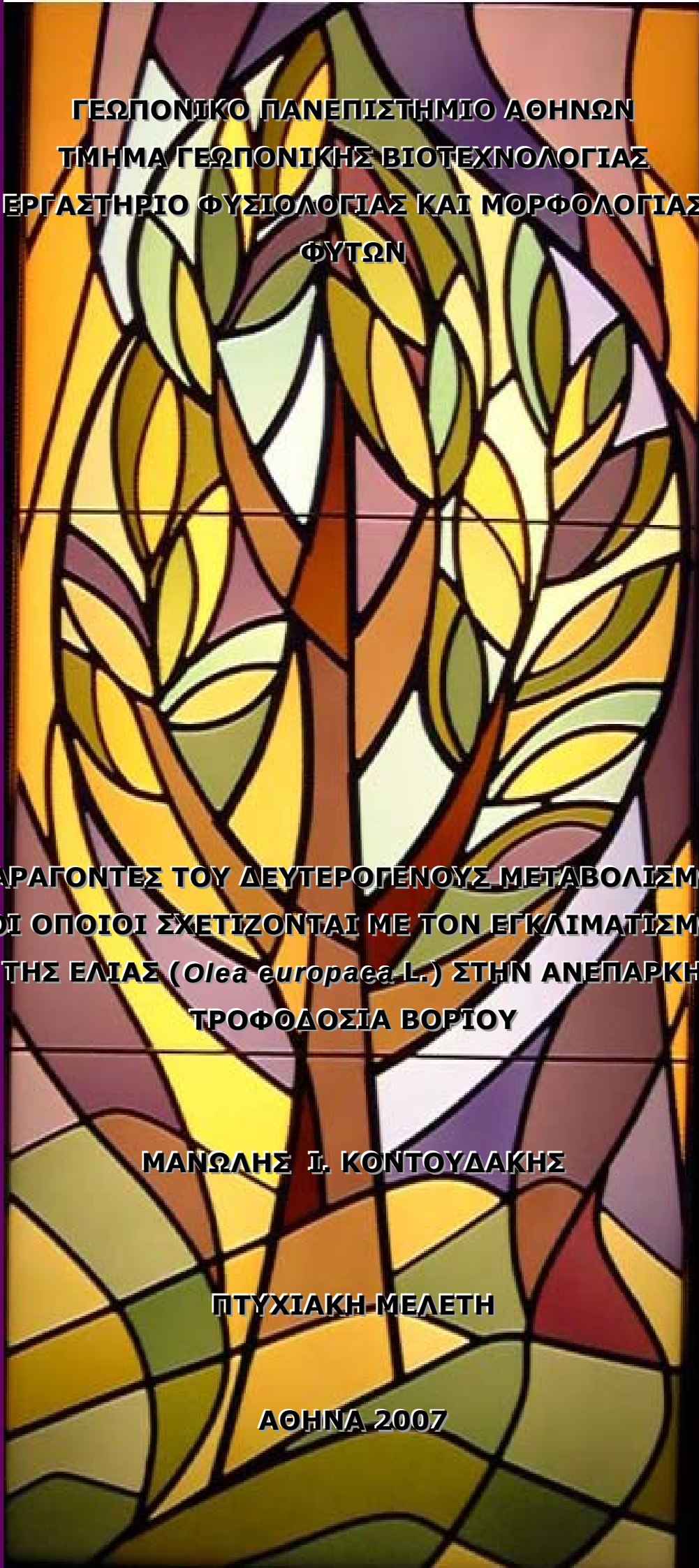


A stylized illustration of an olive branch, rendered in a mosaic or stained-glass style. The leaves are depicted in various shades of yellow, green, and brown, with black outlines. The branch itself is a dark brown color. The background is a solid purple color.

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

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ
ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟ
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*Olea europaea* L.) ΣΤΗΝ ΑΝΕΠΑΡΚΗ
ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑ ΒΟΡΕΙΟΥ**

ΜΑΝΩΛΗΣ Ι. ΚΟΝΤΟΥΔΑΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΘΗΝΑ 2007

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Παράγοντες του δευτερογενούς μεταβολισμού οι οποίοι σχετίζονται
με τον εγκλιματισμό της ελιάς (*Olea europaea* L.) στην ανεπαρκή
τροφοδοσία βορίου

ΜΑΝΩΛΗΣ Ι. ΚΟΝΤΟΥΔΑΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΘΗΝΑ 2007

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δημήτριος Μπουράνης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Γεώργιος Αϊβαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Περιεχόμενα

Πρόλογος	7
Εισαγωγή	9
I. Ανόργανη διατροφή φυτών	9
I.1. Βασικές αρχές	9
I.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο φυτικό σώμα	10
I.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού	11
I.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων	12
I.5. Τροφопενίες θρεπτικών στοιχείων	13
1.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων	14
1.5.2. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη και τον πρωτογενή μεταβολισμό των ανώτερων φυτών	16
1.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στον δευτερογενή μεταβολισμό	16
II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών	18
II.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου και κυρίαρχα χημικά είδη	18
II.2. Μορφές εδαφικού βορίου, πρόσληψη από το ριζικό σύστημα των ανώτερων φυτών και πρωτογενής διανομή του βορίου	20
II.3. Κατανομή του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο	21
II.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού	22
II.5. Ο ρόλος του βορίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών	23
II.5.1. Το βόριο συμμετέχει στην δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων	24
II.5.2. Το βόριο αποτελεί παράγοντα σταθερότητας και λειτουργικότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης	25
II.5.3. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των φυτών	27
II.5.4. Ο ρόλος του βορίου στην φωτοσυνθετική λειτουργία και την διανομή σακχάρων	27
II.5.5. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων	28
Σκοπός της εργασίας	29
Υλικά και Μέθοδοι	31
I. Φυτικό Υλικό και Περιγραφή των Συνθηκών Καλλιέργειας	31
I.1. Προετοιμασία του Φυτικού Υλικού και του Υποστρώματος Καλλιέργειας	31
I.2. Περιγραφή του Συστήματος Πειραματικής Υδροπονικής Καλλιέργειας	31
I.3. Συνθήκες Υδροπονικής Καλλιέργειας	33
II. Πειραματική Πορεία	34
II.1. Χρονοδιάγραμμα Πειράματος, Κατηγορίες Δειγμάτων και Πειραματικοί Χειρισμοί	34
II.2. Παράμετροι Ανάπτυξης και Βιοχημικές Παράμετροι	35
III. Τρόπος Διενέργειας Μετρήσεων	35
III.1. Μέτρηση Ενζυμικής Δραστηριότητας της PAL	35
III.2. Συγκέντρωση Βορίου	36
III.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων για Μέτρηση Ολικού Βορίου	36
III.2.2. Μέτρηση Συγκέντρωσης Βορίου μέσω Χρωματικής Αντίδρασης Αζωμεθίνης	36
III.3. Ανάλυση Φαινολικών	36
III.3.1. Ανάλυση Διαλυτών Φαινολικών	36
III.3.2. Ανάλυση Φαινολικών Υδρολύματος Κυτταρικών Τοιχωμάτων	37
III.3.3. Χρωματογραφική ανάλυση φαινολικών συστατικών	37
Αποτελέσματα	39
I.1. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα	39
I.2. Συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών και δραστηριότητα της PAL	41
I.3. Συγκέντρωση φαινολικών στα φύλλα	45
Συζήτηση	49

Περιεχόμενα

Βιβλιογραφία	51
Περίληψη	59

Πρόλογος

Το φυτό της ελιάς αποτελεί μια βασική καλλιέργεια για την ελληνική ύπαιθρο ενώ έχει συνδεθεί αδιάρρηκτα τόσο με την ιστορία της όσο και με την μυθολογία της. Το υπεραιώνιο αυτό φυτό αντανakλά μια αρχοντιά και αξιοπρέπεια. Στην πτυχιακή μου μελέτη είχα την χαρά να δουλέψω με αυτό αν και σε φυτά μικρής ηλικίας και να ασχοληθώ με την βιολογία και φυσιολογία τους έναν κλάδο αρκετά συναρπαστικό και συνάμα δύσκολο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη πρώτα από όλα για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό του, για την επίβλεψη και την διόρθωση της πτυχιακής μου μελέτης όσο και για την αμέριστη βοήθεια που παρείχε όποτε και να ζητήθηκε αυτή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Μπουράνη και τον επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Αϊβαλάκη για την συμμετοχή τους στην τριμελή Εξεταστική Επιτροπή και την διόρθωση της πτυχιακής μου μελέτης.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα και επιστημονικό μέλος του εργαστηρίου κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο για την πάσης φύσεως βοήθειά του αλλά και την μονίμως θετική αύρα την οποία διαθέτει όπως και την υποψήφια Διδάκτορα Σωτηρία-Βασιλική Σταυριανάκου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Γεώργιο Λιακόπουλο ο οποίος στάθηκε δίπλα μου σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου τόσο στο πειραματικό της σκέλος όσο και στην διαμόρφωση του θεωρητικού της υπόβαθρου. Η βοήθειά του ήταν σημαντική αλλά και ο τρόπος με τον οποίο την παρείχε ακόμα περισσότερο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βασιλεία Τσαγκαράκη για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας μέχρι και το τέλος της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την κα. Νούλη Σίψα, την υποψήφια Διδάκτορα Γεωργία Τουλιάτου, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βαρβάρα Ψαρούδη, τον προπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Παπαχρήστο αλλά και τον γεωπόνο Βαγγέλη Καρβώνη για την βοήθειά τους αλλά και το ευχάριστο κλίμα που καλλιέργησαν κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Θα ήθελα να αναφερθώ στην προσπάθεια όλων των μελών του εργαστηρίου που μου απέδειξαν ότι με ελλιπή χρηματοδότηση, κάνοντας ότι περνάει από τα χέρια τους, κατάφεραν να στήσουν ένα αξιόλογο εργαστήριο που δουλεύει με μεθοδικότητα ,καλλιεργώντας θετικό κλίμα πάντα προς τους φοιτητές κάτι που δεν θεωρείτε αυτονόητο στο Πανεπιστήμιό μας.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την βοήθειά και την υπομονή τους καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου, σε μέρες που αυτές πραγματοποιούνται ολοένα και πιο δύσκολα για πολλούς φοιτητές.

Εισαγωγή

I. Ανόργανη διατροφή φυτών

I.1. Βασικές αρχές

Τα πράσινα φυτά κατατάσσονται στους αυτότροφους οργανισμούς λόγω της ικανότητάς τους να φωτοσυνθέτουν, δεσμεύοντας ηλιακή ενέργεια και μετατρέποντας την σε χημική ενέργεια δεσμών με τελικό αποτέλεσμα τη σύνθεση οργανική ύλης από CO₂. Οι οργανισμοί αυτοί είναι ικανοί να διαβιούν σε ένα αποκλειστικά ανόργανο εδαφικό περιβάλλον λαμβάνοντας από αυτό μόνο νερό και ανόργανα άλατα. Τα απορροφούμενα ανόργανα συστατικά επέχουν ρόλο θρεπτικών στοιχείων και αντιπροσωπεύουν έναν από τους απαραίτητους πόρους για την κανονική ανάπτυξη των φυτών. Συγκεκριμένα, η ισορροπημένη τροφοδοσία των φυτών με ανόργανα θρεπτικά στοιχεία διαδραματίζει βασικό ρόλο στην φυσιολογία των φυτών με επίδραση στην απόδοσή τους και την επιτυχή ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου. Έτσι, σοβαρή έλλειψη σε ένα ή περισσότερα από αυτά μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ανάπτυξη και επιβίωσή τους (Δροσόπουλος, 1998). Η πρόσληψη και η αξιοποίηση των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από τους φυτικούς οργανισμούς δεν αποτελεί μόνο προϋπόθεση για την επιτυχημένη διαβίωση τους αλλά και μια σημαντική διαδικασία μέσω της οποίας η ύλη του αβιοτικού περιβάλλοντος προσφέρεται προς τους ετερότροφους οργανισμούς - καταναλωτές (Taiz and Zeiger, 1998).

Η πρόσληψη και η αξιοποίηση των ανόργανων συστατικών από τους φυτικούς οργανισμούς με την βοήθεια της ενέργειας του ήλιου είναι απαραίτητη τόσο για την ολοκλήρωση και την ομαλή διεξαγωγή του βιολογικού τους κύκλου όσο και για την προσφορά ανόργανων στοιχείων από το αβιοτικό περιβάλλον προς όλους τους ετερότροφους οργανισμούς - καταναλωτές (Taiz and Zeiger, 1998).

Τα βασικά ανόργανα θρεπτικά στοιχεία για τη δόμηση της φυτικής βιομάζας δηλαδή ο άνθρακας (C), το οξυγόνο (O) και το υδρογόνο (H) προσλαμβάνονται από το φυτό μέσω του CO₂ και του οξυγόνου της ατμόσφαιρας και του νερού του εδάφους. Τα παραπάνω στοιχεία απαντούν σε υψηλή περιεκτικότητα στα οργανικά μόρια του φυτικού σώματος όπως οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία προσλαμβάνονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων ως ιόντα από το εδαφικό διάλυμα με την βοήθεια της ρίζας (Δροσόπουλος, 1998).

Η ρίζα, ανάλογα με τη μορφολογία της, εκμεταλλεύεται μέρος του εδάφους από το οποίο μπορεί να αντλεί θρεπτικά στοιχεία. Ο εδαφικός όγκος που περιβάλλει τη ρίζα ονομάζεται ριζόσφαιρα και συνίσταται, όπως και το έδαφος στο σύνολό του, από τη στερεή φάση και τον ελεύθερο χώρο. Ο τελευταίος δημιουργείται από τους εδαφικούς πόρους, οι οποίοι καταλαμβάνονται, κατά περίπτωση, από αέρα ή νερό.

Εισαγωγή

Η στερεή φάση του εδάφους αποτελείται από ανόργανα σωματίδια, τα οποία λειτουργούν ως δεξαμενή θρεπτικών συστατικών, όπως καλίου, ασβεστίου, μαγνησίου και σιδήρου, αλλά και οργανικά υπολείμματα τα οποία αποδίδουν με την αποδόμησή τους στοιχεία όπως φώσφορο, άζωτο και θείο. Η υγρή φάση του εδάφους αποτελεί το εδαφικό διάλυμα του οποίου η σύσταση ποικίλει ανάλογα με το είδος και τα χημικά χαρακτηριστικά της στερεής φάσης και τις κλιματικές συνθήκες. Στο εδαφικό διάλυμα φέρονται διαλυμένα τα θρεπτικά στοιχεία προς άμεση απορρόφηση από το ριζικό σύστημα των φυτών (Γκανή – Σπυροπούλου, 2003α).

Παράγοντες που επηρεάζουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων είναι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, όπως η χημική σύσταση του μητρικού πετρώματος και ο ρυθμός αποσάθρωσής του, η λεπτή υφή του εδάφους, το pH, αλλά και οι επικρατούσες κλιματικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και ο αερισμός του εδάφους. Ακόμη ορισμένοι βιοτικοί παράγοντες όπως η δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εδάφους και η εγκατάσταση συμβιωτικών σχέσεων επηρεάζουν σημαντικά το είδος των θρεπτικών στοιχείων και τις ποσότητες οι οποίες είναι διαθέσιμες στα φυτά (Taiz and Zeiger, 1998).

1.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο φυτικό σώμα

Παρόλο που μια ολοκληρωμένη ανάλυση του φυτικού σώματος αποδίδει ένα μεγάλο αριθμό χημικών στοιχείων, μόνο εκείνα που εξασφαλίζουν την ομαλή ανάπτυξη του φυτού και παίρνουν μέρος στον μεταβολισμό του θεωρούνται απαραίτητα (Δροσόπουλος 1992). Για να χαρακτηριστεί ένα χημικό στοιχείο ως απαραίτητο θα πρέπει να πληρεί τα παρακάτω κριτήρια που θέσπισαν ο Arnon και Stout (1939):

- Το φυτό να μην μπορεί να αναπτυχθεί και να συμπληρώσει τον κύκλο ζωής του χωρίς την παρουσία του στοιχείου αυτού
- Το στοιχείο να μην μπορεί να αντικατασταθεί από άλλο και
- Το στοιχείο να συμμετέχει στην σύνθεση της ξηρής ουσίας η δράση του να είναι άμεση.

Με βάση τις παραπάνω προϋποθέσεις, καταρτίστηκε ο κατάλογος των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων ο οποίος περιλαμβάνει έως σήμερα 17 χημικά στοιχεία. Αυτά είναι τα παρακάτω 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), χλώριο (Cl) και τελευταία (Dalton, 1988) νικέλιο(Ni). Ορισμένα άλλα χημικά στοιχεία θεωρούνται χρήσιμα ή και απαραίτητα σε ιδιαίτερες ομάδες ανώτερων ή

κατώτερων φυτών όπως το νάτριο (Na), το κοβάλτιο (Co), το βανάδιο (V), το πυρίτιο (Si), το σελήνιο (Se), το γάλλιο (Ga), το αργίλιο (Al), το ιώδιο (I) και το τιτάνιο (Ti). Τα θρεπτικά αυτά στοιχεία επειδή δεν τυγχάνουν καθολικής απαίτησης ή επειδή η παρουσία τους είναι ευνοϊκή αλλά όχι καθοριστική για την ανάπτυξη ορισμένων φυτικών ειδών, δεν περιλαμβάνονται στον κατάλογο των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων. Τα στοιχεία αυτά αποτελούν την ομάδα των χρήσιμων ή ευεργετικών θρεπτικών στοιχείων (Δροσόπουλος 1998).

1.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού

Η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων μέσα στο εδαφικό διάλυμα ενός εδάφους που βρίσκεται στην υδατοϊκανότητά του, είναι ίση με το 1-10% των συνολικών και αντιστρεπτά δεσμευμένων ιόντων του εδάφους. Η πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων από τις ρίζες των φυτών γίνεται από μία περιοχή κοντά στο ριζικό σύστημα. Ο όγκος του εδάφους της περιοχής αυτής, από το εδαφικό διάλυμα της οποίας γίνεται η απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων, λέγεται όγκος ή ζώνη απορρόφησης.

Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους τα θρεπτικά ιόντα στο έδαφος μπορούν να φθάσουν στην επιφάνεια της ρίζας. Είτε με πρόσληψη με άμεση επαφή των ριζών με το έδαφος, είτε με διάχυση των ιόντων μέσω του εδαφικού διαλύματος, είτε τέλος με μετακίνηση των ιόντων μέσω μαζικής ροής μαζί με το εδαφικό διάλυμα (Δροσόπουλος 1992). Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο, η πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων γίνεται με απευθείας επαφή των ριζών με τη στερεά φάση του εδάφους χωρίς τη μεσολάβηση του εδαφικού διαλύματος. Τέτοια μορφή απορρόφησης λαμβάνει χώρα όταν νεαρές ρίζες έρχονται για πρώτη φορά σε επαφή με ανεκμετάλλευτα εδαφικά στρώματα. Η ποσότητα των θρεπτικών στοιχείων η οποία έρχεται σε άμεση επαφή με το ριζικό σύστημα αντιστοιχεί στην ποσότητα των ιόντων που υπάρχουν σε όγκο εδάφους ίσο με τον όγκο των ριζών. Κατά την διαδικασία της διάχυσης ένα ιόν κινείται από μία περιοχή υψηλής προς μία χαμηλότερης συγκέντρωσης. Καθώς η ταχύτητα απορρόφησης των θρεπτικών στοιχείων από τις ρίζες είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα ανανέωσης των ιόντων στο εδαφικό διάλυμα από τις ευρύτερες εδαφικές περιοχές, η ριζόσφαιρα μετατρέπεται σε περιοχή έντονης ζήτησης θρεπτικών στοιχείων με αποτέλεσμα να δημιουργείται μεγάλη διαφορά συγκεντρώσεων των αντίστοιχων ιόντων. Η διαφορά αυτή δημιουργεί τις προϋποθέσεις μετακινήσεως των ιόντων δια διαχύσεως προς την περιοχή της ριζόσφαιρας. Τέλος, η μαζική ροή αναφέρεται στη μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων και των άλλων διαλυμένων σωμάτων του εδαφικού διαλύματος μέσω της ροής του ύδατος προς τις ρίζες. Η συγκέντρωση

Εισαγωγή

κάθε στοιχείου γύρω από τη ρίζα εξαρτάται από το ισοζύγιο μεταξύ της απορρόφησης από την ρίζα και της αναπλήρωσης των ιόντων μέσω μαζικής ροής. Η μαζική ροή ευνοεί τη μετακίνηση των ευκίνητων θρεπτικών στοιχείων, εφόσον υπάρχουν σε επαρκείς συγκεντρώσεις στο έδαφος (Δροσόπουλος 1992).

Το επόμενο στάδιο της εισόδου και της μεταφοράς των ιόντων και του νερού από την επιφάνεια απορρόφησης και διαμέσου των κυττάρων της ρίζας (κατά ακτίνα κίνηση), περιλαμβάνει δύο εναλλακτικούς τύπους κίνησης. Την αποπλαστική και την συμπλαστική κίνηση οι οποίες πραγματοποιούνται στους αντίστοιχους χώρους. Ο αποπλαστικός χώρος περιλαμβάνει την υδατική φάση που εντοπίζεται στον χώρο μεταξύ των κυττάρων και εκείνη που είναι προσροφημένη στα κυτταρικά τοιχώματα, λόγω της παρουσίας των πόρων του πλέγματος των πολυμερών (Canny, 1995; Tattini et al., 1996). Ο συμπλασματικός χώρος περιλαμβάνει την κυτταροπλασματική συνέχεια μεταξύ των κυττάρων μέσω των πλασμοδεσμών. Η αποπλαστική κίνηση του νερού και των ιόντων χαρακτηρίζεται από μικρή αντίσταση επειδή γίνεται χωρίς την παρεμβολή του ζωντανού κυττάρου. Αντίθετα η συμπλασματική πορεία μέσω του ζωντανού κυτοπλάσματος από κύτταρο σε αποτελεί την οδό της μεγαλύτερης αντίστασης αλλά και αυτή του εξειδικευμένου ελέγχου αναφορικά με το είδος των μορίων τα οποία διακινούνται. Εσωτερικά του φλοιού της ρίζας και μέχρι την ενδοδερμίδα η μεταφορά του νερού διαφοροποιείται της μεταφοράς των ιόντων γεγονός το οποίο οφείλεται στον παραπάνω ασκούμενο έλεγχο (Δροσόπουλος 1992,1998).

1.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων

Τα θρεπτικά στοιχεία χωρίζονται σε δύο ομάδες τα μακροστοιχεία και τα ιχνοστοιχεία. Ο διαχωρισμός αυτός δεν στηρίζεται στη σπουδαιότητα των στοιχείων που απαρτίζουν την κάθε κατηγορία αλλά αφορά στο βαθμό απαίτησής τους από το φυτό. Ο διαχωρισμός αυτός έχει και διαβαθμίσεις και εντός των ομάδων. Έτσι, από τα μακροστοιχεία το άζωτο, ο φώσφορος και το κάλιο απαιτούνται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με το ασβέστιο, το μαγνήσιο και το θείο. Επίσης, και στα ιχνοστοιχεία υπάρχει αξιοσημείωτη διαβάθμιση όπου για παράδειγμα ο σίδηρος απαιτείται σε ποσότητες περίπου 2000 φορές υψηλότερες συγκριτικά με το μολυβδαίνιο. Κάθε θρεπτικό στοιχείο επιτελεί μια τουλάχιστον ειδική λειτουργία στο φυτικό μεταβολισμό. Τα μακροστοιχεία συμμετέχουν ως κατασκευαστικά συστατικά του κυττάρου, διατηρούν την κυτταρική οργάνωση και παίρνουν μέρος στις ενεργειακές μετατροπές και τις ενζυμικές αντιδράσεις. Με βάση τα παραπάνω, μια νεώτερη ταξινόμηση βασίζεται στο φυσιολογικό ρόλο που επιτελεί κάθε στοιχείο και διακρίνει τέσσερις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συμμετέχουν στοιχεία

όπως το άζωτο και το θείο των οποίων ο ρόλος είναι κυρίως δομικός. Στη δεύτερη ομάδα συμμετέχουν στοιχεία που παίρνουν μέρος στη διαχείριση της ενέργειας και τη δομική ακεραιότητα των κυττάρων. Τέτοια στοιχεία είναι ο φώσφορος και το βόριο. Η τρίτη ομάδα αφορά στοιχεία τα οποία κυρίως παραμένουν και δρουν υπό ιοντική μορφή όπως τα μεταλλικά στοιχεία κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, μαγγάνιο κ.λπ. Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει στοιχεία που συμμετέχουν στη ροή ηλεκτρονίων μέσω εξειδικευμένων ενζύμων όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και το μολυβδαίνιο.

Το κάθε θρεπτικό στοιχείο απαιτείται μέσα στο φυτικό σώμα σε μία οριακή συγκέντρωση η οποία εξασφαλίζει την απρόσκοπτη ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού. Η παρουσία του θρεπτικού στοιχείου σε συγκέντρωση μεγαλύτερη αυτής δεν επιδρά συνήθως θετικά στην αύξησή του. Αντίθετα, αν η συγκέντρωση ενός δεδομένου στοιχείου είναι υπερβολικά υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να εκδηλωθεί τοξικότητα. Τοξικά επίπεδα στις συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων σπάνια παρατηρούνται στα φυτά ωστόσο είναι πολύ συχνές οι τοξικές συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση ενός θρεπτικού στοιχείου είναι μικρότερη της οριακά απαιτούμενης καθίσταται περιοριστική για την αύξηση ή και επιβίωση του φυτού (Δροσόπουλος 1998).

1.5. Τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων

Όταν η συγκέντρωση σε κάποιο από τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία εντός του φυτού είναι μικρότερη των απαιτήσεων του φυτού τότε, εκδηλώνεται μια παθολογική κατάσταση, η οποία αναφέρεται με τον όρο τροφοπενία. Το αίτιο της έλλειψης μπορεί να είναι είτε η απουσία ικανών συγκεντρώσεων του θρεπτικού στοιχείου στο περιβάλλον της ρίζας, είτε, η αδυναμία απορρόφησής του από το ριζικό σύστημα λόγω ανταγωνισμού με άλλα στοιχεία, υποξίας, υψηλής αλλατότητας κ.α. Τα συμπτώματα μίας τροφοπενίας εμφανίζονται σε διάφορα όργανα όπως τα φύλλα, τα μεριστώματα και τα αναπαραγωγικά όργανα. Συνήθως, το σημείο εμφάνισης, καθώς και το είδος των συμπτωμάτων είναι χαρακτηριστικό για κάθε τροφοπενία, ενώ πολλές φορές τα συμπτώματα παρέρχονται μετά τη διόρθωση της συγκέντρωσης του αντίστοιχου θρεπτικού στοιχείου (Δροσόπουλος 1992).

Τα συμπτώματα είναι το αποτέλεσμα μεταβολικών διαταραχών που προκαλούνται από την ανεπάρκεια του υπεύθυνου θρεπτικού στοιχείου. Οι διαταραχές αυτές σχετίζονται με τον ρόλο που επιτελεί το θρεπτικό στοιχείο που βρίσκεται σε έλλειψη, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις τα συμπτώματα έχουν δευτερογενή

Εισαγωγή

αιτιολογία. Στην τελευταία περίπτωση, είναι πιθανό να οδηγηθούμε σε παραπλανητικές υποθέσεις όσον αφορά στο ρόλο που επιτελεί το αντίστοιχο θρεπτικό στοιχείο. Οι κυριότεροι φυσιολογικοί ρόλοι των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων συνοψίζονται στην κατασκευή βιομορίων και λοιπών κυτταρικών συστατικών, στην ενεργοποίηση ενζυμικών συστημάτων και στην ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης κυττάρων, ενώ τα περισσότερα στοιχεία επιτελούν επιπλέον του ενός ρόλου. Όταν μελετάμε την τοπολογία των συμπτωμάτων μια τροφοπενίας θα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη μας την κινητικότητα του υπό εξέταση θρεπτικού στοιχείου. Έτσι το άζωτο, ο φώσφορος και το κάλιο μπορούν να μετακινηθούν από τα ώριμα όργανα προς τα νεαρά, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται για τα δυσκίνητα στοιχεία όπως το βόριο, ο σίδηρος και το ασβέστιο. Συνεπώς, τα συμπτώματα των τροφοπενιών των στοιχείων της πρώτης κατηγορίας, αναμένονται στα παλαιότερα όργανα ενώ αυτών της δεύτερης στα νεότερα (Taiz and Zeiger, 1998).

1.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων

Η έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων κατά την περίοδο της ανάπτυξης συντελεί στην εμφάνιση καταπόνησης. Εντός ορίων, οι φυτικοί οργανισμοί διαθέτουν κατάλληλους προσαρμοστικούς μηχανισμούς οι οποίοι συμβάλουν στην ανθεκτικότητα έναντι του παράγοντα καταπόνησης. Η κινητοποίηση των μηχανισμών αυτών, προϋποθέτει, την αντίληψη και τη μεταγωγή κατάλληλων σημάτων τα οποία θα επάγουν την έκφραση των σχετικών γονιδίων και θα οδηγήσουν στις απαραίτητες μεταβολικές τροποποιήσεις. Αρχικά λαμβάνει χώρα η αντίληψη του ερεθίσματος μέσω εξειδικευμένων δεκτών ή αισθητήρων, οι οποίοι μεταβάλλοντας ορισμένες ιδιότητές του, σηματοδοτούν την έναρξη μίας ακολουθίας διαδικασιών προς την κατεύθυνση της διατήρησης της ομοιόστασης και της βέλτιστης απόδοσης. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της μεταγωγής όπου περιλαμβάνει όλα τα γεγονότα τα οποία μεσολαβούν από την αντίληψη του ερεθίσματος έως την εμφάνιση της απάντησης η οποία κατά κανόνα εξαρτάται από το μέγεθος της έντασης του ερεθίσματος (Καραμπουρνιώτης 2003). Σε συνθήκες έλλειψης ενός θρεπτικού στοιχείου, τα φυτά ενισχύουν τους μηχανισμούς πρόσληψης από το ριζικό σύστημα ώστε να εξασφαλίζουν επαρκείς ποσότητες του στοιχείου παρά την περιορισμένη διαθεσιμότητά του στο εδαφικό διάλυμα. Οι μηχανισμοί αυτοί ποικίλουν από τις ανατομικές αλλαγές σε επίπεδο οργάνου όπως η ανάπτυξη πλάγιων ριζών και πολυάριθμων ριζικών τριχιδίων έως τις βιοχημικές τροποποιήσεις με αύξηση των κατάλληλων μεμβρανικών πρωτεϊνών

στα κύτταρα του ριζικού συστήματος (Marschner, 1995). Σε γενικές γραμμές οι αντιδράσεις των φυτών συμβάλλουν στα παρακάτω:

α) Στην ενίσχυση της λειτουργίας των μηχανισμών πρόσληψης των θρεπτικών στοιχείων καθώς και στην τροποποίηση του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας. Σε συνθήκες έλλειψης ενός θρεπτικού στοιχείου αυξάνεται ο ρυθμός άντλησής του από το ριζικό σύστημα, ρύθμιση η οποία συνήθως δεν επιφέρει μείωση του ρυθμού απορρόφησης των άλλων θρεπτικών στοιχείων. Ο ρυθμός μπορεί να ενισχυθεί αυξάνοντας τις θέσεις δέσμευσης, με σύνθεση μεταφορέων, αλλά και αυξάνοντας την δραστηριότητα των ήδη υπαρχόντων. Παράδειγμα τροποποίησης του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας είναι η έκκριση ουσιών για την διαμόρφωση ευνοϊκής εδαφικής μικροχλωρίδας ή η έκκριση εξωκυτταρικών υδρολυτικών ενζύμων για την αύξηση της διαθεσιμότητας φωσφορικών ιόντων.

β) Στην αλλαγή του προτύπου χρησιμοποίησης των διαθέσιμων ποσοτήτων θρεπτικών στοιχείων. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί των φυτών περιλαμβάνουν μειωμένη εναπόθεση στο χυμοτόπιο του στοιχείου που βρίσκεται σε έλλειψη. Η διαχείριση αυτή αφορά σε θρεπτικά στοιχεία που αποθηκεύονται στο κυτταρόπλασμα ή στο χυμοτόπιο και σε θρεπτικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση της οσμωτικής ισορροπίας των κυττάρων ή σε στοιχεία τα οποία συμμετέχουν σε μόρια του δευτερογενούς μεταβολισμού όπως το άζωτο. Σε επίπεδο πρωτογενούς μεταβολισμού, οι δυνατότητες της τροποποίησης του προτύπου χρήσης των θρεπτικών στοιχείων είναι εξαιρετικά περιορισμένες αφού δεν υπάρχουν εναλλακτικοί τρόποι χρήσης τους (Aerts and Chapin III, 2000).

γ) Στην κινητοποίηση αποθεμάτων από ώριμα όργανα σε συνθήκες ανεπάρκειας θρεπτικών στοιχείων τα φυτά μπορούν να αποδώσουν ορισμένες ποσότητες θρεπτικών στοιχείων από παλαιότερα όργανα σε αναπτυσσόμενα τα οποία έχουν αφενός αυξημένες απαιτήσεις και αφετέρου θεωρούνται πολυτιμότερα για τα φυτά. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ορισμένων συμπτωμάτων κυρίως τροφопενιών θρεπτικών στοιχείων με υψηλή κινητικότητα, πρώτιστα στα παλαιότερα όργανα και στη συνέχεια στα νεαρά. Με τον τρόπο αυτό εξοικονομούνται άμεσα πόροι και δίνεται προτεραιότητα στην ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού.

δ) Στην αλλαγή του προτύπου ανάπτυξης με μείωση του ρυθμού αύξησης ή τροποποίησης του λόγου υπέργειου προς υπόγειο μέρος. Στην περίπτωση αυτή δίδεται προτεραιότητα στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος σε σχέση με το

Εισαγωγή

υπέργειο τμήμα του φυτού, με σκοπό να φθάσει σε νέους και ανεξερευνήτους εδαφικούς όγκους αυξάνοντας την συνολική απορροφητική ικανότητα του φυτού σε σχέση με τις συνολικές απαιτήσεις. Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων εκτός της στρατηγικής ανάπτυξης του ριζικού συστήματος παρατηρείται εκ των πραγμάτων περιορισμός της ανάπτυξης λόγω παρεμπόδισης των κυτταρικών διαιρέσεων. Το γεγονός αυτό αποτελεί από μόνο του μια απάντηση στην έλλειψη δεδομένου ότι η μείωση της βιομάζα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης δεδομένων ποσοτήτων ενός θρεπτικού στοιχείου λόγω συμπύκνωσης (Larcher, 1995).

1.5.2. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη και τον πρωτογενή μεταβολισμό των ανώτερων φυτών

Η έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων επιδρά άμεσα ή έμμεσα στον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών. Με δεδομένη την φυσιολογική λειτουργία του κάθε στοιχείου, ενδεχόμενη έλλειψή του επηρεάζει άμεσα τις λειτουργίες οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ορισμένων διαταραχών όπως η αδυναμία σύνθεσης των συστατικών στα οποία συμμετέχει το υπό έλλειψη στοιχείο, η δυσλειτουργία ενζυμικών συστημάτων, ή η απώλεια της λειτουργικότητας των μεμβρανών που προκαλεί διαταραχή στην διαμερισματοποίηση του κυττάρου και της ομοιόστασής του (Taiz and Zeiger, 1998).

Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων επηρεάζει ποικιλοτρόπως τη φωτοσυνθετική λειτουργία. Ορισμένα θρεπτικά στοιχεία εμπλέκονται άμεσα στη φωτοσυνθετική διαδικασία, όπως το άζωτο (Marschner, 1995), το μαγνήσιο και το μαγγάνιο (Longnecker, 1994), ενώ άλλα επηρεάζουν έμμεσα τη φωτοσύνθεση μέσω της καταστολής της ανάπτυξης και της διαταραχής στη διανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων. Εκτός αυτού, η τροφοπενία ορισμένων θρεπτικών στοιχείων επηρεάζουν την βιοσύνθεση των υδατανθράκων και των αμινοξέων. Η τροφοπενία αζώτου π.χ. ευνοεί την βιοσύνθεση υδατανθράκων εις βάρος των αμινοξέων (Logan et al. 1999 ; Price and Rhodes, 1997; Cakmak et al., 1994).

1.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στον δευτερογενή μεταβολισμό

Ο δευτερογενής μεταβολισμός επηρεάζεται καθοριστικά από παράγοντες καταπόνησης, είτε βιοτικούς είτε αβιοτικούς όπως οι τροφοπενίες. Σύμφωνα με την θεωρία της ισορροπίας άνθρακα\θρεπτικών στοιχείων, το είδος και η ποσότητα των

μεταβολιτών που συνθέτει ένα φυτό εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των πόρων και συγκεκριμένα την ισορροπία μεταξύ παραγωγής οργανικού άνθρακα και διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Τα μόρια των δευτερογενών μεταβολιτών διαχωρίζονται σε αυτά που έχουν ως κύριο δομικό συστατικό τον άνθρακα (φαινολικά συστατικά και τερπένια) και σε εκείνα που περιλαμβάνουν άζωτο (κυρίως αλκαλοειδή). Έτσι, ανάλογα το είδος της τροφопενίας, περιορίζεται η βιοσύνθεση της αντίστοιχης τάξης μεταβολικών προϊόντων (Bryan et al., 1983; Hamilton et al., 2001). Μια δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι οι πόροι που είναι διαθέσιμοι κάθε στιγμή στα φυτά κατανέμονται πρωταρχικά για την ανάπτυξή τους, και εναλλακτικά σε αμυντικούς μηχανισμούς, όπου κύριο ρόλο διαδραματίζουν οι δευτερογενής μεταβολίτες (Herms and Mattson, 1992). Τέλος, μια τρίτη θεωρία αναφέρεται στο γεγονός ότι η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών σχετίζεται με την συνύπαρξη των φυτικών ειδών με τους βιοτικούς εχθρούς τους (Hamilton et al., 2001).

Είναι πάντως κοινά αποδεκτό ότι κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας θρεπτικών στοιχείων, η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αυξάνεται (Gershenzon, 1984; Chou, 1999; Inderjit and del Moral, 1997; Chishaki and Horiguchi, 1997) φαινόμενο που είναι ιδιαίτερα τεκμηριωμένο στην περίπτωση των φαινολικών συστατικών (Gershenzon, 1984; Haukioja et al., 1998; Dixon and Paiva, 1995). Σε φυτά ελιάς (*Olea europaea* L.) υπό ανεπάρκεια βορίου παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο αύξηση της συσσώρευσης των φαινολικών στοιχείων στα φύλλα, από 1.7 έως 5.8 φορές ανάλογα την ηλικία του φύλλου, σε σχέση με τα φυτά που καλλιεργήθηκαν παρουσία ικανοποιητικών ποσοτήτων βορίου (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005).

II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών

Το βόριο ανήκει στην κατηγορία των μικροστοιχείων και θεωρείται πλέον ευεργετικό έως απαραίτητο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Fort et al., 1998; Bennett et al., 1999; Rowe and Eckhert, 1999; Nielsen, 2000). Ειδικότερα στα ανώτερα φυτά, το βόριο είναι τεκμηριωμένα απαραίτητο για την ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου (Gupta 1979; Shorocks 1997). Ο φυσιολογικός ρόλος του βορίου δεν είναι πλήρως κατανοητός (Goldbach, 1997) και ένα μεγάλο μέρος της γνώσης μας προέρχεται από την παρατήρηση των συμπτωμάτων των φυτών υπό τροφοπενία βορίου. Ανάμεσα στους διάφορους φυσιολογικούς ρόλους που μελετώνται, εκείνοι της συμμετοχής του στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και στη δομική ακεραιότητα των πλασματικών μεμβρανών, θεωρούνται οι περισσότερο τεκμηριωμένοι (Δροσόπουλος, 1998). Υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, το μεγαλύτερο ποσοστό του στοιχείου σε επίπεδο κυττάρου εντοπίζεται προσδεμένο στο κλάσμα των πηκτινικών πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ υπό συνθήκες επάρκειας ένα ποσοστό της τάξης του 60% του ολικού βορίου μπορεί να βρίσκεται υπό διαλυτή μορφή στον κυτταρικό χυμό (Pfeffer et al., 1997; Hu and Brown, 1994). Η τροφοπενία βορίου επιφέρει πληθώρα αλλαγών στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων, στην δομή και λειτουργία των μεμβρανών και στον δευτερογενή μεταβολισμό με την υπερπαραγωγή μορίων κυρίως της κατηγορίας των φαινολικών συστατικών (Cakmak and Romheld 1997; Goldbach, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998).

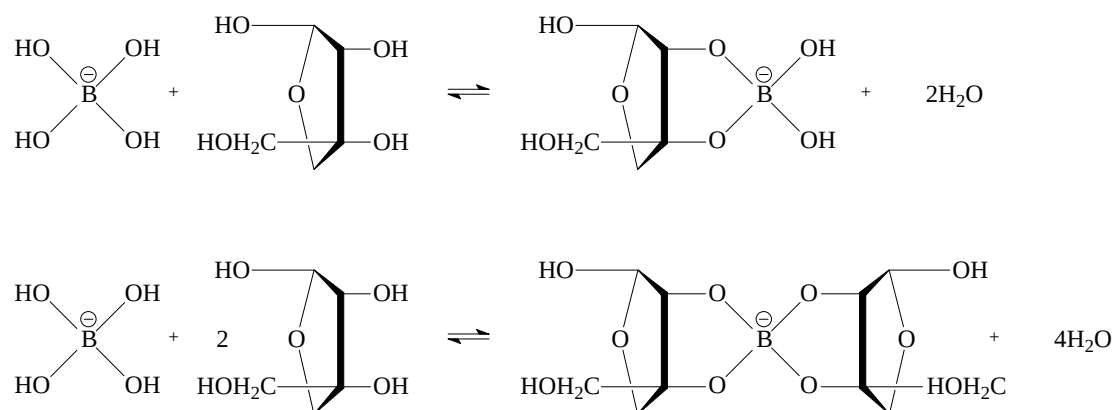
Γίνεται πλέον όλο και περισσότερο κατανοητό ότι όλες οι λειτουργίες του βορίου στα φυτά, όχι μόνο οι γνωστές αλλά και οι πιθανές άγνωστες έως σήμερα, οφείλονται στις ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες του βορίου υπό την μορφή με την οποία απαντάται στα κύτταρα, αυτή του βορικού οξέος και ιδιαίτερα η ιδιότητα του τελευταίου να σχηματίζει σύμπλοκα με μία μεγάλη ποικιλία σημαντικών μορίων του κυττάρου.

II.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου και κυρίαρχα χημικά είδη

Το βόριο ανήκει στη κατηγορία των μεταλλοειδών και είναι το μοναδικό μικροστοιχείο με σταθερό σθένος $+3$ και πολύ μικρή ιοντική ακτίνα (Δροσόπουλος, 1992). Λόγω του υψηλού δυναμικού ιονισμού, το βόριο δεν απαντάται ως ιόν B^{+3} , (Power and woods, 1997) ενώ η κύρια μορφή με την οποία το βόριο παρουσιάζεται σε βιολογικά διαλύματα είναι αυτή του βορικού οξέος. Στα υδατικά διαλύματα είναι ασθενές οξύ κατά Liewes με pK_a 9.24, στους 25 °C. Στο κυτταρόπλασμα, περισσότερο από το 98 % του βορικού οξέως βρίσκεται υπό

αδιάστατη μορφή και λιγότερο από το 2 % ως βορικό ανιόν ενώ στον αποπλαστικό χώρο όπου το pH είναι χαμηλότερο, το ποσοστό του αδιάστατου βορικού οξέος φθάνει το 99.95 %. Τόσο το βορικό οξύ όσο και το βορικό ανιόν έχουν την δυνατότητα να αντιδρούν αυθόρμητα στο κυτταρικό περιβάλλον με ποικίλα βιομόρια με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του δεσμευμένου βορικού οξέως, να υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη της ελεύθερης μορφής του (Woods, 1996). Σε πολύ υψηλές τιμές pH, το βόριο εμφανίζεται σε πολυπλοκότερες μορφές όπως $B_2O(OH)_6^{2-}$, $B_3O_3(OH)_4^-$ και $B_4O_5(OH)_4^{2-}$ (Power and Woods, 1997). Στο κυτταρικό περιβάλλον το ελεύθερο βόριο εμφανίζεται ως αδιάστατο βορικό οξύ $B(OH)_3$ ή βορικό ανιόν $B(OH)_4^-$ (Woods, 1996).

Τα σύμπλοκα του βορικού οξέος σχηματίζονται με τη δημιουργία εστέρων με μόρια τα οποία διαθέτουν υδροξύλια σε γειτονικούς άνθρακες υπό cis-διαμόρφωση (εικόνα 1). Πρόκειται για αυθόρμητες αντιδράσεις με ταχεία κινητική, των οποίων η χημική ισορροπία εξαρτάται από την τιμή του pH και το είδος του υποκαταστάτη (Van Duin et al., 1984; Makkee et al., 1985; Shvarts et al., 2005). Καθώς στις παραπάνω αντιδράσεις συμμετέχουν δύο εστερικοί δεσμοί, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα είναι κυκλικοί διεστέρες. Επιπλέον, λόγω της ύπαρξης τεσσάρων υδροξυλίων στο βορικό ανιόν, μπορούν να προκύψουν τόσο μόνο- όσο και δι- διεστερικά σύμπλοκα ενώ τα τελευταία είναι και τα συχνότερα. Υποκαταστάτες ικανοί να σχηματίζουν σύμπλοκα με το βορικό οξύ είναι τα σάκχαρα και παράγωγά τους, σακχαροαλκοόλες, αλειφατικές και κυκλικές πολυαλκοόλες, υδροξυοξέα, γλυκοπρωτεΐνες, διφαινόλες και ορισμένα αμινοξέα (Tate and Meinster, 1978; Power and Woods, 1997; Dembitsky et al., 2002).



Εικόνα 1. Σχηματισμός διεστερικών συμπλόκων μεταξύ του βορικού ανιόντος και της απιόξης. *Πάνω:* σχηματισμός μονο-υποκατεστημένου συμπλόκου του βορικού οξέος με απιόξη, *Κάτω:* σχηματισμός δι-υποκατεστημένου συμπλόκου του βορικού οξέος με απιόξη.

II.2. Μορφές εδαφικού βορίου, πρόσληψη από το ριζικό σύστημα των ανώτερων φυτών και πρωτογενής διανομή του βορίου

Το βόριο βρίσκεται στο έδαφος σε πέντε μορφές: (α) ως συστατικό των πρωτογενών ορυκτών, (β) ως συστατικό των δευτερογενών ορυκτών, (γ) προσροφημένο στην άργιλο, στην οργανική ουσία και σε ένυδρα οξείδια, (δ) ως διαλυτό βόριο στο εδαφικό διάλυμα και (ε) ως αφομοιωμένο από την βιομάζα. Συνήθως το διαλυτό βόριο, το οποίο αντιπροσωπεύει και τη διαθέσιμη μορφή για τα φυτά, αποτελεί το 10 % του συνολικού εδαφικού βορίου (Power, 1997).

Η πρόσληψη του βορίου από τις ρίζες των φυτών γίνεται με δύο τρόπους, μέσω παθητικής (Dorbas et. al., 2000; Stangoulis et al., 2001) και μέσω ενεργού μεταφοράς (Dannel et al., 2001). Κατά τους Dannel et al., 2002, υπό καθεστώς επαρκούς διαθεσιμότητας βορίου, η πρόσληψη επιτελείται αποκλειστικά μέσω παθητικής μεταφοράς. Μέχρι και πριν μια δεκαετία η παθητική μεταφορά θεωρούνταν ως ο μοναδικός μηχανισμός πρόσληψης βορίου από τα φυτά. Αυτό υποστηρίχθηκε από το γεγονός ότι σε φυσιολογικές τιμές pH του εδάφους, το βορικό οξύ εμφανίζει υψηλή περατότητα διαμέσου της διλιπιδιακής στρώσης των φωσφορολιπιδίων των πλασματικών μεμβρανών, η οποία θεωρείται ικανή να καλύψει τις τυπικές απαιτήσεις ενός φυτού σε βόριο (Hu and Brown, 1997). Ο ρυθμός πρόσληψης βορικού οξέος μέσω παθητικής μεταφοράς μπορεί να είναι ακόμα μεγαλύτερος με τη βοήθεια πρωτεϊνικών καναλιών όπως αποδείχθηκε πρόσφατα με την έκφραση της PIP1, μιας πρωτεΐνης μεταφοράς της οικογένειας των MIP (Major Intrinsic Proteins), σε ώρια *Xenopus laevis* (Dordas et al., 2000). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στη διαμεμβρανική μεταφορά βορικού οξέος παίζει η λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης όπως η περιεκτικότητα σε στερόλες και η δομή των φωσφορολιπιδίων συμπεριλαμβανομένων των αλυσίδων των ακυλίων των λιπιδίων (Dordas and Brown, 2000; Dordas et al., 2000). Τέλος η πρόσληψη βορικού οξέος μέσω παθητικής μεταφοράς από τα κύτταρα της ρίζας μπορεί να επηρεάζεται από το σχηματισμό συμπλόκων του βορικού οξέος με μόρια του κυτταρικού περιβάλλοντος. Το φαινόμενο αυτό είναι ικανό να αλλάζει τη διαβάθμιση συγκεντρώσεων μεταξύ των δύο πλευρών της πλασματικής μεμβράνης η οποία με τη σειρά της επηρεάζει το ρυθμό μεταφοράς του βορίου (Brown and Hu, 1994 ; Brown and Shelp, 1997).

Η ύπαρξη της παθητικής μεταφοράς ως μοναδικού μηχανισμού πρόσληψης βορικού οξέος ήταν ικανή να ερμηνεύσει την πλειονότητα των πειραματικών αποτελεσμάτων αλλά όχι και το σύνολό τους. Μια σειρά αποτελεσμάτων από *in vitro* πειράματα αλλά και αποτελεσμάτων σύμφωνα με τα οποία σημειώνονται διαφορές στην πρόσληψη βορικού οξέος μεταξύ φυτών διαφορετικών γονοτύπων,

τα οποία αναπτύσσονταν κάτω από παρόμοιες συνθήκες, δεν μπορούσαν να ερμηνευτούν από την παραδοχή της παθητικής μεταφοράς ως μοναδικού μηχανισμού πρόσληψης του βορικού οξέος. Ως πιθανή εξήγηση για τα παραπάνω προτάθηκε η ύπαρξη μηχανισμών ενεργού μεταφοράς οι οποίοι κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη βορικού οξέος (Huang and Graham, 1990 ; Hu and Brown, 1997). Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη μηχανισμού μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ανάπτυξη συγκεντρώσεων βορικού οξέος υψηλότερη από την προβλεπόμενη μέσω παθητικής μεταφοράς δόθηκαν από τους Dannel et al. (1997). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του βορικού οξέος στην ρίζα και τον ανιόντα χυμό του ηλίανθου ήταν 22 φορές υψηλότερη από αυτή του εξωτερικού διαλύματος. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι ο μηχανισμός αυτός αδρανοποιείται 24 ώρες μετά τη μεταφορά του φυτού σε περιβάλλον επαρκές σε βόριο (Pfeffer et al., 1999). Προτάθηκε ότι η ανάπτυξη υψηλών συγκεντρώσεων βορικού οξέος είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας ενός μηχανισμού ενεργού μεταφοράς ο οποίος επάγεται μετά τον εγκλιματισμό του φυτού σε περιβάλλον με χαμηλές συγκεντρώσεις βορικού οξέος και ότι η λειτουργία αυτού ή ανάλογων μηχανισμών είναι απαραίτητη για την κάλυψη των αναγκών των φυτών σε περιβάλλον ελλειμματικό σε βόριο (Brown et al. 2002; Dannel et al. 2002). Πλέον, αρκετές εργασίες υποδεικνύουν την ύπαρξη μηχανισμών ανάπτυξης υψηλών συγκεντρώσεων βορικού οξέος οι οποίοι εδράζουν στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας ή στα σημεία φόρτωσης των αγγείων του ξύλου (Dannel et al. 2002; Stavrianakou et al., 2006). Τελικά, η βιοχημική φύση ενός ανάλογου μηχανισμού διευκρινίστηκε στο φυτό *Arabidopsis thaliana* από τους Takano et al. (2002). Πρόκειται για έναν διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό μεταφορέα των κυττάρων του περικυκλίου της ρίζας ο οποίος λειτουργεί με κατανάλωση μεταβολικής ενέργειας. Η ύπαρξη ανάλογων μηχανισμών φαίνεται πως αφορά την πλειονότητα αν όχι το σύνολο των φυτικών ειδών.

II.3. Κατανομή του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο

Μέχρι προσφάτως η μελέτη του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο ήταν αδύνατη λόγω της περιορισμένης δυνατότητας ανίχνευσής του σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά και της έλλειψης ραδιενεργών ισοτόπων που θα μας επέτρεπαν την μελέτη της ροής του βορίου μεταξύ κυτταρικών διαμερισμάτων (Sah and Brown, 1997). Στα κύτταρα, το βόριο απαντάται ως βορικό οξύ σε δύο μορφές, ως αδιάλυτο και ως διαλυτό σε υδατικά μέσα (Pfeffer et al., 1997; Dannel et al., 1998). Το αδιάλυτο βόριο φαίνεται πως είναι ισχυρά προσδεμένο με τα πολυμερή των

Εισαγωγή

κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι Brown and Hu (1994), αναφέρουν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του βορίου των κυττάρων αντιπροσωπεύεται από το αδιάλυτο κλάσμα το οποίο είναι μη ανταλλάξιμο και δεν μπορεί να παραληφθεί με εκχύλιση. Το βόριο του κυτταρικού χυμού αντιπροσωπεύει το διαλυτό βόριο του συμπλάστη και δευτερευόντως της υγρής φάσης του αποπλαστικού χώρου. Το διαλυτό βόριο μπορεί να συμμετέχει σε φυσιολογικές διεργασίες τόσο σε επίπεδο κυττάρου, όσο και σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού (Dannel et al., 1998; Dannel et al. 2001).

Το βόριο φαίνεται ότι δεν απαντάται αποκλειστικά σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα αλλά και με βάση τα χημικά χαρακτηριστικά του βορικού οξέος (σχετικά υψηλή περατότητα διαμέσου πλασματικών μεμβρανών, αντιδράσεις με πολυόλες, έλλειψη αδιάλυτων αλάτων), θεωρείται ότι απαντά σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Η διαμερισματοποίηση του βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα, τον αποπλαστικό χώρο, το κυτταρόπλασμα και το χυμοτόπιο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος του ιστού, το φυτικό είδος και την εξωτερική τροφοδοσία με βόριο. Έτσι, τα υδρόφυτα εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό του συνολικού βορίου εντοπισμένο στα κυτταρικά τοιχώματα έναντι των μεσόφυτων και αντίστοιχα τα μονοκότυλα έναντι των δικότυλων (Dannel et al., 2002). Ένα σημαντικό ποσοστό του βορίου προσδένεται στο πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος, ιδιαίτερα σε συνθήκες ελλειμματικής τροφοδοσίας (Loomis and Durst, 1992 ; Matoh et al., 1993; Hu and Brown, 1994; Dannel et al., 2002). Υπό τις συνθήκες αυτές, το ελεύθερο βόριο του αποπλαστικού χώρου μειώνεται δραματικά (Pfeffer et al., 2001). Αντίθετα, υπό συνθήκες επάρκειας, ποσοστό πλέον του 60% του κυτταρικού βορίου απαντάται σε διαλυτή μορφή (Pfeffer et al., 1997; Hu and Brown, 1994).

II.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού

Η κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού επηρεάζεται σημαντικά από τη δυνατότητα επαναδιανομής του εντός του φυτικού σώματος, διαδικασία που παρουσιάζει αποκλίσεις ανάλογα με το φυτό. Συνήθως, η συγκέντρωση βορίου στο υπέργειο μέρος αυξάνεται με την πορεία της ωρίμανσης των οργάνων με αποτέλεσμα τα παλαιότερα φύλλα να εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα νεότερα. Η παραπάνω εικόνα είναι χαρακτηριστική φυτών με μικρή ικανότητα επαναδιανομής του στοιχείου. Αντίθετα, σε φυτικά είδη στα οποία το βόριο είναι ευκίνητο, το παραπάνω φαινόμενο αντιστρέφεται (Brown and Shelp, 1997). Σε συνθήκες επάρκειας του στοιχείου, οι συγκεντρώσεις του στην ρίζα είναι χαμηλότερες από εκείνες του υπέργειου μέρους, πρότυπο το οποίο αλλάζει δραματικά σε συνθήκες μειωμένης εξωτερικής τροφοδοσίας του στοιχείου

(Stavrianakou et al., 2006b). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να σχετίζεται με την λόγω θέσης προτεραιότητα που έχουν οι ιστοί τις ρίζες όσον αφορά στην κάλυψη των αναγκών τους σε βόριο σε σχέση με το υπέργειο μέρος. Ιδιαίτερα πλούσιοι σε βόριο είναι οι ιστοί των αναπαραγωγικών οργάνων. Ακόμα και στα αγρωστώδη, των οποίων οι ανάγκες της βλαστητικής φάσης είναι αξιοσημείωτα χαμηλές, οι απαιτήσεις σε βόριο αυξάνονται κατακόρυφα κατά την αναπαραγωγική φάση (Loomis and Durst, 1992 ; Brown et al., 2002).

II.5. Ο ρόλος του βορίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών

Οι επιπτώσεις της έλλειψης βορίου σχετίζονται με τον δομικό του ρόλο και προκύπτουν από την απώλεια της κυτταρικής ομοιόστασης. Παρόλο που έως σήμερα δεν έχει διαπιστωθεί κάποια άμεση συμμετοχή του βορίου στον πρωτογενή μεταβολισμό, πιστεύεται πως ορισμένα ένζυμα όπως η ουρεάση (Thellier et al., 1979) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το βορικό οξύ. Ωστόσο, η διευκρίνιση του ακριβούς ρόλου του βορίου στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης παραμένει ελλιπής. Για παράδειγμα, η έλλειψη βορίου στο φυτό *Prunus salicina* παρεμποδίζει πλήρως την ανάπτυξη των νέων ιστών αλλά οι ήδη ανεπτυγμένοι ιστοί παραμένουν λειτουργικοί και χωρίς συμπτώματα για μία τουλάχιστον εβδομάδα υπό πλήρη απουσία βορίου (Brown and Hu, 1997). Επίσης, όπως αναφέρουν οι Fleischer et al. (1999) σε πειράματα συνεχούς καλλιέργειας κυττάρων του φυτού *Chenopodium album* σε μέσο καλλιέργειας με μηδενική συγκέντρωση βορίου, το βόριο είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων μετά τη μετάβασή τους στη στατική φάση. Συγκεκριμένα, απουσία βορίου τα κύτταρα παρουσιάζουν ευπαθή κυτταρικά τοιχώματα με μεγάλο μέγεθος πόρων. Τέτοια κύτταρα τελικά διαρρηγνύονται εάν δεν προστεθεί στο μεταξύ βόριο στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Αντίθετα, το βόριο δεν ήταν απαραίτητο για την συνεχή, πέραν του ενός έτους, καλλιέργεια των κυττάρων με την προϋπόθεση της διατήρησής τους σε φάση συνεχών διαιρέσεων. Το γεγονός αυτό είναι εντυπωσιακό από την άποψη ότι μηδενικές ή έστω συγκεντρώσεις βορίου μικρότερες της τάξης του μM δεν παρεμποδίζουν την διαίρεση και ανάπτυξη των κυττάρων. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι πραγματικές απαιτήσεις του συμπλάστη είναι ελάχιστες συγκριτικά με αυτές του κυττάρου και οπωσδήποτε άγνωστες έως σήμερα (Fleischer et al., 1998; Fleischer et al., 1999).

Οπωσδήποτε, ο δομικός ρόλος του βορίου στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα είναι καθοριστικός για την κανονική ανάπτυξη των κυττάρων. Η έλλειψη βορίου προκαλεί παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των κυττάρων σε αναπτυσσόμενους

Εισαγωγή

ιστούς (Hu and Brown, 1994). Σε όλα τα φυτά, η ανάπτυξη των μεριστωματικών ιστών εξαρτάται από την ομαλή τροφοδοσία τους σε βόριο. Σε περιπτώσεις σοβαρής έλλειψης του στοιχείου, μπορεί να παρατηρηθεί ολική νέκρωση του κορυφαίου μεριστώματος, ενώ τα φύλλα δεν εκπτύσσονται πλήρως, λαμβάνοντας ακανόνιστα σχήματα (Pilbeam and Kirkby, 1983; Hu and Brown, 1994; Huang *et al.*, 1996) και αποκτούν αρχικά σκούρο πράσινο χρώμα και ακολούθως καστανούς χρωματισμούς (Dell and Huang, 1997; Marschner, 1995). Σε ορισμένες περιπτώσεις η τροφοπενία βορίου προκαλεί ανωμαλίες στην ανάπτυξη των αγγείων του ξύλου και των στοιχείων του ηθμού (Dell and Huang, 1997).

II.5.1. Το βόριο συμμετέχει στην δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων

Σημαντικό ποσοστό του βορίου εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα (Hu and Brown, 1994). Το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει το 95-98% του συνολικού κυτταρικού βορίου σε περιπτώσεις ανεπαρκούς τροφοδοσίας (Loomis and Durst, 1992; Matoh *et al.*, 1993; Hu and Brown, 1994; O'Neil *et al.*, 2001). Ωστόσο τα παραπάνω ποσοστά εξαρτώνται από το είδος του φυτού και τις ιδιαίτερες απαιτήσεις του σε βόριο (Hu *et al.*, 1996; Matoh *et al.*, 1996). Με βάση τα παραπάνω αλλά και τις επιπτώσεις της έλλειψης βορίου στην ανάπτυξη των νέων ιστών, υποτέθηκε ότι η παρουσία του βορίου είναι απαραίτητη για την ομαλή συγκρότηση και λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος (Hu and brown, 1994). Η υπόθεση αυτή είχε αρχικά ως πεδίο αναφοράς κυρίως οργανισμούς των οποίων τα κυτταρικά τοιχώματα είναι πλούσια σε υδατάνθρακες (Lewis D., 1980; Loomis and Durst, 1992). Ακολούθως, διαπιστώθηκε ότι η τροφοπενία βορίου σχετίζεται με αλλοιώσεις της λεπτής δομής και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του κυτταρικού τοιχώματος και του μεσοτοιχείου (Hu and Brown, 1994; Loomis and Durst, 1992). Αυτές συνίστανται στην διόγκωση (Matoh *et al.*, 1992), την ακανόνιστη εμφάνιση και την αδρή υφή των κυτταρικών τοιχωμάτων (Hu and Brown, 1994; Matoh *et al.*, 1992). Οι αλλοιώσεις στη λεπτή δομή συνοδεύονται και από βραχυπρόθεσμες (Findelee *et al.*, 1997) αλλά και μακροπρόθεσμες (Hu and Brown, 1994) αλλαγές στα μηχανικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων, όπως στη ελαστικότητα (Findelee *et al.*, 1997) και διάμετρο των πόρων αλλά και στην υδραυλική αγωγιμότητα των κυττάρων (Findelee *et al.*, 1997). Επιπλέον, τα συμπτώματα αυτά κάνουν την εμφάνισή τους μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη διακοπή της τροφοδοσίας με βόριο (Hirsch and Torrey, 1980). Το γεγονός ότι η αντίδραση των φυτικών κυττάρων στην έλλειψη βορίου είναι τόσο ταχείες υποδηλώνει ότι, οι επιπτώσεις στην δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι άμεσες (Hu

and Brown, 1994). Επιπλέον, ο λειτουργικός ρόλος του βορίου στην επιμήκυνση των κυττάρων πιστεύεται ότι σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά ελαστικότητας του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Matoh 2000; Dell and Huang 1997) και την διαμόρφωση του τελικού μεγέθους και σχήματος των κυττάρων (Dell and Huang, 1997).

Μελέτες σε 14 είδη, με διαφορετικές απαιτήσεις σε βόριο, έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης βορίου στα κυτταρικά τοιχώματα και των ποσοτήτων ουρονικού οξέος, ραμνόζης και γαλακτόζης, αλλά και της συγκέντρωσης της πηκτίνης στα κυτταρικά τοιχώματα. Παρόλα αυτά, η έλλειψη βορίου δεν επηρέασε την ποσότητα του ουρονικού οξέος στα κυτταρικά τοιχώματα, φαινόμενο που υποδηλώνει ότι η έλλειψη βορίου δεν έχει καμία επίδραση στον μεταβολισμό της πηκτίνης (Hu et al., 1996). Κάτω από συνθήκες έλλειψης, η ποσότητα του διαλυτού βορίου μειώθηκε δραματικά ενώ το ποσοστό του αδιάλυτου κυτταρικού βορίου αυξήθηκε.

Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι ο ρόλος του βορίου στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα είναι καθαρά δομικός (Hu and Brown, 1997). Συγκεκριμένα, το βορικό οξύ δρα ως παράγοντας συναρμογής των πολυμερών αλυσίδων της πηκτίνης ραμνογαλακτουρονάνης II (RG II) με τη δημιουργία διεστερικών διαδεσμών μεταξύ γειτονικών αλυσίδων (O'Neill et al., 2001; O'Neill et al., 2004). Η RG II είναι ο μοναδικός πολυσακχαρίτης ο οποίος περιέχει βόριο και έχει απομονωθεί από βιολογικό υλικό (Kobayashi et al., 1996; Matoh et al., 1993; Ishii et al., 1996). Οι διαδεσμοί μεταξύ βορικού οξέος και RG II συμβάλλουν στη διατήρηση της μηχανικής αντοχής και της ελαστικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής επιμήκυνσης, ώστε να επιτρέπεται η προοδευτική αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων χωρίς την ανάγκη συνεχούς διάσπασης και αναδημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών (Teasdale and Richards, 1990). Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* τα οποία εμφανίζουν τροποποιήσεις στα πηκτινικά πολυμερή, τέτοιες ώστε να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός των διαδεσμών με το βορικό οξύ, παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη, χαρακτηριστική της έλλειψης βορίου (O'Neill et al., 2001).

II.5.2. Το βόριο αποτελεί παράγοντα σταθερότητας και λειτουργικότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Η παρουσία του βορίου θεωρείται πλέον προϋπόθεση για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της λειτουργικότητας των πλασματικών μεμβρανών των φυτικών κυττάρων (Hirsch and Torrey, 1980; Cakmak and Romheld, 1997; Pfeffer et al., 1998). Ορισμένα από τα συμπτώματα σε φυτά με ανεπάρκεια βορίου είναι η

Εισαγωγή

αύξηση της περατότητάς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης γεγονός το οποίο γίνεται αντιληπτό μέσω της διαρροής ιόντων, σακχάρων και αμινοξέων από τα κύτταρα (Parr and Loughman, 1983; Goldbach, 1984; Cakman et al., 1995; Wang et al., 1999). Η εκροή ιόντων καλίου με τη σειρά της επηρεάζει και τον μηχανισμό ανοίγματος των στοματίων όπως έχει παρατηρηθεί στο φυτό *Commelina communis* (Roth-Bejerano and Itai, 1981). Η βιοχημική βάση του ρόλου του βορίου στις μεμβράνες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Goldbach και Wimmer (2007), η σταθεροποίηση μεμβρανικών βιομορίων, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια, μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ ενδεχομένως να σχετίζεται με το ρόλο του βορίου στις μεμβράνες. Επίσης, η έλλειψη βορίου διαταράσσει την εκλεκτικότητα των μεμβρανών, διαταραχή η οποία είναι πιθανό να σχετίζεται με την παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών και την απώλεια της διαμερισματοποίησης τους εντός του κυττάρου (Cakmak et al., 1995). Ωστόσο, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι δεν υφίσταται άμεση σχέση μεταξύ φαινολικών συστατικών και ομοιόστασης των κυτταροπλασματικών μεμβρανών (Pfeffer et al., 1998). Από την άλλη μεριά, η λειτουργία των κυτταροπλασματικών μεμβρανών μπορεί να επηρεαστεί από την συγκέντρωση ενεργών χημικών ειδών οξυγόνου, όπως η ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), των οποίων η παρουσία θεωρείται ως έμμεσο αποτέλεσμα της τροφопενίας βορίου στα κύτταρα (Cakmak and Römhelt, 1997). Τα παραπάνω φαινόμενα επιτείνονται κάτω από συνθήκες υψηλού φωτισμού (Cakmak and Römhelt, 1997; Pfeffer et al., 1998).

Η έλλειψη βορίου επηρεάζει ιδιαίτερα τη λειτουργικότητα ορισμένων μεμβρανικών ενζυμικών συστημάτων όπως αυτών που σχετίζονται με τη ροή ηλεκτρονίων κατά τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην μεμβράνη (Ferrol and Donaire, 1992; Cseh and Fodor, 1997). Σε συνθήκες έλλειψης βορίου παρατηρείται πτώση της δραστηριότητας της οξειδάσης του NADH της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ενώ επαναχορήγηση του στοιχείου προκαλεί ταχύτατη ενεργοποίηση του ενζύμου (Barr and Crane, 1991; Findelee et al., 1997). Η έλλειψη βορίου διαταράσσει την ικανότητα πρόσληψης και μεταφοράς ιόντων η οποία επίσης αποκαθίσταται ταχέως όταν επαναχορηγηθεί βόριο. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαταραχές στη λειτουργία των μεμβρανικών αντλιών πρωτονίων και σε αδυναμία ανάπτυξης διαφοράς ηλεκτροχημικού δυναμικού μεταξύ των πλευρών της μεμβράνης (Robertson and Loughman, 1974; Pollard et al., 1977; Goldbach, 1984; Cakmak and Römhelt, 1997). Η ταχεία αποκατάσταση της δράσης των μεμβρανικών ενζύμων μετά την επαναχορήγηση βόριο υποδηλώνει πιθανή συμμετοχή του βορίου ως συνενζυμικού παράγοντα (Cakmak and Römhelt, 1997).

II.5.3. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των φυτών

Έως σήμερα δεν έχει αποδειχθεί κάποια άμεση εμπλοκή του βορίου στον φυτικό μεταβολισμό. Ωστόσο, η ικανότητα του βορικού οξέος να σχηματίζει σύμπλοκα με ποικίλα υποστρώματα προσφέρει το βιοχημικό υπόβαθρο για την διατύπωση πιθανών μεταβολικών ρόλων. Μεταξύ άλλων το βόριο έχει θεωρηθεί ως εμπλεκόμενο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των νουκλεϊκών οξέων και των φαινολικών συστατικών (Loomis and Durst, 1992; Δροσόπουλος, 1998). Ορισμένες από τις επιπτώσεις της έλλειψης βορίου εντοπίζονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και συγκεκριμένα στο μεταβολισμό των φωσφοροπεντοζών (PPP). Υπό συνθήκες έλλειψης, ενισχύεται η οδός PPP, γεγονός το οποίο έχει ερμηνευτεί μέσω της αλληλεπίδρασης του βορικού οξέος με το υπόστρωμα 6 – φωσφορογλυκολικό και της παρεμπόδισης της ενζυμικής δραστηριότητας της διυδρογενάσης του 6 – φωσφογλυκολικού οξέος (Lee και Aronoff 1967; Dugger 1983). Επίσης, υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, η ενζυμική δραστηριότητα της αφυδρογονάσης της 6 – φωσφορο – γλυκόζης ενισχύεται περισσότερο από την αντίστοιχη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης του 6 – φωσφογλυκολικού οξέος (Gomes – Rodriguez et al. 1987) με συνέπεια την αύξηση της ροής υποστρωμάτων από τη γλυκόλυση προς την κατεύθυνση της μεταβολικής οδού PPP (Dugger, 1983). Η τροφοπενία βορίου προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης των RNA γεγονός το οποίο έχει αποδοθεί στην αύξηση της αποδομότητάς τους, λόγω της ενεργοποίησης της RNAάσης (Blevins and Lukaszewski, 1998).

II.5.4. Ο ρόλος του βορίου στην φωτοσυνθετική λειτουργία και την διανομή σακχάρων

Έως σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια άμεση σχέση μεταξύ βορίου και φωτοσύνθεσης (Blevins and Lukaszewski, 1998; Dell and Huang, 1997). Οι παρατηρούμενες συνέπειες της τροφοπενίας βορίου στη φωτοσύνθεση αφορούν έμμεσα αποτελέσματα τα οποία μπορούν να συνοψιστούν στην μειωμένη επιφάνεια των φύλλων, σε δυσλειτουργίες των στοματίων και στην επίδραση της τροφοπενίας βορίου στις πλασματικές μεμβράνες, μεταξύ των οποίων είναι και οι μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών (Cakmak et al., 1995; Kastori et al., 1995; Dell and Huang, 1997; El-Shintinawy, 1999). Σε ορισμένες περιπτώσεις η έλλειψη βορίου προκαλεί μείωση τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών και συνεπώς μείωση της φωτοσύνθεσης και της φωτοχημικής ικανότητας των φωτοσυστημάτων με πιο ευαίσθητο το φωτοσύστημα II (Goldbach et al., 1991; Kastori et al., 1995; El – Shintinawy, 1999; Cakmak and Römels, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998).

Εισαγωγή

Εκτός από τις επιπτώσεις επί της φωτοσυνθετικής λειτουργίας, η τροφοπενία βορίου προκαλεί ανάδρομη παρεμπόδιση της φωτοσυνθετικής παραγωγής υδατανθράκων. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τη συσσώρευση φωτοσυνθετικών προϊόντων κυρίως λόγω μειωμένων ρυθμών αύξησης των τροφοπενιακών φυτών με συνέπεια τη μείωση του ρυθμού εξαγωγής άνθρακα προς τα σημεία μεταβολικής κατανάλωσης, κυρίως αναπτυσσόμενα μεριστώματα και αναπαραγωγικά όργανα (Dugger, 1983; Kastori et al., 1995; Shelp, 1993).

II.5.5. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων

Μια από τις χαρακτηριστικότερες αντιδράσεις των φυτών στην έλλειψη βορίου είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν βασικά προϊόντα τόσο του πρωτογενούς όσο και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η τροφοπενία βορίου επηρεάζει τους αρωματικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (Brown et al. 2002; Marschner, 1995; Blevins and Lukaszewski, 1998; Camacho – Christóbal, et al. 2002) κύριες κατηγορίες των οποίων είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή (Seigler, 1998). Η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων αποτελεί καθολική αντίδραση των τροφοπενιακών φυτών και αποδίδεται τόσο στην αύξηση του ρυθμού βιοσύνθεσης των φαινολικών όσο και στη μειωμένη ενσωμάτωσή τους σε δομές όπως αυτή της λιγνίνης του κυτταρικού τοιχώματος (Marschner, 1995; Cakmak and Römheld, 1997). Η αυξημένη βιοσύνθεση των φαινολικών αποδίδεται στην άρση της παρεμπόδισης ή στην ενίσχυση της ενεργότητας συγκεκριμένων ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού των φαινυλοπροπανοειδών, όπως η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης αλλά και στην αύξηση ροής υποστρωμάτων, κυρίως μέσω της οδού PPP, προς την οδό των φαινυλοπροπανοειδών.

Σκοπός της εργασίας

Είναι γνωστό ότι το βορικό οξύ μπορεί να σχηματίσει διεστερικά σύμπλοκα με φαινολικές ενώσεις οι οποίες διαθέτουν δομή *cis*-διόλης (Power and Woods, 1997; Dembitsky et al., 2002). Η πιθανή δημιουργία τέτοιων συμπλόκων υπό συνθήκες επάρκειας και η αντίστοιχη παρεμπόδιση του σχηματισμού τους ή η διάστασή τους υπό συνθήκες έλλειψης βορίου είναι ένα φαινόμενο το οποίο παρέχει το βιοχημικό υπόβαθρο για τη διατύπωση της υπόθεσης σύμφωνα με την οποία η αύξηση ορισμένων φαινολικών συστατικών στα κύτταρα υπό τροφοπενία βορίου δεν οφείλεται αποκλειστικά στην *de novo* σύνθεσή τους αλλά επιπλέον και στην διάσπαση των συμπλόκων τους με το βορικό οξύ. Για την πειραματική προσέγγιση αυτής της υπόθεσης, στην παρούσα εργασία διενεργείται ελεγχόμενη υδροπονική καλλιέργεια φυταρίων ελιάς υπό ελλειμματικές συγκεντρώσεις βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης. Στην πορεία της επιβολής τροφοπενίας βορίου καταγράφονται παράμετροι που σχετίζονται με το μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα η δραστηριότητα της αμμώνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης και η σύσταση των φύλλων σε φαινολικές ενώσεις.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Φυτικό Υλικό και Περιγραφή των Συνθηκών Καλλιέργειας

1.1. Προετοιμασία του Φυτικού Υλικού και του Υποστρώματος Καλλιέργειας

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν φυτά ελιάς ποικιλίας "Μανάκι", η οποία θεωρείται ευαίσθητη στην τροφοπενία βορίου. Παρελήφθησαν υγιή ριζοβολημένα μοσχεύματα ηλικίας ενός έτους (Φυτώριο Ελιάς Γ. Κωστελένος, Πόρος Τροιζινίας) και επιλέχθηκαν 52 φυτά, με βάση την ομοιομορφία και τον αριθμό των φύλλων της υπέργεια βλάστησης για τη διενέργεια του βασικού πειράματος. Τα φυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των 13 φυτών. Στη συνέχεια κάθε ομάδα φυτών καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα με διαφορετική συγκέντρωση βορικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 23,0 μM (φυτά μάρτυρες, B23), 2,0 μM (φυτά B2), 0,5 μM (φυτά B05) και 0,0 μM βορικού οξέος (φυτά B0). Οι τρεις τελευταίες συγκεντρώσεις αντιπροσωπεύουν τις μεταχειρίσεις με ανεπαρκή τροφοδοσία βορίου στο μέσο καλλιέργειας. Τα φυτά είχαν κατά μέσο όρο 7,7 ζεύγη ώριμων και 7,2 ζεύγη νεαρών φύλλων.

Η προετοιμασία των φυτών περιλάμβανε απομάκρυνσή τους από το αρχικό υπόστρωμα, ξέπλυμα των ριζών αρχικά με νερό βρύσης, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του υποστρώματος, και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία όγκου 2 l (ένα φυτό / δοχείο) με χαλαζιακή άμμο (7-15 mesh).

Η άμμος προετοιμάστηκε με εξαντλητικό πλύσιμο, αρχικά με νερό βρύσης και στην συνέχεια με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1 (v/v). Ακολούθως, η άμμος καθαρίστηκε με διάλυμα 5% HCl (w/v) / 1% οξαλικό οξύ (w/v) σε αναλογία επίσης 1:1 (v/v). Τελικά, η άμμος ξεπλύθηκε από τα υπολείμματα των οξέων με απιονισμένο νερό έως ότου το pH του διαλύματος να αποκτήσει τιμή 5,0 ή ανώτερη. Η παραπάνω διαδικασία προετοιμασίας της άμμου θεωρείται ότι απομακρύνει τα ανόργανα άλατα και τα ένυδρα οξείδια σιδήρου και αργίλου και έχει χρησιμοποιηθεί για την πειραματική μελέτη τροφοπενιών με ανόργανα στοιχεία συμπεριλαμβανομένου του βορίου (Hewitt, 1952).

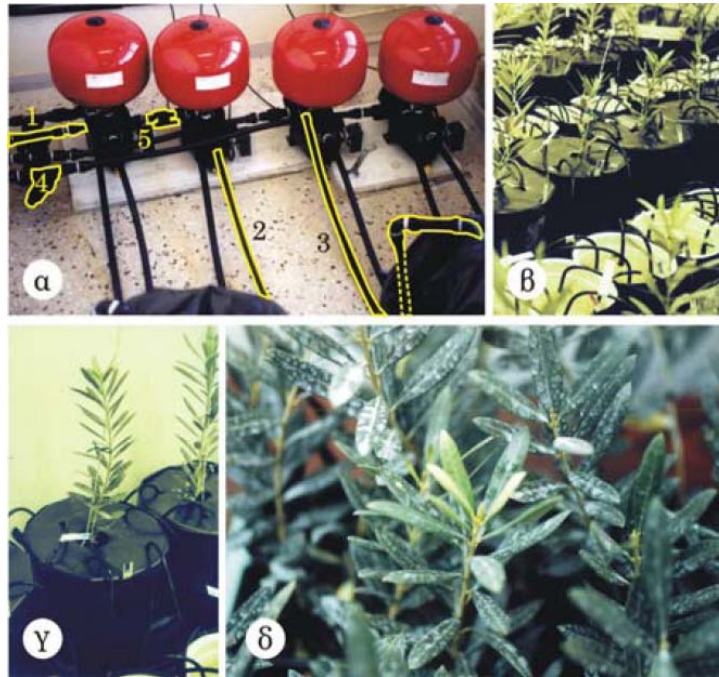
1.2. Περιγραφή του Συστήματος Πειραματικής Υδροπονικής Καλλιέργειας

Για το σύστημα πειραματικής υδροπονίας χρησιμοποιήθηκε κλειστός θάλαμος ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών, ο οποίος διέθετε σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας του αέρα, φωτοπεριόδου και έντασης φωτισμού. Η επιφάνεια ανάπτυξης είχε διαστάσεις 2,0 x 2,3 m. Οι κλιματικές

συνθήκες διαμορφώνονταν με ομοιόμορφη κυκλοφορία αέρα από το εξωτερικό περιβάλλον. Ο θάλαμος διέθετε, επίσης, πίνακα ελέγχου με δυνατότητα προγραμματισμού 24 βημάτων ανά εικοσιτετράωρο, ενώ ο φωτισμός παρέχόταν από 12 λαμπτήρες αλογόνου τύπου Powerstar HQI-BT-400W/D (OSRAM, GmbH, Munich, Germany).

Το σύστημα πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας (εικόνα 1) αποτελείτο από τέσσερα ανεξάρτητα κυκλώματα διανομής θρεπτικού διαλύματος κλειστού τύπου χωρίς ανακύκλωση. Τα θρεπτικά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία όγκου 100 l και για την τροφοδοσία κάθε κυκλώματος χρησιμοποιήθηκε αντλία τύπου DAB JET 81 M-P (DAB Pumps S.P.A., Mestrino, Italy) με δοχείο πίεσης όγκου 24 l. Η αντλία είχε μανομετρικό ύψος 102 m και παροχή 0,06-37,00 m³ h⁻¹. Λόγω των μικρών απαιτήσεων παροχής και με σκοπό την αποφυγή επαναλαμβανόμενων εκκινήσεων κατά την διάρκεια της άρδευσης, καθώς και για την τακτική ανακίνηση των θρεπτικών διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε δευτερεύον κύκλωμα επαναφοράς στο δοχείο φύλαξης. Η πίεση στο κύκλωμα ρυθμιζόταν με βάνα στον σωλήνα του κυρίως κυκλώματος, ενώ η πυκνότητα και ο χρόνος των αρδεύσεων ρυθμιζόταν αυτόματα από προγραμματιστή άρδευσης τύπου Junior 6M (Irritrol Systems, Riverside, CA, USA).

Το κύκλωμα διανομής αποτελείτο από ένα κεντρικό κορμό με βάνα και φίλτρο σίτας και κεντρικές σωληνώσεις $\varnothing$ 25, οι οποίες έφεραν σε καθορισμένα σημεία αυτορρυθμιζόμενους σταλάκτες τύπου TORO (The Toro company, Bloomington, MN, USA) παροχής 4 l h⁻¹ και πίεσης λειτουργίας 1,5-4,0 atm. Οι σταλάκτες στην έξοδό τους έφεραν διακλάδωση τεσσάρων σημείων με σωληνάκια κατανομής του θρεπτικού διαλύματος. Η διάταξη περιλάμβανε ένα σταλάκτη με τέσσερα σωληνάκια ανά δοχείο ανάπτυξης. Για την απορροή των δοχείων χρησιμοποιήθηκε σωλήνας ορθογώνιας διατομής με κατάλληλα ανοίγματα και το εκρέον θρεπτικό διάλυμα οδηγείτο στην αποχέτευση. Όλα τα μέρη του συστήματος άρδευσης, συμπεριλαμβανομένων των δοχείων φύλαξης του θρεπτικού διαλύματος και των δοχείων ανάπτυξης των φυτών, ήταν κατασκευασμένα από πλαστικό υλικό (για την αποφυγή επιρύπανσης του θρεπτικού διαλύματος με βόριο) και σκούρου χρώματος (για τον αποκλεισμό του φωτός από το εσωτερικό των δοχείων και την παρεμπόδιση ανάπτυξης φυκών και λοιπών φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που θα μπορούσαν να ανταγωνίζονται τα φυτά στην απόκτηση των θρεπτικών στοιχείων).



Εικόνα 2. α. Άποψη της εγκατάστασης πειραματικής υδροπονίας, 1: κεντρικός κορμός διανομής; 2: σωλήνας άντλησης; 3: κύκλωμα επαναφοράς; 4: φίλτρο σίτας; 5: βάνα. β. Άποψη των πειραματοφύτων στο θάλαμο ανάπτυξης. γ. Άποψη πειραματοφύτου όπου διακρίνονται τα σωληνάκια διανομής του θρεπτικού διαλύματος. δ. τα πειραματόφυτα τη στιγμή της παραλαβής τους.

Για την αξιολόγηση της ομοιομορφίας μεταξύ των σταλακτών του συστήματος έγιναν δοκιμές άρδευσης με δοκιμαστικά δοχεία και μετρήθηκε ο όγκος του θρεπτικού διαλύματος που συγκεντρωνόταν σε κάθε δοχείο. Η τυπική απόκλιση του όγκου του θρεπτικού διαλύματος ήταν μικρότερη από 2-9 % του μέσου όρου. Για την εξασφάλιση ισορροπίας το υπόστρωμα τοποθετήθηκε στα δοχεία ανάπτυξης και αρδευόταν κανονικά με το θρεπτικό διάλυμα δύο μέρες πριν την τοποθέτηση των φυτών.

1.3. Συνθήκες Υδροπονικής Καλλιέργειας

Τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο σύμφωνα με συγκεκριμένη διάταξη (εικόνα 2) και οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία και φωτοπερίοδος) επιλέχθηκαν έτσι ώστε να αντιστοιχούν στην περίοδο έκπτυξης της νέας βλάστησης. Για την έναρξη ή την λήξη της φωτοπεριόδου οι λαμπτήρες θέτονταν σε λειτουργία ή εκτός λειτουργίας προοδευτικά, ώστε η μετάβαση από την σκοτοπερίοδο προς την φωτοπερίοδο με πλήρη ένταση ακτινοβολίας και αντίστροφα να διαρκεί περίπου 1 h.



Εικόνα 3. Διάταξη των πειραματοφύτων στο θάλαμο ανάπτυξης. Οι αριθμοί δείχνουν την πειραματική μεταχείριση.

Τα φυτά αρδεύονταν με θρεπτικό διάλυμα Hoagland No 2 ημίσειας συγκέντρωσης, η σύσταση του οποίου ήταν (σε μM): KNO_3 6000; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2000; MgSO_4 1000; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1000; FeNaEDTA 50; H_3BO_3 23,0 / 2 / 0,5 / 0,0 (ανάλογα με την μεταχείριση) και MnCl_2 4,6; ZnSO_4 0,43; CuSO_4 0,16; Na_2MoO_4 0,06. Η παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος γινόταν κάθε 7 μέρες με αραιώση μητρικών διαλυμάτων σε απιονισμένο νερό και το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στην τιμή 6,5 με KOH (η μεταβολή του pH του διαλύματος, καθώς το ριζικό σύστημα αναπτύσσεται, οφείλεται στην ποσοτική και ποιοτική εκλεκτική απορρόφηση των ιόντων από τη ρίζα). Κατά την διάρκεια της παρασκευής των θρεπτικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά πλαστικά σκεύη για την αποφυγή επιρύπανσης με βόριο (τα γυάλινα δοχεία παρέχουν νάτριο και βόριο). Η συχνότητα των αρδεύσεων ήταν 9 αρδεύσεις ανά εικοσιτετράωρο, με συχνότητα 2 ώρες στη φωτοπερίοδο και 4 ώρες στη σκοτοπερίοδο, ενώ η διάρκεια κάθε άρδευσης ήταν 1 λεπτό. Με βάση τα παραπάνω, και δεδομένης της παροχής των σταλακτών, κάθε φυτό ελάμβανε 67 ml ανά άρδευση ή ~600 ml ανά εικοσιτετράωρο.

II. Πειραματική Πορεία

II.1. Χρονοδιάγραμμα Πειράματος, Κατηγορίες Δειγμάτων και Πειραματικοί Χειρισμοί

Το πείραμα διήρκησε από τις 01 / 04 / 2006 έως τις 21 / 05 / 2006. Για τη διεξαγωγή του πειράματος, καθορίστηκαν δύο κατηγορίες-δέσμες φύλλων. Η ανώτερη δέσμη ($\Delta 1$) άρχιζε από την κορυφή της νεαρής βλάστησης και κατέληγε στο τελευταίο νεαρό φύλλο, ενώ η δεύτερη δέσμη ($\Delta 2$) περιλάμβανε φύλλα ώριμα που είχαν συμπληρώσει την έκπτυξή τους. Τα δείγματα προέρχονταν από φύλλα και των δύο δεσμών και όλων των χειρισμών βορίου (B23, B2, B05, B0). Οι δειγματοληψίες για μέτρηση συγκέντρωσης βορίου περιελάμβαναν 4 επαναλήψεις

ενώ αυτές για τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών περιελάμβαναν 9 επαναλήψεις.

II.2. Παράμετροι Ανάπτυξης και Βιοχημικές Παράμετροι

Μετά την λήξη του πειράματος ελήφθησαν μετρήσεις που αφορούσαν σε μορφολογικές και φυσιολογικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα έλαβαν χώρα μετρήσεις των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών (αριθμός φύλλων Δ1 και Δ2, νωπό βάρος των φύλλων και της ρίζας, ξηρό βάρος των φύλλων) και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση βορίου και φαινολικών συστατικών στα φύλλα.

III. Τρόπος Διενέργειας Μετρήσεων

III.1. Μέτρηση Ενζυμικής Δραστηριότητας της PAL

Για τον προσδιορισμό των περιεχομένων πρωτεϊνών και της ενζυμικής δραστηριότητας της PAL σε φύλλα ελιάς εφαρμόστηκε η μέθοδος των Morelló et al. (2005). Φυτικό υλικό βάρους 100 mg ομογενοποιήθηκε σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,05 M, pH 6,6). Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε θερμοκρασία 0 - 4 °C. Το εκχυλιστικό περιείχε 0,032 g Triton X-100 και 0,04 g PVPP. Μετά την ομογενοποίηση το ενζυμικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε (2500 × g, 10 min, 4 °C) και 1 ml υπερκειμένου φυγοκεντρήθηκε εκ νέου (16000 × g, 10 min, 4 °C) και κρατήθηκε σε παγόλoutro για τη διενέργεια των μετρήσεων.

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της PAL, 300 μl ενζυμικού εκχυλίσματος προστέθηκαν σε 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης βορικού νατρίου (0,06 M, pH 8,8) και η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 750 μl διαλύματος L-φαινυλαλανίνης (1 g (100 ml)-1, τελική συγκέντρωση στο διάλυμα αντίδρασης 11 mM). Μετά από επώαση για 1 ώρα στους 37 °C, η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 210 μl HCl 5N. Το δείγμα ακολούθως φυγοκεντρήθηκε (16000 × g, 10 min, 20 °C) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 290 nm με χρήση κατάλληλου φωτομετρικού τυφλού από το οποίο είχε αντικατασταθεί το διάλυμα φαινυλαλανίνης με νερό ίσου όγκου, για τον προσδιορισμό του περιεχομένου σιναμικού οξέος. Η ενζυμική δραστηριότητα εκφράστηκε ως προς το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες του εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Για την παραπάνω μέτρηση, 50 μl ενζυμικού εκχυλίσματος και 50 μl νερού προστέθηκαν σε 5 ml αντιδραστήριου Bradford. Ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm.

III.2. Συγκέντρωση Βορίου

III.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων για Μέτρηση Ολικού Βορίου

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού βορίου έλαβε χώρα και στις δύο δέσμες όλων των χειρισμών (B23, B2, B05 και B00) σε τέσσερις επαναλήψεις. Το έλασμα των φύλλων κάθε κατηγορίας χωρίστηκε σε δύο μέρη και απορρίφθηκε η κεντρική νεύρωση. Το ένα μέρος, αφού μετρήθηκε το νωπό βάρος, τοποθετήθηκε στους 900 C ώστε να μετρηθεί το ολικό βόριο. Ακολούθησε λειοτρίβηση αυτού και τοποθέτηση ~30 mg ξηρής ουσίας, περίπου, σε πορσελάνινες κάψες (εξευγενισμένες με πλύσεις διαλύματος HCl 0,6 N και απιονισμένου νερού) και στη συνέχεια ξηρή καύση σε θερμοκρασία 5000 C (ανύψωση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4,20 C min⁻¹ και παραμονή στην παραπάνω θερμοκρασία για 6 h). Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η τέφρα εκχυλίστηκε με 0,5 ml διαλύματος HCl 6 N και το εκχύλισμα αραιώθηκε σε τελικό όγκο 4,5 ml με νερό. Για την παρασκευή των διαλυμάτων, καθώς και για τις εκχυλίσεις, χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

III.2.2. Μέτρηση Συγκέντρωσης Βορίου μέσω Χρωματικής Αντίδρασης Αζωμεθίνης

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης βορίου ακολουθήθηκε η μέθοδος της χρωματικής αντίδρασης με αζωμεθίνη (Banuelos et al., 1992). Όγκος 2 ml από το εκχύλισμα της τέφρας ρυθμίστηκε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος AcNH₄ / AcOH / Na₂EDTA, pH 5,7 και αντέδρασε με 1 ml διαλύματος αζωμεθίνης (0,45 g / 100ml ασκορβικού οξέος 1%). Μετά από 20 min μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 420 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης τύπου Shimadzu UV-Vis 160A (Shimadzu Co., Tokyo, Japan). Η συγκέντρωση βορίου υπολογίστηκε βάση καμπύλης αναφοράς (0,004; 0,02; 0,04; 0,1; 0,3; 2,0 ppm B; 7 σημεία: R² 0,9999) και τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε διάλυμα 0,6 N HCl. Σε όλα τα στάδια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκεύη για την αποφυγή επιρύπανσης με βόριο.

III.3. Ανάλυση Φαινολικών

III.3.1. Ανάλυση Διαλυτών Φαινολικών

Για την εκχύλιση των διαλυτών φαινολικών συστατικών, νωπή μάζα φύλλου εκχυλίστηκε με μεθανόλη 80% και ακολούθως έλαβε χώρα χρωματογραφική ανάλυση όπως περιγράφεται παρακάτω.

III.3.2. Ανάλυση Φαινολικών Υδρολύματος Κυτταρικών Τοιχωμάτων

Για την μέτρηση των ολικών φαινολικών νωπά φύλλα λειοτριβήθηκαν σε γουδί με υγρό άζωτο έως λεπτής σκόνης. Ακολούθησαν τρεις εκχυλίσσεις με 10 ml διαλύματος μεθανόλης 80%, ενώ μετά από κάθε εκχύλιση έλαβε χώρα φυγοκέντρηση (2600×g, 5 min). Το ίζημα εκχυλίστηκε με 10ml απιονισμένου νερού ακολούθησε φυγοκέντρηση (2600×g, 5 min), απομάκρυνση του υπερκείμενου και νέα εκχύλιση του ιζήματος με 10 ml ακετόνης και νέα φυγοκέντρηση. Το στερεό υπόλειμμα πλύθηκε με ακετόνη σε υάλινο φίλτρο 10–16 μm (Winzer Laborglastechnik, Wertheim, Germany) υπό κενό ώστε να απομακρυνθούν τα τελευταία υπολείμματα των χρωστικών και της υγρασίας.

Το προκύπτον ίζημα παρέμεινε στους 50 °C έως την παραλαβή 0,1 g ιστού. Στο δείγμα προστέθηκαν 3ml απιονισμένου νερού και 3 ml διαλύματος NaOH 8 N και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για την δημιουργία κενού, για 6 ώρες υπό χαμηλό φωτισμό. Μετά το πέρας των 6 ωρών ακολούθησε οξίνιση του ενεωρήματος που προέκυψε σε pH 1 με διάλυμα HCl 6N. Στην συνέχεια έλαβε χώρα εκχύλιση δυο φορές σε διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα, έτσι ώστε να παραληφθούν τα φαινολικά συστατικά από την υδατική φάση. Ακολούθησε απομάκρυνση των υπολειμάτων του οξέος με πλύσιμο της φάσης του οξικού αιθυλεστέρα τρεις φορές σε ίσο όγκο νερού σε εκχυλιστική χοάνη και τέλος το δείγμα συμπυκνώθηκε έως ξηρού υπό κενό. Μετά την συμπύκνωση ακολούθησε αραίωση των συστατικών σε 10ml μεθανόλης 80%. Τέλος, έλαβε χώρα χρωματογραφική ανάλυση όπως περιγράφεται παρακάτω.

III.3.3. Χρωματογραφική ανάλυση φαινολικών συστατικών

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-mm particle size; 250 · 4,6 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη χρωματογραφική ανάλυση ορισμένος όγκος δείγματος διηθήθηκε από φίλτρο μεμβράνης 0,2 μm Chromafil CA – 20 / 25 (Macherey – Nagel, Düren, Germany) και η εισαγωγή του δείγματος έγινε με βαλβίδα εισαγωγής 7725i (Reodyne, Rohnhert Park, California, USA) χωρητικότητας 20 μl. Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου, ενώ τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητή φάση ήταν: A: 10% MeCN σε 1% H₃PO₄ και B: MeCN.

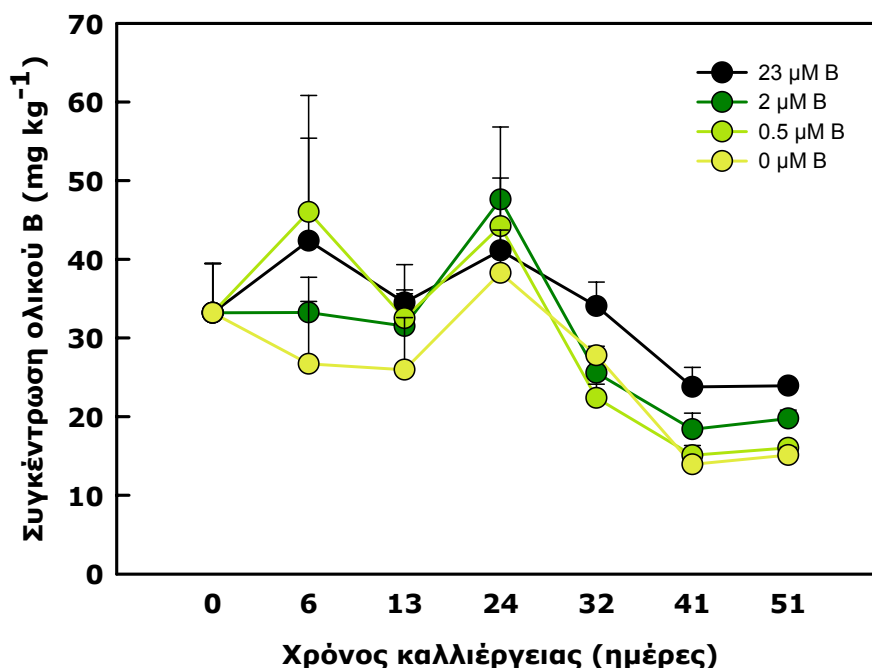
Υλικά και Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα έκλουσης: αρχικές συνθήκες: (A:B) 94:6; gradient για 15 min προς 89:11; ισοκρατικό για 3 min; gradient για 22 min προς 66:34; gradient για 1 min προς 0:100; ισοκρατικό για 4 min; επαναφορά στις αρχικές συνθήκες και εξισορρόπηση για 10 min. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹ και η ανίχνευση έγινε στα 281 και 333 nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Borwin Chromatographic Software, ver. 1. 21. 60 (JMBS Development, Fontaine, France).

Αποτελέσματα

1.1. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα

Στις εικόνες 4-6 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια (εικόνες 4-5) και στη λήξη (εικόνα 6) του πειράματος. Η μέτρηση της συγκέντρωσης ολικού βορίου πραγματοποιήθηκε σε ώριμα (εικόνα 4) και νεαρά φύλλα (εικόνα 5) (για ορισμό της ηλικίας των φύλλων βλ. 'Υλικά και Μεθόδους'), για τις τέσσερις μεταχειρίσεις συγκέντρωσης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας. Η πορεία της συγκέντρωσης ολικού βορίου στα ώριμα φύλλα παρουσίασε έντονες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του πειράματος, ωστόσο η συνολική μεταβολή ήταν πτωτική για όλες τις μεταχειρίσεις (εικόνα 4). Μετά τις 32 ημέρες καλλιέργειας, η συγκέντρωση βορίου διαμορφώθηκε ανάλογα με την πειραματική μεταχείριση. Έτσι, στη λήξη του πειράματος στα ώριμα φύλλα των φυτών του μάρτυρα (23 μM B στο θρεπτικό διάλυμα) μετρήθηκε συγκέντρωση βορίου περίπου 23 ppm ενώ στα φύλλα των φυτών της πλέον ελλειμματικής μεταχείρισης (0 μM B στο θρεπτικό διάλυμα)

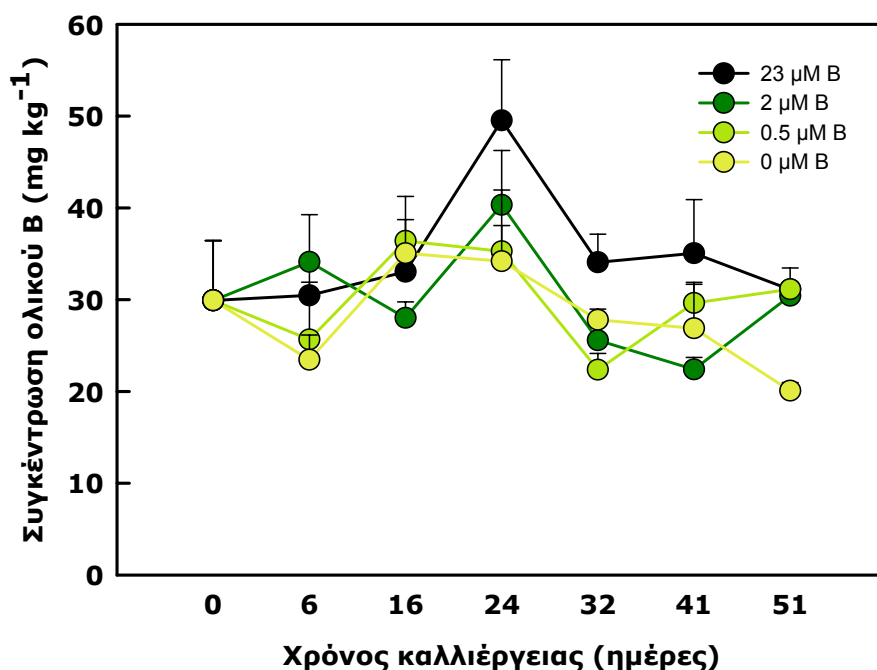


Εικόνα 4. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα ώριμα φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου.

μετρήθηκε συγκέντρωση βορίου περίπου 15 ppm (εικόνα 6). Η πορεία της συγκέντρωσης ολικού βορίου στα νεαρά φύλλα παρουσίασε επίσης έντονες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του πειράματος, και η συνολική μεταβολή ήταν

Αποτελέσματα

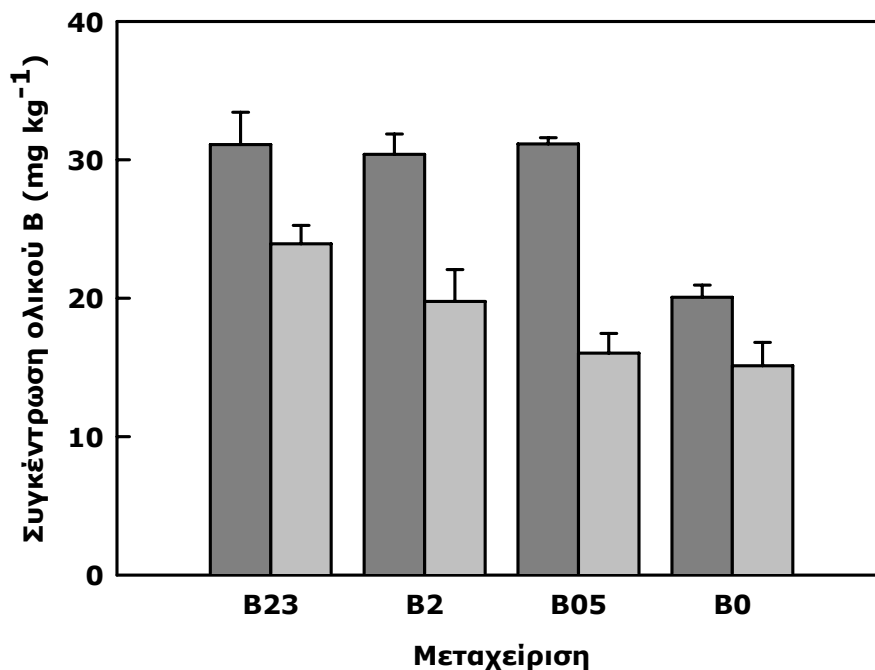
γενικά μικρή για όλες τις μεταχειρίσεις (εικόνα 5). Μετά τις 24 ημέρες καλλιέργειας, η συγκέντρωση βορίου διαμορφώθηκε ανάλογα με την πειραματική μεταχείριση. Έτσι, στη λήξη του πειράματος στα νεαρά φύλλα των φυτών του μάρτυρα (23 μM B στο θρεπτικό διάλυμα) μετρήθηκε συγκέντρωση βορίου περίπου



Εικόνα 5. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα νεαρά φύλλα των πειραματοφυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου.

31 ppm ενώ στα φύλλα των φυτών της πλέον ελλειμματικής μεταχείρισης (0 μM B στο θρεπτικό διάλυμα) μετρήθηκε συγκέντρωση βορίου περίπου 20 ppm (εικόνα 6). Μεταξύ νεαρών και ώριμων φύλλων παρατηρήθηκαν διαφορές παρόμοιες με αυτές που έχουν σημειωθεί σε προηγούμενα ανάλογα πειράματα. Έτσι, σε κάθε μεταχείριση, η συγκέντρωση των νεαρών φύλλων ήταν υψηλότερη από αυτή των ώριμων φύλλων στη λήξη του πειράματος (εικόνα 6). Επίσης αξίζει να επισημανθεί πως η συγκέντρωση βορίου στα νεαρά φύλλα μεταξύ των μεταχειρίσεων B23, B2 και B0.5 (με συγκεντρώσεις βορίου στο θρεπτικό διάλυμα 23, 2 και 0,5 μM αντίστοιχα) ήταν αξιοσημείωτα σταθερή υποδηλώνοντας την ικανότητα των φυτών για τη διατήρηση της ομοιόστασης στα νεαρά φύλλα. Ωστόσο, στη μεταχείριση B0 (με συγκέντρωση βορίου 0 μM B στο θρεπτικό διάλυμα) η ομοιόσταση αυτή δεν διατηρήθηκε (εικόνα 6). Η εικόνα για τα ώριμα φύλλα ήταν διαφορετική και συγκεκριμένα η συγκέντρωση βορίου ακολούθησε σε μεγάλο βαθμό την μείωση της συγκέντρωσης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα υποδηλώνοντας πως τα αποθέματα βορίου των ώριμων φύλλων μειώνονται όσο αυξάνουν οι απαιτήσεις σε

επίπεδο φυτού (λόγω μείωσης της εξωτερικής διαθεσιμότητας), πιθανώς λόγω επαναδιανομής του στοιχείου προς τα νεαρότερα όργανα (εικόνα 6).



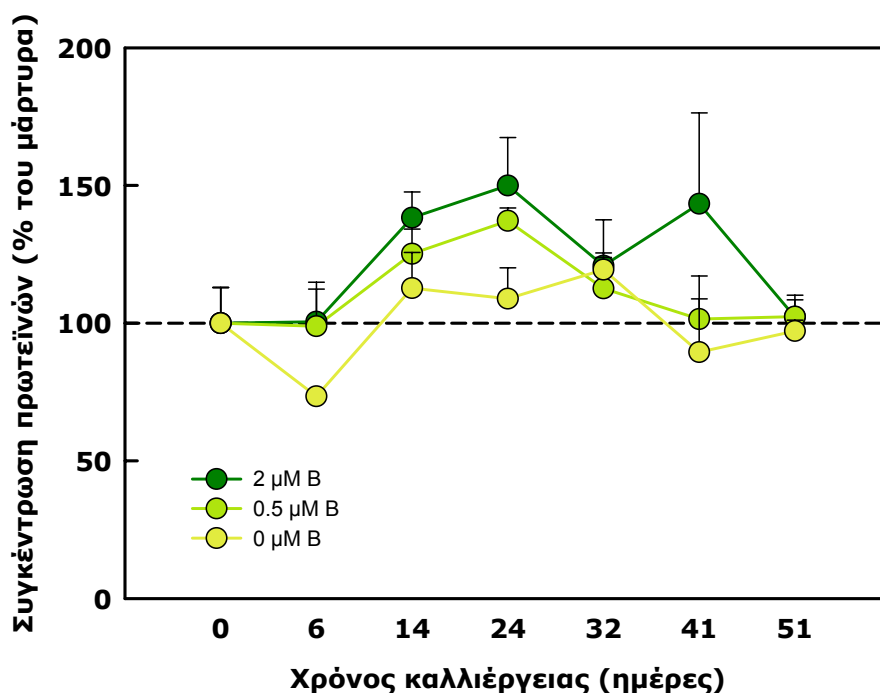
Εικόνα 6. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51η ημέρα) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Με σκούρες ράβδους παριστάνεται η συγκέντρωση βορίου των νεαρών φύλλων και με ανοικτές ράβδους η συγκέντρωση βορίου των ώριμων φύλλων. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου.

1.2. Συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών και δραστηριότητα της PAL

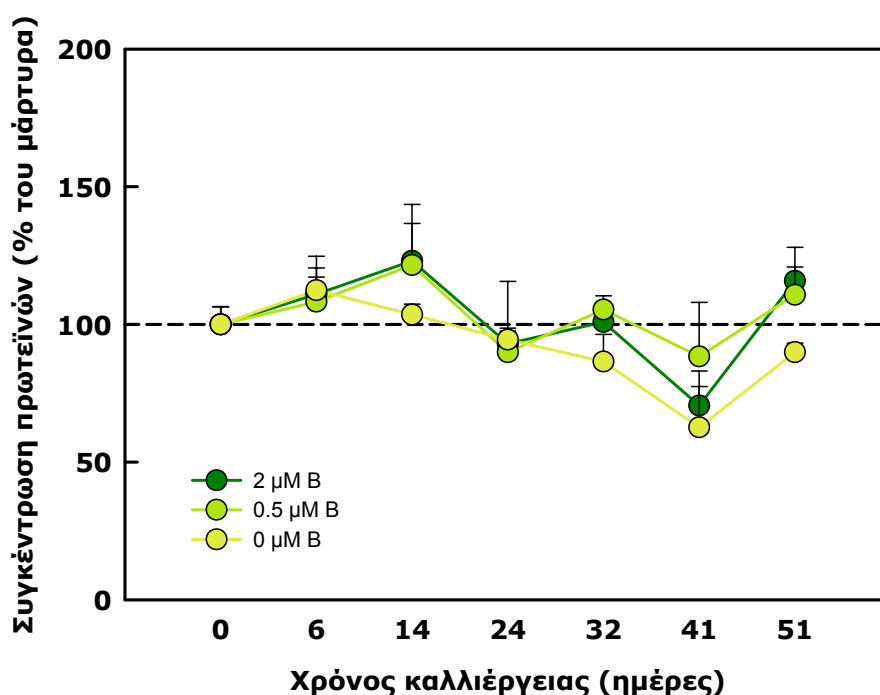
Στις εικόνες 7 και 8 παρουσιάζεται η συγκέντρωση πρωτεϊνών στα ώριμα και νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών των ώριμων φύλλων ήταν αυξημένη, λόγω ελλειμματικών συγκεντρώσεων βορίου στο θρεπτικό διάλυμα, σχεδόν στο σύνολο της πειραματικής περιόδου (εικόνα 7). Μεταξύ των πειραματικών μεταχειρίσεων, υψηλότερες αυξήσεις εμφανίστηκαν στις μέτρια ελλειμματικές συγκεντρώσεις βορίου (2 και 0,5 μM B στο θρεπτικό διάλυμα) συγκριτικά με την μηδενική (0 μM B στο θρεπτικό διάλυμα). Αντίθετα, η συγκέντρωση πρωτεϊνών στα νεαρά φύλλα δεν εμφάνισε αξιοσημείωτες μεταβολές κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (εικόνα 8).

Η δραστηριότητα της αμμόνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL) μετρήθηκε στα ώριμα (εικόνες 9 και 11) και νεαρά (εικόνες 10 και 12) φύλλα κατά τη διάρκεια του πειράματος, και εκφράστηκε τόσο επί του νωπού βάρους του ιστού (εικόνες 9 και 10) όσο και επί του πρωτεϊνικού περιεχομένου των φύλλων (εικόνες 11 και

Αποτελέσματα



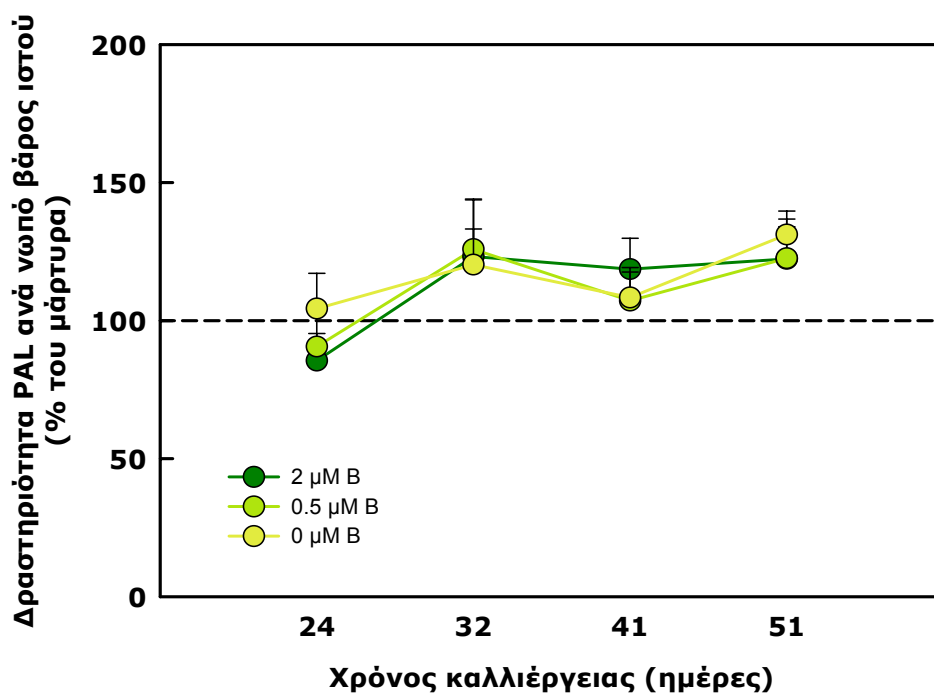
Εικόνα 7. Συγκέντρωση πρωτεϊνών στα ώριμα φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις ελλειμματικές πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου και παρουσιάζονται ως ποσοστό του μάρτυρα (23 μM B).



Εικόνα 8. Συγκέντρωση πρωτεϊνών στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις ελλειμματικές πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου και παρουσιάζονται ως ποσοστό του μάρτυρα (23 μM B).

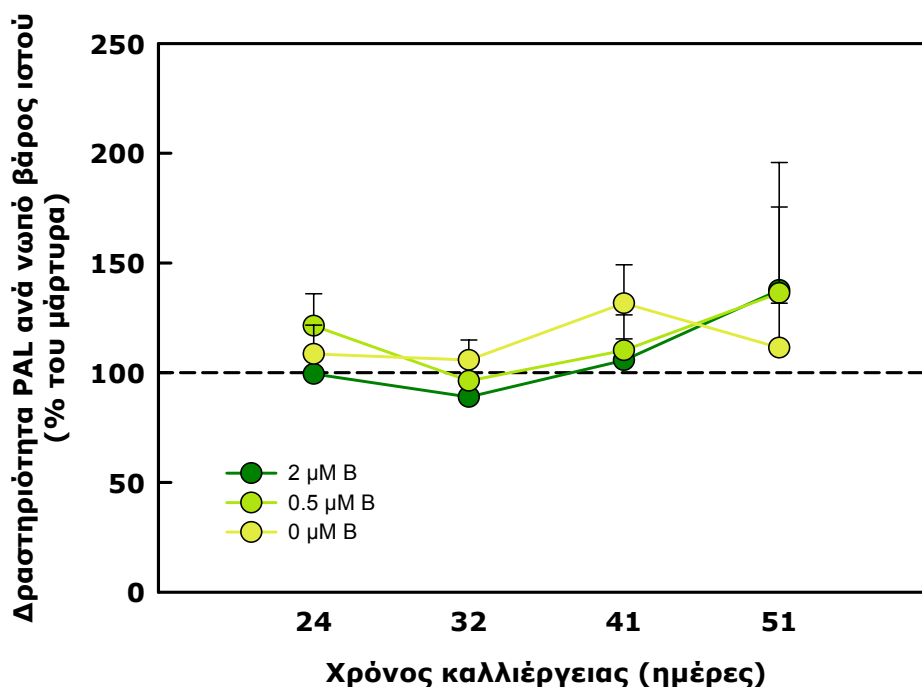
12), πάντα ως ποσοστό του μάρτυρα. Παρατηρούμε πως, τόσο στα ώριμα όσο και στα νεαρά φύλλα, σημειώθηκε μια σταδιακή αύξηση της δραστηριότητας του

ενζύμου κατά 30 έως 40% περίπου συγκριτικά με το μάρτυρα, ανάλογα με τη μεταχείριση και την ηλικία των φύλλων (εικόνες 9 και 10). Γενικά, δεν αναγνωρίστηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ δραστηριότητας της PAL και έλλειψης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα. Όταν η δραστηριότητα της PAL εξετάστηκε επί του πρωτεϊνικού περιεχομένου, παρατηρήθηκαν έντονες διακυμάνσεις. Στα ώριμα φύλλα, οι διακυμάνσεις αυτές ήταν τόσο θετικές όσο και αρνητικές συγκριτικά με το μάρτυρα ενώ οι πλέον θετικές τιμές (υψηλότερη δραστηριότητα συγκριτικά με το μάρτυρα) σημειώθηκαν στην πλέον ελλειμματική μεταχείριση (εικόνα 11). Στην περίπτωση των νεαρών φύλλων, οι διακυμάνσεις ήταν κυρίως θετικές, ειδικά για την πλέον ελλειμματική μεταχείριση όπου σημειώθηκε η υψηλότερη τιμή κοντά στην λήξη του πειράματος (περίπου 180% αυξημένη συγκριτικά με το μάρτυρα, εικόνα 12).

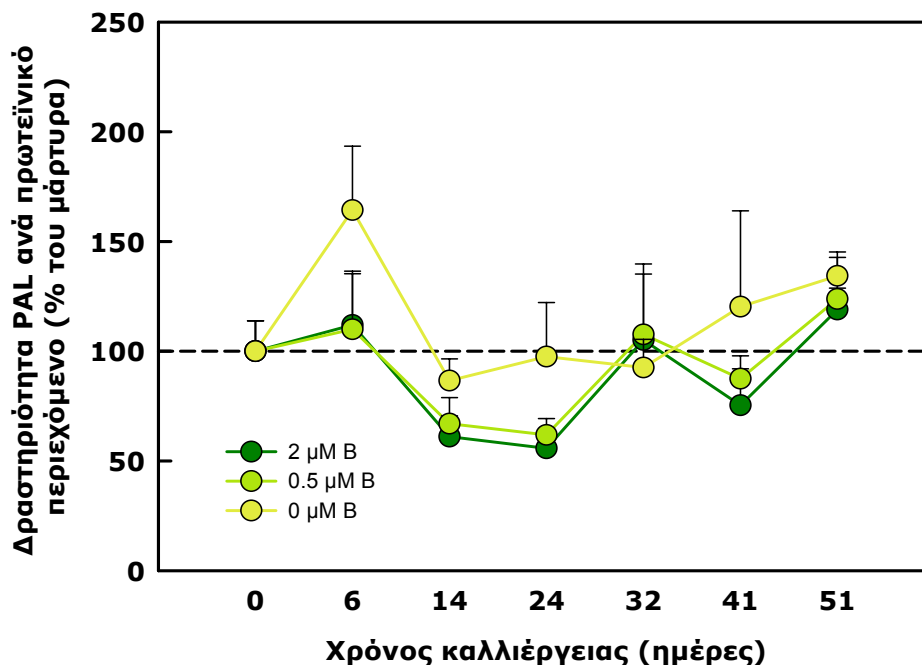


Εικόνα 9. Δραστηριότητα PAL ανά νωπό βάρος ιστού στα ώριμα φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις ελλειμματικές πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου και παρουσιάζονται ως ποσοστό του μάρτυρα (23 μM B).

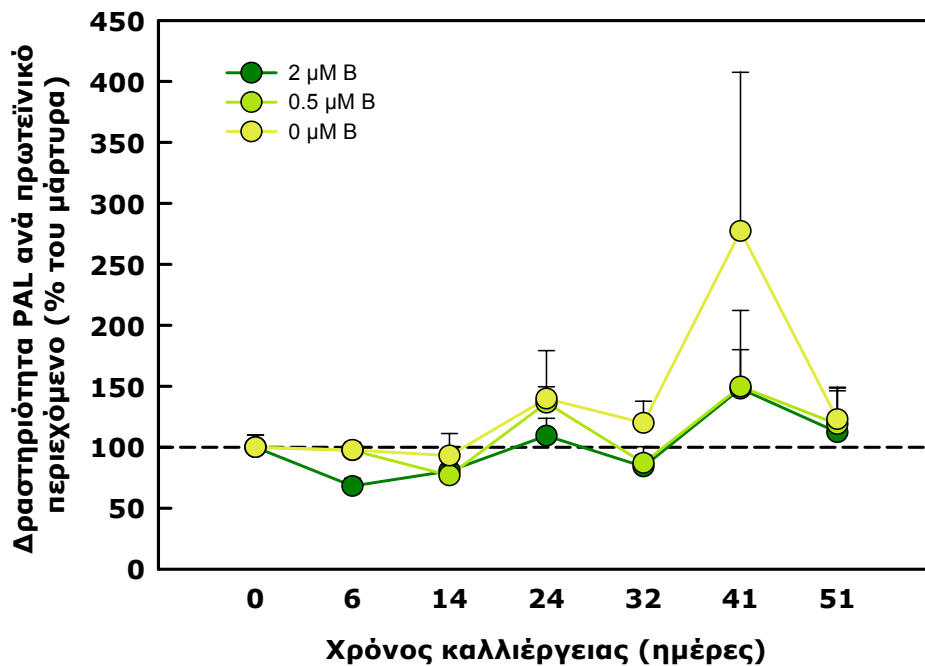
Αποτελέσματα



Εικόνα 10. Δραστηριότητα PAL ανά νωπό βάρος ιστού στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις ελλειμματικές πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου και παρουσιάζονται ως ποσοστό του μάρτυρα (23 μM B).



Εικόνα 11. Δραστηριότητα PAL ανά πρωτεϊνικό περιεχόμενο στα ώριμα φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις ελλειμματικές πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου και παρουσιάζονται ως ποσοστό του μάρτυρα (23 μM B).



Εικόνα 12. Δραστηριότητα PAL ανά πρωτεϊνικό περιεχόμενο στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων κατά τη διάρκεια του πειράματος (51 ημέρες) για τις ελλειμματικές πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου και παρουσιάζονται ως ποσοστό του μάρτυρα (23 μM B).

1.3. Συγκέντρωση φαινολικών στα φύλλα

Στην πίνακα 1 παριστάνεται η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών φαινολικών των νεαρών φύλλων στη λήξη του πειράματος για τις τέσσερις μεταχειρίσεις. Οι τιμές ελήφθησαν ως ολική επιφάνεια ολοκλήρωσης των κορυφών έκλουσης με ανίχνευση στα 284 και 333 nm μετά το διαχωρισμό των ουσιών σε αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Παρατηρούμε πως η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών φαινολικών αυξήθηκε μόνο στα φυτά της μεταχείρισης B2 (2 μM B στο θρεπτικό διάλυμα). Ανάλογη εικόνα προκύπτει από την εξέταση της συγκέντρωσης των επιμέρους φαινολικών μεταβολιτών οι οποίοι ανιχνεύθηκαν στις συγκεκριμένες χρωματογραφικές αναλύσεις (εικόνα 13). Ειδικότερα, οι μεταβολίτες P2, P6 και P9 αυξήθηκαν έως και 100% συγκριτικά με το μάρτυρα (εικόνα 13).

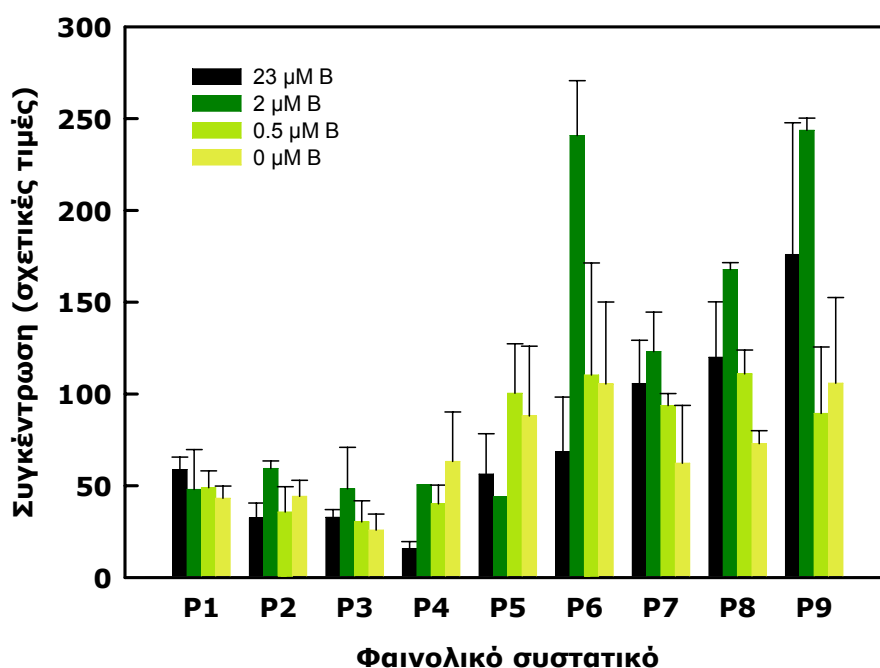
Επίσης μελετήθηκε η σύσταση των φαινολικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Στην πίνακα 1 φαίνεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών του υδρολύματος των κυτταρικών τοιχωμάτων των νεαρών φύλλων στη λήξη του πειράματος για τις τρεις μεταχειρίσεις. Οι τιμές ελήφθησαν ως ολική επιφάνεια ολοκλήρωσης των κορυφών έκλουσης με ανίχνευση στα 284 και 333 nm μετά το διαχωρισμό των ουσιών σε αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Αποτελέσματα

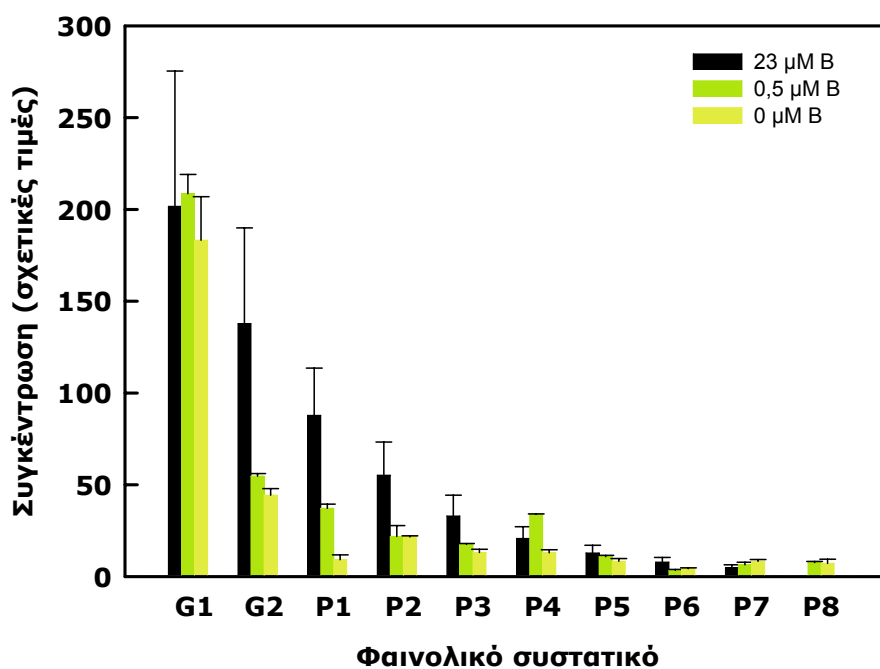
(HPLC). Η συγκέντρωση των φαινολικών των κυτταρικών τοιχωμάτων μειώθηκε αισθητά ως αποτέλεσμα των μεταχειρίσεων B0.5 και B0 (πίνακας 1). Η μείωση ήταν ανάλογη της έλλειψης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα. Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των κύριων φαινολικών μεταβολιτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγκέντρωση σχεδόν όλων των μεταβολιτών μειώθηκε ως αποτέλεσμα της έλλειψης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας (εικόνα 14).

Πίνακας 1. Συγκέντρωση ολικών διαλυτών φαινολικών και φαινολικών του υδρολύματος των κυτταρικών τοιχωμάτων στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51η ημέρα) για κάθε πειραματική μεταχείριση. Οι τιμές είναι σε σχετικές μονάδες και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου.

μεταχείριση	διαλυτά φαινολικά	φαινολικά κυττ. τοιχωμάτων
B23	3,18 $\pm$ 0,73	5,62 $\pm$ 1,96
B2	4,20 $\pm$ 0,29	--
B0.5	3,33 $\pm$ 0,33	4,02 $\pm$ 0,23
B0	2,97 $\pm$ 0,72	3,12 $\pm$ 0,39



Εικόνα 13. Συγκέντρωση των κυρίαρχων διαλυτών φαινολικών στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51η ημέρα) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 14. Συγκέντρωση των κυρίαρχων φαινολικών του υδρολύματος των κυτταρικών τοιχωμάτων στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51η ημέρα) για τις τρεις πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου.

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση της έλλειψης βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας σε ορισμένες παραμέτρους του δευτερογενούς μεταβολισμού των φύλλων φυτών ελιάς. Σκοπός της εργασίας ήταν να διαπιστωθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ δραστηριότητας της αμμώνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης και συσσώρευσης φαινολικών συστατικών στα φύλλα. Περαιτέρω, καθώς έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων φαινολικών συστατικών κάτω από τις συνθήκες αυτές μπορεί να μην είναι αποτέλεσμα *de novo* βιοσύνθεσης, εξετάστηκε εάν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνάδουν με μια τέτοια υπόθεση. Για το σκοπό αυτό, παράλληλα με την ανάλυση του διαλυτού κλάσματος των φαινολικών συστατικών, αναλύθηκαν και τα φαινολικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φύλλων. Το τελευταίο αυτό κλάσμα εξετάστηκε καθώς, εάν η παραπάνω υπόθεση αληθεύει, η αύξηση ορισμένων φαινολικών συστατικών στα φύλλα μπορεί να προέρχεται και από τα κυτταρικά τοιχώματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης βορίου στα φύλλα, ανάλογα με την έκταση της έλλειψης και την ηλικία τους. Ωστόσο, η μείωση αυτή προσέγγισε τα κατώτερα επίπεδα επάρκειας του στοιχείου αλλά δεν έφτασε σε τιμές οι οποίες χαρακτηρίζονται ως τροφοπενιακές. Η κλιμάκωση της συγκέντρωσης βορίου μεταξύ φύλλων διαφορετικής ηλικίας ήταν σύμφωνα με το γνωστό πρότυπο το οποίο οφείλεται στην επανεκκίνηση του στοιχείου στο συγκεκριμένο φυτικό είδος (Brown and Shelp, 1997; Liakopoulos *et al.*, 2005).

Αλλαγές στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των φύλλων σημειώθηκαν κυρίως στα ώριμα φύλλα των τριών ελλειμματικών μεταχειρίσεων. Αντίθετα, στα νεαρά φύλλα, οι μεταβολές ήταν μη αξιολογήσιμες. Το γεγονός αυτό, πέραν της πιθανής επίδρασης της ηλικίας των φύλλων, μπορεί να σχετίζεται και με τη συγκέντρωση του στοιχείου στα φύλλα κάθε κατηγορίας και συγκεκριμένα με την σημαντική μείωση της συγκέντρωσης βορίου στα ώριμα φύλλα συγκριτικά με τα νεαρά. Η αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου θα μπορούσε να σχετίζεται με τον εγκλιματισμό των φύλλων στο θρεπτικό καθεστώς. Η δραστηριότητα της αμμώνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης παρουσίασε αύξηση στις ελλειμματικές μεταχειρίσεις συγκριτικά με το μάρτυρα. Η επίδραση αυτή της έλλειψης βορίου στα φυτά έχει αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις, αν και το ακριβές αίτιο δεν είναι γνωστό (Cakmak *et al.*, 1995; Cakmak and Römheld, 1997; Cara *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σημειώθηκε νωρίτερα για τα ώριμα φύλλα συγκριτικά με τα νεαρά γεγονός το

Συζήτηση

οποίο, όπως και στην περίπτωση των πρωτεϊνών, μπορεί να σχετίζεται με τα επίπεδα του βορίου στα φύλλα κάθε ηλικίας.

Παρά την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για την ροή υποστρωμάτων προς τη βιοσυνθετική οδό των φαινολικών, η συγκέντρωση των φαινολικών του διαλυτού κλάσματος των νεαρών φύλλων παρουσίασε αύξηση μόνο στη μεταχείριση όπου η συγκέντρωση του βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ήταν 2 μM (B2) και όχι στις πλέον ελλειμματικές μεταχειρίσεις με συγκέντρωση βορίου 0,5 και 0 μM (B0.5 και B0 αντίστοιχα). Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να ερμηνευτεί με τα μέχρι τώρα γνωστά για τις αντιδράσεις των φυτών στην έλλειψη βορίου. Αντίθετα, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του κλάσματος των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσίασε μείωση ανάλογη με την έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Η αντίδραση αυτή των φυτών δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία έως τώρα και ως τέτοια χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Είτε η ενσωμάτωση τέτοιων μορίων πιθανότατα στα πηκτινικά πολυμερή ήταν μικρότερη υπό έλλειψη του στοιχείου, είτε μέρος των ενσωματωμένων φαινολικών αποσπάστηκε ως αποτέλεσμα των πειραματικών μεταχειρίσεων. Καθώς η πηκτίνη αποτελεί πολυμερές κυρίως του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος, του οποίου η βιοσύνθεση ολοκληρώνεται σχετικά σύντομα (Lerouxel *et al.*, 2006), ο δεύτερος μηχανισμός είναι περισσότερο πιθανός. Ωστόσο, αύξηση των φαινολικών συστατικών του διαλυτού κλάσματος παρατηρήθηκε μόνο στην μεταχείριση B2 και όχι στις B0.5 και B0, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί μέσω του πρώτου μηχανισμού.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την υπόθεση σύμφωνα με την οποία η έλλειψη βορίου στο φυτό της ελιάς προκαλεί μείωση των φαινολικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος μέσω απόσπασης ή μη ενσωμάτωσής τους ενδεχομένως στα πηκτινικά πολυμερή. Ωστόσο, περισσότερα πειραματικά δεδομένα απαιτούνται ώστε να διαλευκανθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται αυτή η αλλαγή στη χημεία των κυτταρικών τοιχωμάτων. Σε επόμενα πειράματα θα πρέπει να διερευνηθεί η χημική δομή των συστατικών καθώς και ο ακριβής τρόπος πρόσδεσής τους στα κυτταρικά τοιχώματα. Επίσης θα πρέπει να διερευνηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ των φαινολικών του κυτταρικού τοιχώματος και του διαλυτού κλάσματος του κυττάρου.

Βιβλιογραφία

- Aerts, R. and Chapin, III F.S. 2000. The mineral nutrition of wild plants revisited: A Reevaluation of processes and patterns. In: *Advances in Ecological Research*, Vol 30, San Diego: Academic Press.
- Baluska, F., Volkmann, D., and Barlow, P.W. (2000a): Actin-based domains of the 'cell periphery complex' and their associations with polarized 'cell bodies' in higher plants. *Plant Biol.* 2: 253-267.
- Banuelos, G.S., Cardon, G. Pflaum, T. and Akohoue, S. 1992. Comparison of dry ashing and wet acid digestion on the determination of boron in plant tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23: 2383-2397.
- Barr, R. and F.L. Crane. 1991. Boron stimulates NADH oxidase activity of cultured carrot cells. In: D.D. Randall, D.G. Blevins, D.G. and C.D. Miles (eds). *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol. 10, University of Missouri Press, Columbia, USA, pp. 290.
- Bassil, E., Hu, H.N. and 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.
- Bennett, A., Rowe, R.I., Soch, N. and Eckhert, C.D. 1999. Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth. *J. Nutr.* 129: 2236-2238.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 481-500.
- Brown P. H. and Hu, H. N. (1994) Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.* 91: 435-441.
- Brown, P.H. and Hu, H. 1997. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? *Plant and Soil*, 196: 211-215.
- Brown P. H. and Shelp, B. J. (1997) Boron mobility in plants. *Plant and soil* 193, 85-101.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, MA., Bassil, ES., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. and Römhelt, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4: 205-223.
- Bryant, J.P., Chapin, III F.S. and Klein, R.D. 1983. Carbon / nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *OIKOS*, 40: 357-368.
- Cakmak I, Hengeler C. And Marchner H. 1994. Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 45:1251-1257.
- Cakmak, I., Kurz, H. and 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.
- Cakmak I. and Römhelt V. 1997. Boron deficiency – induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil*, 193: 71-83.
- Camacho-Cristóbal, J.J., Anzellotti, D. and González-Fontes, A. 2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 997-1002.
- Canny, M.J. 1995. Apoplastic water and solute movement: New rules for an old space. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 215-236.

Βιβλιογραφία

Cara, F.A., E. Sánchez, J.M. Ruiz and L. Romero. 2002. Is phenol oxidation responsible for the short term effects of boron deficiency on plasma-membrane permeability and function in squash roots? *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 853-858.

Chishaki, N. and Horiguchi, T. 1997. Responses of secondary metabolism to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 987-991.

Chou, C.-H. 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, 18: 609-636.

Cseh, E. and Fodor, F. 1997. Role of boron in other plasmalemma turbo reductase activity. *In: Boron in Soils and Plants*, RW Bell and B Rerkasem (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Dannel, F., Pfeffer, H. and Romheld, V. (1997). Effect of pH and boron concentration in the nutrient solution on translocation of boron in the xylem of sunflower in : *Boron in Soil and Plants*, RW Bell and B. Rerkasem (eds), The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.

Dannel, F., Pfeffer, H. and Romheld, V. (1998). Compartmentation of boron in roots and leaves of sunflower as affected by boron supply. *Journal of Plant Physiology*, 153: 615-622.

Dannel, F., Pfeffer, H. and Romheld, V. (1999). Distribution within the plant or compartmentation does not contribute substantially to the detoxification of excess boron in sunflower. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 95-99.

Dannel, F., Pfeffer, H. and Romheld, V. (2000). Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using stable isotopes ¹⁰B and ¹¹B, *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 397-405.

Dannel, F., Pfeffer, H., Walch-Liu, P. and Römheld, V. 2001. Characteristics of boron uptake in roots of sunflower by a putative boron transporter. *Plant Nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*. W.J.Horst et al. (eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 162-163.

Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 2002. Update on boron in higher plants – Uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biology*, 4: 193-204.

Dell, B. and Huang, L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil*, 193: 103-120.

Dembitsky, V.M., R. Smoum, A.A. Al-Quntar, H. Abu Ali, I. Pergament and M. Srebnik. 2002. Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Sci.*, 163: 931-942.

Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995. Stress – induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1085-1097.

Dorbas, C. and Brown, P. H. (2000). Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *J. Membrane Biol.* 175, 95-105.

Dorbas, C., Chrispeels, M. J., and Brown, P. H. (2000) Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* 124: 1349-1361.

Dugger, W.M. 1983. Boron in plant metabolism. *In: Encyclopedia of Plant Physiology*, A Läuchli and RL Bielecki (eds), New Series, Volume 15A. Inorganic Plant Nutrition. Berlin: Springer – Verlag.

El-Shintinawy, F. 1999. Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves. *Photosynthetica*, 36: 565- 573.

- Ferrol, N., A. Belver, M. Roldan, M.P. Rodriguez-Rosales and J.P. Donaire. 1993. Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes. *Plant Physiol.*, 103: 763-769.
- Ferrol, N. and J.P. Donaire. 1992. Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Sci.*, 86: 41-47.
- Findelee, P., Wimmer, M. and Goldbach, H.E. 1997. Early effects of boron deficiency on physical cell wall parameters, hydraulic conductivity and plasmalemma – bound reductase activities in young *C. pepo* and *V. faba* roots. In: *Boron in Soils and Plants*, RW Bell and B Rerkasem, (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Fleischer A, Titel C, Ehward R (1998). The boron requirement and cell wall properties of growing- and stationary- phase suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiology* 117: 1401-1410.
- Fleischer, A., M.A. O'Neill and R. Ehwald. 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 Physiol.*, 121: 829-838.
- Fort, D.J., Propst, T.L., Stover, E.L., Strong, P.L. and Murray, F.J. 1998. Adverse reproductive and developmental effects in *Xenopus* from insufficient boron. *Biol. Trace Elem. Res.* 66: 237-259.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: *Phytochemical Adaptations to stress*, BN Timmermann, C Steelink and FA Loewus (eds), New York: Plenum.
- Goldbach, H.E. 1984. Influence of boron nutrition on boron nutrition on net uptake and efflux of ^{32}P and ^{14}C -glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 118: 431-438.
- Goldbach, H.E., Blaser-Grill, J., Lindemann, N., Porzelt, M., Hormann, C., Lupp, B. and Gessner, B. 1991. Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic process. In: *Current topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol. 10, DD.
- Goldbach. H. E. (1997) A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants : suggestions for further research and methodological requirements. *J. Trace and Microprobe Tech.* 15: 51-91.
- Goldbach, H.E. and M.A. Wimmer. 2007. Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure? *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 170: 39-48.
- Gomes-Rodriguez, M.V., Luna del Castillo de D. and Alvarez-Tinaut, M.C. 1987. The evolution of glucose-6P-dehydrogenase and 6P-gluconate-dehydrogenase activities and the ortho-diphenolic content of sunflower leaves cultivated under different boron treatments. *J. Plant Nutr.*, 10: 2211-2229. .
- Gupta, U.C. (1979) Boron nutrition of crops. *Advances in Agronomy* 31: 273-307. .
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H. and Berenbaum, M.R. 2001. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*, 4: 86-95.
- Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Honkanen, T., Larsson, S. and Lempa, K. 1998. Biosynthetic origin of carbon- based secondary compounds- cause of variable responses of woody plants to fertilization? *Chemoecology*, 8: 133-139.
- Herms, D.A. and Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or to defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3): 283-335.
- Hewitt, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent.

Βιβλιογραφία

- Hirsch AM and Torrey JG. (1980). Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Canadian journal of Botany*, 58:856-866.
- Huang. C. and Graham. R. D. (1990) Resistance of wheat genotypes to boron toxicity is expressed at the cellular level. *Plant and soil* 126: 295-300.
- Huang, L., Ye, Z. and Bell, R.W. 1996. The importance of sampling immature leaves for the diagnosis of boron deficiency in oilseed rape (*Brassica napus* cv. Eureka). *Plant and Soil*, 183: 187-198.
- Hu, H. and 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.
- Hu, H., Brown, P.H. and Labavitch, J.M. 1996. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany*, 47: 227-232.
- Hu, H. and Brown, P.H. (1997). Absorption of boron by plants roots. *Plant and soil* 193, 49-58.
- Inderjit, and del Moral, R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? *The Botanical Review*, 63: 221-230.
- Ishii, T. and Matsunaga, T. 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.* 284: 1-9.
- Karabourniotis G. Kofidis G, Fasseas C, Liakoura V, and Drossopoulos I. 1998. Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 85:1007-1012.
- Kastori, R., Plesnicar, M., Pankovic, D. and Sakac, Z. 1995. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1751-1763.
- Kobayashi, M., Matoh T. and Azuma, J.-I (1996). *Plant physiology* 110:1017-1020.
- Kobayashi, M., Ohno, K., and Matoh, T. (1997) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. II. Characterization of the boron-poly-saccharide complex. *Plant Cell Physiol.*, 38: 676-683.
- Larcher, W. 1995. *Physiological plant ecology*. New York: Springer-Verlag.
- Lee, S. and Aronoff, S. 1967. Boron in plants: a biochemical role. *Science* 158: 798-799.
- Lerouxel, O., D.M. Cavalier, A.H. Liepman and K. Keegstra. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 621-630.
- Lewis, D. H. (1980) Boron, lignification and the origin of vascular plants- a unified hypothesis. *New phytol*, 84:209-229.
- Liakopoulos G. and Karapourniotis G., (2005). Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: a compined growth chamber and field study. *Tree Physiology*, 25: 307-315.
- Logan BA, Demming-Adams B, Rosentiel TN and Adams III WW. (1999). Effects of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relation to other metabolic characteristics. *Planta*, 209:213-220.
- Longnecker N. 1994. Nutrient deficiencies and vegetative growth. In *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity : Modern Approaches*, AS Basra (ed), New York: Marcel Dekker.

- Loomis, W.D. and Durst, R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3: 229-239.
- Makkee, M., A.P.G. Kieboom and H. van Bekkum. 1985. Studies on borate esters. III. Borate esters of D-mannitol, D-glucitol, D-fructose and D-glucose in water. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 104: 230-235.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, London: Academic Press.
- Matoh, T., Ishigaki, K., Mizutani, M., Matsunaga, W., and Takabe, K. (1992) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for and intracellular localization of boron and selection of cells tha tolerate low levels of boron. *Plant Cell Physiol.* 33: 1135-1141.
- Matoh, T., Ishigaki K., Ohno, K. and Azuma, J, 1993. Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. *Plant Cell Physiology*, 34: 639-642. .
- Matoh, T., Kawaguchi, S. and Kobayashi, M. 1996. Ubiquity of a borate – rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiology*, 37: 636-640.
- Matoh T, Takasaki M, Kobayashi M and Takabe K. (2000). Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. III. Characterization of the boron- rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron. *Plant Cell Physiology*, 41:363-366.
- Nielsen, F.H. 2000. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition* 16: 512-514.
- O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P and Darvill AG. 2001. Requirement of borate cross – linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Science*, 294: 846-849.
- O'Neill, M.A., T. Ishii, P. Albersheim and A.G. Darvill. 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 109-139.
- Parr, A.J., Loughman, B.C. 1983. Boron and membrane function in plants. In: Robb DA, Pierpoint WS, (eds), *Metals and micronutrients. Uptake and utilization by plants*. New York: Academic Press, 87-107.
- Pfeffer, H., Dannel, F., and Romheld, V. (1999). Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower ? *J. Plant Physiol.* 155, 34-40.
- Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 1997. Compartmentation of boron in roots and its translocation to the shoot of sunflower as affected by short term changes in boron supply. In: *Boron in Soils and Plants*, RW Bell and B Rerkasem (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 2001. Boron compartmentation in roots of sunflower plants of different boron status: A study using the stable isotopes ¹⁰B and ¹¹B adopting two independent approaches. *Physiologia Plantarum*, 113: 346-351.
- Pilbeam, D.J. and Kirkby, E.A. 1983. The physiological role of boron in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 563-582.
- Pollard, A.S., A.J. Parr and B.C. Loughman. 1977. Boron in relation to membrane function in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 28: 831-841.
- Power, P.P. and Woods, W.G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. In: *Plant Soil* 193: 1-13.

Βιβλιογραφία

- Price KR and Rhodes MJC. 1997. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74:331-339.
- Robertson, G.A. and B.C. Loughman. 1974. Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. *New Phytol.*, 73: 291-298.
- Roth-Bejerano, N. and Itai, C. 1981. Effect of boron on stomatal opening in epidermis strips of *Commelina communis*. *Physiol. Plant.* 52: 302-304.
- Rowe, R.I. and Eckhert, C.D. 1999. Boron is required for zebrafish embryogenesis. *J. Exp. Biol.* 202: 1649-1654.
- Ruiz, J.M., P.C. Garcia, R.M. Rivero and L. Romero. 1999. Response of phenolic metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Physiol. Plant.*, 106: 151-157.
- Sah, R.N. and P.H. Brown. (1997). Techniques for boron determination and their application to the analysis of plant and soil samples. *Plant Soil*, 193: 15-33.
- Seigler, D.S. 1998. Plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Shelp, B.J. 1993. Physiology and biochemistry of boron in plants. In: Boron and its role in crop production, UC Gupta (ed), Boca Raton: CRC Press.
- Shelp Bj, Kitheka AM, Vanderpool RA, Van Cauwenberghe OR and Spiers GA (1998). Xylem – to- phloem transfer of born in broccoli and lupin during early reproductive growth. *Physiologia Plantarum*, 104: 533-540.
- Shepherd C.J. 1951. The enzymes of carbohydrate metabolism in *Neurospora*. *Biochemical Journal*, 48: 483-486.
- Shorrocks, V.M (1997) The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant and soil* 193, 121-148.
- Shvarts, E.M., R.T. Ignash and R.G. Belousova. 2005. Reactions of polyols with boric acid and sodium monoborate. *Russ. J. Gen. Chem.*, 75: 1687-1692.
- Sivaguru, M., Baluska, F., Volkmann, D., Felle, H.H., and Horst, W.J. (1999): Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119: 1073-1082.
- Stangoulis, J.C.R, Reid, R.J., Brown, P.H. and Graham, R.D. 2001. Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta* 213: 142-146.
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G. and Karabourniotis G. (2006b). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Diitrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*, 56: 293-300.
- 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. and Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420: 337-340.
- Tate, S, S, and Meister, A (1978) Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of gamma-glutamyl transeptidase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75, 4806-4809.
- Tattini, M., Gucci, R., Romani, A., Baldi, A. and Everard, J.D. 1996. Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 98: 117-124.

- Teasdale R.D. and Richards DK. 1990. Boron deficiency in cultured pine cells. *Plant Physiology*, 93: 1071–1077.
- Thellier M., Duval Y. and 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.
- van Duin, M., J.A. Peters, A.P.G. Kieboom and H. van Bakkum. 1984. Studies on borate esters 1. The pH dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by ^{11}B NMR. *Tetrahedron*, 40: 2901-2911.
- Wang, Z.Y., Y.L. Tang, F.S. Zhang and H. Wang. 1999. Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. *J. Plant Nutr.*, 22: 543-550.
- Woods, W.G (1996) Review of possible boron speciation relating to its essentiality. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 9, 153-163.
- Yamauchi T., Hara, T., and Sonoda, Y. (1986). Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall. *Plant Cell Physiol.* 27:729-732.
- Γκάνη - Σπυροπούλου Κ. 2003α. Πρόσληψη και μεταφορά ιόντων. Από: Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Α. Κ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Δροσόπουλος, Ι. 1992. Στοιχεία ανόργανης διατροφής των φυτών. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Δροσόπουλος Ι. 1998. Φυσιολογία φυτών. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. 2002. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν φυσιολογικές παράμετροι της σχέσης μεταξύ έλλειψης του απαραίτητου μικροστοιχείου βορίου και του δευτερογενούς μεταβολισμού, συγκεκριμένα του μεταβολισμού των φαινολικών συστατικών, στα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea*). Το βορικό οξύ, η κυρίαρχη μορφή βορίου στα φυτικά κύτταρα, μπορεί να σχηματίσει διεστερικά σύμπλοκα με φαινολικές ενώσεις οι οποίες διαθέτουν δομή *cis*-διόλης. Η πιθανή δημιουργία τέτοιων συμπλόκων υπό συνθήκες επάρκειας και η αντίστοιχη παρεμπόδιση του σχηματισμού τους ή η διάστασή τους υπό συνθήκες έλλειψης βορίου είναι ένα φαινόμενο το οποίο παρέχει το βιοχημικό υπόβαθρο για τη διατύπωση της υπόθεσης σύμφωνα με την οποία η αύξηση ορισμένων φαινολικών συστατικών στα κύτταρα υπό τροφопενία βορίου δεν οφείλεται αποκλειστικά στην *de novo* σύνθεσή τους αλλά επιπλέον και στην διάσπαση των συμπλόκων τους με το βορικό οξύ. Στο πειραματικό μέρος εξετάστηκε η πιθανή σχέση μεταξύ δραστηριότητας της αμμώνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης και συσσώρευσης φαινολικών συστατικών στα φύλλα της ελιάς υπό διάφορα καθεστώτα θρέψης με βόριο. Παράλληλα με την ανάλυση του διαλυτού κλάσματος των φαινολικών συστατικών, αναλύθηκαν και τα φαινολικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φύλλων. Το τελευταίο αυτό κλάσμα εξετάστηκε καθώς, εάν η παραπάνω υπόθεση αληθεύει, η αύξηση ορισμένων φαινολικών συστατικών στα φύλλα μπορεί να προέρχεται και από τα κυτταρικά τοιχώματα. Η έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του βορίου στα φύλλα ανάλογα με την μεταχείριση αλλά και την ηλικία τους. Μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα ώριμα φύλλα γεγονός που οφείλεται στην επανεκκίνηση του στοιχείου. Στα ώριμα φύλλα των τριών ελλειμματικών μεταχειρίσεων σημειώθηκε μεταβολή του πρωτεϊνικού περιεχομένου σε αντίθεση με τα νεαρά φύλλα που δεν παρουσίασαν αξιόλογες μεταβολές. Η δραστηριότητα της αμμώνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης παρουσίασε αύξηση στις ελλειμματικές μεταχειρίσεις συγκριτικά με το μάρτυρα, αύξηση που διαγνώστηκε νωρίτερα στα ώριμα φύλλα συγκριτικά με τα νεαρά. Ωστόσο, παρά την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, η συγκέντρωση των φαινολικών του διαλυτού κλάσματος αυξήθηκε μόνο στην μεταχείριση όπου η συγκέντρωση του βορίου στα θρεπτικό διάλυμα ήταν 2μM. Αντίθετα η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του κλάσματος των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσίασε μείωση ανάλογη με την έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα της καλλιέργειας. Συμπερασματικά, η έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας προκάλεσε εμφανώς παρεμπόδιση της πρόσδεσης των φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα ή αύξηση του ρυθμού υδρόλυσής τους, γεγονός το οποίο

Περίληψη

συνδέει τις παραπάνω μεταβολές με την θρεπτική κατάσταση των κυττάρων. Από την άλλη μεριά, η σχέση μεταξύ δραστηριότητας της αμμώνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης και συγκέντρωσης των διαλυτών φαινολικών δεν ήταν τόσο εμφανής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, είναι ενδεχόμενη η ισχύς της υπόθεσης εργασίας. Έτσι, η πιθανή απελευθέρωση φαινολικών συστατικών από το κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να θεωρηθεί ως μια πρωτογενής αντίδραση των κυττάρων στην έλλειψη βορίου.

