προστάτη κατά 53%. Η σάλτσα ντομάτας είχε την ισχυρότερη αντίστροφη σχέση με τον κίνδυνο του καρκίνου του προστάτη, ενώ ασθενέστερες αρνητικές συσχετίσεις είχαν παρατηρηθεί με τις ντομάτες και την πίτσα, αλλά καμία με το χυμό ντομάτας (Giovannucci, 1995). Σε άλλες μελέτες ασθενών-μαρτύρων που πραγματοποιήθηκαν δεν διαπιστώθηκε αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης τομάτας και του κινδύνου από καρκίνο του προστάτη, σε ποσοστό βέβαια μη στατιστικά σημαντικό (Giovannucci, 1999). Κάποια συσχέτιση μεταξύ της νωπής ή της μαγειρεμένες τομάτες και του κινδύνου του καρκίνου του προστάτη επίσης δε διαπιστώθηκε. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ισχυρότερη διαιτητική ένωση που βρέθηκε σε αυτή

ήταν για τα ψητά φασόλια. Έτσι προτάθηκε ότι τα ψητά φασόλια σε κονσέρβα μπορεί να παρέχουν πιο υψηλή βιοδιαθεσιμότητα του λυκοπενίου από ότι η σάλτσα ντομάτας (Silcocks et al., 1997). Σε άλλες μελέτες που είχαν εξετάσει το ποσοστό των καροτενοειδών στο αίμα, σε σχέση με τον κίνδυνο του καρκίνου του προστάτη, βρέθηκε σε ποσοστό 6,2% χαμηλότερο μέσο επίπεδο λυκοπενίου στον προστάτη σε περίπτωση ατόμων που είχαν καρκίνο. Φυλετικές διαφορές στην αιτιολόγηση του καρκίνου του προστάτη μπορεί επίσης να είναι σημαντικές, δεδομένου ότι άτομα συγκεκριμένης καταγωγής (Ασία για παράδειγμα) μπορεί να έχουν εγγενώς χαμηλή ευαισθησία στον καρκίνο του προστάτη (Giovannucci, 1995).

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της ασθένειας του καρκίνου του μαστού, σχετικά λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση της με την πρόσληψη τομάτας ή λυκοπενίου. Σε μια διατροφική μελέτη που έγινε δεν υποστηρίχθηκε σύνδεση μεταξύ της πρόσληψης τομάτας και του κινδύνου του καρκίνου του μαστού (Okajima et al., 1997). Σε μια άλλη μελέτη με βάση τα επίπεδα των καροτενοειδών στο λιπώδη ιστό του μαστού κατά τον έλεγχο ατόμων, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις του λυκοπενίου μεταξύ των ασθενών ατόμων, αν και ο αντίκτυπος του καρκίνου στα επίπεδα λυκοπενίου ιστού δεν μπορεί να αποκλειστεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι το λυκοπένιο στο λιπώδη ιστό του μαστού συσχετίζεται ασθενώς με την πρόσληψη λυκοπενίου (Zhang et al., 1997).

Σε διάφορες μελέτες, η μηνιαία κατανάλωση τομάτας ήταν υψηλότερη στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με άτομα σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων όσον αφορά τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αποδείχτηκε ότι οι γυναίκες που κατανάλωναν τομάτες τρεις ή περισσότερες φορές την εβδομάδα, είχαν μείωση κατά 40% στον κίνδυνο δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας σε σχέση με αυτές που δεν κατανάλωναν (Giovannucci, 1999). Μια άλλη μελέτη έδειξε υψηλότερο κίνδυνο στις γυναίκες με χαμηλά επίπεδα του ορού σε λυκοπένιο και πενταπλάσια αύξηση του κινδύνου μεταξύ των ατόμων με χαμηλά επίπεδα λυκοπενίου διαιτητικά. Έτσι παρατηρείται μια αντίστροφη σχέση όσον αφορά την κατανάλωση τομάτας και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Vaneenwy et al., 1991).

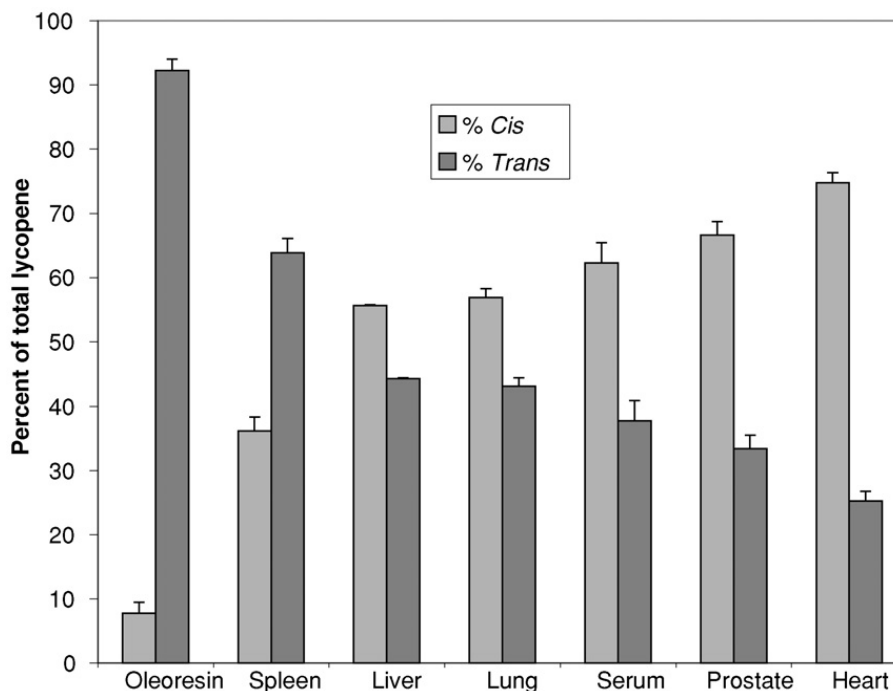
### **1.4.2.3 Λυκοπένιο και καρδιαγγειακά νοσήματα**

Οι αντιοξειδωτικές θρεπτικές ουσίες πιστεύεται ότι επιβραδύνουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν βλαβερές οξειδωτικές διαδικασίες. Μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση της τομάτας και των προϊόντων της που

περιέχουν λυκοπένιο μειώνουν τον κίνδυνο της καρδιαγγειακής νόσου. Τα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο λιπώδη ιστό, τα οποία είναι καλύτεροι δείκτες μακροχρόνιας έκθεσης από ότι τα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο αίμα, χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες της κατάστασης των αντιοξειδωτικών. Βιοψία δειγμάτων λιπώδους ιστού που λήφθηκαν αμέσως μετά το έμφραγμα και αναλύθηκαν για τα διάφορα καροτενοειδή, έδειξαν ότι μόνο το λυκοπένιο είναι προστατευτικό. Επίσης οι καπνιστές με χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούντων καροτενοειδών είχαν αυξημένο κίνδυνο για τα επόμενα έμφραγματα του μυοκαρδίου. Χαμηλότερα επίπεδα λυκοπενίου στο αίμα βρέθηκαν να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για θάνατο από τη στεφανιαία νόσο ασθενειών (Agarwal & Rao, 2000).

#### **1.4.2.4 Λυκοπένιο και χοληστερόλη**

Έπειτα από κλινικές δοκιμές έχουν προσκομιστεί αποδεικτικά στοιχεία ότι το λυκοπένιο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη μείωση της οξειδωτικής καταπόνησης, ιδίως στην πρόληψη της οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης - χοληστερόλης (LDL), την καταστολή της χοληστερόλης και την υποβάθμιση της LDL . Οξειδωμένα LDL σωματίδια προκαλούν μια σειρά από διεργασίες που οδηγούν σε σχηματισμό φλεγμονής, πλάκας, αθηρωματικές βλάβες και ρήξη της πλάκας. Επιπλέον, τα οξειδωμένα σωματίδια LDL επηρεάζουν δυσμενώς την κανονική λειτουργία του ενδοθηλίου αναστέλλοντας το μονοξειδίου του αζώτου (NO) επηρεάζοντας έτσι την αρτηριακή πίεση. Υψηλά επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης και υψηλή αρτηριακή πίεση αναγνωρίζονται ως παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές νόσους. Το λυκοπένιο έχει προταθεί για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και της αρτηριακής πίεσης. Μπορεί να θεωρηθεί ως αποτελεσματικό για τη μείωση της LDL και της ολικής χοληστερόλης, αν ληφθεί σε δόσεις υψηλότερες από 25 mg ημερησίως. Όσον αφορά την αρτηριακή πίεση η μείωση της από το λυκοπένιο έχει αποδοθεί στη διέγερση της παραγωγής NO στο ενδοθήλιο (Ried & Flaker, 2011).



**Σχήμα 7. Περιεκτικότητα λυκοπενίου σε ανθρώπινους ιστούς**

Περιεκτικότητα (%) ε μορφή *cis* και *trans* στα διάφορα όργανα του σώματος όπως είναι η σπλήνα, το συκώτι, οι πνεύμονες,, ο προστάτης αδένας και η καρδιά καθώς επίσης και στο αίμα (Rao et. al, 1999).

### 1.4.2.5 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Αν και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του λυκοπενίου θεωρείται ότι είναι ο κύριος υπεύθυνος για τις ευεργετικές επιδράσεις της τομάτας, συσσωρεύονται αποδείξεις που υποδηλώνουν ότι πιθανόν και άλλοι μηχανισμοί να εμπλέκονται. Μαζί με τους γενετικούς παράγοντες και την ηλικία, ο τρόπος ζωής και η διατροφή θεωρούνται επίσης σημαντικά αίτια κίνδυνου. Περίπου το 50% όλων των καρκίνων έχουν αποδοθεί σε διατροφικά θέματα. Η οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι μία από τις κύριες αιτίες που σχετίζονται με τον καρκίνο και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι υψηλής δραστηριότητας μόρια, οξειδωτικά και παράγονται ενδογενώς, ανάλογα με τον τρόπο ζωής και τις διατροφικές μας συνήθειες. Αντιδρούν με κυτταρικά συστατικά, προκαλώντας οξειδωτική βλάβη σε βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι αυτή η βλάβη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση πολλών χρόνιων ασθενειών (Agarwal & Rao, 2000).

## 1.5 Η εξέλιξη των ποικιλιών

Η Μεσογειακή διατροφή, η οποία είναι πλούσια σε λαχανικά και φρούτα, συμπεριλαμβανομένων και των τοματών, έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνη για τα

χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου σε όλες τις περιοχές. Κατά την πράσινη επανάσταση της γεωργίας όμως, αναπτύχθηκαν προγράμματα αναπαραγωγής υβριδικών ποικιλιών που αναπτύσσονται με υψηλό δυναμικό απόδοσης ανά εκτάριο, μία ενιαία και ευχάριστη εμφάνιση, με ανοχή στις νόσους, και μεγάλη διάρκεια ζωής στο ράφι και στο σπίτι. Αυτό οδήγησε στο να αναπτυχθεί ενός πολύ μικρός αριθμός ποικιλιών που να διατίθενται για μεγάλης κλίμακας αγορές. Σήμερα όμως οι καταναλωτές ψάχνουν για υγιεινά και νόστιμα φαγητά. Συνεπώς, παρόλο που ο αριθμός των εμπορικών ποικιλιών τομάτας εξακολουθεί να είναι περιορισμένος, το περιεχόμενο των βιολογικά δραστικών ενώσεων γίνεται πλέον μια κρίσιμη παράμετρος για τους καλλιεργητές ντομάτας (Dorais et al., 2008)

Οι σποροπαραγωγικές εταιρίες προσφέρουν πλέον διαφορετικά είδη καρπών (κερασόμορφες, στρογγυλές, επιμήκεις, μικρές, μεγάλες κλπ.) σε διάφορα χρώματα (κόκκινο, πορτοκαλί, ροζ, μοβ) με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά. Σε διάφορα προγράμματα αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται σήμερα παραδοσιακές αλλά και μοριακές μέθοδοι ώστε να αυξηθούν τα επίπεδα του λυκοπενίου και διαφόρων άλλων καροτενοειδών στις τομάτες (Ronen et al., 2000). Αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικών επιτεύχθηκαν μέσω της τροποποίησης του αποσυνθετικού μονοπατιού φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών ενώσεων. Η επιλογή των μικρών και πολύχρωμων τοματών από τους παραγωγούς και τις αλυσίδες διανομής της αγοράς έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση του επιπέδου των καροτενοειδών, των φλαβονοειδών και της βιταμίνης C και κατά συνέπεια τη θρεπτική τους αξία και τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Τα μικρότερα φρούτα έχουν συνήθως υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, ενώ η μεγαλύτερη αναλογία του φλοιού ως προς τον όγκο μπορεί να ενισχύσει τα επίπεδα των φλαβονοειδών, τα οποία βρίσκονται κυρίως στην επιδερμίδα (Dorais et al., 2008). Στην εμπορική κλίμακα χρησιμοποιούνται συνήθως ποικιλίες με γονότυπους που έχουν γενικά μια υψηλότερη περιεκτικότητα σε καροτενοειδή ενώ αποδείχθηκε ότι το λυκοπένιο ανάμεσα σε 40 ποικιλίες τομάτας ήταν υψηλότερο σε τύπους ντομάτας cherry (Kuti & Konuru 2005).

## **1.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες ρύθμισης**

Οι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα και τη γεύση των καρπών τομάτας (Rosales et al., 2010). Οι δύο αυτοί παράγοντες μπορεί να είναι στενά συνδεδεμένοι. Υπάρχουν βέβαια και μελέτες που αναφέρθηκαν σχετικά με το άμεσο αποτέλεσμα των

υψηλών εκπομπών CO<sub>2</sub> και την υγρασία του αέρα όσον αφορά τα φυτοθρεπτικά συστατικά. Οι αλληλεπιδράσεις όμως μεταξύ των παραγόντων, καθιστούν δύσκολη την ερμηνεία για το πώς επιδρά ο καθένας είτε μεμονωμένα είτε συνεργιστικά με τους άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα στα μεγαλύτερα υψόμετρα μειώνεται η θερμοκρασία αλλά αυξάνεται το ορατό και το υπεριώδες φως, γεγονός το οποίο μπορεί να αυξήσει το επίπεδο ορισμένων θρεπτικών συστατικών του φυτού, όπως είναι τα καροτενοειδή, καθώς η κύρια λειτουργία τους είναι να απορροφούν το φως κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και να προστατεύουν τα κύτταρα από το υπερβολικό φως (Dorais et al., 2008).

Τα θρεπτικά συστατικά της τομάτας, όπως η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή και οι φαινόλες επηρεάζονται έντονα από την ένταση, τη διάρκεια και την ποιότητα του φωτός. Αποδείχθηκε ότι τα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C, το λυκοπένιο, η β-καροτίνη και οι φαινόλες αυξάνονται με αύξηση της έντασης του φωτός (Dorais et al., 2008). Αν και το φως δεν είναι απαραίτητο για τη σύνθεση διαφόρων αντιοξειδωτικών, το πόσο η ένταση του φωτός κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου επηρεάζει το περιεχόμενό τους στον καρπό έγκειται στο γεγονός ότι οι διάφορες ουσίες (όπως για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ) συντίθενται από τα σάκχαρα που παρέχονται μέσω της φωτοσύνθεσης. Θετικές συσχετίσεις όμως παρατηρήθηκαν και μεταξύ της περιεκτικότητας σε σάκχαρα στα φρούτα, σε βιταμίνη C και στο λυκοπένιο (Gautier et al., 2004). Ακόμα κι αν το φως δεν είναι απαραίτητο για την ωρίμανση των τομάτων το να μην εκτίθενται τα φρούτα σε φωτοπερίοδο (8 ωρών) οδηγεί στο να μην καταφέρουν να αναπτύξουν τα επίπεδα λυκοπενίου σε τόσο υψηλά επίπεδα όσο αυτά που εκτίθενται σε 24 ώρες. Το ερυθρό φως προκαλεί τη βιοσύνθεση του λυκοπενίου ενώ το βαθύ ερυθρό αντιστρέφει τη διαδικασία αυτή (Cox et al., 2003). Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C αυξάνεται με την έκθεση στο βαθύ ερυθρό. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια συνδυασμένη επίδραση της φασματικής ποιότητας και της θερμοκρασίας των φρούτων, η οποία επηρεάζει τον μεταβολισμό του σακχάρου και κατά συνέπεια την περιεκτικότητα της βιταμίνη C (Dorais et al., 2008). Όσον αφορά τη διάρκεια της ωρίμανσης των φρούτων, το μπλε φως αύξησε την περιεκτικότητα των φρούτων σε λυκοπένιο και β-καροτένιο (Gautier et al., 2004). Σε πείραμα που έγινε σε φυτά τομάτας που καλλιεργούνταν σε ψηλά τούνελ και εκτίθονταν σε υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (290-400 nm), παρατηρήθηκε ότι οι καρποί είχαν κατά 20% υψηλότερο ποσοστό φαινολικών οξέων (καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό και φερουλικό οξύ) και 10-16% υψηλότερο συνολικό φαινολικό

περιεχόμενο από ό, τι φρούτα που καλλιεργούνται σε υπεριώδες συνθήκες αποκλεισμού των μήκων κύματος από τα 380nm και κάτω (Luthria et al., 2006).

Ο παράγοντας θερμοκρασία έχει άμεση επίδραση στο μεταβολισμό των φυτών και κατά συνέπεια επηρεάζει την ανάπτυξη του καρπού της τομάτας αλλά και τη θρεπτική της αξία. Παρατηρήθηκε ότι το ασκορβικό οξύ μειώνεται γενικά με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ η ρύθμιση της θερμοκρασίας των καροτενοειδών είναι συγκεκριμένη για κάθε καλλιέργεια. Για την τομάτα, η σύνθεση λυκοπενίου είναι υψηλότερη όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 12-21 °C (όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω). Η βέλτιστη θερμοκρασία εξαρτάται από το γονότυπο της ποικιλίας αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Λόγω του ότι το φορτίο φρούτων ανά θέση αλλάζει την απόκριση του καρπού σε θερμοκρασία, το περιεχόμενο του λυκοπενίου μπορούμε να πούμε ότι αυξάνεται όταν έχουμε υψηλότερη θερμοκρασία σε καρπούς που βρίσκονται σε φυτά με χαμηλό ανταγωνισμό φρούτων ενώ μειώνεται σημαντικά κάτω από υψηλή αναλογία ανταγωνισμού των φρούτων (Doraís et al., 2008). Οι ψυχρές θερμοκρασίες της νύχτας για την καλλιέργεια της τομάτας παρατηρήθηκε ότι μειώνουν τα καροτενοειδή. Σε αντίθεση το λυκοπένιο και το β-καροτένιο είναι ελαφρώς επηρεαζόμενα από την υψηλή θερμοκρασία, πιθανότατα λόγω της μετατροπής της β-καροτίνης σε λυκοπένιο υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας. Παρ' όλα αυτά, σε κερασόμορφες τομάτες (τύπου cherry) που υπόκεινται σε υψηλές θερμοκρασίες και ηλιακή ακτινοβολία, παρατηρήθηκε τη αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων και μειωμένη περιεκτικότητα καροτενοειδών όπως το λυκοπένιο και β-καροτένιο στο εξωκάρπιο. Παρά το γεγονός αυτό όμως η οξείδωση του ασκορβικού οξέος αυξήθηκε κάτω από αυτές τις συνθήκες (Rosales et al., 2010).

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Συνθήκες ανάπτυξης των πειραματικών φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum*)**

Για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τομάτας από τρία στάδια ωρίμανσης του καρπού (ανώριμη, μεσοώριμη και ώριμη) τα οποία είτε είχαν αγοραστεί από τοπικές υπεραγορές, είτε είχαν προμηθευτεί από διάφορους μεγαλοπαραγωγούς. Κατόπιν, ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τις πληροφορίες της ποικιλίας που αναγράφονταν στην ετικέτα (Hellfrucht, Brillante Fa 179 και HA34449 F1 υβρίδιο – cherry). Την ημέρα της παραλαβής τους, οι τομάτες είχαν καθαριστεί και προετοιμαστεί ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προβλεπόμενων αναλύσεων. Οι φρέσκες αυτές τομάτες χρησιμοποιήθηκαν για αναλύσεις αντιοξειδωτικές, αναλύσεις του λυκοπενίου και για διάφορες μοριακές αναλύσεις. Για τις αναλύσεις αυτές, ψιλοκόψαμε τα δείγματα και αφού τα ομογενοποιήσαμε με υγρό άζωτο μέχρι που έγιναν σκόνη τα καταψύξαμε και τα αποθηκεύσαμε στους -80°C ώστε ο ιστός να διατηρείται στη φυσική του κατάσταση χωρίς να υποβαθμίζεται με την πάροδο του χρόνου.

### **2.2 Αναλυτικές τεχνικές**

#### **2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του λυκοπενίου**

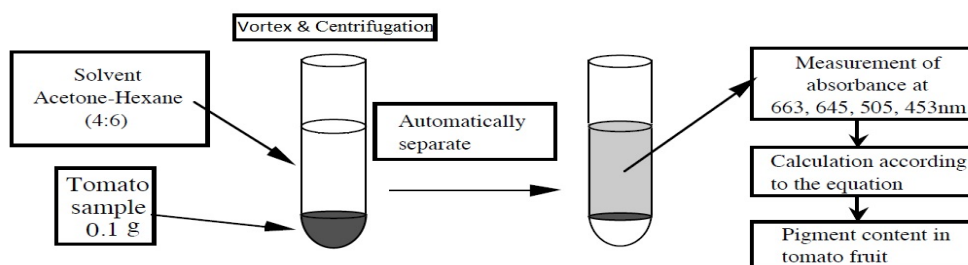
Ο προσδιορισμός του λυκοπενίου έγινε μετά από εκχύλιση του φυτικού ιστού με τη χρήση του διαλύτη-μείγματος ακετόνης-εξανίου σε αναλογία 4:6 αντίστοιχα. Για κάθε εκχύλιση τοποθετήθηκαν 0,1 gr σε 1,54 ml του μίγματος-διαλύτη και αφού ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση γουδιού-γουδοχειριού, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες και εφαρμόστηκε έντονη ανάδευση (Vortex) για 30-40 δευτερόλεπτα. Κατόπιν το ομογενοποιημένο μείγμα τοποθετήθηκε στη ψυχομένη φυγόκεντρο (4°C) για 5 λεπτά στις

5000 x g.

Μετά το τέλος της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική ανάλυση με μέτρηση της απορρόφησης στα εξής μήκη κύματος: 663nm, 645nm, 505nm, 453nm. Για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε το μίγμα-διαλύτης ακετόνης- εξανίου (4-6).

Ο υπολογισμός των ποσοτήτων του λυκοπενίου σε  $\text{gr L}^{-1}$ , έγινε με τη χρήση της ακόλουθης εξίσωσης (Nagata & Yamashita, 1992)

$$\text{Λυκοπένιο (g/ml)} = -0.0458A_{663} + 0.204A_{645} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$$



Εικόνα 5. Αναπαράσταση διαδικασίας ποσοτικού προσδιορισμού του λυκοπενίου

(Nagata & Yamashita, 1992)

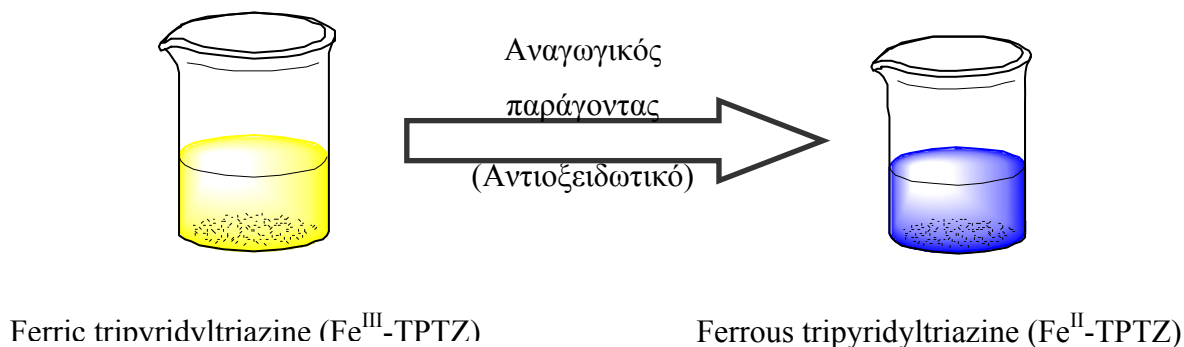
## 2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

### 2.2.2.1 Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος της FRAP (ferric reducing antioxidant power) είναι μία γρήγορη και άμεση φασματοφωτομετρική μέθοδος η οποία ουσιαστικά υπολογίζει τη συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα (αναγωγική ικανότητα) ενός φυτικού εκχυλίσματος. Στηρίζεται στην αναγωγή και κάτω από όξινες συνθήκες (χαμηλό pH), το σύμπλοκο  $\text{Fe}^{+3}$ -τριπυριδύλο-τριαζίνη ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) παίρνει δισθενή μορφή (αντιδρώντας με τις αντιοξειδωτικές ουσίες) και αποκτά έντονο μπλε χρώμα το οποίο έχει μέγιστο απορρόφησης στα 593 nm. Το αντιοξειδωτικό παρέχει το υδρογόνο, το οποίο είναι απαραίτητο για να έχουμε τη μετατροπή αυτή στη μορφή του σιδήρου (Benzie and Strain, 1996; Wojdyło et al., 2007).

Επομένως στη μέθοδο αυτή ευνοείται η αναγωγή του τρισθενούς συμπλόκου από το σύνολο των αντιοξειδωτικών ουσιών που βρίσκονται στο διάλυμα δοκιμής. Το ποσοστό της μείωσης της φερυλμετμογλοβίνης μπορεί να καθοριστεί φασματοσκοπικά (spectroscopy) στην ορατή περιοχή. Έτσι προτάθηκε για να χαρακτηρίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών. Η μέθοδος αυτή θεωρείται οικονομική και αξιόπιστη αλλά έχει το

μειονέκτημα ότι δεν προσδιορίζει τις θειολικές ομάδες σαν αντιοξειδωτικά. Όμως επειδή δεν υπάρχουν αντιοξειδωτικές θειόλες σε διαιτητικά φυτά και στα παράγωγά τους, η μέθοδος FRAP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε φυτικό υλικό (Βελίτσος, 2009).. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα του β καροτενίου.



#### Εικόνα 6. Αναπαράσταση της μεθόδου FRAP

Κάτω από όξινες συνθήκες (χαμηλό pH), το σύμπλοκο Fe<sup>+3</sup>-τριπυριδύλο-τριαζίνη (Fe<sup>+3</sup>-TPTZ) παίρνει δυσθενή μορφή αφού το αντιοξειδωτικό παρέχει το υδρογόνο (πρωτόνιο) (απαραίτητο για να έχουμε τη μετατροπή αυτή) αποκτώντας έντονο μπλε χρώμα (Benzie & Strain, 1996).

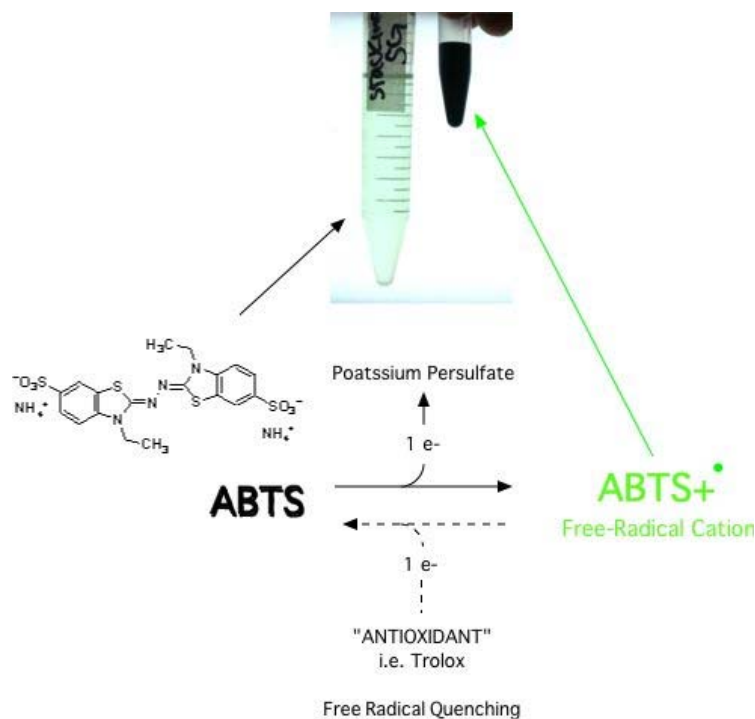
#### 2.2.2.2 Μέθοδος TEAC

Η ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox (TEAC) μετρά την αντιοξειδωτική ικανότητα μιας συγκεκριμένης ουσίας σε σύγκριση με τη γνωστή πρότυπη ένωση, Trolox. Συνήθως η αντιοξειδωτική ικανότητα μετριέται με τη μέθοδο του αποχρωματισμού του ABTS+. Με αυτή τη μέθοδο έχουμε τη δημιουργία της ρίζας ABTS+, με την προσθήκη του υπερθειικού νατρίου. Η δημιουργία της ένωσης αυτής οδηγεί στην παραγωγή μπλε χρώματος που απορροφά φως στα 734 nm. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρουσία αντιοξειδωτικών, η μπλε ανιονική ρίζα ABTS+ αποχρωματίζεται (Εικόνα 6). Η αντίδραση αυτή παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά για 1 min. Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων σε κάθε εκχύλισμα συγκρίνεται με εκείνη του Trolox, το οποίο είναι ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E (Podsdek 2003; Pahy, 2011).

Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μετρήθηκε με τη χρήση της μεθόδου αποχρωματισμού ABTS. Τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά προήλθαν από κατεψυγμένο ιστό βάρους 0,15 g, και έγιναν τρεις επαναλήψεις από τρία διαφορετικά δείγματα. Για την εκχύλιση τους έγινε χρήση ακετόνης (50% v/v), έντονη ανάδευση για πλήρη ομογενοποίηση και ακολούθως τοποθετήθηκαν τους -20°C για όλη τη νύχτα. Ακολούθως τα δείγματα

υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 7 λεπτά, με το πέρας της οποίας τα υπερκείμενα είχαν ανακτηθεί ώστε να χρησιμοποιηθούν για τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής δράσης (Pahy, 2011). Η κατιονική ρίζα του 2,2'-Αζινοδις(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) (Sigma) (ABTS<sup>+</sup>) (Sigma), παρήχθη από την αντίδραση 7 mM υδατικού διαλύματος ABTS με 2,45 mM υπερθειικού καλίου (τελική συγκέντρωση). Το μείγμα τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες πριν από τη χρήση του. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στη διεκπεραίωση του πειράματος αραιώθηκε σε αιθανόλη μέχρι η απορρόφηση του στα 734 nm να είναι ίση με  $0,70 \pm 0,02$ .

Τα αντιοξειδωτικά εκχυλίσματα και/ή τα διαλύματα Trolox (10 μl) αναμίχθηκαν με 1 ml του αραιωμένου ABTS<sup>+</sup>. Ακολούθως το διάλυμα μετρήθηκε στα 734 nm μετά από 1 λεπτό στους 30°C. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μετρήθηκε σε Perkin-Elmer UV / Vis φασματοφωτόμετρο (Perkin-Elmer, Jögesheim, Γερμανία). Το φρέσκα παρασκευασμένο Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλγρόμα-2-καρβοξυλικό οξύ Sigma), χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο διάλυμα για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης και η ισοδύναμη ικανότητα (TEAC) εκφράστηκε σε mM Trolox ανά 1 g τομάτας. Η πρότυπη καμπύλη Trolox δημιουργήθηκε με εύρος συγκεντρώσεων 0-16 mM. Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον τρεις φορές, και εις τριπλούν για κάθε δείγμα καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα.



### **Εικόνα 7. Αναπαράσταση της μεθόδου TEAC**

Η αντίδραση της ελεύθερης ρίζας ABTS με την παρουσία του αντιοξειδωτικού κατά τη διάρκεια της δημιουργίας ABTS<sup>+</sup> (Zulueta et al., 2009).

## **2.3 Μοριακές τεχνικές ανάλυσης**

### **2.3.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)**

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε με τη μέθοδο της τριζόλης (PureZol RNA isolation reagent, Bio-Rad) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή ακολούθησε συγκομιδή των καρπών στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης και κατόπιν αφού τεμαχίστηκαν και διαχωρίστηκαν προσεκτικά σε επιδερμίδα, σάρκα και σπόρους, κονιορτοποιήθηκαν σε υγρό άζωτο με τη χρήση γουδιού και γουδοχειριού. Κατόπιν, 50-100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού αναμείχθηκε με 1ml του αντιδραστηρίου Trizol και έπειτα από έντονη ανάδευση (Vortex) για 30-40 δευτερόλεπτα, το ομογενοποιημένο μίγμα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 25°C. Ακολούθως έγινε προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου σε κάθε σωλήνα (για κάθε 1ml Trizol που χρησιμοποιήθηκε αρχικά), και καλή ανάδευση (20 δευτερόλεπτα) πριν από τη φυγοκέντρηση (16000 x g για 30 λεπτά στους 4°C). Η υπερκείμενη φάση (στην οποία εμπεριέχεται το RNA) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 0,5 ml ισοπροπανόλης και αφού γίνει καλή ανάδευση τοποθετείται για 30 λεπτά στους -20°C. Το ίζημα που περιέχει το RNA παραλαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση στις 12000 x g για 10 λεπτά στους 4°C. Για να απομακρυνθούν τα άλατα γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 1ml διαλύματος αιθανόλης 75% (v.v.). Το ίζημα ακολούθως αφήνεται να στεγνώσει στο block heater για 2-3 λεπτά στους 50-55°C και κατόπιν επαναιωρείται σε 20μl απιονισμένου νερού (απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες), ανάλογο τις ποσότητας RNA που ιζηματοποιήθηκε. Τέλος το RNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

### 2.3.2 Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος του ριβονουκλεϊκού οξέος

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του RNA (ng/μl) και της καθαρότητας του όσον αφορά την ποιοτική και ποσοτική ανάλυσή του, έγινε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποιοτική ανάλυση ελέγχεται με τους λόγους A260/A280 και A260/A230.

Λόγος A260/A280: Ως ένα κριτήριο για την αξιολόγηση του ποσοστού επιμόλυνσης του RNA μπορούμε να θεωρήσουμε την απορρόφηση των 2 πλευρικών της αλυσίδων της αλυσίδων αμινοξέων (όπως η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη) στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία στο μήκος κύματος 280 nm μέσω της φασματοφωτομέτρησης. Η μέτρηση αυτή μπορεί να ληφθεί ταυτόχρονα με ποσοτικοποίηση του RNA στο μήκος κύματος 260 nm. Ωστόσο η μέγιστη απορρόφηση των πρωτεϊνών είναι στα 280 nm. Στο πλήρες φάσμα όμως των UV απορροφήσεων έχουμε ακόμα μια σημαντική απορρόφηση στα 260 nm. Για το RNA ισχύει το αντίστροφο. Ο λόγος αυτός ουσιαστικά δείχνει την πρόσμιξη του μίγματος των νουκλεϊνικών οξέων σε πρωτεΐνες. Αν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1,8-2, τότε το δείγμα RNA είναι καθαρό από τέτοιες προσμίξεις.

Λόγος A260/A230: Ένα άλλο μέτρο καθαρότητας του RNA είναι το ποσοστό των προσμείξεων του σε οργανικούς διαλύτες και πολυσακχαρίτες. Ο μεγάλος αριθμός παραγόντων πρόσμιξης, τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές, μπορεί να επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στις δραστηριότητες των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στη real time PCR. Οι ενώσεις πρόσμιξης μπορούν να απορροφήσουν επίσης στο υπεριώδες φως «αυξάνοντας» έτσι τεχνητά τη φαινομενική συγκέντρωση του δείγματος του RNA. Αναγνωρίζοντας λοιπόν το ότι ορισμένες από αυτές τις προσμείξεις απορροφούν το φως στο υπεριώδες φάσμα, το ποσοστό της απορρόφησης στα μήκη κύματος 260 και 230 nm χρησιμοποιείται για να εκτιμήσει περαιτέρω την ποιότητα και καθαρότητα του RNA. Ένα καθαρό δείγμα του RNA θα πρέπει να αποδώσει μια τιμή περίπου 2,0 ιδανικά ή να είναι τουλάχιστο μεγαλύτερη από 1,7. Ωστόσο, σε αντίθεση με τον λόγο A260/A280 ο οποίος πραγματοποιείται κυρίως για να δούμε το ποσοστό προσμίξεων του RNA από τις πρωτεΐνες, ο λόγος A260/A230 υπόκειται σε μεγαλύτερες διακυμάνσεις, ανάλογα με τον παράγοντα πρόσμιξης και το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται. Ως εκ τούτου, ο λόγος A260/A230 είναι λιγότερο ακριβής από τον λόγο A260/A280.

### 2.3.3 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-Reverse Transcription)

Η αντίδραση αυτή εφαρμόστηκε έτσι ώστε να δημιουργηθεί συμπληρωματικό DNA το οποίο επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για μετέπειτα αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR. Για τη δημιουργία του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Pimescript 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit της Takara. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας, η αντίδραση της σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο 1μg ολικού RNA με 0,5μg εκκινητή oligo(dT) και 0,1μl dNTPs σε τελικό όγκο 10μl τοποθετήθηκαν στους 65°C για 5 λεπτά έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη δευτεροταγών δομών RNA καθώς και των εκκινητών. Ακολουθεί ο Πίνακας 1 στον οποίο αναγράφονται τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις του πρώτου σταδίου.

**Πίνακας 1. Αντίστροφη Μεταγραφή – Στάδιο 1<sup>ο</sup>**

<u>Συστατικά Αντίδρασης</u>	<u>Όγκος</u>
Ολικό RNA	X μl (1μg)
Εκκινητής Oligo dT (50μM)	1μl
dNTPs (10μM)	1μl
H <sub>2</sub> O (RNase-free)	Έως τα 10 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl

Ο επόμενος πίνακας (Πίνακας 2) αναγράφει τα συστατικά και τις συγκεντρώσεις του δεύτερου σταδίου.

**Πίνακας 2. Αντίστροφη Μεταγραφή – Στάδιο 2<sup>ο</sup>**

<u>Συστατικά Αντίδρασης</u>	<u>Όγκος</u>
Μίγμα εκμαγείου RNA/εκκινητών	10 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (5x)	4 μl
Παρεμποδιστής ριβονουκλεασών (40 units/μl)	0,5 μl
Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης (100 units/μl)	1 μl
H <sub>2</sub> O (RNase-free)	Έως τα 20 μl

Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την αντίδραση της είναι το ακόλουθο:

1. 30 °C για 10 λεπτά
2. 42 °C για 60 λεπτά
3. 95 °C για 5 λεπτά
4. 4 °C

### **2.3.4 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων RNA και προϊόντων της PCR από cDNA σε πηκτή αγαρόζης**

Το RNA και τα προϊόντα της PCR με εκμαγείο cDNA αναλύονται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Sambrook *et al.*, 1989). Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται με διάλυση της αγαρόζης με θέρμανση σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE τελικής συγκεντρώσεως 1,0% w/v. Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται να ψυχθεί και όταν φτάσει σε θερμοκρασία μικρότερη των 60°C προστίθεται ειδική χρωστική (GelRed dye) σε τελική συγκέντρωση 0,4 µg/ml και το διάλυμα αποχύνεται στη συσκευή. Με την ελάττωση της θερμοκρασίας σχηματίζεται το πλέγμα της πηκτής, η πυκνότητα του οποίου εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης. Με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού το μόριο του RNA και του cDNA κινείται προς την άνοδο, εξαιτίας του αρνητικού του φορτίου. Το ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων που χρησιμοποιείται είναι το TAE σε τελική συγκέντρωση 1X. και το διάλυμα επιστοίβαξης των δειγμάτων, (συγκέντρωσης 6X), περιέχει 0,25% w/v κυανού του ξυλενίου, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης και 30% v/v γλυκερόλη. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του RNA και του cDNA καθορίζεται από το μέγεθός τους.

Η πιο εύκολη μέθοδος για την ανίχνευση του DNA σε πηκτές αγαρόζης είναι με χρήση της ειδικής χρωστικής, που απορροφά στο UV και φθορίζει, όταν παρεμβάλλεται στις περιοχές ελίκωσης των νουκλεϊνικών οξέων. Το DNA που σχηματίζει σύμπλοκο με τη χρωστική, είναι ορατό κατά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία (254 nm) επειδή το ίδιο εκπέμπει την ακτινοβολία που απορρόφησε στην ορατή περιοχή (590 nm). Η ένταση της ακτινοβολίας αυτής είναι ανάλογη της ποσότητας του RNA και του προϊόντος της PCR

αντίστοιχα. Η ένταση φθορισμού του συμπλόκου χρωστικής - νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ μεγαλύτερη από την ένταση της ελεύθερης χρωστικής και έτσι είναι δυνατόν μικρές ποσότητες DNA ή RNA να ανιχνευθούν (Sambrook et al., 1989).

### 2.3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή PCR (Polymerase Chain Reaction) δίνει τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί η επιθυμητή ακολουθία του παραγόμενου cDNA, αρκεί να είναι γνωστή η ακολουθία εκατέρωθεν του γονιδίου στόχου ή της περιοχής στόχου (Watson *et al.*, 1992). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ενίσχυση τμημάτων cDNA ώστε να ελεγχθεί μετέπειτα μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρισης αν παίρνουμε λειτουργικό προϊόν.

Η θεωρητική βάση της PCR έχει ως εξής: χρησιμοποιείται μονόκλωνο cDNA ως εκμαγείο της DNA πολυμεράσης, για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια προκύπτουν κατά τη θέρμανση του δίκλωνου μορίου στους 95°C. Απαραίτητη προϋπόθεση για να ξεκινήσει η DNA πολυμεράση την αντιγραφή είναι η ύπαρξη μιας μικρής δίκλωνης περιοχής στο μόριο του DNA. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μικρού μεγέθους, τα οποία είναι συμπληρωματικά μιας περιοχής εκατέρωθεν της επιθυμητής ακολουθίας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χαρακτηρίζονται ως εκκινητές τα οποία σχεδιάζονται έτσι ώστε να περιέχουν τη θέση κοπής μιας ενδονουκλεάσης περιορισμού. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα ώστε να έχουν μήκος 20-30 βάσεις, το περιεχόμενό τους σε GC να είναι 40-60 % και ελέγχονται να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή διμερή μεταξύ τους με κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα (π.χ. 'Primer3'). Αντιδραστήρια τα οποία θεωρούνται ως απαραίτητα για να ξεκινήσει η αντίδραση, εκτός από το DNA-εκμαγείο και τους εκκινητές, είναι τα κατάλληλα dNTPs, ένα ρυθμιστικό διάλυμα, άλατα και μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (*Taq* DNA πολυμεράση). Η *Taq* είναι το ένζυμο πολλαπλασιασμού.

Τα στάδια μιας αντίδρασης PCR είναι τρία και αυτά επαναλαμβάνονται σε πολλαπλούς κύκλους. Στο πρώτο στάδιο οι δυο κλώνοι του δίκλωνου DNA διαχωρίζονται με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος στους 95°C. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη ψύξη του μίγματος σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ώστε να επιτευχθεί ο υβριδισμός των εκκινητών στην κατάλληλη συμπληρωματική περιοχή των δύο κλώνων. Η θερμοκρασία αυτή, όπως και ο χρόνος παραμονής του μίγματος σε αυτήν εξαρτάται από το μέγεθος της ακολουθίας και το μέγεθος και τη σύσταση των εκκινητών σε GC. Το στάδιο αυτό καθορίζει

την εξειδίκευση της αντίδρασης. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης γίνεται η αντιγραφή του DNA η οποία λαμβάνει χώρα στους 56°C, θερμοκρασία που είναι πολύ κοντά στη βέλτιστη της *Taq* DNA πολυμεράσης. Η διάρκεια αυτού του σταδίου εξαρτάται από το μήκος της ακολουθίας.

Οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται προέρχονται από θερμοανθεκτικούς μικροοργανισμούς, για να μη μετουσιώνονται στις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο κύκλος των τριών σταδίων επαναλαμβάνεται 25-35 φορές και παράγονται 2<sup>n</sup> μόρια DNA, όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιούνται. Στο τέλος των κύκλων έχουμε το τελευταίο στάδιο της προέκτασης στους 56°C που διαρκεί 10 min ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης σύνθεση των προϊόντων της PCR.

Οι αντιδράσεις PCR έγιναν σε αυτόματη προγραμματιζόμενη συσκευή PTC-200 Peltier Thermal Cycler της εταιρείας M.J. Research Inc., Massachusetts, USA.

### **2.3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time RT-PCR)**

Η πραγματοποίηση των αντιδράσεων της RT-PCR έγινε στο θερμοκυκλοποιητή Biorad IQ5 (Biorad, USA). Σε κάθε αντίδραση τοποθετήθηκε 4μl cDNA (αραιωμένο 1:5), 5μl 2x μείγματος αντίδρασης (SYBR Green Super Mix, Invitrogen) και 0,5μl από κάθε εκκινητή (ανοδικός και καθοδικός τελικής συγκέντρωσης 10μM ο καθένας). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανερχόταν στα 10μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές για το κάθε δείγμα. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δομικό γονίδιο *GAPD*. Στο πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των διαφόρων αντιδράσεων περιλαμβάνονταν οι εξής κύκλοι:

- i. Αποδιάταξη της διπλής έλικας στους 95 °C για 5λεπτά
- ii. Αποδιάταξη της έλικας για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 95 °C, ακολούθως υβριδισμός των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία ανάλογη του εκκινητή και δράση της πολυμεράσης στους 72 °C για 30

δευτερόλεπτα ώστε να επιμηκυνθεί η αλυσίδα. Ο δεύτερος κύκλος επαναλαμβάνεται 40 φορές

iii. Σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 5<sup>0</sup>C από τους 65<sup>0</sup>C στους

95<sup>0</sup>C σε χρονικό διάστημα 30 δευτερολέπτων. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται

61 φορές. Στο στάδιο αυτό ουσιαστικά γίνεται ο διαχωρισμός του κύριου προϊόντος από πιθανά διμερή εκκινητών ή από υποπροϊόντα της αντίδρασης, με σκοπό την ανίχνευση μη επιθυμητών παραπροϊόντων λόγω επιμολύνσεων ή μη συγκεκριμένης δραστηριότητας των εκκινητών.

**Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση βιοσυνθετικών γονιδίων λυκοπενίου**

Γονίδιο	Εκκινητής	Νουκλεϊνική Αλληλουχία	Ta(°C)
<i>GAPD</i>	F-GAPD	5' – CAC TTG AAG GGT GGT GCC AAG - 3'	60°C
	R-GAPD	5' – CCT GTT GTC GCC AAC GAA GTC - 3'	60°C
<i>SIZDS</i>	F-SIZDS	5' – TGA TAG ACG TGG GAA CCA CA – 3'	60°C
	R-SIZDS	5' – CCC CTA TTT CAC CCC CTT TA – 3'	60°C
<i>SibLCY</i>	F-SibLCY	5' – CCC GGG TAT CAA GTT GCT TA – 3'	60°C
	R-SibLCY	5' – GCC ACC ATT CGT TCT TGA AT -3'	60°C

### 2.3.7 Στατιστική ανάλυση

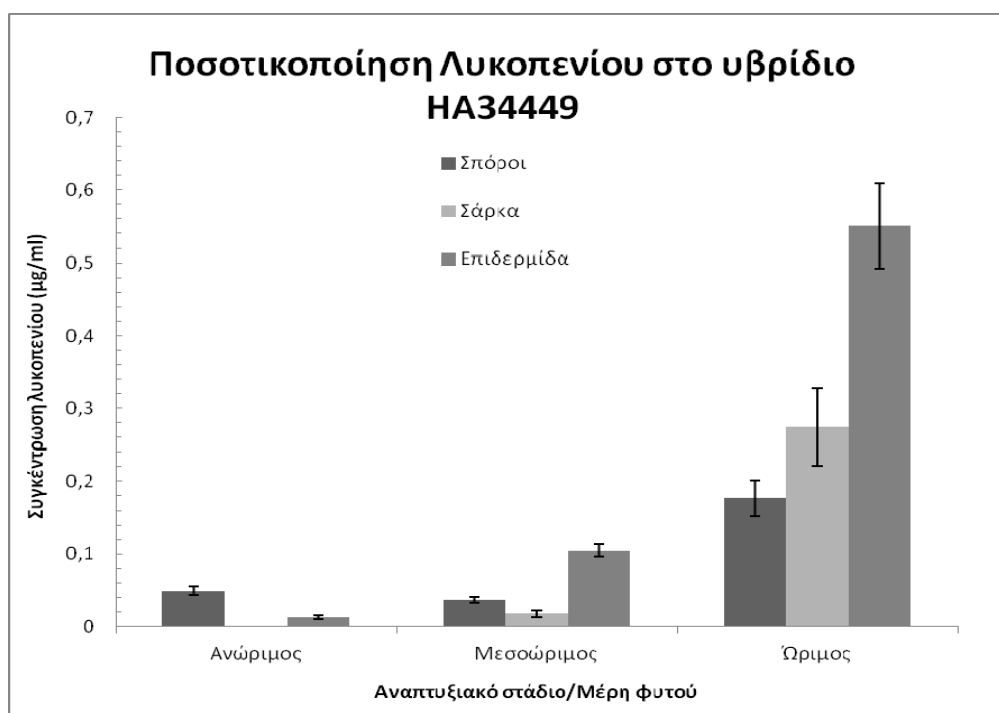
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR έγινε με τη χρήση του προγράμματος REST (Pfaffl et al., 2002). Τα αποτελέσματα των βιοχημικών και αναλυτικών μετρήσεων αναλύθηκαν με τη χρήση της ANOVA. Για τον έλεγχο της στατιστικής

σημαντικότητας των μεταξύ των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε ο δίπλευρος έλεγχος με επίπεδο σημαντικότητας 5%.

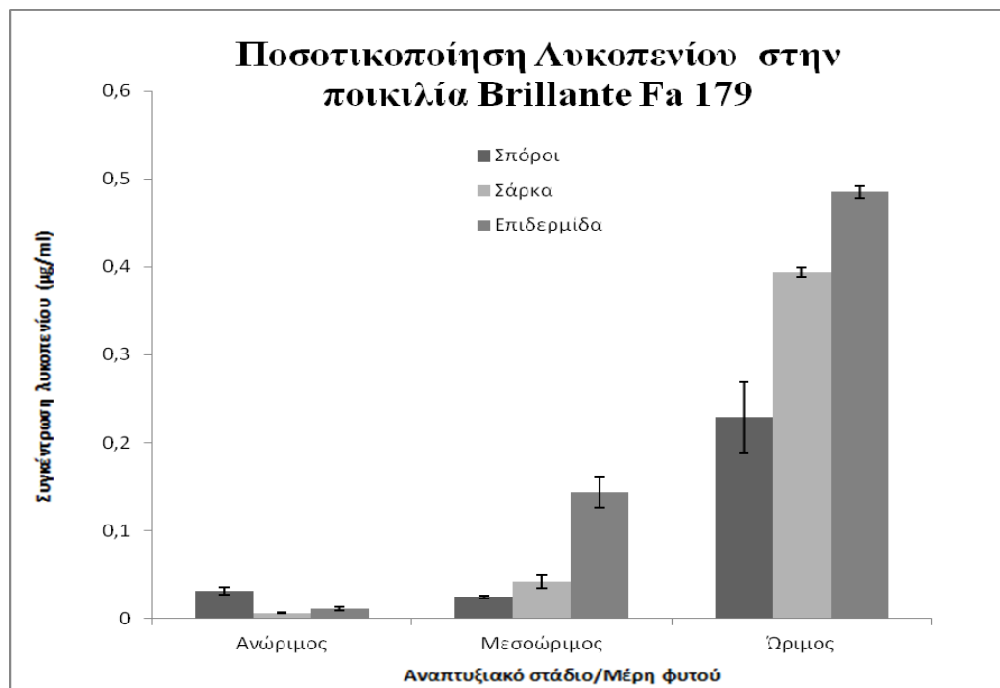
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του λυκοπενίου

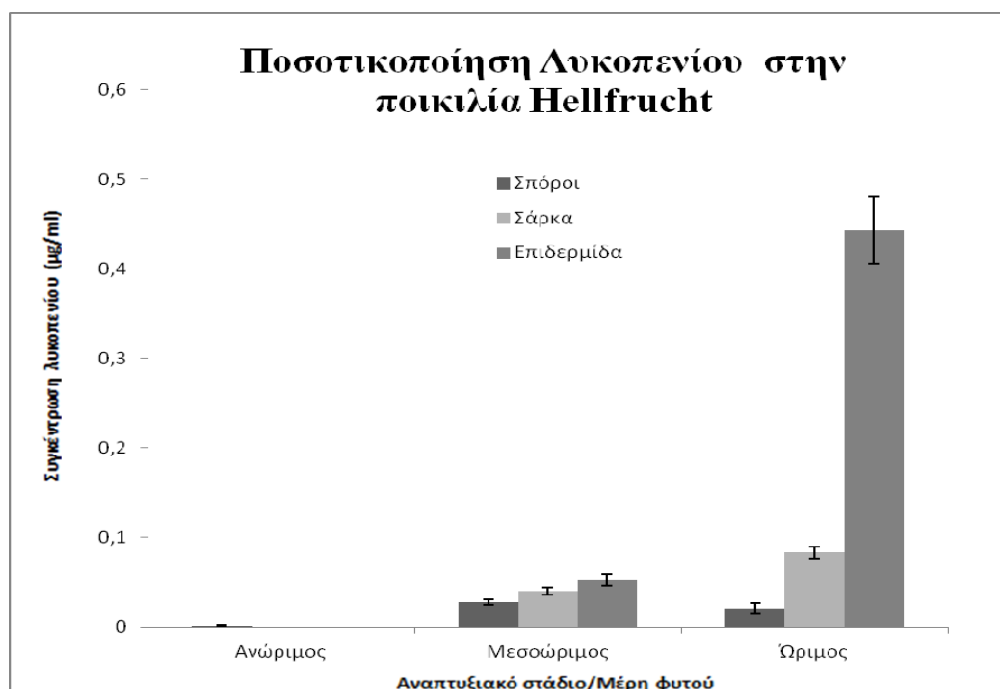
Η συγκέντρωση ολικού λυκοπενίου προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά μετά από εκχύλιση του φυτικού ιστού με τη χρήση του διαλύτη-μείγμα ακετόνης-εξανίου, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, σε καρπούς εμπορεύσιμων τομάτων σε τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια για σύγκριση της ποσοτικοποίησης στα ίδια μέρη του καρπού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το στάδιο της ανώριμης, το στάδιο της μεσοώριμης και το στάδιο της ώριμης τομάτας και η σύγκριση έγινε μεταξύ τριών ποικιλιών, της Hellfrucht, της Brillante Fa 179 και της HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Οι μετρήσεις των τριών ποικιλιών έγιναν σε απομονωμένους ιστούς από σπόρο, σάρκα και επιδερμίδα, σε τριπλέτα για την κάθε περίπτωση.



Σχήμα 8. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου από κάθε στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα). Ποικιλία HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry)

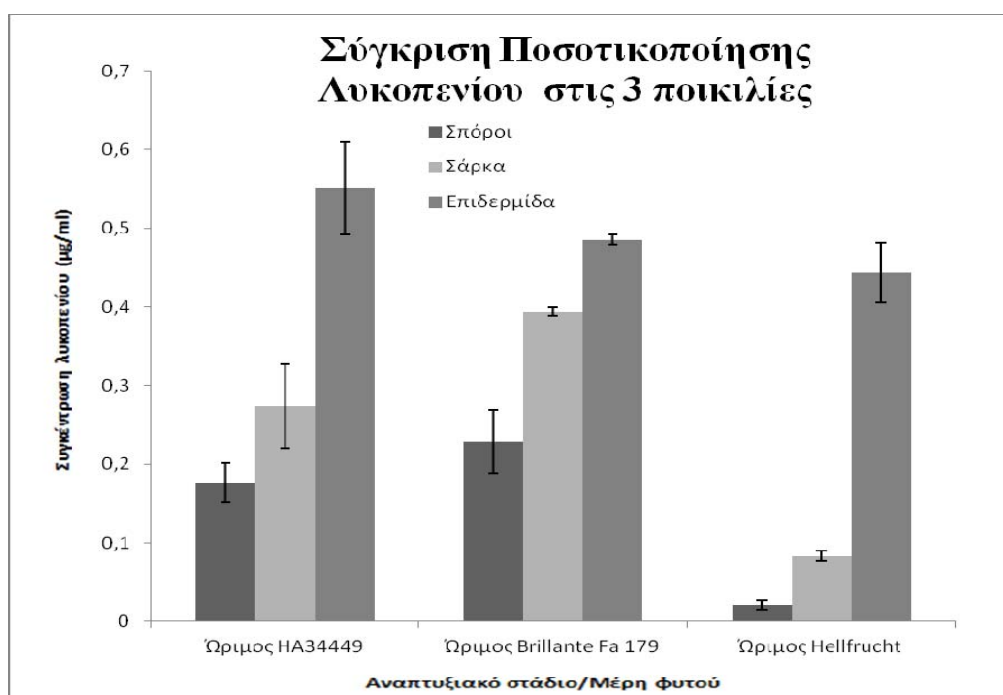


Σχήμα 9. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου από κάθε στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα). Ποικιλία Brillante Fa 179



**Σχήμα 10. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου από κάθε στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα). Ποικιλία Hellfrucht**

Όπως προαναφέρθηκε, πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα του λυκοπενίου στην τομάτα, όπως είναι η ποικιλία, η θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία. Αυτό που παρατηρούμε στα σχήματα 8-10 είναι πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση λυκοπενίου παρατηρείται στην επιδερμίδα, με την αύξηση αυτή να φαίνεται έντονα στο στάδιο της μεσοώριμης ανάπτυξης, αλλά να γίνεται ακόμα εντονότερη στο στάδιο της ώριμης. Αμέσως επόμενη σε περιεκτικότητα σε λυκοπένιο παρουσιάζεται η σάρκα, με μια μικρή αύξηση στο μεσοώριμο στάδιο και μέγιστη αύξηση στο ώριμο στάδιο. Οι σπόροι από την άλλη μεριά παρουσιάζουν διαφοροποίηση σε σχέση με τα άλλα δύο μέρη, αφού αρχικά στην ανώριμη φάση παρουσιάζουν συγκέντρωση λυκοπενίου μεγαλύτερη από τους άλλους δύο ιστούς, μια συγκέντρωση που παραμένει σταθερή και στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια (Σχήματα 8-10). Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει πως οι σπόροι παράγουν μέγιστη δυνατή ποσότητα λυκοπενίου από πρώιμα στάδια ωρίμανσης, διατηρώντας αυτή τη συγκέντρωση σταθερά χαμηλή κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.



**Σχήμα 11. Ποσοτικός προσδιορισμός λυκοπενίου στο ώριμο στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα)**

Σύγκριση των 3 ποικιλιών

Η ποικιλία που παρατηρείται να έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο στην επιδερμίδα είναι η HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry), γεγονός το οποίο υποστηρίζεται από μία πρόσφατη μελέτη όπου αποδείχθηκε ότι το λυκοπένιο ανάμεσα σε 40 ποικιλίες τομάτας ήταν υψηλότερο σε τύπους ντομάτας cherry (Kuti & Konuru 2005). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα μικρότερα φρούτα έχουν συνήθως υψηλότερη περιεκτικότητα σε ουσίες που βρίσκονται στην επιδερμίδα λόγω της μεγαλύτερης αναλογίας του φλοιού ως προς τον όγκο που μπορεί να ενισχύσει τα επίπεδα τους σε αναλογία φρούτου/kg. Η ποικιλία που παρατηρείται να έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λυκοπένιο στην σάρκα και τους σπόρους είναι η Brillante Fa 179. Στην ποικιλία Hellfrucht στα μέρη της σάρκας και των σπόρων παρατηρείται μια αισθητή διαφορά στην περιεκτικότητα του λυκοπενίου σε ποσοστά πολύ μικρότερα από ότι στις άλλες 2 ποικιλίες (HA34449 και Brillante Fa 179). (Σχήμα 11).

### **3.2 Έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ποικιλιών τομάτας σε διάφορους ιστούς της τομάτας**

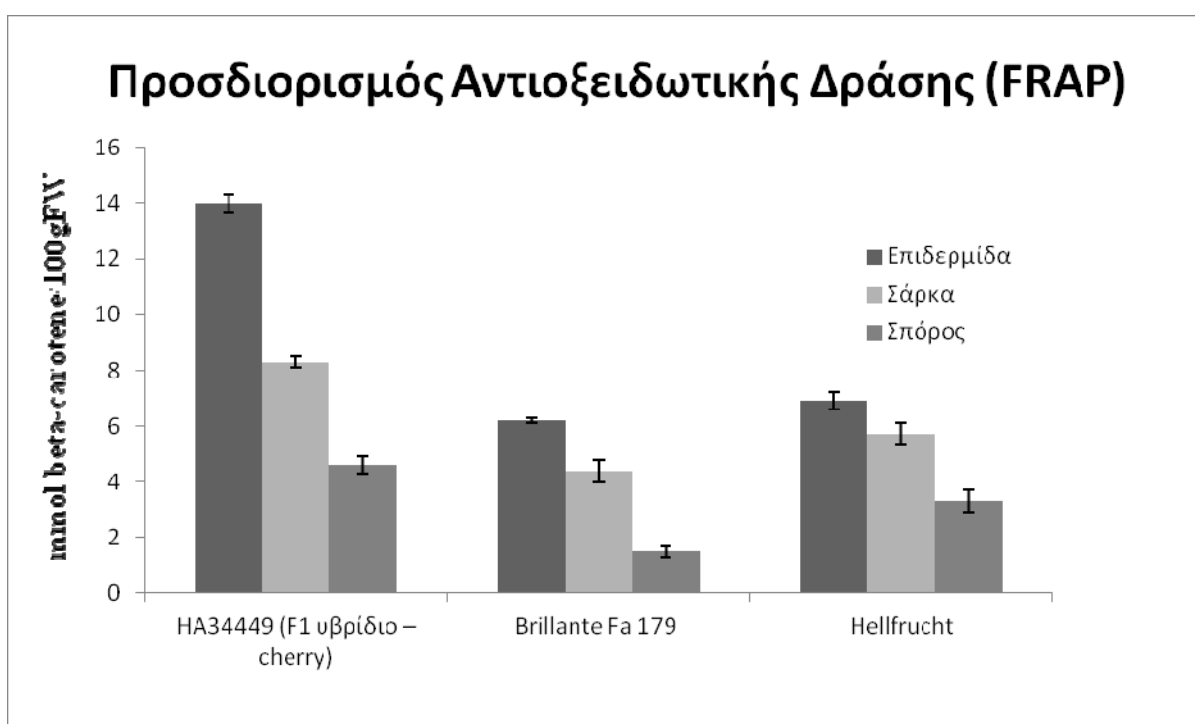
Μεταξύ των φυτοθερπτικών συστατικών με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα βρίσκονται τα καροτενοειδή (όπως το λυκοπένιο και το β-καροτένιο). Απαραίτητο κρίνεται να αξιολογηθούν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση ώστε να γνωρίζουμε τη διατροφική ποιότητα της τομάτας.

Ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των διαφόρων ποικιλιών τομάτας σε διάφορα μέρη της εξεταστηκε χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους, τη μέθοδο Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) και τη μέθοδο Ferric reducing ability of plasma (FRAP). Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

### 3.2.1 Αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο FRAP

Όπως αναφέραμε πιο πάνω η μέθοδος FRAP υπολογίζει τη συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα, βασιζόμενη στην αναγωγή του συμπλόκου  $Fe^{+3}$ -τριπυριδύλο-τριαζίνη ( $Fe^{+3}$ -TPTZ) στη δισθενή μορφή του σιδήρου.

Το κιτρινωπό χρώμα του αρχικού συμπλόκου μετατρέπεται σε μπλε και η μέγιστη απορρόφηση του μετράται στα 593 nm. Το αντιοξειδωτικό δίνει το υδρογόνο ώστε να πραγματοποιηθεί η αναγωγή.



**Σχήμα 12.** Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης στο ώριμο στάδιο στα τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα) με τη μέθοδο FRAP

Σύγκριση των 3 ποικιλιών

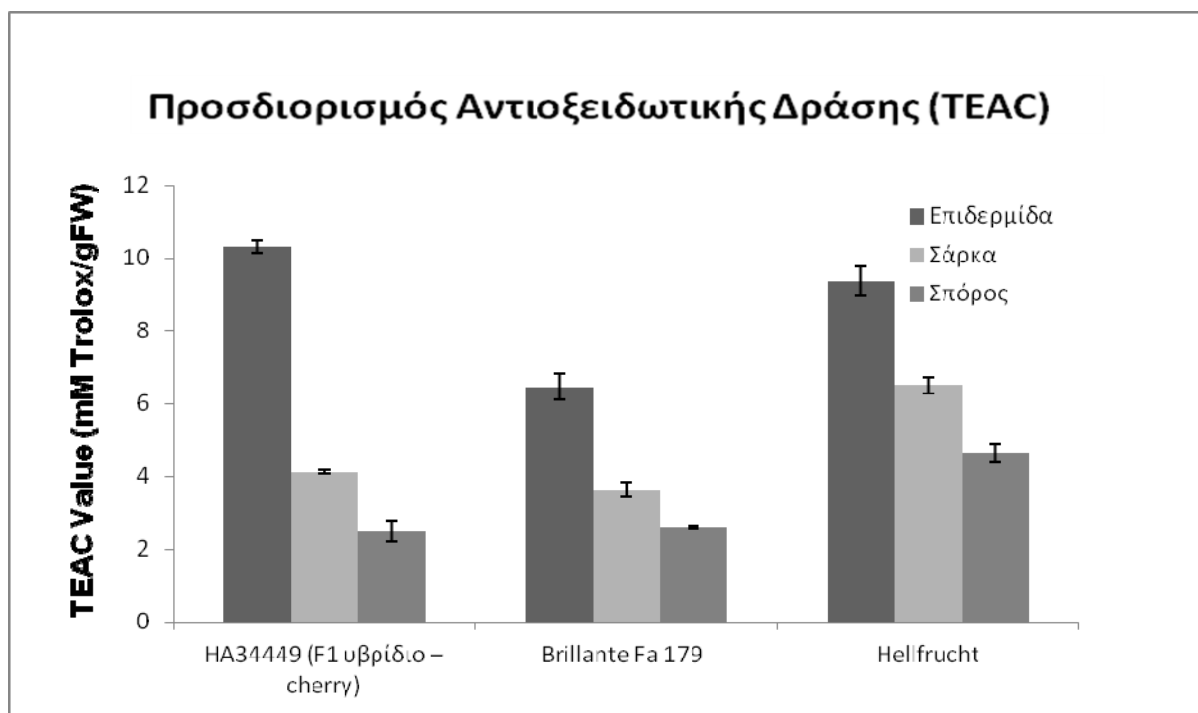
Αυτό που παρατηρούμε έπειτα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων που πήραμε από το φασματοφωτόμετρο και αφού έγινε η σύγκριση με τις τιμές της πρότυπης καμπύλης του β-καροτενίου είναι ότι η ποικιλία που έχει την μεγαλύτερη ποσότητα αντιοξειδωτικών ουσιών στην επιδερμίδα είναι η HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Η ποικιλία που παρατηρείται να έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ενώσεις στην σάρκα και τους σπόρους είναι και πάλι η HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Στην ποικιλία

Hellfrucht και στην ποικιλία Brillante Fa 179 παρατηρείται μια αισθητή διαφορά στην περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών σε ποσοστά πολύ μικρότερα από ότι στην ποικιλία HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Οι τιμές των δύο ποικιλιών αυτών παρατηρείται ότι είναι παραπλήσιες με ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά στην ποικιλία Brillante Fa 179 (Σχήμα 12).

### 3.2.2 Αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο TEAC

Όπως προαναφέρθηκε η ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox (TEAC) μετρά την αντιοξειδωτική ικανότητα μιας συγκεκριμένης ουσίας (του λυκοπενίου στην περίπτωση μας), σε σύγκριση με τη γνωστή πρότυπη ένωση, Trolox.

Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μετρήθηκε έπειτα σε φασματοφωτόμετρο στα 734nm και πήραμε τις παρακάτω ενδεικτικές τιμές (Σχήμα 6).



Σχήμα 13. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης στο ώριμο στάδιο στους τρεις ιστούς του καρπού (σπόροι, σάρκα και επιδερμίδα) με τη μέθοδο TEAC

Σύγκριση των 3 ποικιλιών

Παρατηρείται έπειτα από ανάλυση των αποτελεσμάτων ότι η ποικιλία με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα ποσοστού αντιοξειδωτικών ουσιών στην επιδερμίδα είναι η

HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Στην ποικιλία Hellfrucht και στην ποικιλία Brillante Fa 179 παρατηρείται διαφορά στην περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών σε ποσοστά μικρότερα από ότι στην ποικιλία HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry) όσον αφορά την επιδερμίδα. Η ποικιλία Brillante Fa 179 παρατηρείται και πάλι να έχει τα χαμηλότερα ποσοστά αντιοξειδωτικών ενώσεων ως σύνολο (Σχήμα 6). Και στις 3 ποικιλίες, η περιεκτικότητα αντιοξειδωτικών ουσιών σε σάρκα και σπόρους είναι πολύ λιγότερη από ότι στην επιδερμίδα. Οι σπόροι έχουν το μικρότερο ποσοστό αντιοξειδωτικών ουσιών ακολουθούμενη από την σάρκα και την επιδερμίδα, ένα μοτίβο που ισχύει και στις 3 ποικιλίες.

Η διαφορά της επιδερμίδας σε σχέση με σάρκα-σπόρους είναι πολύ μεγαλύτερη στην ποικιλία HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry), ακολουθούμενη από την Brillante Fa 179 και την Hellfrucht.

### **3.3 Απομόνωση RNA από διάφορες ποικιλίες τομάτας σε διάφορα στάδια ωρίμανσης**

Για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του λυκοπενίου, πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση RNA από όλες τις ποικιλίες και όλα τα στάδια ωρίμανσης. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του RNA (ng/μl) (ποσοτική ανάλυση) και έλεγχος της καθαρότητας του (ποιοτική ανάλυση), μπορεί να γίνει με τη χρήση της συσκευής Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer όπου ελέγχονται οι λόγοι A260/A280 και A260/A230.

**Πίνακας 4. Η συγκέντρωση του RNA (ng/μl) και οι λόγοι A260/A280 και A260/A230.**

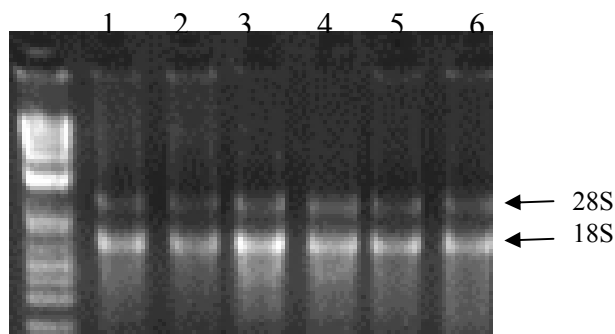
<b>Δείγμα</b>	<b>ng/ul</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>1</b>	336,51	2,11	1,24
<b>2</b>	276,64	2,14	0,92
<b>3</b>	156,78	2,08	0,98
<b>4</b>	160,05	2,12	1,33
<b>5</b>	162,01	2	0,86
<b>6</b>	193,19	2,1	0,96

Τα δείγματα 1-2 αντιπροσωπεύουν την επιδερμίδα της ποικιλίας HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry), 4-6 την σάρκα της ποικιλίας HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry) και 7-9 τους σπόρους της ποικιλίας HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Τα δείγματα 3-4 αντιπροσωπεύουν την σάρκα της Brillante Fa 179 και 5-6 τους σπόρους της ποικιλίας Brillante Fa 179.

Όπως προαναφέρθηκε αν ο λόγος A260/280 είναι μεταξύ 1,8-2, τότε το δείγμα RNA είναι καθαρό από προσμίξεις του μίγματος των νουκλεϊκών οξέων σε πρωτεΐνες. Στα δείγματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 παρατηρείται ότι ο λόγος όλων των δειγμάτων είναι πάνω από 2. Ένα καθαρό δείγμα του RNA θα πρέπει να αποδώσει επίσης μια τιμή περίπου 2,0 ιδανικά ή να είναι τουλάχιστο μεγαλύτερη από 1,7. Ωστόσο, σε αντίθεση με τον λόγο A260/A280 ο οποίος πραγματοποιείται κυρίως για να δούμε το ποσοστό προσμίξεων του RNA από τις πρωτεΐνες, ο λόγος A260/A230 υπόκειται σε μεγαλύτερες διακυμάνσεις, ανάλογα με τον παράγοντα πρόσμιξης επομένως καθαρό δείγμα θεωρείται αυτό που παίρνει τιμές κοντά στο 1-1,8. Στον Πίνακα 1 παρατηρείται ότι ο λόγος A260/A230 όλων των δειγμάτων είναι αρκετά ικανοποιητικός (κοντά στο 1) επομένως θεωρείται ότι η απομόνωση του λειτουργικού RNA ποιοτικά και ποσοτικά είναι ικανοποιητική.

Κρίσιμο σημείο για μια επιτυχημένη ανάλυση PCR και real time PCR είναι το μέγεθος, η ακεραιότητα και η καθαρότητα του RNA. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι εύκολο να αξιολογηθεί αρχικά με ανάλυση των λόγων A260/280 και A260/230 και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση της ακεραιότητας του RNA και της περιεκτικότητας σε προσμίξεις όπως DNA που φαίνεται στην ηλεκτροφόρηση, λόγω μεγαλύτερου μεγέθους (Σχήμα 5). Ωστόσο, η ανάλυση στην πηκτή απαιτεί ποσότητα 1μg του ολικού RNA. Όσο οι 18S και 28S rRNA ζώνες φθορίζουν έπειτα από την πρόσπτωση της UV ακτινοβολίας στις καθορισμένες ζώνες και δίνουν κορυφές χωρίς κηλίδες προς ένα μικρότερο μέγεθος, το δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτό για περαιτέρω ανάλυση (Σχήμα 5).

Στην πιο κάτω εικόνα φαίνεται ενδεικτικά το RNA που απομονώθηκε από συγκεκριμένα δείγματα και ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης.

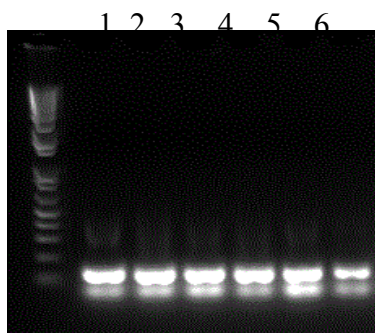


### **Εικόνα 8. Απομόνωση ολικού RNA από διάφορα μέρη του φυτού σε τρία αναπτυξιακά στάδια**

Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA σε πηκτή αгарόζης 1,5% (w/v) από δείγματα: επιδερμίδας ώριμου καρπού τομάτας (διαδρομές 1-2), σάρκας ώριμου (διαδρομές 3-4) και σπόρων ώριμου καρπού τομάτας (διαδρομές 5-6).

### **3.4 Έλεγχος και επιλογή λειτουργικών cDNA για έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των διαφόρων ποικιλιών**

Αφού έγινε η αντίδραση έτσι ώστε να δημιουργηθεί συμπληρωματικό DNA (cDNA) το οποίο επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για μετέπειτα αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR, τα προϊόντα της PCR με εκμαγείο cDNA αναλύθηκαν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Sambrook et al., 1989).



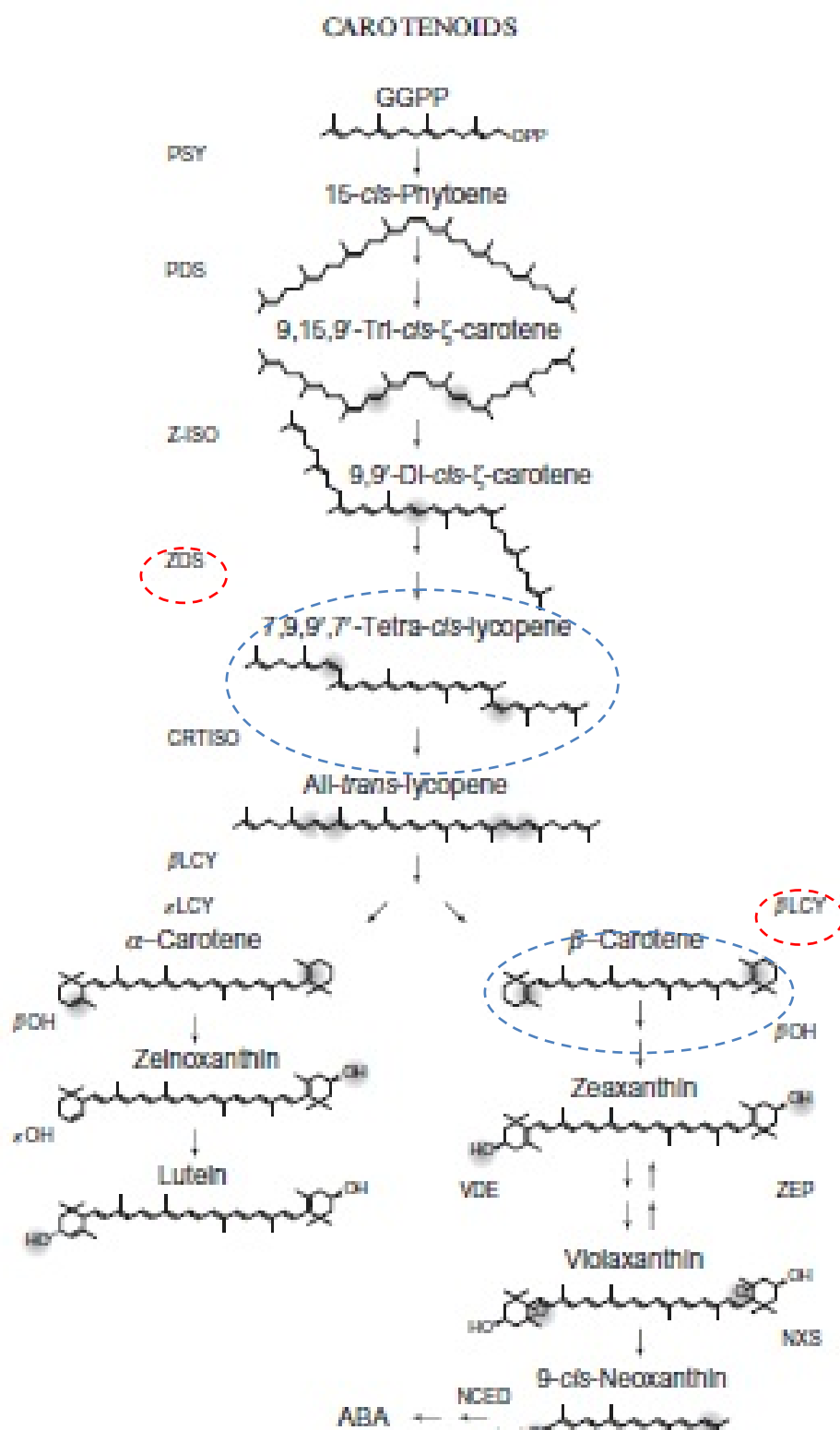
### **Εικόνα 9. Έλεγχος προϊόντων PCR του δομικού γονιδίου GAPD σε διάφορα μέρη του φυτού στα τρία αναπτυξιακά στάδια**

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR, με εκμαγείο cDNA σε πηκτή αгарόζης 1,5% (w/v) από δείγματα: σάρκα μεσοώριμης τομάτας Brillante Fa 179 (διαδρομή 1), επιδερμίδα ανώριμης τομάτας Brillante Fa 179 (διαδρομή 2), σάρκα ανώριμης τομάτας Brillante Fa 179 (διαδρομή 3), επιδερμίδα μεσοώριμης τομάτας Brillante Fa 179 (διαδρομή 4), σπόροι ανώριμης τομάτας Brillante Fa 179 (διαδρομή 5) και σπόροι μεσοώριμης τομάτας Brillante Fa 179 (διαδρομή 6).

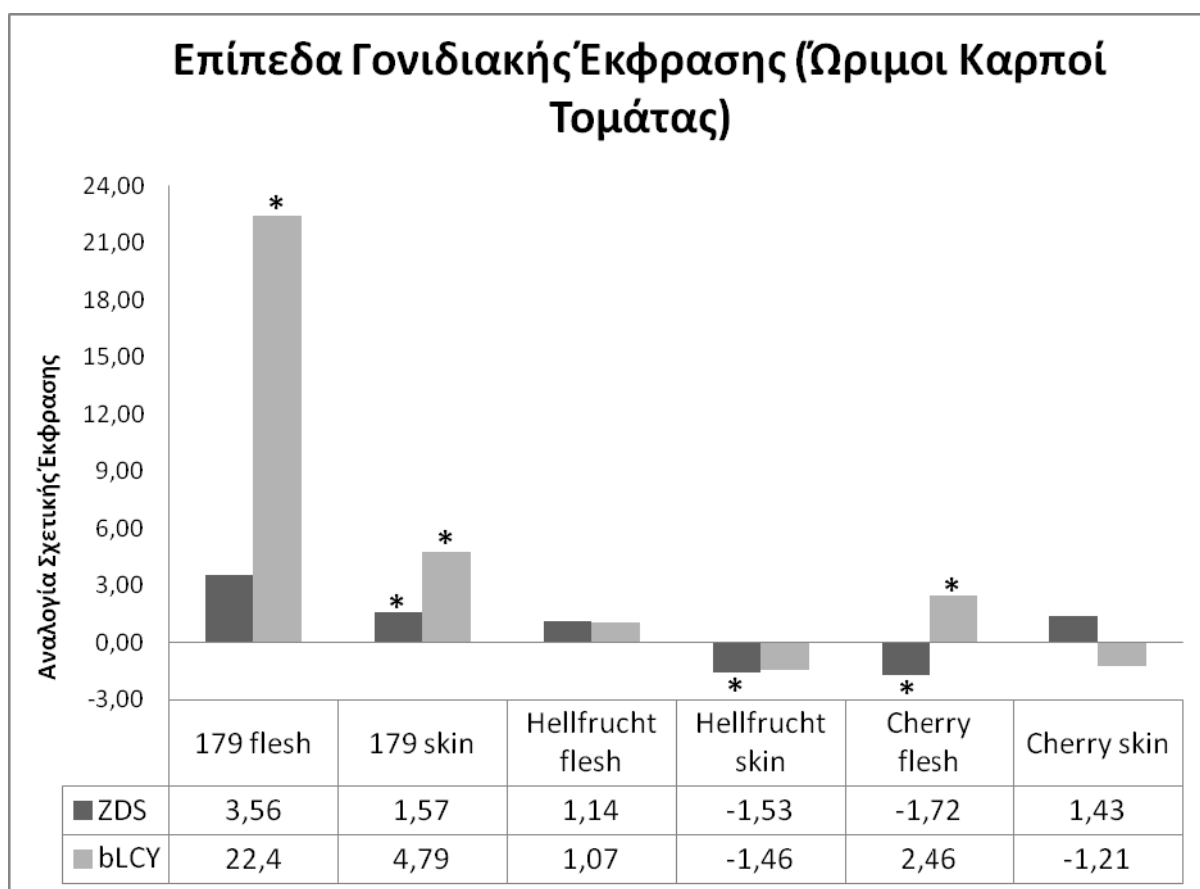
### **3.5 Έλεγχος των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης σημαντικών γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού του λυκοπενίου**

Τα επίπεδα έκφρασης 2 γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του λυκοπενίου (β-κυκλάση και ισομεράση β-καροτενίου) εξετάστηκαν με την ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Για κάθε γονίδιο

χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το δομικό γονίδιο αναφοράς *GAPD*.



**Εικόνα 10. Μονοπάτι βιοσύνθεσης των καροτενοειδών όπως απαντάται στα ανώτερα φυτά.**



Στο μονοπάτι παρουσιάζονται οι πρωτοβάθμιες αντιδράσεις που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά είδη (Cuttriss et al., 2011).

**Εικόνα 11. Επίπεδα σχετικής έκφρασης γονιδίων αντιοξειδωτικών ενζύμων.**

Τα επίπεδα των *SlZDS* και *SlbLCY* εκφράστηκαν με ανάλυση qRT-PCR σε ώριμους καρπούς τομάτας από τρεις εμπορεύσιμες ποικιλίες (Hellfrucht, Brillante Fa 179 και HA34449 F1 υβρίδιο – cherry) και από δύο διαφορετικούς ιστούς του φρούτου (σάρκα και επιδερμίδα). Τα δεδομένα αντιστοιχούν στο μέσο όρο ( $\pm$ τυπικό σφάλμα,  $n=3$ ). Τιμές που διαφέρουν από το μάρτυρα για επίπεδο σημαντικότητας  $P \leq 0.05$  εκφράζονται με \*.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, τα αποτελέσματα από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης για τα διάφορα γονίδια βιοσύνθεσης λυκοπενίου έδειξαν διαφορετική ρύθμιση ανάμεσα στις τρεις διαφορετικές ποικιλίες και τους δύο διαφορετικούς ιστούς.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι το γονίδιο *SlbLCY* επάγεται σε όλους τους ιστούς των ποικιλιών εκτός από την επιδερμίδα της ποικιλίας *Hellfrucht* και της ποικιλίας *Cherry* όπου παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων. Στη σάρκα της ποικιλίας 179 έχουμε το μεγαλύτερο ποσοστό επαγωγής. Για το γονίδιο *SlZDS* παρατηρείται επαγωγή σε όλους τους ιστούς των ποικιλιών εκτός από την επιδερμίδα της ποικιλίας *Hellfrucht* και τη σάρκα της ποικιλίας *Cherry* όπου παρατηρείται καταστολή του γονιδίου (Εικόνα 11).

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το λυκοπένιο αποτελεί το 60-74% των ολικών καροτενοειδών στις τομάτες αλλά και στα υποπροϊόντα της. Όπως προαναφέρθηκε, η ένωση αυτή μπορεί να υπάρχει υπό μορφή διαφορετικών ισομερών, αλλά η κυρίαρχη μορφή που βρέθηκε στις τομάτες και τα προϊόντα της (95% περίπου) είναι το ολικό *trans* λυκοπένιο. Είναι πολλοί οι παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα του λυκοπενίου, όπως η ωριμότητα, η ποικιλία και η θερμοκρασία κάτω από την οποία αναπτύσσεται ο καρπός (Valverde et al., 2002).

Σε αναλύσεις που έγιναν σε διάφορες μελέτες και πειράματα είχαν παρουσιαστεί τα εξής αποτελέσματα. Η περιεκτικότητα του λυκοπενίου κατά μέσο όρο σε καρπό καρπουζιού κυμαίνονταν στα 23.0–72.0 mg/g νωπού βάρους καρπού, σε κοκκινόσαρκο καρπό καβάφας 54.0mg/g νωπού βάρους καρπού, σε κοκκινόσαρκο γκρέιπφρουτ ήταν 33.6 mg/g νωπού βάρους καρπού, σε καρπό παπάγιας κυμαινόταν από 20.0-53.0 mg/g νωπού βάρους καρπού και σε καρπό βερίκοκου ήταν χαμηλότερο από 0,1 mg/g νωπού βάρους καρπού. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε επίσης ότι η περιεκτικότητα του λυκοπενίου κατά μέσο όρο σε καρπό τομάτας κυμαίνονταν στα 8.8–42.0 mg/g νωπού βάρους καρπού, σε μαγειρεμένη τομάτα 37.0 mg/g βάρους, σε σως τομάτας 62.0 mg/g βάρους, σε πάστα τομάτας 54.0–1500.0 mg/g βάρους, σε σούπα τομάτας 79.9 mg/g βάρους, σε τομάτα υπό τη μορφή σκόνης 1126.3–1264.9 mg/g βάρους, σε τοματοχυμό 50.0–116.0 mg/g βάρους, σε σος πίτσας 127,1 0 mg/g βάρους και τέλος σε κέτσαπ 99–134 mg/g βάρους (Rao et al., 2006).

Μέσω της διαδικασίας της ποσοτικοποίησης του λυκοπενίου παρατηρήθηκε ότι οι τομάτες όσο αναπτύσσονται από το ανώριμο πράσινο στάδιο στο ώριμο κόκκινο, αυξάνεται

και η περιεκτικότητα τους στο λυκοπένιο. Έτσι προχωρήσαμε σε έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ποικιλιών τομάτας εστιάζοντας στο κόκκινο – ώριμο στάδιο της τομάτας, μελετώντας διαφορετικά μέρη του ιστού του φρούτου (επιδερμίδα, σάρκα, σπόρος) στα οποία και παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις.

Σε όλα τα δείγματα τομάτας, έγινε η ανάλυση και μετρήθηκαν αντίστοιχα οι τιμές του λυκοπενίου για το ανώριμο, μεσοώριμο και ώριμο αναπτυξιακό στάδιο των σπόρων της σάρκα και της επιδερμίδας όπου και παρατηρήθηκε ότι το περιεχόμενο του λυκοπενίου στις ώριμες τομάτες έχει αισθητά υψηλότερες τιμές και στις 3 ποικιλίες που ελέγχθηκαν και συγκεκριμένα η μεγαλύτερη τιμή ανιχνεύθηκε στην επιδερμίδα της τομάτας. Πρώτη σε περιεκτικότητα λυκοπενίου φαίνεται να είναι η επιδερμίδα της ποικιλίας HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry) (Σχήμα 4.4). Αυτό πιστοποιήθηκε και σε πρόσφατη μελέτη στην οποία αποδείχθηκε ότι το λυκοπένιο ανάμεσα σε 40 ποικιλίες τομάτας ήταν υψηλότερο σε τύπους ντομάτας cherry (Kuti & Konuru 2005).

Το λυκοπένιο βρίσκεται μεταξύ των φυτοθεραπευτικών συστατικών με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στον καρπό της τομάτας (Rosales et al., 2010). Υπάρχουν όμως και άλλα στοιχεία με αντιοξειδωτική ικανότητα όπως είναι για παράδειγμα άλλα καροτενοειδή (β-καροτένιο) και το ασκορβικό οξύ, τα οποία είναι απαραίτητο να αναλυθούν ώστε να αξιολογηθεί η διατροφική ποιότητα της ντομάτας ως προς την αντιοξειδωτική της ικανότητα.

Η αντιοξειδωτική δράση των φρούτων τομάτας έχει εξεταστεί χρησιμοποιώντας δυο μεθόδους. Τη μέθοδο της Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) και τη μέθοδο της Ferric reducing ability of plasma (FRAP). Ανεξάρτητα από την επιλογή της μεθόδου, η κάθε ανάλυση της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε στο ώριμο στάδιο του φρούτου (σε επιδερμίδα, σάρκα και σπόρους) δείχνοντας ότι γενικά η υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα βρίσκεται στην επιδερμίδα του φρούτου (Σχήμα 4). Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Οι τιμές με βάση τις δύο μεθόδους (κατά μέσο όρο τριπλέτας) έχουν μία διακύμανση η οποία πιθανόν να οφείλεται κυρίως στις διαφορές της δραστηριότητας των υπολοίπων αντιοξειδωτικών ενώσεων που βρίσκονται στους διάφορους ιστούς.

Σε γενικές γραμμές, η αντιοξειδωτική δράση των φρούτων και λαχανικών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της αναλυτικής μεθόδου, των φυτικών

ποικιλιών, της γεωγραφικής τους προέλευσης αλλά και των περιβαλλοντικών συνθηκών στους οποίους αναπτύσσονται τα φρούτα (Valverde et al., 2002). Και οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη λειτουργούν σε γενικές γραμμές με βάση την ίδια ιδιότητα, δηλαδή την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, έτσι τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν είναι συγκρίσιμα. Δηλαδή και στις δύο αντιοξειδωτικές μεθόδους η υψηλότερη τιμή φαίνεται να είναι στην επιδερμίδα της ποικιλίας HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry), ενώ και στις τρεις περιπτώσεις των ποικιλιών παρατηρείται μείωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας όσο περνάμε από τα εξωτερικά στρώματα του καρπού προς τα εσωτερικά (Σχήμα 5 & Σχήμα 6). Χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ως σύνολο καρπού παρουσίασε η ποικιλία Brillante Fa 179(Σχήμα 5 & Σχήμα 6). Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι η συγκεκριμένη ποικιλία είναι η πλέον εμπορεύσιμη και χρησιμοποιούμενη από τους παραγωγούς, αφού ως υβρίδιο αναπτύχθηκε μέσω προγραμματών αναπαραγωγής που αναπτύχθηκαν με υψηλό δυναμικό απόδοσης ανά εκτάριο, μία ενιαία και ευχάριστη εμφάνιση, με ανοχή στις νόσους, και μεγάλη διάρκεια ζωής στο ράφι και στο σπίτι θέτοντας έτσι τη διατροφική της αξία σε δεύτερη μοίρα.

Η συσχέτιση μεταξύ των συνολικών αντιοξειδωτικών και του περιεχομένου του λυκοπενίου στις τομάτες που αναλύθηκαν δείχνει να είναι αρκετά σημαντική. Οι συγκεντρώσεις των μεμονωμένων ποσοτήτων του λυκοπενίου στη τομάτα μπορούν να καθοριστούν από πολλούς αγρονομικούς, γεωγραφικούς και εποχιακούς παράγοντες πέρα από τον παράγοντα ποικιλία (Rosales et al., 2010). Η κατανόηση της σχέσης μεταξύ των παραγόντων αυτών και της περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικές ενώσεις κρίνεται ως απαραίτητο εφόσον τα δυνητικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση τομάτας και των προϊόντων της, πρέπει να αξιοποιηθούν. Στην παρούσα μελέτη η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων τομάτας έδειξε σαφή διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών με πρώτη ποικιλία σε λυκοπένιο και συνολικά αντιοξειδωτικά να είναι η HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry). Ωστόσο, είναι προφανές από τη μελέτη αυτή ότι δεν υπάρχει μία ένωση ή μια ομάδα ενώσεων που να καθορίζει επαρκώς τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτικών ιστών και ότι μια πολύ-παραγοντική προσέγγιση κρίνεται ως απαραίτητη, δεδομένου ότι άλλα αντιοξειδωτικά θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στο φρέσκες ντομάτες θα μπορούσαν να παράγουν μια συνεργιστική επίδραση σχετικά με τη συνολική αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Αν και δεν υπάρχουν μεμονωμένες πληροφορίες σε σχέση με το περιεχόμενο των διαφόρων αντιοξειδωτικών ενώσεων (για παράδειγμα των φαινολικών ενώσεων) στους καρπούς της τομάτας που υποβάλλονται σε αυτή τη μελέτη, μπορεί να υποθεί ότι στην επιδερμίδα της τομάτας, η οποία ουσιαστικά είναι αυτή που εκτίθεται σε υψηλή ηλιακή ακτινοβολία, τα αντιοξειδωτικά βιοσυντίθενται γρήγορα ως ένας φυσιολογικός μηχανισμός αντίδρασης. Αυτό οφείλεται στο ότι μπορούν να απορροφούν το φως και να μειώσουν την οξειδωτική καταπόνηση που προκαλεί ο ήλιος στο φρούτο για να αποφευχθεί η ζημιά (Rosales et. al, 2011). Αυτό το φαινόμενο αποτελεί ένα μηχανισμό της φυσιολογικής απόκρισης σε αυτού του είδους την καταπόνηση, προσφέροντας όμως παράλληλα και θρεπτικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση αυτών των προϊόντων.

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δοκιμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των καρπών τομάτας όπως είναι η μέθοδος της FRAP, της TEAC και της DPPH (Rosales et. al, 2011). Στην μελέτη αυτή επιλέγηκαν δύο μέθοδοι οι οποίες δείχνουν την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε αυτό το πείραμα, παρατηρήσαμε ότι οι δυο αναλύσεις αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήσαμε (FRAP και TEAC) παρουσίασαν παρόμοια μοτίβα ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα, καταγράφοντας τις υψηλότερες τιμές στην επιδερμίδα του φρούτου όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Επιπλέον πέραν του παράγοντα ποικιλία, βιβλιογραφικά μπορούμε να πούμε επίσης ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν οι καρποί που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της περιόδου με υψηλότερη θερμοκρασία και ηλιακή ακτινοβολία λόγω της αύξησης σε άλλων παραμέτρων, όπως οι ολικές φαινόλες, τα φλαβονοειδή και το ασκορβικό οξύ (Rosales et al., 2011).

Ακολούθησε μελέτη των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων ενζύμων του βιοσυνθετικού μονοπατιού του λυκοπενίου. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *SIZDS* και *SibLCY* στην επιδερμίδα και τη σάρκα ώριμων καρπών τομάτας. Στην ποικιλία Brillante Fa 179 παρατηρείται επαγωγή του γονιδίου *SIZDS* στην επιδερμίδα και τη σάρκα το οποίο συμμετέχει στη βιοσύνθεση του λυκοπενίου (βλέπε Εικόνα 11). Παράλληλα, επισημάνεται αύξηση στατιστικώς σημαντική της έκφρασης του γονιδίου *SibLCY* τόσο στην επιδερμίδα όσο και στη σάρκα όπου παρουσιάζονται τα υψηλότερα επίπεδα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να δικαιολογήσει τα χαμηλά επίπεδα λυκοπενίου που παρατηρούνται στη συγκεκριμένη ποικιλία, αφού το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το ένζυμο που αποικοδομεί το λυκοπένιο σε β-καροτένιο, αποτέλεσμα όμως το

οποίο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Όσον αφορά την ποικιλία Hellfrucht παρατηρείται επαγωγή και των δύο γονιδίων στη σάρκα, ενώ αντίθετα στην επιδερμίδα παρουσιάζεται παρόμοιων επιπέδων καταστολή. Το αποτέλεσμα αυτό δεν συσχετίζεται με τη συγκέντρωση λυκοπενίου που παρατηρήθηκε κατά την ποσοτικοποίηση, με την επιδερμίδα να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση λυκοπενίου από τη σάρκα. Πιθανόν η γονιδιακή ρύθμιση να μην γίνεται μόνο σε μεταγραφικό επίπεδο αλλά να υπεισέρχεται ρύθμιση σε μεταφραστικό και κυρίως σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, κάτι που χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση.

Ενδιαφέρον αποτέλεσμα αποτελεί το γεγονός ότι στην ποικιλία HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry) στη σάρκα παρατηρείται καταστολή του γονιδίου *SIZDS* και επαγωγή του γονιδίου *SibLCY*. Αντιθέτως στην επιδερμίδα παρατηρείται επαγωγή του γονιδίου *SIZDS* και καταστολή του γονιδίου *SibLCY*. Συσχετίζοντας αυτό το αποτέλεσμα με την ποσοτικοποίηση λυκοπενίου, η μεγαλύτερη συγκέντρωση λυκοπενίου στην επιδερμίδα συγκριτικά με την σάρκα οφείλεται στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης και ενδεχομένως στην αύξηση της ποσότητας αλλά και δραστηριότητας βιοσυνθετικών ενζύμων του λυκοπενίου. Επιπρόσθετα η καταστολή του *SibLCY* που παρατηρείται στην επιδερμίδα, σε αντίθεση με την έκφραση των γονιδίων αυτών στη σάρκα δείχνει και πάλι την έντονη συσσώρευση του λυκοπενίου αφού δεν αποικοδομείται από το αντίστοιχο ένζυμο.

Συμπερασματικά, ο εντοπισμός του λυκοπενίου στην ώριμη τομάτα σε μεγάλες ποσότητες και η ανάλυση της περιεκτικότητάς του σε διάφορους ιστούς της συγκρίνοντας διάφορες ποικιλίες έδειξε αισθητά υψηλότερες τιμές λυκοπενίου στις ώριμες τομάτες και συγκεκριμένα στην επιδερμίδα της τομάτας. Οι παρατηρήσεις αυτές έδωσαν το έναυσμα στο να μελετήσουμε την περαιτέρω δράση του ως αντιοξειδωτικό, εστιάζοντας στις ώριμες κόκκινες τομάτες. Η αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και στις τρεις ποικιλίες όσο περνάμε από τα εξωτερικά στρώματα του καρπού προς τα εσωτερικά σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης του λυκοπενίου δείχνει τη σημασία του λυκοπενίου ως αντιοξειδωτικό έναντι των υπολοίπων. Προχωρώντας στη διαλεύκανση της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης των ενζύμων στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του λυκοπενίου μελετήθηκαν 2 ένζυμα η β-κυκλάση και η ισομεράση του β-καροτενίου. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν αρχή μελλοντικών στόχων όπως το να γίνει έλεγχος και σε άλλες εμπορεύσιμες ποικιλίες τομάτας και κατόπιν να συνδυαστούν τα αποτελέσματα με πειράματα μελέτης της ενζυμικής δραστηριότητας βασικών ενζύμων του βιοσυνθετικού μονοπατιού και πειράματα ανοσοαποτύπωσης με εξειδικευμένα αντισώματα για ποσοτικό προσδιορισμό των

αντίστοιχων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι αυτό αλλά και τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης τους σε μεταγραφικό, μεταφραστικό αλλά και μετα-μεταφραστικό επίπεδο.

Η διατροφική εισήγηση που προτείνουμε είναι να καταναλώνονται όσο το δυνατό πιο κόκκινες-ώριμες τομάτες, να αποφεύγονται αποφλοιωμένες τομάτες (λόγω της μέγιστης ποσότητας στον φλοιό) και οι καρποί να προέρχονται από κερασόμορφες ποικιλίες (όπως για παράδειγμα HA34449 (F1 υβρίδιο – cherry)) οι οποίες έχουν μεγαλύτερη αναλογία φλοιού κατ' όγκο. Έτσι θα υπάρχει έντονη μείωση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό και κατά συνέπεια θα αποφεύγονται τα διάφορα προβλήματα υγείας.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Agarwal, S., & Rao V. A. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Or its Licensors*, 163(6), 739-44.
- Benzie, F. F. I., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, D., Avellini, C., Bianchi, S., Blot, W. (1989). A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *International Journal of Cancer*, 44(4), 611-616. doi:10.1002/ijc.2910440409
- Burney, P., Comstock, G., & Morris, J. (1989). Serologic precursors of cancer: Serum micronutrients and the subsequent risk of pancreatic cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49(5), 895-900.
- Cox, S.E., Stushnoff, C., and Sampson, D.A. (2003). Relationship of fruit color and light exposure to lycopene content and antioxidant properties of tomato. *Can. J. Plant Sci*, 83, 913-919.

Cuttriss J. A., Cazzonelli, I. C., Wurtzel, T. E., and Pogson J. B. (2011). Carotenoids. *Advances in Botanical Research*, 58. doi: 10.1016/B978-0-12-386479-6.00005-6

De Mesquita, H. B. B., Maisonneuve, P., Runia, S., & Moerman, C. J. (1991). Intake of foods and nutrients and cancer of the exocrine pancreas: A population-based case-control study in the netherlands. *International Journal of Cancer*, 48(4), 540-549.  
doi:10.1002/ijc.2910480411

Dorais, M., Ehret, D. L., & Papadopoulos, A. P. (2008). Tomato (*solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 231-250.  
doi:10.1007/s11101-007-9085-x

Foolad, R.M., & Panthee, R.D., (2012). Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 93–123. doi:0.1080/07352689.2011.616057

Franceschi, S., Bidoli, E., Vecchia, C. L., Talamini, R., D'Avanzo, B., & Negri, E. (1994). Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *International Journal of Cancer*, 59(2), 181-184.  
doi:10.1002/ijc.2910590207

Franceschi, S., Favero, A., La Vecchia, C., Negri, E., Conti, E., Montella, M., . . . Decarli, A. (1997). Food groups and risk of colorectal cancer in italy. *International Journal of Cancer*, 72(1), 56-61. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970703)72:1<56::AID-IJC8>3.0.CO;2-3

Ilahy, R., Hdider, C., Lenucci, S.M., Tlili, I., and Dalessandro, G. (2011). Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars, *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 588–595. doi:10.1016/j.jfca.2010.11.003

Gautier, H., Rocci, A., Buret, M., Grasselly, D., Dumas, Y., and Causse, M., (2005). Effect of photoselective filters on the physical and chemical traits of vine-ripened tomato fruits. *Can. J. Plant Sci*, 85, 439–446

- Giovanucci, E. (2005). Tomato products, lycopene, and prostate cancer: A review of the epidemiological literature. *The Journal of Nutrition*, 135(8), 2030S-2031S
- Giovanucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 217-331
- Giovanucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1995). Intake of carotenoids and retino in relation to risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(23), 1767-1776. doi:10.1093/jnci/87.23.1767
- Key T.J.A. , Silcocks P.B., Davey G.K., Appleby P.N., Bishop D.T. (1997). A case-control study of diet and prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 76(5), 678-678-687.
- La Vecchia, C., Negri, E., Decarli, A., D'Avanzo, B., & Franceschi, S. (1987). A case-control study of diet and gastric cancer in northern italy. *International Journal of Cancer*, 40(4), 484-489. doi:10.1002/ijc.2910400409
- Le Marchand, L., Hankin, J. H., Kolonel, L. N., Beecher, G. R., Wilkens, L. R., & Zhao, L. P. (1993). Intake of specific carotenoids and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2(3), 183-187.
- Luthria, L. D., Mukhopadhyay, S., and Krizek, T. D. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 771-777. doi:10.1016/j.jfca.2006.04.005
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323-330. doi:10.1002/jsfa.1035

Nagata, M., & Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and Carotenoids in tomato fruit. *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol. (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, 39(10), 925-928.

Nomura, A. M., Ziegler, R. G., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., & Craft, N. E. (1997). Serum micronutrients and upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 6(6), 407-412.

Okajima, E., Ozono, S., Endo, T., Majima, T., Tsutsumi, M., Fukuda, T., Konishi, Y. (1997). Chemopreventive efficacy of piroxicam administered alone or in combination with lycopene and  $\beta$ -carotene on the development of rat urinary bladder carcinoma after A N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine treatment. *Cancer Science*, 88(6), 543-552.  
doi:10.1111/j.1349-7006.1997.tb00417.x

Nagata, M., & Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruits. *J. Japan Soc. Food Sci. Technol. (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, 39(10), 925-928

Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Hammar, S. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 334(18), 1150-1155.  
doi:10.1056/NEJM199605023341802

Pfaffl, M.W, Horgan, G.W, Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res*, 30, e36.

Podsedeck, A., Sosnowska, D., and Anders, B. (2003). Antioxidative capacity of tomato products. *Eur Food Res Technol*, 217, 296–300. doi:10.1007/s00217-003-0751-y

- Ramón, J. M., Serra, L., Cerdó, C., & Oromí, J. (1993). Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain. *Cancer*, *71*(5), 1731-1735. doi:10.1002/1097-0142(19930301)71:5<1731::AID-CNCR2820710505>3.0.CO;2-X
- Rao, A. V., & Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research*, *19*(2), 305-323. doi:10.1016/S0271-5317(98)00193-6
- Rao, A. V., Ray, M.R., & Rao, L.G. (2006). Lycopene. *Adv Food Nutrition Research*, *51*, 99-164.
- Ried, K., & Fakler, P. (2011). Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas*, *68*(4), 299-310. doi:10.1016/j.maturitas.2010.11.018
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., and Hirschberg J. (2000). An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *PNAS*, *97*, 11102-11107
- Rosales, A.M., Cervilla, M.L., Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Blasco, B., Rios, J.J., Soriano, T., Castilla, N., Romeroa, L., and Ruiza, M.J. (2010). The effect of environmental conditions on nutritional quality of cherry tomato fruits: evaluation of two experimental Mediterranean greenhouses. *J Sci Food Agric*, *91*, 152-162. doi:10.1002/jsfa.4166
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., . . . Giuliano, G. (2000). Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal*, *24*(3), 413-420. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00880.x
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NewYork;1989.

Van Eenwyk, J., Davis, F. G., & Bowen, P. E. (1991). Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer*, 48(1), 34-38.

doi:10.1002/ijc.2910480107

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. (1992). The Polymerase Chain Reaction in "Recombinant DNA" (2nd edittion), *Scientific American Books, New York*, 79-85

Wojdyło, A., Oszmianski, J., and Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Elsevier*, doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.038

Βελίτσος, Κ., 2009. Προσδιορισμός και συσχέτιση ολικών φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ελληνικούς καφέδες της ελληνικής αγοράς. *Πτυχιακή διατριβή. Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων.*

Λυμπεράκη, Ε., Ελευθερίου, Φ., Μακρή, Σ., Πέτρου, Χ. (2010). Προσδιορισμός επιπέδων αντιοξειδωτικών ουσιών στο αίμα μετά από πλούσια σε αντιοξειδωτικά διατροφή. Ερευνητική εργασία, *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης*, 28(1), 57-62.

Ολύμπιος, Μ. Χ. (2001). *Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια*. Αθήνα: Σταμούλης, 39-209