

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΒΟΡΙΚΟ ΟΞΥ
ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ
ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ (*OLEA EUROPAEA* L.)
ΣΧΕΣΗ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ Ή ΑΠΛΗ ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ;**

ΑΚΥΛΑΣ ΦΡΑΓΓΕΛΑΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**Φαινολικά συστατικά και βορικό οξύ στο κυτταρικό τοίχωμα
φύλλων ελιάς (*Olea europaea* L.)**

Σχέση συνδεδεμένων μορίων ή απλή συνύπαρξη;

ΑΚΥΛΑΣ ΦΡΑΓΓΕΛΑΚΗΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής (Μέλος)

Γεώργιος Λιακόπουλος, Λέκτορας (Μέλος)

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	5
Πρόλογος	7
Εισαγωγή	9
I. Ανόργανη διατροφή των ανώτερων φυτών	9
I.1. Βασικές αρχές.....	9
I.2. Πρόσληψη και διακίνηση των ανόργανων στοιχείων.....	10
I.3. Τροφοπενίες ανόργανων στοιχείων	10
II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών	12
II.1. Πρόσληψη και διακίνηση του βορίου	13
II.2. Φυσιολογικοί ρόλοι του βορίου.....	13
II.3. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού, ιστού και κυττάρου.....	15
II.4. Κατανομή βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα	16
III. Τα φαινολικά συστατικά των ανώτερων φυτών	16
III.1. Δομή φαινολικών συστατικών	16
III.2. Ρόλοι των φαινολικών συστατικών στα ανώτερα φυτά	18
III.3. Σχέση μεταξύ φαινολικών συστατικών και κυτταρικού τοιχώματος	18
Σκοπός της εργασίας	21
Υλικά και Μέθοδοι	23
I. Φασματοσκοπικές μελέτες της δημιουργία συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών με ή χωρίς την παρουσία βορονικών οξέων	23
II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα.....	24
II.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας.....	24
II.2. Δειγματοληψίες	24
II.3. Απομόνωση και χειρισμοί των κυτταρικών τοιχωμάτων.....	24
II.4. Επώαση κυτταρικών τοιχωμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία βορονικών οξέων	25
II.5. Χρωματογραφική ανάλυση των μορίων που ελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα.....	25
Αποτελέσματα	27
I. Φασματοσκοπικές μελέτες της δημιουργία συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών με ή χωρίς την παρουσία βορονικών οξέων	27
II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα.....	33
II.1. Χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων από διάφορους ιστούς και ανταλλάξιμα μόρια μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλβορονικό οξύ	33
II.2. Απελευθέρωση μορίων μετά από επώαση με βορονικό οξύ	34
Συζήτηση	39
Βιβλιογραφία	43

Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με αφορμή την ολοκλήρωσή της, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γιώργος Καραμπουρνιώτη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την διάρκεια της εργασίας και τις ουσιαστικές συμβουλές του σε όλα τα στάδια της μελέτης μέχρι την ολοκλήρωσή της.

Στο μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπουράνη θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την συμμετοχή του στην επιτροπή καθώς και για την διόρθωση της μελέτης μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την ουσιαστική του καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας αλλά και για την υπομονή και την στήριξη του σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Επίσης ευχαριστώ τον Διδάκτορα, επιστημονικό μέλος του εργαστηρίου Δημοσθένη Νικολόπουλο για την βοήθεια που μου παρείχε όποτε την χρειάστηκα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Κωνσταντίνο Κεσόγλου για την πολύτιμη βοήθειά του και για την από κοινού εκτέλεση ορισμένων πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ πάρα πολύ την οικογένειά μου για την αγάπη, την ηθική και οικονομική υποστήριξη καθώς και την συμπαράσταση που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

Εισαγωγή

I. Ανόργανη διατροφή των ανώτερων φυτών

Η ομαλή και επαρκής τροφοδοσία των φυτών με τα απαραίτητα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία καθορίζει την ποσότητα και ποιότητα των γεωργικών προϊόντων. Επιπρόσθετα, σοβαρές ελλείψεις σε ένα ή περισσότερα από αυτά μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς έως και την επιβίωση των φυτών. Για τους παραπάνω λόγους, η μελέτη της ανόργανης διατροφής των φυτών αποτελεί σημαντικό μέρος της γεωργικής έρευνας.

Το σύνολο των θρεπτικών στοιχείων του φυτικού σώματος αντιστοιχεί στο 10% της ξηρής βιομάζας, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από νερό. Ωστόσο, όλα τα ανόργανα στοιχεία δεν αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για το φυτό καθώς μπορούν να προσληφθούν από αυτό όταν βρίσκονται σε αφθονία στο περιβάλλον ανάπτυξής του. Απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία θεωρούνται όσα εξασφαλίζουν την ομαλή ανάπτυξη του φυτού και συμμετέχουν στον φυτικό μεταβολισμό. Σύμφωνα με τους Arnon and Stout (1939), για να θεωρηθεί ένα στοιχείο απαραίτητο, πρέπει να πληρεί τις παρακάτω τρεις βασικές προϋποθέσεις:

-
- α) Το φυτό να μην μπορεί να αναπτυχθεί και να συμπληρώσει το βιολογικό του κύκλο χωρίς την παρουσία του στοιχείου αυτού,
 - β) το στοιχείο να μην μπορεί να αντικατασταθεί από άλλο στοιχείο και
 - γ) το στοιχείο να συμμετέχει στη σύνθεση της ξηρής ουσίας και η δράση του να είναι άμεση.

Τα θρεπτικά στοιχεία που εκπληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις και θεωρούνται απαραίτητα για τη θρέψη των φυτών είναι 16: Άνθρακας(C), υδρογόνο(H), οξυγόνο(O), άζωτο(N), φώσφορος(P), κάλιο(K), ασβέστιο(Ca), μαγνήσιο(Mg), θείο(S), σίδηρος(Fe), μαγγάνιο(Mn), ψευδάργυρος(Zn), χαλκός(Cu), μολυβδαίνιο(Mo), βόριο(B) και χλώριο(Cl). Τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία ανάλογα με τις σχετικές ποσότητες που απαιτούνται στα φυτά, χωρίζονται σε δύο ομάδες: α) τα μακροστοιχεία και β) τα ιχνοστοιχεία ή μικροστοιχεία. Τέλος ταξινομούνται ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, σε μεταλλικά (όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, μαγγάνιο, ψευδάργυρος, χαλκός, κ.α.) και σε αμέταλλα θρεπτικά στοιχεία (άζωτο, θείο, φώσφορος, χλώριο, κ.α.). Νεώτεροι τρόποι ταξινόμησης λαμβάνουν υπόψη τους τον φυσιολογικό ρόλο κάθε στοιχείου στο φυτό.

I.1. Βασικές αρχές

Τα μακροστοιχεία συμμετέχουν στην κατασκευή του φυτικού σώματος και στη δομή του μορίου των μεταβολικών προϊόντων, λαμβάνουν μέρος σε ενεργειακές

Εισαγωγή

μετατροπές και σχετίζονται με την ρύθμιση ωσμωτικών παραμέτρων. Ο άνθρακας, το οξυγόνο και το υδρογόνο αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών και αποτελούν το 94% της ξηρής ουσίας των φυτών. Εκτός όμως από τον δομικό τους ρόλο, εξασφαλίζουν και την απαιτούμενη μεταβολική ενέργεια μέσω της οξειδωτικής διάσπασης των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών κατά τη διάρκεια της αναπνοής.

Η κατάταξη των θρεπτικών στοιχείων με βάση το ρόλο τους έχει ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία, ωστόσο παρουσιάζει δυσκολίες διότι ορισμένα τουλάχιστον, από αυτά έχουν ταυτόχρονα και δομικό και λειτουργικό ρόλο. Το ασβέστιο για παράδειγμα, αποτελεί σημαντικό δομικό συστατικό του δικτύου των πηκτινικών πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ ταυτόχρονα δρα ως παράγοντας μεταγωγής κυτταρικών σημάτων μέσω του συστήματος καλμοντουλίνης-ασβεστίου. Άλλα στοιχεία, όπως το μαγνήσιο, συμμετέχουν στην δομή μορίων αλλά συμβάλλουν και στην ενεργότητα ενζυμικών συστημάτων.

1.2. Πρόσληψη και διακίνηση των ανόργανων στοιχείων

Η πρόσληψη των ιόντων είναι εντονότερη στην περιοχή κοντά στο κορυφαίο μερίστωμα της ρίζας ενώ μειώνεται δραματικά κατά μήκος του άξονα. Η πρόσληψη ενός ιόντος προϋποθέτει την κίνησή του από το εδαφικό διάλυμα προς τα διάφορα σημεία του φυτικού σώματος (αρχικά στο υπόγειο και στη συνέχεια στο υπέργειο μέρος του). Η πορεία αυτή περιλαμβάνει απορρόφηση από τους επιφανειακούς ιστούς της ρίζας και μετακίνηση κατά μήκος των εσωτερικών ιστών της ρίζας έως τα αγγεία του ξύλου. Η απορρόφηση πραγματοποιείται είτε μέσω παθητικής μεταφοράς είτε μέσω ενεργού απορρόφησης. Στη συνέχεια, η πορεία των ιόντων, δια μέσου του φλοιώδους παρεγχύματος, προς τον κεντρικό κύλινδρο μπορεί να ακολουθήσει δύο εναλλακτικές οδούς:

α) Διάχυση στον ελεύθερο χώρο της ρίζας, δηλαδή παθητική κίνηση των ιόντων μέσω του αποπλαστικού χώρου. Η μη μεταβολική αυτή κίνηση των ιόντων, γνωστή ως αποπλαστική κίνηση, πραγματοποιείται χωρίς τη συμβολή του κυτταροπλάσματος και αφορά σε κίνηση διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεσοκυττάρων χώρων και παρουσιάζει, συνεπώς, τη μικρότερη αντίσταση.

β) Κίνηση διαμέσου του κυτταροπλάσματος και από κύτταρο σε κύτταρο, δια μέσου των πλασμοδεσμών. Η διαδρομή αυτή αποτελεί την συμπλαστική οδό η οποία παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη αντίσταση.

1.3. Τροφοπενίες ανόργανων στοιχείων

Η ελάχιστη απαίτηση για την παρουσία κάποιου θρεπτικού στοιχείου σε ένα φυτό ορίζεται ως οριακή συγκέντρωση. Όταν η συγκέντρωση στο φυτικό ιστό βρίσκεται κάτω από την κρίσιμη αυτή τιμή θεωρείται ανεπαρκής και περιορίζει την αύξηση

του φυτού ενώ έντονη έλλειψη μπορεί να απειλήσει την επιβίωσή του. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε λόγω χαμηλής συγκέντρωσής του στο εδαφικό διάλυμα είτε λόγω αδυναμίας απορρόφησης του εξαιτίας ανισορροπιών μεταξύ των στοιχείων, ακραίων τιμών pH, κ.λπ. Όταν η συγκέντρωση του στοιχείου είναι υψηλότερη της οριακής, και έως ενός ανώτερου ορίου, συμβάλλει στην παραγωγικότητα του φυτού. Η υπέρβαση του ορίου αυτού οδηγεί σε ανάσχεση της ανάπτυξης λόγω τοξικών φαινομένων.

Οι φυσιολογικές διαταραχές, όπως η δυσλειτουργία ενζυμικών συστημάτων ή η απώλεια της δομής και λειτουργικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεμβρανών (Taiz and Zeiger, 1998), που εμφανίζει ένα φυτό λόγω έλλειψης ενός ή περισσότερων απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων συνιστούν παθολογικές καταστάσεις που είναι γνωστές ως τροφοπενίες. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων τροφοπενίας είναι δυνατόν να εμφανιστεί με τη μορφή συνδρόμου λόγω της αλληλεπίδρασης των θρεπτικών στοιχείων μεταξύ τους, σε συνδυασμό με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Οι τροφοπενίες συνοδεύονται από την εμφάνιση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων στα διάφορα όργανα (φύλλα, μεριστώματα, καρπούς κ.λ.π.), τα οποία αίρονται με τη χορήγηση του υπό έλλειψη θρεπτικού στοιχείου (Δροσόπουλος, 1992).

Για την αντιμετώπιση της μερικής έλλειψης ενός ή περισσότερων στοιχείων τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς αποφυγής και ανθεκτικότητας που λειτουργούν είτε στο επίπεδο της προσαρμογής είτε στο επίπεδο του εγκλιματισμού. Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα από την εμφάνιση της έλλειψης έως την εμφάνιση του εγκλιματισμού του φυτού είναι η αντίληψη, η μεταγωγή σήματος και η απάντηση. Κατά το στάδιο της αντίληψης τα φυτικά κύτταρα αντιλαμβάνονται τις μεταβλητές του θρεπτικού περιβάλλοντος μέσω αλλαγής των ιδιοτήτων εξειδικευμένων μορίων-δεκτών. Το στάδιο της μεταγωγής αφορά σε όλα τα γεγονότα που μεσολαβούν από την αντίληψη του ερεθίσματος έως την εμφάνιση της απάντησης, δηλαδή περιλαμβάνει μεταβολές τόσο στην έκφραση γονιδίων όσο και στο μεταβολικό επίπεδο. Στο τελικό στάδιο εμφανίζεται η απάντηση του φυτικού οργανισμού με τη μορφή εγκλιματισμού στις εκάστοτε συνθήκες θρέψης.

Υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, εκτός από τις γενικές μεταβολικές αντιδράσεις, τα φυτά αντιδρούν στην καταπόνηση αναπτύσσοντας και διατηρώντας υψηλές συγκεντρώσεις ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών με συγκεκριμένες ιδιότητες (Dixon and Paiva, 1995; Koricheva et al., 1998). Η πλέον χαρακτηριστική αντίδραση του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι η συσσώρευση αρωματικών δευτερογενών μεταβολιτών.

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να συνθέτουν μια πληθώρα φαινολικών συστατικών που συμμετέχουν σε σημαντικές οικοφυσιολογικές λειτουργίες, όπως

Εισαγωγή

αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και του βιοτικού ή αβιοτικού περιβάλλοντος (Harborne, 1988; Seigler, 1998). Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων συχνά αυξάνει τις συγκεντρώσεις των φαινολικών στους φυτικούς ιστούς είτε με συσσώρευση τους στις υπάρχουσες 'δεξαμενές' είτε επιδρώντας απευθείας στις μεταβολικές διαδικασίες που οδηγούν σε *de novo* σύνθεση μορίων (Tan, 1980; Gerschenzon, 1984; Brown et al., 1984; Chishaki and Horiguchi, 1997; Herms and Mattson, 1992). Σε πολλά φυτά ένα σημαντικό μέρος της δεξαμενής των φαινολικών συστατικών εκκρίνεται στη φυλλική επιφάνεια από εξειδικευμένους ιστούς (είτε εκκριτικούς αδένες είτε αδενώδεις τρίχες), με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εμπλουτισμένου πολύπλοκου μείγματος δευτερογενών μεταβολιτών, αποτελούμενο κυρίως από τερπενοειδή, άγλυκα φλαβονοειδή και απλά φαινολικά (Wollenweber and Dietz, 1981; Wagner, 1991; Gibson, 1996; Fahn, 2000). Η εμφάνιση φαινολικών συστατικών (και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών) σε αυτά τα μείγματα σχετίζεται με την άμυνα έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Kelsey et al., 1984; Karamanoli, 2002). Η μεταφορά δευτερογενών μεταβολιτών, μέσω έκπλυσης ή αποδόμησης οργανικών φυτικών υλικών, στο έδαφος σχετίζεται με την εμφάνιση αλληλοπαθητικής δράσης, αναστέλλοντας ή διεγείροντας την ανάπτυξη των γειτονικών φυτών (Inderjit and Duke, 2003).

II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών

Το βόριο είναι ένα απαραίτητο μικροστοιχείο, το οποίο απαιτείται για την ανάπτυξη όλων των ανώτερων φυτών και ορισμένων ειδών θαλάσσιων φυκών, διατόμων και κυανοβακτηρίων. Σύμφωνα με πρόσφατες ενδείξεις, το βόριο είναι απαραίτητο για ορισμένα είδη ζώων και τουλάχιστον επωφελές για τον άνθρωπο (Nielsen, 2000). Το βόριο απαντάται στα βιολογικά συστήματα με τη μορφή βορικού οξέος. Η διισταμένη μορφή του είναι το τετραϋδρόξυ-βορικό ανιόν. Αυτές οι δύο μορφές είναι και οι μοναδικές που απαντώνται στα φυτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στο κυτταρόπλασμα η επικρατούσα μορφή του βορικού οξέος είναι το αδιάστατο μόριο κατά περίπου 98%, ενώ λιγότερο από το 2% ανιχνεύεται ως βορικό ανιόν. Στον αποπλαστικό χώρο τα ποσοστά αυτά παρουσιάζονται ελαφρώς τροποποιημένα (99,95 και 0,05% περίπου) λόγω των χαμηλότερων τιμών pH (Woods, 1996; Brown et al., 2002). Το βόριο διακρίνεται σε δύο κλάσματα, το υδατοδιαλυτό και το αδιάλυτο στο νερό κλάσμα. Το υδατοδιαλυτό κλάσμα αντιπροσωπεύει το βόριο του συμπλάστη ενώ το αδιάλυτο το βόριο των κυτταρικών τοιχωμάτων. Το βορικό οξύ έχει την δυνατότητα να σχηματίζει τόσο μόνο- όσο και δι εστερικά σύμπλοκα. Έτσι μπορεί να συμπλοκοποιήσει σημαντικά μόρια του κυτταρικού περιβάλλοντος, όπως σάκχαρα και παράγωγά τους (σακχαροαλκοόλες και ουρονικά οξέα), υδροξυοξέα, γλυκοπρωτεΐνες και ορισμένα ορθο-διφαινολικά συστατικά (όπως το

καφεϊκό και το υδροξυφερουλικό οξύ), τα οποία εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα (Power and Woods, 1997; Dembitsky et al., 2002).

II.1. Πρόσληψη και διακίνηση του βορίου

Το βόριο απαντά σε τέσσερις μορφές στο έδαφος: ως συστατικό διαφόρων ορυκτών, προσροφημένο στις επιφάνειες των αργίλλων και των ένυδρων οξειδίων του σιδήρου και αργιλίου, ως συστατικό της οργανικής ύλης και ως ελεύθερο βορικό οξύ στο εδαφικό διάλυμα. Το αδιάστατο βορικό οξύ αποτελεί την κύρια μορφή στο εδαφικό διάλυμα και ταυτόχρονα τη βασική μορφή με την οποία το βόριο απορροφάται από τις ρίζες, σε τιμές του pH από 5 έως 9 (Δροσόπουλος, 1992). Σε pH ανώτερα του 7 έως 8 το βορικό οξύ προσλαμβάνει υδροξύλια από το νερό και σχηματίζει το βορικό ανιόν $[B(OH)_3 + 2H_2O \leftrightarrow B(OH)_4^- + H_3O^+]$. Το εδαφικό pH επηρεάζει σημαντικά τη διαθεσιμότητα του βορίου. Κατά συνέπεια, σε αλκαλικά εδάφη με εδαφικό pH υψηλότερο του 6,3 – 6,5 και με υψηλή περιεκτικότητα αργίλου παρατηρείται σημαντική μείωση της διαθεσιμότητας του βορίου και πρόσληψής του από τα φυτά, λόγω προσρόφησης του σχηματιζόμενου βορικού ανιόντος $B(OH)_4^-$.

Η είσοδος του βορίου εντός των φυτικών κυττάρων επιτελείται μέσω παθητικής και ενεργού μεταφοράς (Dordas et al., 2000; Raven 1980; Dannel et al., 2002; Takano et al., 2002). Στην πρώτη περίπτωση, η οποία επικρατεί υπό συνθήκες υψηλής διαθεσιμότητας βορίου από το έδαφος, οι ανάγκες των φυτών μπορούν να ικανοποιηθούν, δεδομένης της ύπαρξης ικανού διαπνευστικού ρεύματος (Δροσόπουλος, 1998). Η μεταφορά του βορίου από τις ρίζες στα φύλλα γίνεται δια μέσου των αγγείων του ξύλου (Raven, 1980) και σχετίζεται στενά όχι μόνο με τη μαζική ροή του νερού προς την επιφάνεια των ριζών, αλλά και με τη ροή εντός των αγγείων του ξύλου (Δροσόπουλος, 1992). Στην περίπτωση όπου η διαθεσιμότητα του εδαφικού βορίου είναι χαμηλή, η απορρόφηση του βορίου σε ποσότητες ικανές να καλύψουν τις ανάγκες των φυτικών οργανισμών στηρίζεται σε μηχανισμούς ενεργού μεταφοράς. Οι τελευταίοι επάγονται από χαμηλές συγκεντρώσεις βορίου στο εδαφικό διάλυμα και εδράζονται είτε στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας είτε στα σημεία φόρτωσης του ανιόντος χυμού των ξυλωδών αγγείων (Dannel et al., 2002, Dannel et al., 1997, Pfeffer et al., 1999; Takano et al., 2002; Stavrianakou et al., 2006).

II.2. Φυσιολογικοί ρόλοι του βορίου

Το βόριο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών. Η έλλειψη βορίου περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών και κυρίως κατά την περίοδο έκπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων (Blevins and Lukaszewski, 1998; Brown et al., 2002). Μερική έλλειψη βορίου έχει ως

Εισαγωγή

αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικρόσωμων φυτών με λιγότερα φύλλα, συνήθως παχύτερα και μικρότερα σε επιφάνεια (Stavrianakou et al., 2005). Σε φυτά με χαμηλή κινητικότητα του στοιχείου τα πρώτα όργανα που επηρεάζονται είναι τα νεότερα φύλλα, τα οποία αποχρωματίζονται και ξηραίνονται, καθώς και τα κορυφαία μεριστώματα των βλαστών και τα ακραία μεριστώματα του ριζικού συστήματος, τα οποία νεκρώνονται. Στα ώριμα φύλλα εμφανίζεται χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται χλώρωση των κορυφαίων τμημάτων του ελάσματος. Επίσης, παρατηρείται πτώση ανθέων και αναπτυσσόμενων καρπών, ενώ σε πολλά λαχανοκομικά φυτά εμφανίζονται νεκρωμένες κορυφές και σκουρόχρωμες ή μελανόχρωμες εστίες στο βραχυγονατωμένο βλαστό (Δροσόπουλος, 1998).

Επίσης το βόριο συμμετέχει στη δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων. Είναι τεκμηριωμένο ότι η ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση την επάρκεια βορίου και ότι η έλλειψη του στοιχείου έχει επίπτωση στη δομή και στις μηχανικές του ιδιότητες (Loomis and Durst, 1992; Brown and Hu, 1997; Matoh, 1997; Fleischer et al., 1999; O'Neill et al., 2001).

Το βόριο σχετίζεται τόσο με τη δομική όσο και τη λειτουργική ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Blevins and Lukaszewski, 1998). Η τροφопενία βορίου αλλάζει την περατότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών (Robertson and Loughman, 1974; Pollard et al., 1977; Wang et al., 1999; Alpaslan and Gunes, 2001), επηρεάζει τη ροή ιόντων μέσω της δραστηριότητας των μεμβρανικών αντλιών πρωτονίων (Ferrol et al., 1993; Obermeyer et al., 1996) και της δραστηριότητας άλλων μεμβρανικών ενζύμων (Goldbach et al., 1990; Lawrence et al., 1995; Cara et al., 2002). Άλλες άμεσες επιδράσεις αφορούν στην αλλαγή των ιδιοτήτων του κυτταροσκελετού (Bassil et al., 2004), τη μεταφορά δομικών υλικών του κυτταρικού τοιχώματος (Yu et al., 2002) και την αλλαγή στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου της μεμβράνης και του αποπλαστικού χώρου (Muhling et al., 1998). Ο ρόλος του βορίου στη λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητά του να σχηματίζει σύμπλοκα με συστατικά των μεμβρανών με δομή *cis*-διόλης, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Η πρόσδεση του βορίου σε πολυυδροξυλομάδες των μεμβρανών διεγείρει την ενεργότητα της προσδεμένης στη μεμβράνη ΑΤΡάσης και έτσι διατηρείται η δομική ακεραιότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και ο έλεγχος της διαπερατότητάς τους (Cakmak et al., 1995; Ferrol et al., 1993; Goldbach et al., 1990; Pollard et al., 1977; Roldan et al., 1992; Tang and Della Fuente, 1986). Ωστόσο, άμεσες πειραματικές αποδείξεις για τον παραπάνω ρόλο του βορίου δεν έχουν έως σήμερα εμφανιστεί.

Η τροφοπενία βορίου στα ανώτερα φυτά προκαλεί ποικίλα και πολλές φορές αντίθετα αποτελέσματα ως συνέπεια εκτεταμένων μεταβολικών αλλαγών. Λόγω της ιδιότητάς του να σχηματίζει σύμπλοκα κυμαινόμενης σταθερότητας με διαφορετικά υποστρώματα, ένζυμα και μεμβρανικά συστατικά, έχουν κατά καιρούς διατυπωθεί πολλές υποθέσεις σύμφωνα με τις οποίες το βόριο εμπλέκεται σε πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες. Αυτές περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ενζύμων και το μεταβολισμό των υδατανθράκων, του RNA, του ινδολυλοξεικού οξέος (IAA), των φαινολικών συστατικών και του αναπνευστικού μεταβολισμού (Loomis and Durst, 1992; Δροσόπουλος, 1998). Υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, η συγκέντρωση των αυξινών είναι συχνά πολύ υψηλότερη από τη φυσιολογική, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συμπτώματα της έλλειψης βορίου οφείλονται στην αυξημένη στάθμη ορισμένων ορμονών (Δροσόπουλος, 1992).

Το βόριο δεν εμπλέκεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική λειτουργία (Blevins and Lukaszewski, 1998; Dell and Huang, 1997). Ωστόσο, η τροφοπενία βορίου προκαλεί ορισμένες δευτερογενείς επιδράσεις στη φωτοσύνθεση. Σε αυτές περιλαμβάνεται η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φύλλων, η αυξημένη αγωγιμότητα των στοματίων, η μεταβολή της κατάστασης των φωτοσυνθετικών χρωστικών, η αποδιοργάνωση των θυλακοειδών μεμβρανών του χλωροπλάστη και η αυξημένη ευαισθησία στη φωτοπαρεμπόδιση (Cakmak et al., 1995; Kastori et al., 1995; Dell and Huang, 1997; El-Shintinawy, 1999).

II.3. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού, ιστού και κυττάρου

Τα αποθέματα του στοιχείου κατανέμονται σε μεγάλο ποσοστό στα κυτταρικά τοιχώματα, ειδικά στα δίκτυλα φυτά (Hu and Brown, 1994; Matoh et al., 1992). Τα μονοκότυλα αγρωστώδη φυτά, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα περιεχόμενα σε πηκτίνη, χαρακτηρίζονται και από χαμηλότερες απαιτήσεις σε βόριο συγκριτικά με τα δίκτυλα και τα μη αγρωστώδη μονοκότυλα φυτικά είδη ανεξαρτήτως του θρεπτικού καθεστώτος (Hu et al., 1996). Το βόριο πιστεύεται πως κατανέμεται σχετικά ομοιόμορφα μεταξύ υποκυτταρικών διαμερισμάτων, κυρίως κυτταροπλάσματος και χυμοτοπίου (Thellier et al., 1979; Dannel et al., 2002). Ωστόσο, τα έως σήμερα στοιχεία για την υποκυτταρική κατανομή του βορίου παραμένουν εξαιρετικά περιορισμένα.

Η κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτικού σώματος επηρεάζεται έντονα από το βαθμό της κινητικότητας του βορικού οξέος στον ηθμό, καθώς η τελευταία παράμετρος σχετίζεται με τη δυνατότητα επαναδιανομής του στοιχείου. Εάν η κινητικότητα του βορίου είναι χαμηλή, αναμένεται αύξηση των συγκεντρώσεων με την ηλικία του οργάνου. Αντίθετα, σε φυτά με υψηλή κινητικότητα του βορίου, τα αποθέματα των ώριμων οργάνων είναι διαθέσιμα προς επαναδιανομή σε σημεία του φυτού με υψηλές απαιτήσεις, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις του στοιχείου

Εισαγωγή

να είναι υψηλότερες στα νέα όργανα συγκριτικά με τα ωριμότερα, ειδικά υπό καθεστώς έλλειψης του στοιχείου στο έδαφος.

II.4. Κατανομή βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα

Σχετικά πρόσφατα (Kaneko et al., 1996; Kobayashi et al., 1996; O'Neill et al., 2004) βρέθηκε ότι το βόριο συμμετέχει στη δομή της πηκτίνης του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα περιέχει ελάχιστη πηκτίνη). Επόμενες εργασίες αποσαφήνισαν ότι το βορικό οξύ λειτουργεί ως συνδετικό μόριο μεταξύ των αλυσίδων ραμνογαλακτουρονάνης II (RG-II) της πηκτίνης και συγκεκριμένα μεταξύ των υπολειμμάτων της απιόζης των πηκτινικών αλυσίδων (O'Neill et al., 1996) και ότι απουσία των παραπάνω διαδεσμών, λόγω έλλειψης βορίου, έχει δραματικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών (O'Neill et al., 2001).

Η RG-II είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους δομικό πολυμερές του πηκτινικού κλάσματος, το οποίο εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των αναπτυσσόμενων φυτικών κυττάρων (O'Neill et al., 1991; O'Neill et al., 1996). Η RG-II έχει απομονωθεί από τα κυτταρικά τοιχώματα δικότυλων (Darvill et al., 1978; Kobayashi et al., 1996), μονοκότυλων (Thomas et al., 1989; Stevenson et al., 1988) και ενός γυμνόσπερμου φυτικού είδους (Thomas et al., 1987), ενώ απαντάται και στο κόκκινο κρασί (Doco and Brillouet, 1993). Αποτελεί το μοναδικό έως σήμερα πολυσακχαρίτη ο οποίος περιέχει βόριο και ο οποίος έχει απομονωθεί από βιολογική πηγή (Kobayashi et al., 1996; Matoh et al., 1993; Ishii and Matsunaga, 1996). Η δομή της RG-II είναι σταθερή ανεξαρτήτως του φυτού από το οποίο έχει απομονωθεί. Κατά το σχηματισμό των διαδεσμών με το βορικό οξύ, δύο μόρια μονομερούς RG-II σχηματίζουν σύμπλοκο με ένα μόριο βορικού οξέος (Kobayashi et al., 1996, εικόνα 2).

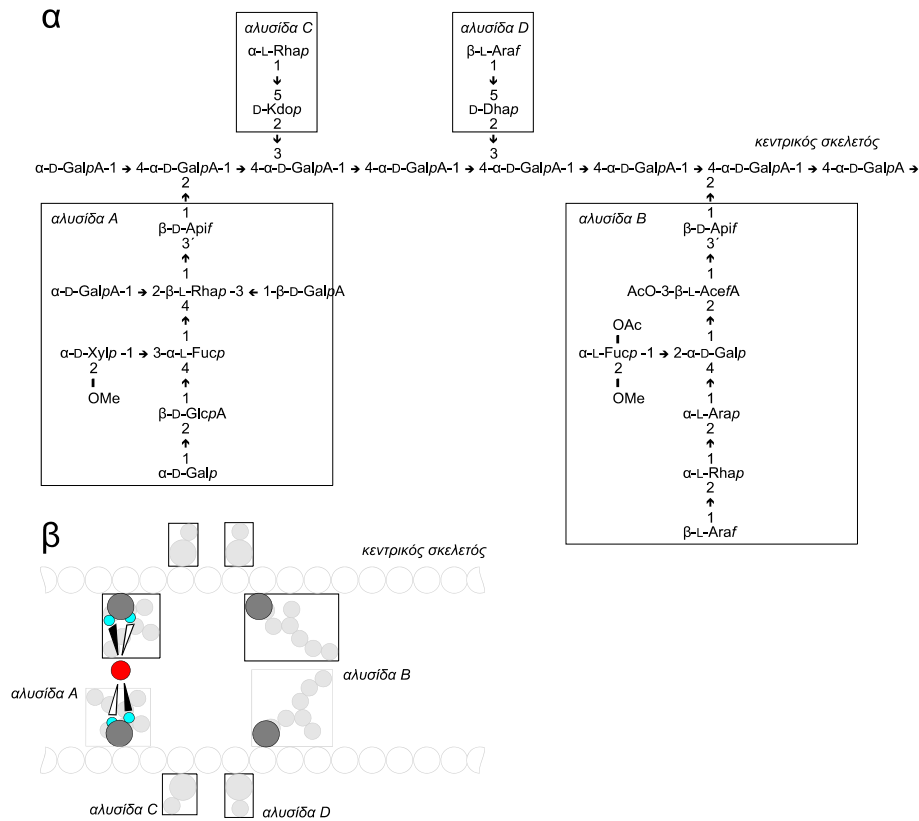
Οι διαδεσμοί που δημιουργεί το βόριο με πηκτινικά πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος είναι πολύ σημαντικοί γιατί συμβάλλουν στην ελαστικότητα και την δομική ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων διαμορφώνοντας έτσι τα μηχανικά τους χαρακτηριστικά.

III. Τα φαινολικά συστατικά των ανώτερων φυτών

Τα φαινολικά συστατικά θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντική τάξη δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών βάσει της διάδοσής τους, της ποικιλίας των δομών και του πλήθους των φυσιολογικών ρόλων που επιτελούν.

III.1. Δομή φαινολικών συστατικών

Τα φαινολικά συστατικά προέρχονται από το σινναμικό οξύ το οποίο αποτελεί το προϊόν της απαμίνωσης της φαινυλαλανίνης, βήμα το οποίο θεωρείται ως η



Εικόνα 1. Μερική δομή της ραμνογαλακτουρονάνης-II. **(α)** Ο κεντρικός σκελετός της RG-II αποτελείται από μονάδες α-D-γαλακτοσυλο-πυρανοσυλ-ουρονικού οξέος (GalpA) στο οποίο ενώνονται τέσσερις πλάγιες αλυσίδες ολιγοσακχαριτών (A-D). Η A-αλυσίδα ενώνεται στον κεντρικό σκελετό με μια μονάδα β-D-απιουσυλ-φουρανοζίτη (Arif). Οι ομάδες Arif της A-αλυσίδας συμμετέχουν ανά δύο στο σχηματισμό του συμπλόκου RG-II-B-RG-II **(β)** Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι γλυκοφουρανόζες δημιουργούν τα σταθερότερα διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ στη συγκεκριμένη δομή, η απιόζη αποτελεί το μόνο γλυκοφουρανοζίτη με ελεύθερες γειτονικές υδροξυλομάδες με cis-διαμόρφωση. Άλλες συντηρήσεις: AcefA, 3-C-καβροξυ-5-δεοξυ-L-ξυλοφουρανοζίτης; Araf, αραβινο-φουρανοζίτης; Arap, αραβινο-πυρανοζίτης; Dhap, 3-δεοξυ-D-λυξο-επτοουλο-πυρανοσυλ-αρικό οξύ; Fucp, φουκο-πυρανοζίτης; Galp, γαλακτο-πυρανοζίτης; GlcpA, γλυκο-πυρανοσυλ-ουρονικό οξύ; Kdor, 3-δεοξυ-D-μαννο-οκτουλο-πυρανοσυλονικό οξύ; 2-O-MeFucp, 2-O-μεθυλο-φουκο-πυρανοζίτης; 2-O-MeXylp, 2-O-μεθυλο-ξυλο-πυρανοζίτης; Rhap, ραμνο-πυρανοζίτης; OAc, O-ακετύλιο.

μετάβαση από τον πρωτογενή προς τον δευτερογενή μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων στα φυτά (Dixon et al., 1992). Μια βασική κατηγορία φαινολικών συστατικών, τα φαινυλοπροπανοειδή με σκελετό C6-C3, παράγονται μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης και αφυδάτωσης. Κύριοι εκπρόσωποι των φαινυλοπροπανοειδών είναι το φερουλικό, το p-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ. Παράγωγα των φαινυλοπροπανοειδών είναι αρκετά απλούστερα φαινολικά συστατικά, από το μόριο των οποίων λείπει η πλάγια αλυσίδα των τριών

Εισαγωγή

ατόμων άνθρακα, όπως το σαλικυλικό και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Dixon and Paiva, 1995). Από τον συνδυασμό του σιναμικού και του μαλονικού οξέος (το οποίο προέρχεται από το ομώνυμο βιοσυνθετικό μονοπάτι) προκύπτουν τα φλαβονοειδή με σκελετό C6-C3-C6 (Shirley, 1996).

III.2. Ρόλοι των φαινολικών συστατικών στα ανώτερα φυτά

Οι ρόλοι των φαινολικών συστατικών επικεντρώνονται κυρίως στις σχέσεις των φυτών με το περιβάλλον, τόσο με την αβιοτική όσο και την βιοτική του συνιστώσα. Δεν είναι υπερβολή να αναφερθεί ότι οι ρόλοι των φαινολικών είναι σχεδόν τόσο όσοι και οι παράγοντες του περιβάλλοντος οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών. Τα απλά φαινολικά και τα φαινυλοπροπανοειδή αποτελούν πρόδρομα μόρια για τα φλαβονοειδή και τα δομικά φαινολικά συστατικά (π.χ. λιγνίνη, σουβερίνη, κ.α.) και σχετίζονται έτσι με την μηχανική και αμυντική ενδυνάμωση των φυτικών ιστών (Dixon and Paiva, 1995; Boudet, 1998). Προσφέρουν επίσης προστασία έναντι της υπεριώδους (Shirley, 1996) και ορατής ακτινοβολίας (Steyn et al., 2002) καθώς και προστασία έναντι παθογόνων (Phillips and Karulnik, 1995) και φυτοφάγων (Harborne and Williams, 2000). Επιπλέον, τα φλαβονοειδή εμπλέκονται σε οικολογικές σχέσεις φυτών με άλλους οργανισμούς μέσω της εγκαθίδρυσης συμβιωτικών σχέσεων με μικρόβια (Phillips and Karulnik, 1995; Harborne and Williams, 2000), μέσω της αλληλοπάθειας (Inderjit, 2003) αλλά και μέσω της προσέλκυσης επικονιαστών (Forkmann, 1991).

III.3. Σχέση μεταξύ φαινολικών συστατικών και κυτταρικού τοιχώματος

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών περιλαμβάνει φαινολικά συστατικά με διάφορες δομές και τρόπο σύνδεσης. Κυρίαρχο φαινολικό συστατικό του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος ορισμένων κυτταρικών τύπων είναι η λιγνίνη. Πρόκειται για φαινολικό πολυμερές, το πλέον άφθονο πολυμερές στα φυτά μετά την κυτταρίνη, το οποίο παράγεται από την συνένωση φαινοξυ-ριζών που έπεται της ενζυμικής ή μη ενζυμικής οξειδωση τριών μονολιγνολών, της p-κουφερυλαλκοόλης, της κονιφερυλαλκοόλης και της σιναφυλαλκοόλης (Boudet, 1998). Εκτός από την λιγνίνη, στο κυτταρικό τοίχωμα απαντούν φαινυλοπροπανοειδή με κυρίαρχα τα p-κουμαρικό και φερουλικό οξύ τα οποία προσδένονται εστερικά σε υδατανθρακικά υπολείμματα της πηκτίνης όπως η γαλακτόζη και η αραβινόζη (Levigne et al., 2004). Ιδιαίτερα το φερουλικό οξύ μπορεί, μέσω οξειδωτικής διασύνδεσης να σχηματίζει ομοδιμερές μεταξύ δύο πηκτινικών αλυσίδων. Η δημιουργία τέτοιων διαδεσμών είναι ιδιαίτερα παρούσα στα αγρωστώδη μονοκότυλα και συμβάλει στην μηχανική ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος (Ishii, 1997). Ανάλογα με την πηγή του φυτικού υλικού, φαινολικά συστατικά προσδένονται και μέσω αιθερικών δεσμών με συστατικά του κυτταρικού

τοιχώματος (Lozonaya et al., 1999). Επίσης, στο κυτταρικό τοίχωμα ορισμένων φυτικών ειδών εναποτίθενται φλαβονοειδή. Παρόλο που η φύση της πρόσδεσής τους δεν είναι γνωστή, φαίνεται πως προσδένονται ομοιοπολικά πιθανώς σε υδατάνθρακες ή πρωτεΐνες του τοιχώματος καθώς δεν είναι άμεσα απομονώσιμα με τις συνήθεις τεχνικές εκχύλισης (Markham et al., 2000).

Σκοπός της εργασίας

Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει ότι η επίδραση του βορονικού οξέος 3-NBA, το οποίο διασπά εκλεκτικά τους διεστερικούς δεσμούς του βορικού οξέος με διάφορους υποκαταστάτες, σε δίσκους φύλλων ελιάς προκαλεί αύξηση του κυτταρικού βορικού οξέος υποδηλώνοντας ότι βορικό οξύ, το οποίο έχει προηγουμένως εναποτεθεί σε κάποια κυτταρική δομή, ελευθερώνεται στο κυτταρικό περιβάλλον (Τσαγκαράκη, 2007). Επειδή το κύριο μέρος του βορίου στα φυτικά κύτταρα απαντάται στο κυτταρικό τοίχωμα (Hu et al., 1996), η κυτταρική αυτή δομή είναι πιθανότατα υπεύθυνη για την παραπάνω αύξηση. Ωστόσο, το γεγονός αυτό από μόνο του δεν συνεπάγεται την ύπαρξη συμπλόκων του βορικού οξέος με φαινορικά συστατικά στο κυτταρικό τοίχωμα καθώς είναι ήδη γνωστή η ύπαρξη συμπλόκων του βορικού οξέος με το πηκτινικό πολυμερές ραμνογαλακτουρονάνη II *in muro* (O'Neill et al., 2001). Μάλιστα το μεγαλύτερο μέρος του βορικού οξέος που ελευθερώνεται αναμένεται να προκύπτει από τα παραπάνω σύμπλοκα.

Έχει δειχθεί ότι, υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, η περιεκτικότητα του κυτταρικού τοιχώματος σε εστεροποιημένα προσδεδεμένα φαινορικά μειώνεται (Κλουβάτου 2006; Τσαγκαράκη 2007). Μια πιθανή εξήγηση για την μείωση αυτή θα ήταν η απευθείας συμμετοχή του βορικού οξέος στην δημιουργία διεστερικών συμπλόκων με φαινορικά συστατικά στο τοίχωμα. Έτσι, η μείωση της συγκέντρωσης του βορίου στο κυτταρικό περιβάλλον, ως αποτέλεσμα της τροφοπενίας, αναμένεται να παρεμποδίζει το σχηματισμό των παραπάνω συμπλόκων στο τοίχωμα και να οδηγεί στην παρατηρούμενη μείωση της περιεκτικότητας του σε φαινορικά. Ένα επιπλέον αποτέλεσμα που συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης τέτοιων συμπλόκων είναι η μείωση της περιεκτικότητας του τοιχώματος σε φαινορικά μετά την επίδραση του 3-NBA σε δίσκους φύλλων (Τσαγκαράκη, 2007) η οποία είναι ανάλογη αυτής που σημειώνεται υπό συνθήκες τροφοπενίας. Επειδή το 3-NBA διασπά εκλεκτικά τους εστερικούς δεσμούς του βορικού οξέος είναι λογικό να υποτεθεί πως η παραπάνω μείωση να οφείλεται σε φαινορικά τα οποία βρίσκονταν προσδεδεμένα στο τοίχωμα μέσω εστερικών δεσμών με το βορικό οξύ παρά ως συνήθεις εστέρες μέσω της καρβοξυλομάδας του φαινολικού οξέος.

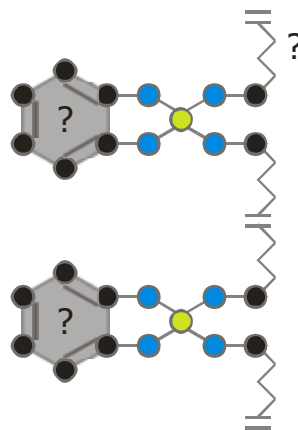
Από τα προηγούμενα πειράματα προέκυψαν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη συμπλόκων φαινολικών με βορικό οξύ στο κυτταρικό τοίχωμα φύλλων ελιάς. Ωστόσο, η επιλογή των δίσκων φύλλων ως πειραματικού υλικού είχε το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας όσον αφορούσε στα μόρια που ελευθερώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα και τον προσδιορισμό τους σε διαλυτή μορφή καθώς ο κυτταρικός χυμός είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε φαινορικά συστατικά.

Σκοπός

Επιπλέον, η χρήση των δίσκων φύλλων εμπεριέχει τον κίνδυνο της εξάλειψης των μορίων που απελευθερώνονται είτε λόγω προσρόφησής τους σε διάφορα κυτταρικά συστατικά και δομές είτε λόγω άλλων φαινομένων όπως οξειδώσεων των φαινολικών από ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος ή του κυτταροπλάσματος κ.λπ. Τέλος, η χρήση του παραπάνω πειραματικού συστήματος εισαγάγει πρόσθετες δυσκολίες όσον αφορά στην προσβασιμότητα του 3-NBA στο κυτταρικό τοίχωμα λόγω χαμηλής απορρόφησής του από τα κύτταρα.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ύπαρξης συμπλόκων φαινολικών συστατικών δομής *cis*-διόλης με το βορικό οξύ στα κυτταρικά τοιχώματα (εικόνα 2). Η ύπαρξη τέτοιων συμπλόκων στο κυτταρικό τοίχωμα είναι πιθανή καθώς τόσο το βορικό οξύ όσο και φαινολικά συστατικά απαντώνται στην κυτταρική αυτή δομή. Επιπλέον, είναι ήδη διαπιστωμένο πως το βορικό οξύ σχηματίζει διεστερικά σύμπλοκα με τα πηκτινικά πολυμερή στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα τα οποία ήταν απαλλαγμένα οποιωνδήποτε διαλυτών μορίων ή λειτουργικών ενζύμων, ώστε να παρακαμφθούν τα μειονεκτήματα της χρήσης άθικτων ιστών όπως αυτά εκτέθηκαν παραπάνω.

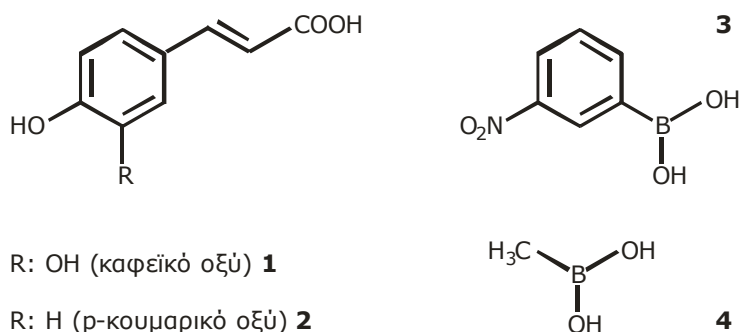
Εικόνα 2. Σχηματικό μοντέλο συμπλόκων φαινολικών συστατικών με βορικό οξύ στο κυτταρικό τοίχωμα. Μαύρο: άνθρακας, μπλε: οξυγόνο, πράσινο: βόριο. Οι δομές των φαινολικών και των υπολειμμάτων των πολυσακχαριτών του συμπλόκου δεν είναι γνωστές.



Υλικά και Μέθοδοι

I. Φασματοσκοπικές μελέτες της δημιουργία συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών με ή χωρίς την παρουσία βορονικών οξέων

Στα πειράματα της κατηγορίας αυτής μελετήθηκε η συμπλοκοποίηση φαινολικών με σύστημα ορθο-δι-υδροξυ με το βορικό οξύ καθώς και η ικανότητα των βορονικών οξέων να αποσπούν το βορικό οξύ από τα παραπάνω σύμπλοκα. Τα βορονικά οξέα, τα οποία είναι ισχυρότερα από το βορικό οξύ (παρουσιάζουν μικρότερη τιμή pK_a) παρεμποδίζουν το σχηματισμό συμπλόκων με πολυόλες ή εκδιώκουν το βορικό οξύ από τις υπάρχουσες θέσεις δέσμευσης (Bassil et al., 2004). Τα πειράματα μέσω επίδρασης βορονικού οξέως σε πρότυπα φαινολικά συστατικά πραγματοποιήθηκαν ώστε να διαπιστωθεί η παραπάνω συμπεριφορά σε φαινολικά συστατικά τα οποία διαθέτουν σύστημα ορθο-δι-υδροξυ. Ως πρότυπο φαινολικό συστατικό χρησιμοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ (3-(3,4-διϋδροξυ-φαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ, **1**) ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και το p-κουμαρικό οξύ (3-(4-υδροξυ-φαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ, **2**) το οποίο διαθέτει μια υδροξυλομάδα. Τα φαινολικά διαλύθηκαν αρχικά σε 50% μεθανόλη (stock διαλύματα) σε συγκέντρωση 2,5 mM. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν μίγματα κάθε φαινολικού συστατικού με βορικό οξύ (BA, $pK_a = 9,2$), 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικό οξύ (3-NBA, $pK_a = 7,2$, **3**), μεθυλο-βορονικό οξύ (MBA, $pK_a = 10,7$, **4**) ή συνδυασμούς τους σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 μ M και καταγράφηκε το φάσμα απορρόφησής τους. Το 3-NBA εκτός του χαρακτηριστικού του ως ισχυρότερο οξύ από το βορικό οξύ διαθέτει ομάδα νιτρο-βενζολίου η οποία αποτελεί ισχυρό χρωμοφόρο και επιτρέπει την ανίχνευσή του κατά τις χρωματογραφικές αναλύσεις.



Εικόνα 3. Χημικοί τύποι μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (βλ. κείμενο).

II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα

II.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν φυτά ελιάς της ποικιλίας 'Μανάκι', η οποία θεωρείται ευαίσθητη στην τροφοπενία βορίου. Συνολικά παρελήφθησαν 34 υγιή φυτά ηλικίας ενός έτους (φυτώριο Ελιάς Γ. Κωστελένος, Πόρος Τροιζινίας). Τα φυτά παρέμειναν στα αρχικά δοχεία ανάπτυξης και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης σε φωτοπερίοδο 16 h, θερμοκρασία 25/20 °C και σχετική υγρασία 50/70%. Ο φωτισμός παρεχόταν από 12 λαμπτήρες αλογόνου τύπου Powerstar HQI-BT-400W/D (OSRAM, GmbH, Munich, Germany). Οι συνθήκες αυτές αντιστοιχούν στις τυπικές κλιματικές συνθήκες οι οποίες επικρατούν κατά την περίοδο έκπτυξης της νέας βλάστησης. Τα φυτά ποτίζονταν καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής τους στο θάλαμο ανά δύο ημέρες.

II.2. Δειγματοληψίες

Διακρίθηκαν τέσσερις ηλικιακές κατηγορίες φύλλων με βάση την έκπτυξη του ελάσματος: α) εκπτυσσόμενα φύλλα με επιφάνεια ελάσματος μικρότερη του 50% της πλήρους έκπτυξης (κατηγορία E50), β) εκπτυσσόμενα φύλλα με επιφάνεια ελάσματος μεταξύ 50 και 75% της πλήρους έκπτυξης (κατηγορία E75), γ) πλήρως εκπτυγμένα νεαρά φύλλα (κατηγορία E100) και δ) ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους (ΩΡ). Εκτός από τα φύλλα, σε ορισμένες περιπτώσεις συλλέχθηκαν και ρίζες (ΡΙ).

II.3. Απομόνωση και χειρισμοί των κυτταρικών τοιχωμάτων

Για την απομόνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων χρησιμοποιήθηκαν νωπά φύλλα ή ρίζες. Μετά την λήψη του νωπού βάρους τα φύλλα ή οι ρίζες καθαρίστηκαν εξωτερικά με απιονισμένο νερό και τεμαχίστηκαν. Ακολούθησε λειοτρίβηση με υγρό άζωτο και εκχύλιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) στο οποίο είχε προστεθεί L-ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 1% (w/v). Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (2600×g, 10 min) και εκχυλίσαις του ιζήματος σε απιονισμένο νερό, μεθανόλη, μεθανόλη:χλωροφόρμιο (1:1), ακετόνη και τέλος σε απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ασκορβικό οξύ και ξανά σε ακετόνη για ξήρανση. Ενδεικτικά, για ιστό συνολικής νωπής βιομάζας 1 g χρησιμοποιήθηκαν 50 ml από κάθε έναν από τους παραπάνω διαλύτες. Τέλος τα κυτταρικά τοιχώματα ξηράνθηκαν στους 75 °C για 10 min και καταγράφηκε η ξηρή μάζα.

II.4. Επώαση κυτταρικών τοιχωμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία βορονικών οξέων

Η επώαση των απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) παρουσία 3-NBA (10 mM) και ασκορβικού οξέος (1%, w/v) ώστε να απελευθερωθούν στο μέσο επώασης τα φαινολικά συστατικά τα οποία βρίσκονται προσδεδεμένα στα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω διεστερικών δεσμών με το βορικό οξύ. Παράλληλα, για τον έλεγχο της μεθόδου, ένα δείγμα κυτταρικών τοιχωμάτων επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία βορονικού οξέος ενώ ένα δεύτερο δείγμα επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του MBA (10 mM). Τα ξηρά απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα εναιωρήθηκαν στο μέσο επώασης με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων (10 min). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 40 °C υπό συνεχή ανάδευση για 16 h. Στο τέλος της επώασης παραλήφθηκε το υπερκείμενο και διηθήθηκε σε φίλτρο μεμβράνης οξικής κυτταρίνης (0.2 μm, Macherey-Nagel, Duren, Germany).

II.5. Χρωματογραφική ανάλυση των μορίων που ελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) εξοπλισμένο με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού UV-970 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Ο διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη Zorbax Stablebond SB-C18 column (5 μm μέγεθος σφαιριδίων, διαστάσεις 250×4,6 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) σε θερμοκρασία δωματίου. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με βαλβίδα εισαγωγής 7725i (Reodyne, Rohnhert Park, California, USA) χωρητικότητας 20μl. Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου ενώ τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην κινητή φάση ήταν: A: 1% H₃PO₄, B: 50% μεθανόλη σε 1% H₃PO₄ και Γ: μεθανόλη. Η διαδοχή της σύστασης της κινητής φάσης ήταν ως εξής: αρχική σύσταση (A:B:C) 60:40:0, 0-12 min γραμμικό gradient προς 0:100:0, 12-17 min γραμμικό gradient προς 0:0:100, 17-20 min ισοκρατικό. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹ και η ανίχνευση έγινε στα 300nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Borwin Chromatographic Software, ver. 1.21.60 (JMBS Development, Fontaine, France). Οι κορυφές έκλουσης αναγνωρίστηκαν με σύγκριση με πρότυπες ουσίες, με βάση το χρόνο συγκράτησης, τα φάσματα απορρόφησης και με συγχρωματογράφιση. Η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με παύση ροής χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή.

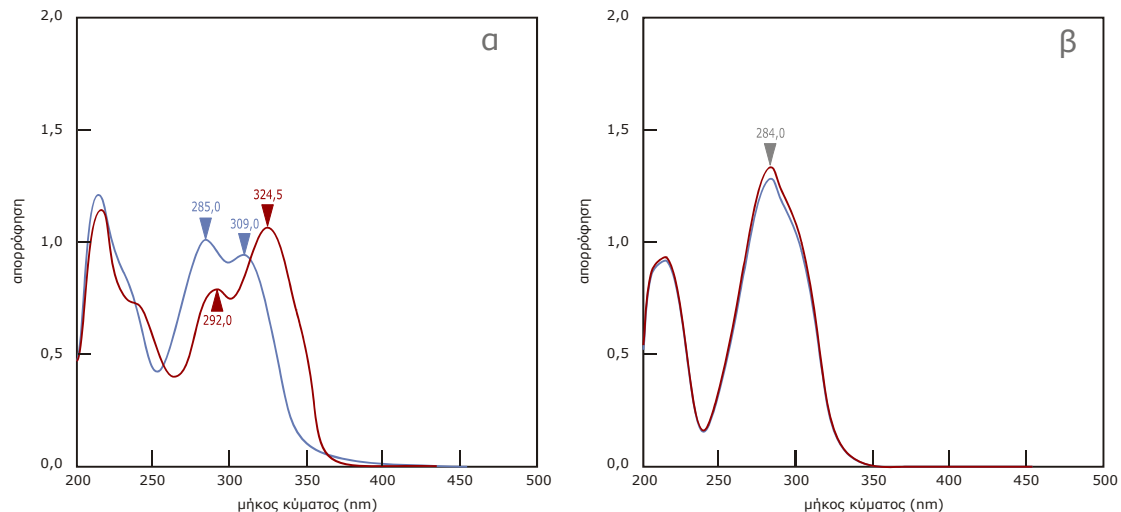
Υλικά και Μέθοδοι

Η συγκέντρωση των εκλουόμενων συστατικών μετρήθηκε μέσω του εμβαδού των κορυφών.

Αποτελέσματα

I. Φασματοσκοπικές μελέτες της δημιουργία συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών με ή χωρίς την παρουσία βορονικών οξέων

Στα πειράματα της κατηγορίας αυτής μελετήθηκε η συμπλοκοποίηση του καφεϊκού οξέος το οποίο διαθέτει σύστημα ορθο-δι-υδροξυ με το βορικό οξύ καθώς και η ικανότητα των βορονικών οξέων να αποσπούν το βορικό οξύ από το παραπάνω σύμπλοκο. Παράλληλα πειράματα έγιναν με την χρήση του p-κουμαρικού οξέος στο οποίο λείπει η μια από τις δύο υδροξυλομάδες του βενζοϊκού δακτυλίου. Στην εικόνα 4 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού και του p-κουμαρικού οξέος καθώς και οι αλλαγές που υφίστανται όταν συνυπάρχουν το βορικό οξύ ή και το 3-NBA. Παρατηρούμε ότι η προσθήκη βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1 με το φαινολικό οξύ προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση (BM) ως αποτέλεσμα του σχηματισμού διεστερικού συμπλόκου. Απαραίτητες προϋποθέσεις για το σχηματισμό του συμπλόκου είναι η ύπαρξη γειτονικών υδροξυλίων στον βενζοϊκό δακτύλιο (καθώς στην περίπτωση του p-κουμαρικού οξέος δεν παρατηρείται BM) και η υψηλή γραμμομοριακή αναλογία βορικού οξέος:φαινολικού οξέος.



Εικόνα 4. Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού (α) και του p-κουμαρικού οξέος σε συγκέντρωση 33 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) (μπλε ίχνος). Στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος (α), όταν στο διάλυμα προστεθεί βορικό οξύ παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση (κόκκινο ίχνος) η οποία εξαρτάται από την συγκέντρωση του τελευταίου. Η μετατόπιση των μεγίστων απορρόφησης μεγιστοποιείται σε γραμμομοριακή αναλογία 1000:1 (βορικού οξέος:φαινολικού συστατικού) όπως είναι αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Στο (α) η βαθυχρωμική μετατόπιση είναι ίση με 15,5 nm. Στην περίπτωση του p-κουμαρικού οξέος δεν παρατηρείται βαθυχρωμικό φαινόμενο (β).

Αποτελέσματα

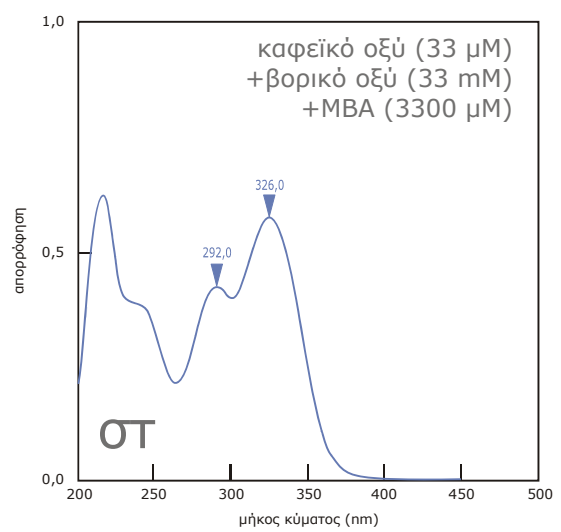
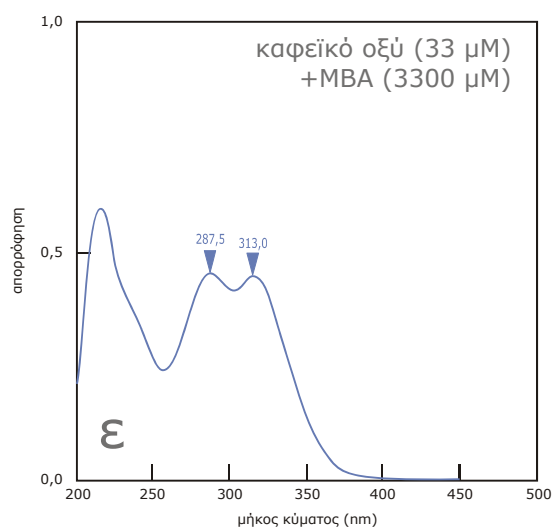
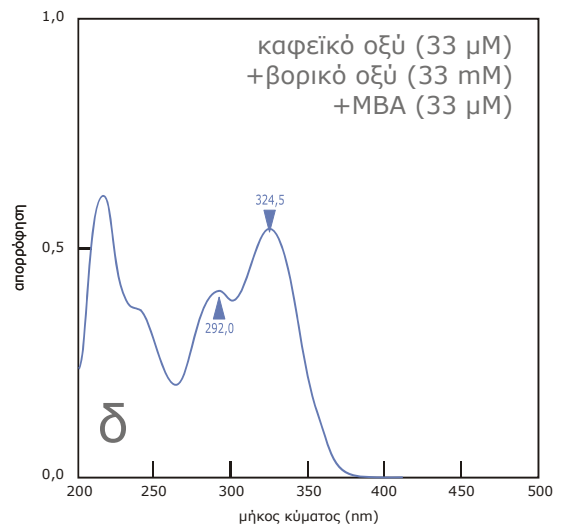
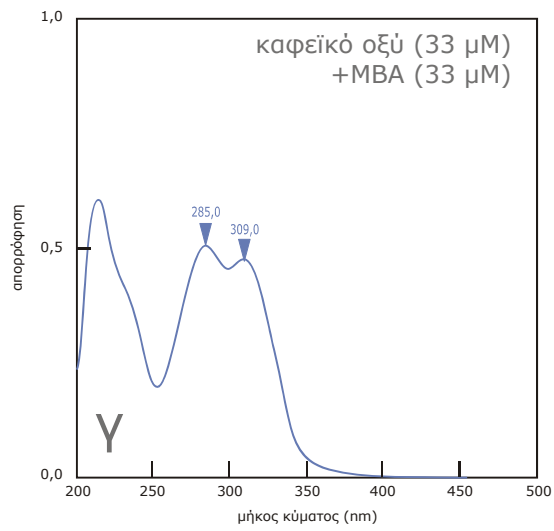
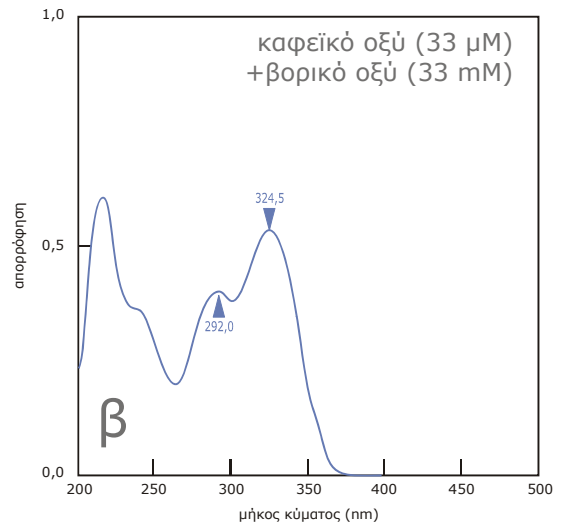
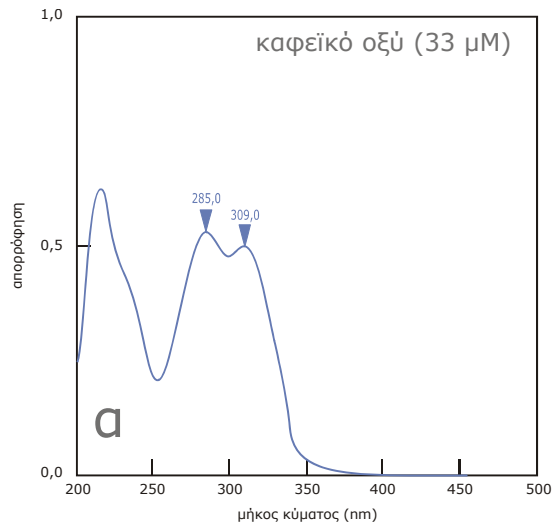
Σύμφωνα με τα φάσματα της εικόνας 5, η προσθήκη του, ασθενέστερου οξέος του βορικού οξέος, μεθυλοβορονικού οξέος σε ισομοριακή αναλογία δεν προκαλεί ΒΜ στο φάσμα του καφεϊκού οξέος (εικόνες 5α, 5γ) ενώ μικρή μετατόπιση (4 nm) παρατηρείται όταν η αναλογία μεθυλοβορονικού οξέος:καφεϊκού οξέος αυξηθεί στο 100:1 (εικόνες 5α, 5ε). Σημειώνεται πως η μετατόπιση που παρατηρείται στο φάσμα του καφεϊκού οξέος με την προσθήκη βορικού οξέος παραπάνω αναλογία είναι κατά 2 nm υψηλότερη (Κλουβάτου, 2006). Υπό ταυτόχρονη παρουσία μεθυλοβορονικού οξέος και βορικού οξέος (εικόνες 5α, 5β, 5δ, 5στ) δεν παρατηρείται αξιόλογη αλλαγή στην ΒΜ του φάσματος του καφεϊκού οξέος συγκριτικά με το φάσμα του υπό την παρουσία βορικού οξέος. Ειδικότερα, η προσθήκη μεθυλοβορονικού οξέος σε αναλογία 100:1 του καφεϊκού προκαλεί επιπλέον μετατόπιση κατά 1,5 nm (εικόνες 5β, 5στ).

Η μελέτη της επίδρασης του 3-NBA στο φάσμα του καφεϊκού οξέος παρουσιάζει δυσκολία λόγω της εμφάνισης ισχυρής απορρόφησης στην περιοχή των 277 nm λόγω ύπαρξης ισχυρού χρωμοφόρου του 3-NBA (εικόνες 5α, 6β). Για την μελέτη των παραπάνω μιγμάτων η συγκέντρωση των μορίων μειώθηκε στο 33% και τροποποιήθηκε ο φωτομετρικός μάρτυρας με προσθήκη του 3-NBA σε ίση συγκέντρωση με το κάθε δείγμα. Σε αντίθεση με το μεθυλοβορονικό, η προσθήκη του, ισχυρότερου οξέος του βορικού οξέος, 3-NBA σε ισομοριακή αναλογία προκαλεί ισχυρή ΒΜ (κατά 13 nm) στο φάσμα του καφεϊκού οξέος (εικόνες 5α, 6γ) ενώ το 3-NBA σε αναλογία μόλις 2:1 προκαλεί μέγιστη ΒΜ (κατά 18 nm, εικόνες 5α, 6δ, 6ε), ίση με αυτή του φάσματος του καφεϊκού οξέος υπό την ταυτόχρονη παρουσία βορικού οξέος (σε αναλογία πλέον της 1000:1) και 3-NBA (σε αναλογία 1:1) (εικόνες 5α, 6στ).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το 3-NBA είναι ικανό σε χαμηλές συγκεντρώσεις (έως και σε ισομοριακή αναλογία) να δημιουργήσει διεστερικά σύμπλοκα με το καφεϊκό οξύ. Αντίθετα, το συγκριτικά πολύ ασθενέστερο μεθυλοβορονικό οξύ δεν μπορεί να σχηματίσει ανάλογα σύμπλοκα με το καφεϊκό οξύ, τουλάχιστον σε αναλογίες μικρότερες του 100:1.

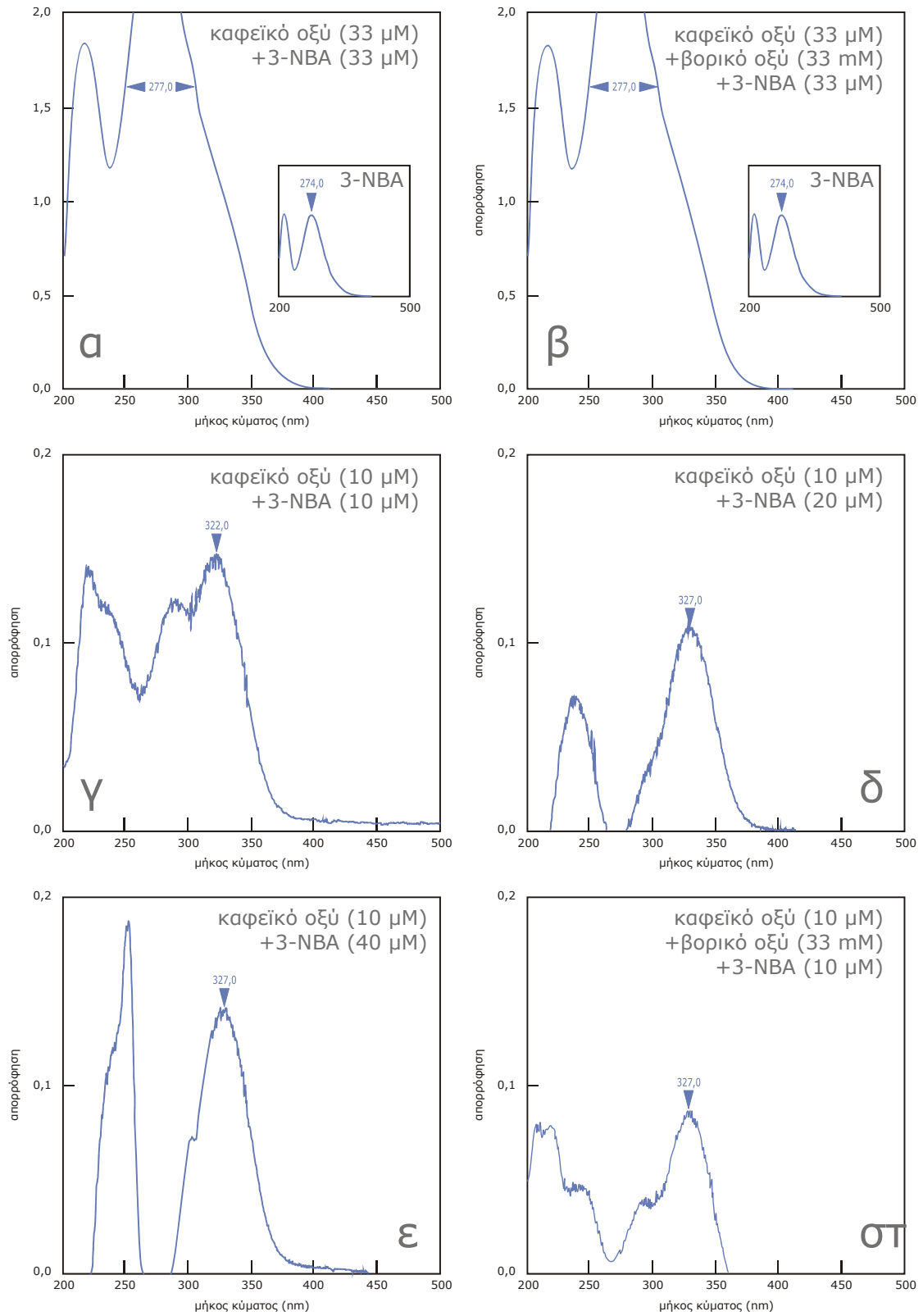
Εικόνα 5 (επόμενη σελίδα). Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος σε συγκέντρωση 33 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων βορικού ή βορονικών οξέων στο διάλυμα. α, β: Η προσθήκη βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1 (βλ. επίσης εικόνα 4α) προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση (BM) ίση με 15,5 nm. γ, ε: η προσθήκη μεθυλοβορονικού οξέος (MBA) σε ισομοριακή αναλογία δεν προκαλεί BM ενώ μικρή BM (4 nm) παρατηρείται όταν η αναλογία των δύο μορίων ανέβει στο 100:1. δ, στ: αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και με την ταυτόχρονη παρουσία βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1.

Αποτελέσματα



Εικόνα 6 (επόμενη σελίδα). Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος σε συγκέντρωση 33 ή 10 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων βορικού ή βορονικών οξέων στο διάλυμα. α, β: Η προσθήκη 3-νιτροφαινυλοβορονικού οξέος (3-NBA) σε αναλογία 1:1 παρουσία ή απουσία βορικού οξέος προκαλεί την εμφάνιση ισχυρής απορρόφησης με μέγιστο περίπου στα 277 nm λόγω της ύπαρξης ισχυρού χρωμοφόρου στο μόριο του 3-NBA (βλ. ένθετο φάσμα του 3-NBA) με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ερμηνεία του φάσματος του καφεϊκού. γ, δ, ε, στ: Η προσαρμογή του φωτομετρικού μάρτυρα με την προσθήκη ίσης συγκέντρωσης 3-NBA επιτρέπει, παρόλο τον αναλυτικό θόρυβο λόγω υψηλού υποβάθρου απορρόφησης του μάρτυρα, την μελέτη του φάσματος του καφεϊκού οξέος. γ, δ, ε: Η προσθήκη του 3-NBA σε ισομοριακή αναλογία με το καφεϊκό οξύ προκαλεί έντονη ΒΜ (13 nm) ενώ αρκεί η προσθήκη του 3-NBA σε αναλογία 2:1 για να προκαλέσει μέγιστη ΒΜ (18 nm). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραπάνω ΒΜ είναι ακόμα υψηλότερη από αυτή του βορικού οξέος εάν το τελευταίο προστεθεί σε αναλογία 1000:1. στ: η προσθήκη βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1 παρουσία του 3-NBA (σε αναλογία 1:1) δεν προκαλεί περαιτέρω μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης.

Αποτελέσματα

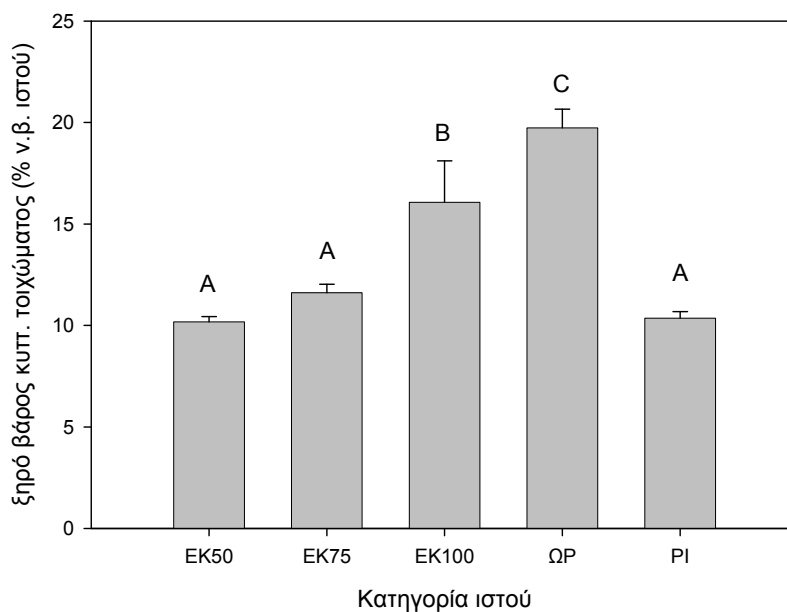


II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα

II.1. Χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων από διάφορους ιστούς και ανταλλάξιμα μόρια μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλβορονικό οξύ

Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι το 3-NBA λειτουργεί ως ανταγωνιστικός υποκαταστάτης του βορικού οξέος στα διεστερικά σύμπλοκα που σχηματίζει το τελευταίο με τα φαινολικά συστατικά που διαθέτουν ορθο-δι-υδροξυ- σύστημα όπως το καφεϊκό οξύ. Αποτελεί συνεπώς κατάλληλο μόριο για την διερεύνηση της ύπαρξης συμπλόκων του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά στο κυτταρικό τοίχωμα σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας. Στα πειράματα αυτής της ενότητας κυτταρικά τοιχώματα που απομονώθηκαν από διάφορους ιστούς ελιάς (φύλλα και ρίζα) επώαστηκαν με το παραπάνω βορονικό οξύ με σκοπό την απελευθέρωση φαινολικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος στο διάλυμα επώασης.

Σύμφωνα με την εικόνα 7, η αναλογία κυτταρικών τοιχωμάτων ανά νωπό βάρος ιστού αυξάνεται καθώς κινούμαστε από το αναπτυξιακό στάδιο των εκπυσσόμενων προς αυτό των ώριμων φύλλων. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς αυξανόμενης της ηλικίας των φύλλων αυξάνεται η εναπόθεση πολυμερών υλικών στο πρωτογενές τοίχωμα και επιπλέον δημιουργείται το



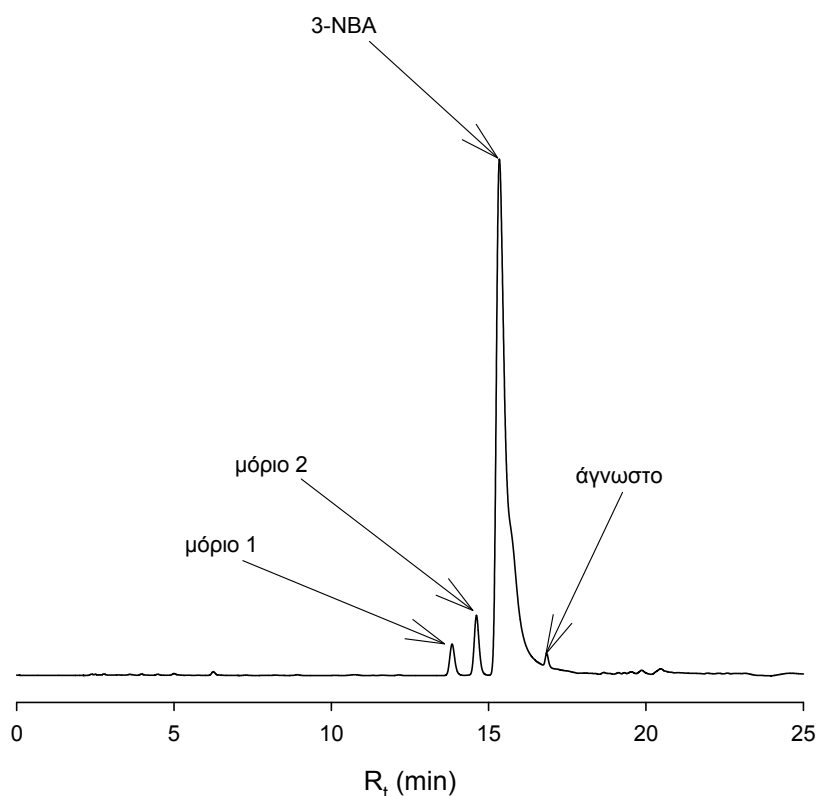
Εικόνα 7. Περιεκτικότητα στο κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος φύλλων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (εκπυσσόμενα φύλλα: EK50: με επιφάνεια ελάσματος μικρότερη του 50% της πλήρους έκπτυξης, EK75: επιφάνεια ελάσματος μεταξύ 50 και 75% της πλήρους έκπτυξης, E100: πλήρως εκπτυγμένα φύλλα, ΩΡ: ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους) ή ρίζας (ΡΙ). Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου). Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Αποτελέσματα

δευτερογενές τοίχωμα ενώ σε ορισμένες κατηγορίες κυττάρων εναποτίθεται και λιγνίνη. Επιπλέον, η αναλογία κυτταρικών τοιχωμάτων ανά νωπό βάρος ρίζας είναι περίπου ίση με αυτή των φύλλων που έχουν εκπτυχθεί σε ποσοστό μικρότερο από το 50% της πλήρους έκπτυξης (εικόνα 7).

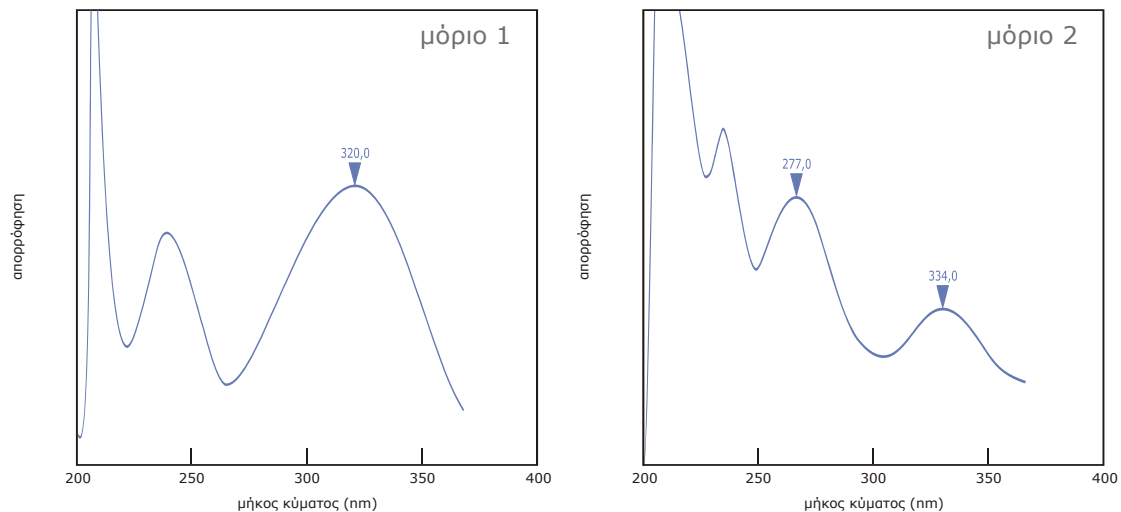
II.2. Απελευθέρωση μορίων μετά από επώαση με βορονικό οξύ

Μετά από την επώαση των δειγμάτων και την χρωματογραφική ανάλυση του υπερκείμενου διαπιστώθηκε η παρουσία δύο μορίων τα οποία προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα (εικόνα 8) καθώς τα μόρια αυτά δεν ανιχνεύονται όταν στο διάλυμα δεν έχει εναιωρηθεί το παραπάνω υλικό. Επιπλέον, είναι πιθανό ότι τα μόρια αυτά βρίσκονταν προσδεμένα στα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ καθώς δεν ανιχνεύθηκαν στο υπερκείμενο της επώασης κυτταρικού τοιχώματος με το ασθενέστερο του βορικού οξέος μεθυλοβορονικό οξύ (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).



Εικόνα 8. Χρωματογραφική ανάλυση του υπερκείμενου εναιωρήματος κυτταρικών τοιχωμάτων από φύλλο ελιάς μετά από επώαση με 10 mM 3-NBA σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34). Η ανίχνευση πραγματοποιείται με απορρόφηση στα 300 nm. Για χρωματογραφικές συνθήκες βλ. Υλικά και Μέθοδοι. Αναλύονται τέσσερα μόρια: μόριο 1 και 2: συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (βλ. φάσματα απορρόφησης, εικόνα 9), 3-NBA: μη συμπλοκοποιημένο, άγνωστο: χημικό είδος με χαρακτηριστικά απορρόφησης του 3-NBA.

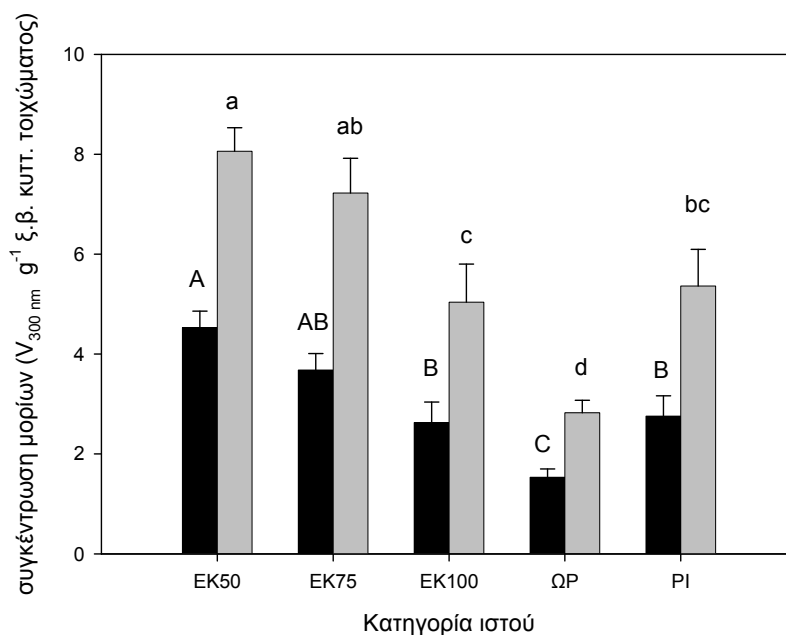
Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης των δύο μορίων φαίνεται στην εικόνα 9. Το μόριο 1 απορροφάει σε σχετικά μεγάλα μήκη κύματος ($UV_{max} = 320 \text{ nm}$) γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό της συμμετοχής ισχυρής χρωμοφόρου ομάδας στο μόριο. Παρόλο που δεν υπάρχουν διαθέσιμες περαιτέρω πληροφορίες για την δομή του μορίου 1, το φάσμα του υποδηλώνει πως μπορεί να πρόκειται για φαινολικό συστατικό. Λόγω των συνθηκών φασματοσκοπίας (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) αναμένεται πως το μέγιστο απορρόφησης του μορίου 1 θα βρίσκεται ακόμα υψηλότερα εάν ληφθεί σε μεθανόλη. Το μόριο 2 έδωσε δύο μέγιστα σε μεγάλα μήκη κύματος ($UV_{max} = 277 \text{ nm}$ και 334 nm) γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό της παρουσίας δύο χρωμοφόρων ομάδων στο μόριο. Παρόλο που δεν υπάρχουν διαθέσιμες περαιτέρω πληροφορίες για την δομή του μορίου 2, το φάσμα του υποδηλώνει πως μπορεί να πρόκειται για φλαβονοειδές.



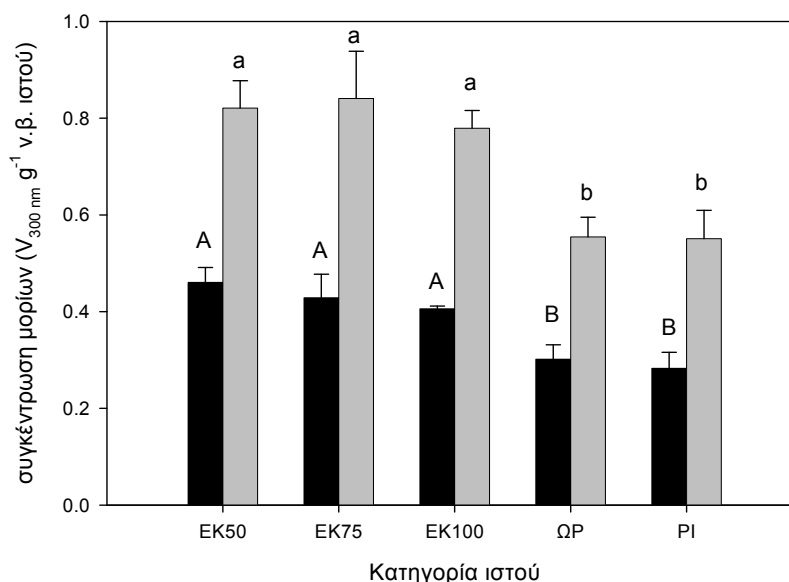
Εικόνα 9. Φάσματα απορρόφησης των μορίων 1 και 2 που διαλυτοποιούνται από το κυτταρικό τοίχωμα μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του 3-NBA (10 mM) για 18 h. Τα φάσματα ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης του υπερκειμένου της επώασης με πείραμα παύσης ροής. Διαλύτης: μεθανόλη σε 1% H_3PO_4 .

Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων στα δύο μόρια τα οποία απελευθερώθηκαν μετά από την επώαση. Παρατηρείται πως τα δύο μόρια είναι παρόντα στα κυτταρικά τοιχώματα όλων των ιστών που εξετάστηκαν. Σε όλους τους ιστούς, το μόριο 2 εμφανίζει υψηλότερες συγκεντρώσεις (με την παραδοχή ότι οι συντελεστές μοριακής απόσβεσης των δύο μορίων στα 300 nm δεν διαφέρουν) ενώ η αναλογία τους είναι σχεδόν σταθερή και ίση με 1,9 περίπου (μόριο 2:μόριο 1, εικόνα 10). Η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων στα δύο μόρια είναι ιδιαίτερα υψηλή στα εκπυσσόμενα φύλλα (περίπου τριπλάσια συγκριτικά με την περιεκτικότητά τους στα ώριμα φύλλα). Το γεγονός αυτό μπορεί να συσχετιστεί με την ύπαρξη υψηλότερων

Αποτελέσματα



Εικόνα 10. Συγκέντρωση των μορίων 1 (μαύρο) και 2 (γκρι) που διαλυτοποιούνται από το κυτταρικό τοίχωμα φύλλων ή ρίζας (για τις κατηγορίες των ιστών βλ. εικόνα 7) μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του 3-NBA (10 mM) για 18 h. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω της αναγωγής της επιφάνειας της κορυφής έκλουσης στα 300 nm ανά μονάδα ξηρού βάρους κυτταρικού τοιχώματος. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου). Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($P < 0.05$).



Εικόνα 11. Συγκέντρωση των μορίων 1 (μαύρο) και 2 (γκρι) που διαλυτοποιούνται από το κυτταρικό τοίχωμα φύλλων ή ρίζας (για τις κατηγορίες των ιστών βλ. εικόνα 7) μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του 3-NBA (10 mM) για 18 h. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω της αναγωγής της επιφάνειας της κορυφής έκλουσης στα 300 nm ανά μονάδα νωπού βάρους ιστού. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου). Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($P < 0.05$).

συγκεντρώσεων φαινολικών συστατικών στους νεαρούς ιστούς συγκριτικά με τους περισσότερο ώριμους. Στα κυτταρικά τοιχώματα της ρίζας μετρήθηκαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις (εικόνα 10). Ανάλογη αλλά λιγότερο έντονα πτωτική τάση με την αύξηση της ηλικίας των φύλλων εμφανίζεται και στην περιεκτικότητα των δύο μορίων ανά μονάδα νωπού βάρους του ιστού. Τα κυτταρικά τοιχώματα της ρίζας εμφανίζουν περιεκτικότητα των δύο μορίων ανάλογη με αυτή των ώριμων φύλλων (εικόνα 11).

Συζήτηση

Από προηγούμενα πειράματα υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα τα οποία, επιπρόσθετα αυτών τα οποία προσδένονται μέσω συνήθων εστερικών ή αιθερικών δεσμών (Fry, 1982; Lozonaya et al., 1999; Markham et al., 2000; Levigne et al., 2004; Kang et al., 2008), συνδέονται μέσω εστερικών διαδεσμών μέσω βορικού οξέος (εικόνα 12). Οι προϋποθέσεις για την ύπαρξη των παραπάνω συμπλόκων είναι: α) η ύπαρξη κατάλληλων υποκαταστατών με υδροξυλομάδες σε γειτονικά άτομα άνθρακα στις αλυσίδες των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος ώστε να προσφέρουν την μια από τις δύο πλευρές για τη δημιουργία του εστερικού διαδεσμού, β) η ύπαρξη φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα τα οποία επίσης φέρουν δύο ομάδες υδροξυλίου σε γειτονικά άτομα άνθρακα (δομή όρθο-) και γ) η δυνατότητα του βορικού οξέος να δημιουργεί σύμπλοκα με τα παραπάνω φαινολικά.

α) Είναι διαπιστωμένο ότι οι πηκτινικές αλυσίδες της ραμνογαλακτουρονάνης II (RG-II) φέρουν στην πλάγια αλυσίδα A ένα υπόλειμμα απιόζης το οποίο συνδέεται με το βορικό οξύ. Μέσω αυτής της συνδεσμολογίας το βορικό οξύ δημιουργεί διαμοριακούς δεσμούς με τις αλυσίδες της RG-II (O'Neill et al., 1996; O'Neill et al., 2004). Κάλλιστα λοιπόν θα μπορούσαν να υφίστανται και σύμπλοκα του βορικού οξέος στα οποία η μια πλευρά του συμπλόκου συνδέεται με την RG-II ενώ η άλλη με υποκαταστάτη διαφορετικό της RG-II.

β) Τα κυτταρικά τοιχώματα φέρουν φαινολικά συστατικά με ποικίλες δομές. Παρόλο που οι πλέον συνηθισμένες δομές που έχουν χαρακτηριστεί είναι το p-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ, τα οποία δεν φέρουν ορθο-δι-υδροξυ σύστημα, υπάρχουν αναφορές και για την παρουσία καφεϊκού οξέος στο κυτταρικό τοίχωμα (Gibbons et al., 1999; Yang and Uchiyama, 2000), το οποίο διαθέτει δομή ορθο-διφαινόλης.

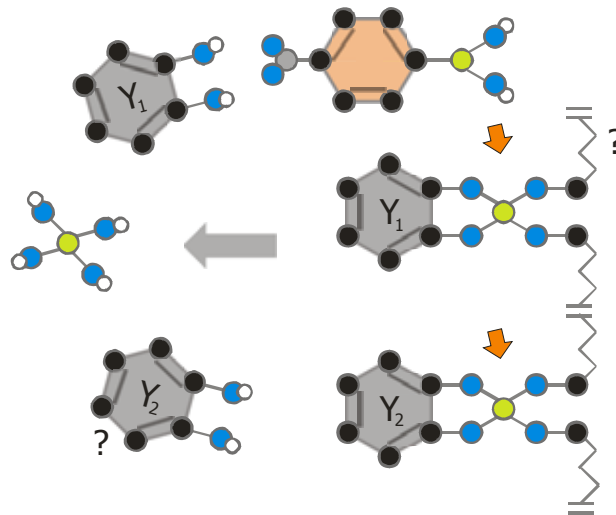
γ) Λόγω χημικών ιδιοτήτων, η συμπλοκοποίηση του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά που φέρουν ορθο-δι-υδροξυ σύστημα είναι θεωρητικά δυνατή (Dembitsky et al., 2002). Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει τον σχηματισμό σταθερών συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών όπως το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ καθώς και με τον φαινυλαιθανοειδή γλυκοζιτη ακτεοσίδη, συστατικό του φυτού της ελιάς.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων πειραμάτων, η έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας φυτών ελιάς προκαλεί δραματική αύξηση των φαινολικών συστατικών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ο ακτεοσίδης και δύο γλυκοζίτες της λουτεολίνης (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Liakopoulos et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα), μόρια με δυνατότητα δημιουργίας συμπλόκων με το βορικό οξύ. Επιπλέον, η αύξηση ορισμένων συστατικών όπως του ακτεοσίδη

Συζήτηση

είναι πολύ υψηλότερη αυτής των υπολοίπων φαινολικών συστατικών. Με βάση τα παραπάνω, διατυπώθηκε η υπόθεση σύμφωνα με την οποία η αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων μορίων δεν οφείλεται, τουλάχιστον αποκλειστικά, σε *de novo* σύνθεση αλλά στην παρεμπόδιση της δημιουργίας ή στην διάσπαση υπαρχόντων συμπλόκων τους με το βορικό οξύ στο κυτταρικό τοίχωμα λόγω χαμηλής συγκέντρωσης του τελευταίου στο κύτταρο ως αποτέλεσμα της τροφопενίας βορίου. Επόμενα πειράματα έδειξαν ότι η τροφопενία βορίου μειώνει την περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων σε φαινολικά συστατικά (Κλουβάτου, 2006) καθώς επίσης και ότι η επίδραση του 3-NBA (το οποίο διασπά τους διεστερικούς δεσμούς του βορικού οξέος με διάφορους υποκαταστάτες) έχει το ίδιο αποτέλεσμα αλλά επιπλέον προκαλεί την απελευθέρωση βορικού οξέος στο μέσο επώασης (Τσαγκαράκη, 2007).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τον λεπτομερή χαρακτηρισμό της συμπεριφοράς του 3-NBA (σε αντιδιαστολή με το μεθυλοβορονικό οξύ το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, βλ. επίσης Bassil et al., 2004) κατά τους χειρισμούς βιολογικών υλικών με σκοπό την διάσπαση των συμπλόκων του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε πρότυπα συστήματα τα οποία έδειξαν ότι το 3-NBA αποτελεί κατάλληλο μόριο για την ποσοτική διάσπαση των παραπάνω συμπλόκων ακόμα και όταν χρησιμοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό την εξειδικευμένη επίδραση του παραπάνω μορίου στο κυτταρικό τοίχωμα το οποίο απομονώθηκε από διάφορους ιστούς φυτών ελιάς. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν κυτταρικά τοιχώματα από ρίζα καθώς και από φύλλα διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η, σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα σε δίσκους φύλλων (Τσαγκαράκη, 2007), χαμηλή προσβασιμότητα του 3-NBA στο κυτταρικό τοίχωμα και η μικρή διακριτικότητα των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών που τυχόν ελευθερώνονται στο μέσο επώασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ο παραπάνω χειρισμός έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο μορίων από το κυτταρικό τοίχωμα στο μέσο επώασης τα οποία, κρίνοντας από τα φάσματα απορρόφησής τους, πιθανότατα ανήκουν σε φαινολικά. Περαιτέρω αναλύσεις σε διάφορους ιστούς ελιάς έδειξαν ότι η περιεκτικότητα του κυτταρικού τοιχώματος στα δύο αυτά μόρια είναι υψηλή σε νεαρούς ιστούς. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να συσχετιστεί με το γεγονός ότι στην ελιά και στους παραπάνω ιστούς, κατά μείζονα λόγο, συνυπάρχουν φαινολικά συστατικά (Karabourniotis et al., 1995), βορικό οξύ (Fernández-Escobar et al. 1999; Liakopoulos et al., 2005) και πιθανότατα, λόγω της υψηλής αναλογίας του



Εικόνα 12. Προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ του βορικού οξέος και των φαινολικών συστατικών στα κυτταρικά τοιχώματα σύμφωνα με το οποίο το βορικό οξύ δρα ως συνδετικό μόριο μεταξύ διυδροξυ-ομάδων υπολειμμάτων του κυτταρικού τοιχώματος και ορθο-διφαινολικών συστατικών. Η επίδραση του 3-νιτροφαινυλοβορονικού οξέος (πορτοκαλί) σε απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα προκάλεσε την ελευθέρωση στο διάλυμα δύο φαινολικών συστατικών καθώς και βορικού οξέος (Y_1 και Y_2). Μαύρο: άνθρακας, μπλε: οξυγόνο, λευκό: υδρογόνο, πράσινο: βόριο.

πρωτογενούς τοιχώματος στα αναπτυσσόμενα κύτταρα, και πηκτινικά πολυμερή σε μεγάλη συγκέντρωση στο κυτταρικό τοίχωμα.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία έδειξε ότι στο κυτταρικό τοίχωμα ιστών του φυτού της ελιάς απαντώνται δύο φαινολικά συστατικά τα οποία διαλυτοποιούνται μέσω της εξειδικευμένης επίδρασης του μορίου 3-NBA. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως τα μόρια αυτά προσδένονται στα πηκτινικά πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος ως διεστέρες του βορικού οξέος (εικόνα 12). Τα αποτελέσματα αυτά συνιστούν την πρώτη αναφορά για την ύπαρξη σταθερών συμπλόκων του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά σε κυτταρική δομή των ανώτερων φυτών και επιπλέον την τρίτη αναφορά για την ύπαρξη συμπλόκων του βορικού οξέος με κυτταρικά συστατικά μετά την πηκτίνη και τις σακχαροαλκοόλες. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της ακριβούς δομής των δύο αυτών συστατικών καθώς και η επιβεβαίωση του σχηματισμού συμπλόκων τους με συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος αναμένεται να συμβάλλουν στην επιβεβαίωση της υπόθεσης εργασίας.

Βιβλιογραφία

- Alpaslan, M., Gunes, A. 2001. Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant and Soil*, 236: 123-128.
- Arnon, D.I. and Stout, P.R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, 14:371-375.
- Bassil, E., Hu, H., Brown, P.H. 2004. Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiology*, 136: 3383-3395.
- Blevins, D.G., Lukaszewski, K.M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 481-500.
- Boudet, A.-M. 1998. A new view of lignification. *Trends in Plant Science*, 3: 67-71.
- Brown, P. H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeiffer, H., Dannel, F., Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4: 205-223.
- Brown, P.H., Hu, H. 1996. Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Annals of Botany*, 77: 497-505.
- Brown, P.H., Hu, H. 1997. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? *Plant and Soil*, 196: 211-215.
- Cakmak, I., Kurz, H., Marschner, H. 1995. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiologia Plantarum*, 95: 11-18.
- Cara, F.A., Sanchez, E., Ruiz, J.M., Romero, L. 2002. Is phenol oxidation responsible for the short term effects of boron deficiency on plasma-membrane permeability and function in squash roots? *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 853-858.
- Chishaki, N., Horiguchi, T. 1997. Responses of secondary metabolism to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 987-991.
- Dannel, F., Pfeiffer, H., Römheld, V. 1997. Effect of pH and boron concentration in the nutrient solution on translocation of boron in the xylem of sunflower. *Boron in Soils and Plants*, R.W. Bell and B. Rerkasem (eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 183-186.
- Dannel, F., Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4: 205-223.
- Dannel, F., Pfeiffer, H., Römheld, V. 2002. Update on boron in higher plants - Uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biology*, 4: 193-204.
- Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P. 1978. Structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, 62: 418-422.
- Dell, B., Huang, L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil*, 193: 103-120.
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I., Srebnik, M. 2002. Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science*, 163: 931-942.

Βιβλιογραφία

- Dixon, R.A., Choudhary, A.D., Dalkin, K., Edwards, R., Fahrendorf, T., Gowri, G., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Loake, G.J., Maxwell, C.A., Orr, J., Paiva, N.L. 1992. Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 26, Phenolic metabolism in plants, H. Stafford, R.K. Ibrahim (eds.), New York: Plenum Press, 4: 91-138.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell, 7: 1085-1097.
- Dordas, C., Brown, P.H. 2000. Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. Journal of Membrane Biology, 175: 95-105.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. 1992. Η ανόργανη διατροφή των φυτών. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. 1998. Φυσιολογία Φυτών ΙΙ. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- El-Shintinawy, F. 1999. Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves. Photosynthetica, 36: 565-573.
- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. Advances in Botanical Research, 31: 37-75.
- Fernández -Escobar, R., Moreno, R., Garcia-Creus, M. 1999. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. Scientia Horticulturae, 82: 25-45.
- Ferrol, N., Belver, A., Roldan, M., Rodriquez-Rosales, M.P., Donaire, J.P. 1993. Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes. Plant Physiology, 103: 763-769.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A., Ehwald, R. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. Plant Physiology, 121: 829-838.
- Fry, S.C. 1982. Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. Biochemical Journal, 203: 493-504.
- Gibbons, S., Mathew, K.T., Gray, A.I. 1999. A caffeic acid ester from *Halocnemum strobilaceum*. Phytochemistry, 51: 465-467.
- Gibson, A.C. 1996. Structure-function relations of warm desert plants. Springer, Berlin, Germany.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. Phytochemical Adaptations to Stress. Eds. B.N. Timmermann, C. Steelink and F.A. Loewus. Plenum Press, New York, USA, pp 270-320.
- Goldbach, H.E., Hartmann, D., Rotzer, T. 1990. Boron is required for the stimulation of the ferricyanide-induced proton release by auxins in suspension-cultured cells of *Daucus carota* and *Lycopersicon esculentum*. Physiologia Plantarum, 80: 114-118.
- Grayer, R.J., Harborne, J.B., Kimmins, E.M., Stevenson, F.C., Wijayagunasekera, H.N.P. 1994. Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. Acta Horticulturae, 381: 691-694.

- Harborne, J.B. 1988. Biochemical interactions between higher plants. Introduction to ecological biochemistry, 9: 277-301.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Herms, D.A., Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or to defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3): 283-335.
- Hu, H., Brown, P.H. 1994. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. Evidence for a structural role of boron in the cell wall. *Plant Physiology*, 105: 681-689.
- Inderjit,, Duke, S.O. 2003. Ecological aspects of allelopathy. *Planta*, 217: 529-539.
- Ishii, T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 12: 111-127.
- Ishii, T., Matsunaga, T. 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 284: 1-9.
- Kaneko, S., Ishii, T., Matsunaga, T. 1996. A boron-rhamnogalacturonan II complex from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry*, 44: 243-248.
- Kang, Y.-H., Parker, C.C., Smith, A.C., Waldron, K.W. 2008. Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 8558-8564.
- Karabourniotis, G., Kotsabassidis, D., Manetas, Y. 1995. Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Canadian Journal of Botany*, 73: 376-383.
- Karabourniotis, G., Liakopoulos, G. 2005. Phenolic compounds in plant cuticles: physiological and ecological aspects. *Advances in Plant Physiology*, Vol. 8. A. Hemantaranjan (ed.), Scientific Publishers (India), pp. 33-47.
- Karamanoli, K. 2002. Secondary metabolites as allelochemicals in plant defence against microorganisms of the phyllosphere. *Allelopathy. From molecules to ecosystems*. M.J. Reigosa, N. Pedrol (eds.), Enfield: Science Publishers Inc., pp. 277-288.
- Kastori, R., Plesnicar, M., Pankovic, D., Sakac, Z. 1995. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1751-1763.
- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W., Rodriguez, E. 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. *Biology and Chemistry of plant trichomes* (E. Rodriguez, P.L. Healey, I. Mehta, eds) Plenum Press, pp. 187-241.
- Κλουβάτου, Α. 2006. Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου των φαινολικών συστατικών τα οποία συσσωρεύονται στην ελιά (*Olea europaea* L.) υπό συνθήκες ανεπάρκειας βορίου. Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Βιβλιογραφία

- Kobayashi, M., Match, T., Azuma, J. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiology*, 110: 1017-1020.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., Keinänen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *OIKOS*, 83: 212-226.
- Lawrence, K., Bhalla, P., Misra, P.C. 1995. Changes in (NADP)H-dependent redox activities in plasmalemma-enriched vesicles isolated from boron- and zinc-deficient chick pea roots. *Journal of Plant Physiology*, 146: 652-657.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., Que?me?ner, B., Thibault, J.-F. 2004. Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. *Carbohydrate Research*, 339: 2315-2319.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Filippou, M., Fasseas, C., Tsadilas, C., Drossopoulos, I., Karabourniotis, G. 2005. Boron remobilization at low boron supply in olive (*Olea europaea*) in relation to leaf and phloem mannitol concentrations. *Tree Physiology*, 25: 157-165.
- Loomis, W.D., Durst, R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3: 229-239.
- Lozovaya, V.V., Gorshkova, T.A., Yablokova, E.V., Rumyantseva, N.I., Valieva, A., Ulanov, A., Widholm, J.M. 1999. Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (buckwheat, soybean and flax). *Phytochemistry*, 50: 395-400.
- Markham, K.R., Ryan, K.G., Gould, K.S., Rickards, G.K. 2000. Cell wall sited flavonoids in lisianthus flower petals. *Phytochemistry*, 54: 681-687.
- Match, T. 1997. Boron in plant cell walls. *Plant and Soil*, 193: 59-70.
- Match, T., Ishigaki, K., Ohno, K., Azuma, J. 1993. Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. *Plant and Cell Physiology*, 34: 639-642.
- Match, T., Ishigaki, K.-I., Mizutani, M., Matsunaga, W., Takabe, K. 1992. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for an intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant and Cell Physiology*, 33: 1135-1141.
- Nielsen, F.H. 2000. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 16: 512-514.
- Obermeyer, G., Kriechbaumer, R., Strasser, D., Maschessnig, A., Bentrup, F.W. 1996. Boric acid stimulates the plasma membrane H⁺-ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiologia Plantarum*, 98: 281-290.
- O'Neill, M.A., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1991. The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods of Plant Biochemistry*. Vol. 2. Ed. P.M. Dey. Academic Press, London, pp 415-441.
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P., Darvill, A.G. 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*, 294: 846-849.

- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G. 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 109-139.
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., Albersheim, P. 1996. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 22923-22930.
- Pfeffer, H., Dannel, F., Römheld, V. 1999. Isolation of soluble boron complexes and their determination together with free boric acid in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 154: 283-288.
- Phillips, D.A., Kapulnik, Y. 1995. Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends in Microbiology*, 3: 58-64.
- Pollard, A.S., Parr, A.J., Loughman, B.C. 1977. Boron in relation to membrane function in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 28: 831-841.
- Power, P., Woods, W.G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil*, 193: 1-13.
- Raven, J.A. 1980. Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytologist*, 84: 231-249.
- Raven, J.A. 1980. Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytologist*, 84: 231-249.
- Robertson, G.A., Loughman, B.C. 1974. Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. *New Phytologist*, 73: 291-298.
- Roldan, M., Belver, A., Rodriguez-Rosales, P., Ferrol, N. and Donaire, J.D. 1992. In vivo and in vitro effects of boron on the plasma membrane proton pump of sunflower roots. *Physiol. Plant.*, 84:49-54.
- Seigler, D.S. 1998. Plant secondary metabolism. *Plant Secondary Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, AH Dordrechtm The Netherlands.
- Shirley, B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*, 1: 377-382.
- Stavrianiakou, S., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G. 2006. Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*, 56: 293-300.
- Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., Jacobs, G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349-361.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420: 337-340.
- Tan, S.C. 1980. Phenylalanine ammonia-lyase and the phenylalanine ammonia-lyase inactivating system: Effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7: 159-167.

Βιβλιογραφία

- Tang, P.M. and dela Fuente, R.K. 1986. The transport of indole-3-acetic acid in boron –and calcium- deficient sunflower hypocotyls segments. *Plant Physiology*, 81: 646-650
- Thellier, M., Duval, Y., Demarty, M. 1979. Borate exchange of *Lemna minor* as studied with the help of the enriched stable isotopes of an (n, α) nuclear reaction. *Plant Physiology*, 63: 283-288.
- Thomas, J.R., McNeil, M., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1987. Structure of plant cell walls XIX. Isolation and characterisation of wall polysaccharides from suspension-cultured Douglas fir cells. *Plant Physiology*, 83:659-671.
- Thomas, J.R., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1989. Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from walls of suspension – cultured rice cells. *Carbohydrate Research*, 185:261–277.
- Τσαγκαράκη, Β. 2007. Η χρήση βορονικών οξέων για τη μελέτη των επιπτώσεων της τροφοπενίας βορίου στο φυτό της ελιάς (*Olea europaea* L.). Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Wagner, G.J. 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 96: 675-679.
- Wang, S.Y. 1999. Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18: 127-134.
- Wollenweber, E., Dietz, V.H. 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20: 869-932.
- Woods, W.G. 1996. Review of possible boron speciation relating to its essentiality. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine (The)*, 9: 153-163.
- Yang, J.-G., Uchiyama, T. 2000. Dehydrodimers of caffeic acid in the cell walls of suspension-cultured *Mentha*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 862-864.
- Yu, Q., Hlavacka, A., Matoh, T., Volkmann, D., Menzel, D., Goldbach, H.E., Baluska, F. 2002. Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. *Plant Physiology*, 130: 415-421.
- Muhling, K.H., Wimmer, M., Goldbach, H.E. 1998. Apoplastic and membrane-associated Ca²⁺ in leaves and roots as affected by boron deficiency. *Physiologia Plantarum*, 102: 179-184.

