

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση της ανεπάρκειας βορίου σε ορισμένους μεταβολίτες του κυτταρικού τοιχώματος των φύλλων της ελιάς (*Olea europaea*)

ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ ΓΑΡΟΦΑΛΑΚΗ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Γ. ΛΙΑΚΟΠΟΥΛΟΣ (ΛΕΚΤΟΡΑΣ)  
ΑΘΗΝΑ 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση της ανεπάρκειας βορίου σε ορισμένους μεταβολίτες του  
κυτταρικού τοιχώματος των φύλλων της ελιάς (*Olea europaea*)

ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ ΓΑΡΟΦΑΛΑΚΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Γ. ΛΙΑΚΟΠΟΥΛΟΣ (ΛΕΚΤΟΡΑΣ)

ΑΘΗΝΑ 2011



## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση της ανεπάρκειας βορίου σε ορισμένους μεταβολίτες του κυτταρικού τοιχώματος των φύλλων της ελιάς (*Olea europaea*).

ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ ΓΑΡΟΦΑΛΑΚΗ

Το θέμα και η τριμελής εξεταστική επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εγκρίθηκαν με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 16/17-05-2010).

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γεώργιος Λιακόπουλος, Λέκτορας (Επιβλέπων)

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Μέλος)

Στυλιανή Χωριανοπούλου, Λέκτορας (Μέλος)



## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	5
Περίληψη .....	7
Abstract .....	9
Πρόλογος .....	11
1. Εισαγωγή.....	13
1.1. Ανόργανη διατροφή των φυτών .....	13
1.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος.....	13
1.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού .....	14
1.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων .....	15
1.5. Τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων .....	16
1.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων.....	16
1.5.2. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη και τον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών .....	17
1.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών .....	17
1.6. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών .....	18
1.6.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου.....	18
1.6.2. Το βόριο στο έδαφος.....	19
1.6.3. Υποκυτταρική κατανομή του βορίου .....	20
1.6.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού.....	21
1.6.5. Ο ρόλος του βορίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών .....	21
1.6.5.1. Ρόλος του βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα .....	22
1.6.5.2. Πηκτινικοί πολυσακχαρίτες .....	23
1.6.5.3. Βόριο και πηκτίνη.....	24
1.6.5.4. Εμπλοκή του βορίου στο μεταβολισμό των φαινολικών συστατικών.....	25
1.7. Η ελιά.....	27
1.7.1. Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς.....	27
1.7.2. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της ελιάς.....	27
1.7.3. Η επίδραση της έλλειψης βορίου στην ανάπτυξη και φυσιολογία της ελιάς .....	28
2. Σκοπός της εργασίας .....	31
3. Υλικά και Μέθοδοι .....	33
3.1. Υδροπονική καλλιέργεια και πρόκληση τροφοπενίας βορίου σε φυτά ελιάς .....	33
3.1.1. Φυτικό υλικό και περιγραφή των συνθηκών καλλιέργειας.....	33
3.1.1.1. Προετοιμασία του φυτικού υλικού και του υποστρώματος καλλιέργειας.....	33
3.1.1.2. Περιγραφή του συστήματος πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας .....	34
3.1.1.3. Συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας .....	35
3.2. Πειραματική πορεία .....	36
3.2.1. Χρονοδιάγραμμα πειράματος, κατηγορίες δειγμάτων και πειραματικοί χειρισμοί.....	36
3.3. Μετρήσεις παραμέτρων ανάπτυξης και βιοχημικών παραμέτρων.....	36

## Περιεχόμενα

3.3.1. Συγκέντρωση βορίου.....	36
3.3.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση ολικού βορίου .....	36
3.3.1.2. Μέτρηση συγκέντρωσης βορίου μέσω χρωματικής αντίδρασης αζωμεθίνης.....	37
3.3.2. Ανάλυση φαινολικών.....	37
3.3.2.1. Απομόνωση κυτταρικών τοιχωμάτων.....	37
3.3.2.2. Εκχύλιση εστεροποιημένων φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοιχώμα .....	37
3.3.2.3. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών προσδεδεμένων στο κυτταρικό τοιχώμα ως βορικοί διεστέρες.....	38
3.3.2.4. Ανάλυση φαινολικών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης .....	38
4. Αποτελέσματα .....	39
4.1. Συγκέντρωση βορίου στα φύλλα των φυτών.....	39
4.2. Παράμετροι ανάπτυξης των φυτών .....	39
4.3. Σύσταση φαινολικών συστατικών των φύλλων.....	42
4.3.1. Σύσταση διαλυτού κλάσματος.....	42
4.3.2. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων .....	42
5. Συζήτηση.....	47
5.1. Επίδραση της τροφοπενίας βορίου στη συγκέντρωση βορίου στα φύλλα και την ανάπτυξη των φυτών .....	47
5.2. Επίδραση της τροφοπενίας βορίου στη σύσταση των φαινολικών συστατικών των φύλλων.....	48
6. Βιβλιογραφία.....	51

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σύστασης φύλλων ελιάς σε διαλυτά φαινολικά συστατικά αλλά και σε φαινολικά του κυτταρικού τοιχώματος, υπό τροφοπενία βορίου. Τα φαινολικά του κυτταρικού τοιχώματος μελετήθηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση η οποία διασπά τους πάσης φύσεως εστερικούς δεσμούς μεταξύ φαινολικών συστατικών και καταλοίπων του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και μετά από επώαση με κατάλληλο βορονικό οξύ το οποίο προκαλεί επιλεκτική υδρόλυση διεστερικών δεσμών μεταξύ του βορικού οξέος και των φαινολικών συστατικών τα οποία ενδεχομένως προσδένονται με τον τρόπο αυτό σε κατάλοιπα πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος.

Κατά την πειραματική περίοδο πραγματοποιήθηκε υδροπονική καλλιέργεια φυτών ελιάς σε θρεπτικό μέσο με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Βορίου (0  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  και 23 $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). Διακρίθηκαν τρεις ηλικιακές κατηγορίες φύλλων, εκπυσσόμενα, πλήρως εκπυγμένα και ώριμα. Αρχικά, απομονώθηκαν τα φαινολικά συστατικά του διαλυτού κλάσματος. Στην συνέχεια απομονώθηκαν κυτταρικά τοιχώματα και έγινε παραλαβή και ανάλυση εστεροποιημένων φαινολικών συστατικών μετά από αλκαλική υδρόλυση με  $\text{NaOH}$  καθώς και παραλαβή και ανάλυση φαινολικών συστατικών τα οποία είναι θεωρητικά προσδεδεμένα μέσω βορικών διεστέρων μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ (3-NBA). Οι ελλειμματικές σε βόριο μεταχειρίσεις προκάλεσαν τροφοπενία βορίου ιδιαίτερα στα νεαρά φύλλα. Επίσης, παρατηρήθηκε δραματική αύξηση της συγκέντρωσης του ακτεοσίδη (στο διαλυτό κλάσμα) σε όλα σχεδόν τα τροφοπενιακά φύλλα, ιδιαιτέρως στη μεταχείριση B0. Τα αποτελέσματα των δύο κλασμάτων φαινολικών συστατικών των απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων έδειξαν ότι δύο συστατικά, τα A315 και A331, με χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης φαινολικών συστατικών, προσδένονται με διαφορετικό τύπο εστερικού δεσμού συγκριτικά με τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και πιθανότατα μέσω βορικών διεστερικών δεσμών. Από την άλλη πλευρά, τα φαινολικά συστατικά που προσδένονται με συνήθεις εστερικούς δεσμούς στο κυτταρικό τοίχωμα παρουσίασαν αύξηση λόγω της τροφοπενίας βορίου γεγονός το οποίο διαπιστώνεται για πρώτη φορά. Η διαφορετική επίδραση της τροφοπενίας βορίου στα φαινολικά συστατικά των δύο κλασμάτων υποδηλώνει διαφορετική φύση των δεσμών μέσω των οποίων τα συστατικά αυτά προσδένονται στο τοίχωμα.

**Λέξεις κλειδιά:** *Olea europaea*, βόριο, φαινολικά συστατικά, κυτταρικά τοιχώματα, ακτεοσίδης, αλκαλική υδρόλυση, 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ, ανάλυση HPLC.





## Abstract

**Title:** Effect of boron deprivation on metabolites of cell wall of olive *Olea europaea* leaves.

The purpose of this work was the study of the composition of olive leaves in soluble phenolic compounds and phenolic compounds of the cell wall, under boron deficiency. The phenolics of the cell wall were studied after alkaline hydrolysis which breaks down ester linkages between phenolic compounds and residues of cell wall polysaccharides and after incubation with the appropriate boronic acid which causes selective hydrolysis of tentative complexes between phenolic compounds and polysaccharide residues through borate diester bonds.

During the experimental period, olive seedlings were grown using semi-hydroponic cultivation in sand supplied with media with three different concentrations of boron (0 mM, 0,5 mM and 23 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). Three leaf ages were sampled, namely developing, fully expanded and mature. Phenolic compounds of the soluble and the insoluble (cell wall bound) fraction were isolated and analysed. For the latter, phenolic compounds of isolated cell walls, were either released via alkaline hydrolysis with NaOH or via incubation with 3-nitrophenylboronic acid (3-NBA). According to the results, low boron supply (treatments B0 and B05) caused boron deficiency which was especially apparent in young leaves. A dramatic increase in the concentration of acteoside (a phenylethanoid glucoside of the soluble fraction) was apparent in almost all low-boron treatments and leaf ages but especially in B0 plants. Study of the composition of phenolic compounds of the two different fractions isolated from cell walls showed that two metabolites, A315 and A331, with characteristic absorption spectra of substituted aromatic ring, are bound through a different type of ester bond compared with other phenolic components found in the NaOH fraction, probably through borate-diester links, since they were only present in the 3-NBA fraction. On the other hand, phenolic components which were bound via normal ester bonds in the cell wall increased due to boron deficiency, a result that is reported for the first time. The different effect of boron deficiency on phenolic constituents of the two fractions suggests a different type of ester link through which these components attached to the cell wall.

**Keywords:** *Olea europaea*, boron, phenolic compounds, cell walls, acteoside, alkaline hydrolysis, 3-nitrophenyl-boronic acid, HPLC analysis.



## **Πρόλογος**

Στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, πραγμάτωσα την παρούσα πτυχιακή μελέτη στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών.

Με το πέρας αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που μου προσέφεραν την πολύτιμη βοήθεια τους, και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής είτε την με την ψυχική είτε με την γνωσιακή τους φροντίδα.

Αρχικά θα ήθελα να δώσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέπων μου, Λέκτορα κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την αμέριστη και ουσιαστική καθοδήγηση του, την υπομονή του και την στήριξη του σε κάθε βήμα έως και την ολοκλήρωση της. Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη για την συμμετοχή του ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής καθώς και για την υποδοχή και αποδοχή μου ως μέλος του εργαστηρίου. Επιθυμώ να ευχαριστήσω τη Λέκτορα κ. Στέλλα Χωριανοπούλου για την συμμετοχή της ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Ένα άλλο άτομο που θα ήθελα να ευχαριστήσω είναι τον Διδάκτορα, και μέλος ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο για την βοήθεια που μου παρείχε όποτε την χρειάστηκα. Τη φίλη και συναδέλφο στο εργαστήριο κ. Νατάσσα Κοσμίδου για τη συνεργασία στο κοινό μέρος του πειράματος αυτής της εργασίας, Επίσης, την υποψήφια διδάκτορα κ. Παναγιώτα Μπρέστα για την βοήθεια της και την στήριξη κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω τον Γεωπόνο και φυτωριούχο κ. Γεώργιο Κωστελένο για την ευγενική χορηγία των πειραματοφύτων ελιάς τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Πάνω από όλα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη και την αγάπη της όλα αυτά τα χρόνια, τους φίλους μου, αλλά και την αμέριστη συμπαράσταση του Μάνου.



## **1. Εισαγωγή**

### **1.1. Ανόργανη διατροφή των φυτών**

Ως **αυτότροφοι οργανισμοί**, τα πράσινα φυτά είναι ικανά να αξιοποιούν υλικά και ενέργεια που βρίσκουν στο αβιοτικό περιβάλλον για την παραγωγή των οργανικών μορίων τα οποία απαιτούνται για την κατασκευή της βιομάζας τους και το σύνολο των φυσιολογικών τους λειτουργικών. Η παρουσία στο περιβάλλον του συνόλου των ανόργανων στοιχείων τα οποία απαιτούν τα φυτά για την ανάπτυξή τους είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου. Τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, όπως ονομάζονται, επιπλέον θα πρέπει να απαντούν ως χημικώς αφομοιώσιμες μορφές και στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και μεταξύ τους αναλογίες ώστε η απορρόφησή τους από το ριζικό σύστημα των φυτών να πραγματοποιείται απρόσκοπτα. Η πρόσληψη και η αξιοποίηση των απαραίτητων 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).

Στο φυτικό σώμα μπορούν να ανιχνευτούν έως και 60 διαφορετικά ανόργανα στοιχεία. Από αυτά, ένας περιορισμένος αριθμός ανήκει στην κατηγορία των ονομαζόμενων απαραίτητων στοιχείων, χωρίς τα οποία δεν είναι δυνατή η ομαλή ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού. Έως σήμερα, 17 ανόργανα στοιχεία έχουν χαρακτηριστεί ως απαραίτητα για τα φυτά. Πρόκειται για τα C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B και Ni, τα οποία κατανέμονται σε μακροστοιχεία (C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe) και μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία (Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B, Ni), καθώς τα τελευταία απαιτούνται σε πολύ μικρότερες ποσότητες συγκριτικά με τα προηγούμενα. Υπάρχουν επίσης ορισμένα στοιχεία τα οποία θεωρούνται απαραίτητα σε ιδιαίτερες ομάδες κατώτερων ή ανώτερων φυτών αλλά όχι για το σύνολο των ειδών. Για το λόγο αυτό δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων. Αναφέρονται δε ως ωφέλιμα θρεπτικά στοιχεία και ορισμένα από αυτά είναι τα Na, Co, Si, V, Se, Ga, Al, J και Ti (Δροσόπουλος, 1998).

### **1.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος**

Τα βασικά ανόργανα θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για τη δόμηση της φυτικής βιομάζας, προσλαμβάνονται από την ατμόσφαιρα και το έδαφος. Ο άνθρακας (C), το οξυγόνο (O) και το υδρογόνο (H) παρέχονται μέσω των CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O ενώ τα υπόλοιπα ως ιόντα με την βοήθεια του ριζικού συστήματος από το εδαφικό διάλυμα (Δροσόπουλος, 1998).

## **Εισαγωγή**

Η διαθεσιμότητα ενός θρεπτικού στοιχείου εξαρτάται τόσο από τα εδαφικά χαρακτηριστικά όσο και από τα χαρακτηριστικά του φυτικού οργανισμού. Στους εδαφικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η συγκέντρωσή του θρεπτικού στοιχείου στο εδαφικό διάλυμα, η κατανομή του μεταξύ των τριών φάσεων του εδάφους, δηλ. των πρωτογενών ορυκτών, των ιονανταλλακτικών ορυκτών της αργίλου και του εδαφικού διαλύματος και ο ρυθμός μετακίνησής του από τη μια φάση στην άλλη (Δροσόπουλος, 1992). Η τιμή της συγκέντρωσης των θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα παρουσιάζεται μεταβαλλόμενη και εξαρτώμενη από τις αυξομειώσεις της συγκέντρωσης του νερού στο έδαφος όπως και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους όπως η χημική σύσταση του μητρικού πετρώματος, ο ρυθμός αποσάθρωσής του, η υφή του εδάφους, το pH, αλλά και οι επικρατούσες τιμές θερμοκρασίας, υγρασίας και αερισμού. Ορισμένοι βιοτικοί παράγοντες, όπως η δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εδάφους και η ύπαρξη συμβιωτικών σχέσεων, επίσης επιδρούν στα παραπάνω χαρακτηριστικά (Taiz and Zeiger, 1998).

### **1.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού**

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 ζώνη απορρόφησης. Τα θρεπτικά ιόντα στο έδαφος μπορούν να φθάσουν στην επιφάνεια της ρίζας, είτε με άμεση επαφή των ριζών με το έδαφος, είτε με διάχυση των ιόντων μέσω του εδαφικού διαλύματος, είτε με μετακίνηση των ιόντων μέσω μαζικής ροής κατά την κίνηση του εδαφικού διαλύματος κυρίως λόγω του ρεύματος της διαπνοής (Δροσόπουλος 1992).

Με την άμεση επαφή των ριζών και του εδάφους, πραγματοποιείται πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από την στερεή του φάση χωρίς την συμμετοχή του εδαφικού διαλύματος. Επιτυγχάνεται μέσω της ανταλλαγής ιόντων δεσμευμένων πάνω στα κολλοειδή του εδάφους με κατάλληλα ιόντα αντικατάστασης τα οποία απεκκρίνονται από τις ρίζες. Η διάχυση των ιόντων βασίζεται στην διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ των δύο περιοχών με αποτέλεσμα την κίνηση τους από την περιοχή με υψηλή προς την περιοχή με χαμηλή συγκέντρωση. Η μετακίνηση των ιόντων προς το ριζικό σύστημα μέσω μαζικής ροής οφείλεται στην κίνηση του εδαφικού διαλύματος από ευρύτερες εδαφικές περιοχές προς τη ζώνη απορρόφησης, κίνηση που οφείλεται στην ροή του ύδατος προς τις ρίζες. Η συγκέντρωση 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 αυτά υπάρχουν σε επαρκείς συγκεντρώσεις στο έδαφος (Δροσόπουλος 1992).

Αφού γίνει η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών στο φυτικό σώμα, ακολουθεί η διακίνηση τους μέσα σε αυτό. Η πορεία που μπορούν να ακολουθήσουν είναι είτε η αποπλαστική οδός, είτε η συμπλαστική οδός. Ο αποπλάστης αποτελείται από την υδατική φάση που βρίσκεται στο χώρο μεταξύ των κυττάρων και από την υδατική φάση που βρίσκεται προσροφημένη στα κυτταρικά τοιχώματα, λόγω της παρουσίας των πόρων του πλέγματος των πολυμερών (Δροσόπουλος, 1998). Η αποπλαστική λοιπόν κίνηση του νερού και των ιόντων, γίνεται χωρίς κατανάλωση ενέργειας, αφού δεν παρεμβάλλεται ο πρωτοπλάστης, και θεωρείται παθητική, γεγονός που αποδίδεται στους μηχανισμούς της διάχυσης και μαζικής ροής (Marschner, 1995). Η κίνηση του εδαφικού διαλύματος μέσω του αποπλαστικού χώρου καθορίζεται τόσο από τα ανατομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων όσο και από τις συνθήκες που επικρατούν στο έδαφος, στο φυτό και στην ατμόσφαιρα (Steudle, 2001). Η συμπλαστική κίνηση είναι κίνηση που πραγματοποιείται μέσω του συμπλάστη και η μεταφορά των ιόντων από κύτταρο σε κύτταρο γίνεται συμπλαστικά μέσω των πλασμοδεσμών. Η κίνηση αυτή απαιτεί την είσοδο του νερού και των ιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, είσοδος η οποία εμποδίζεται από την ύπαρξη της στοιβάδας των φωσφορολιπιδίων. Για την διέλευση των ιόντων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης χρησιμοποιούνται μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες επιτρέπουν είτε την παθητική (κανάλια) είτε την ενεργητική μεταφορά πρωτεϊνικών μεταφορέων.

### **1.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων**

Τα θρεπτικά στοιχεία συμμετέχουν κυρίως ως δομικά συστατικά του φυτικού σώματος, συμμετέχουν στο μεταβολισμό και τη διαχείριση της ενέργειας, ως συστατικά των ενζύμων και ως οσμωρυθμιστές. Τα μακροστοιχεία συμμετέχουν κυρίως ως δομικά συστατικά του κυττάρου, διατηρούν την κυτταρική οργάνωση και παίρνουν μέρος στις ενεργειακές μετατροπές και τις ενζυμικές αντιδράσεις. Ο άνθρακας, το υδρογόνο και το οξυγόνο αποτελούν το 94% της ξηρής ουσίας των φυτών ως τα κύρια δομικά στοιχεία των οργανικών ενώσεων. Ο φώσφορος, το άζωτο και το θείο, μαζί με τα προηγούμενα συνθέτουν την ομάδα των στοιχείων που αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Τα υπόλοιπα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία λειτουργούν ως παράγοντες σταθεροποίησης της ειδικής δομής του πρωτοπλάσματος και των οργανιδίων του κυττάρου, σταθεροποίησης των ενζύμων καθώς και παραγόντων με καταλυτική σημασία (Δροσόπουλος, 1992). Κύριο οσμωρυθμιστικό στοιχείο είναι το κάλιο. Το φυτικό σώμα απαιτεί για την φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του, το κάθε θρεπτικό στοιχείο σε μία ελάχιστη συγκέντρωση την οποία ονομάζουμε οριακή



## **Εισαγωγή**

συγκέντρωση. Η ύπαρξη ενός θρεπτικού στοιχείου σε υψηλότερη συγκέντρωση από την ιδανική δεν επιδρά συνήθως θετικά και οδηγεί σε φαινόμενα τοξικότητας. Ιδιαίτερα συχνές είναι οι περιπτώσεις τοξικότητας των μικροστοιχείων (Δροσόπουλος, 1998).

### **1.5. Τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων**

Τροφοπενία ονομάζεται η παθολογική κατάσταση, ενός φυτού, που προκαλείται από την μερική ή ολική έλλειψη κάποιου θρεπτικού στοιχείου. Η τροφοπενία μπορεί να είναι απλή, όταν υπάρχει έλλειψη ενός μόνο στοιχείου, ή σύνθετη, όταν το πρόβλημα περιλαμβάνει έλλειψη περισσότερων στοιχείων. Η έλλειψη μπορεί να οφείλεται στην ανεπάρκεια ή στην απουσία του στοιχείου στο υπόστρωμα, ή στην αδυναμία των ριζών να απορροφήσουν το στοιχείο, ενώ αυτό υπάρχει στο υπόστρωμα, είτε γιατί αυτό είναι δεσμευμένο, είτε γιατί η διαδικασία πρόσληψης παρεμποδίζεται από άλλους παράγοντες. Μία τροφοπενία προκαλεί δυσάρεστα αποτελέσματα σε μία ή περισσότερες ζωτικές λειτουργίες του φυτού και έχει ως συνέπεια την εμφάνιση συμπτωμάτων σε διάφορα όργανα του, στα φύλλα, στα μεριστώματα και στα αναπαραγωγικά όργανα. Συνήθως, το σημείο εμφάνισης, καθώς και το είδος των συμπτωμάτων είναι χαρακτηριστικό για κάθε τροφοπενία, ενώ πολλές φορές τα συμπτώματα υποχωρούν άμεσα μετά τη διόρθωση της συγκέντρωσης του αντίστοιχου θρεπτικού στοιχείου (Δροσόπουλος 1992). Τα συμπτώματα είναι συνήθως αποτέλεσμα μεταβολικών διαταραχών που προκαλούνται από την ανεπάρκεια του υπεύθυνου θρεπτικού στοιχείου. Τέτοιες διαταραχές είναι ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, η διαταραχή της οργάνωσης και λειτουργίας των μεμβρανών λόγω απώλειας της δομής τους ή απενεργοποίησης των ενζυμικών συστημάτων που εδράζουν σε αυτές. Συνέπεια των παραπάνω είναι ή απώλεια της της διαμερισματοποίησης και της εκλεκτικότητας του κυττάρου (Taiz and Zeiger, 1998).

#### **1.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων**

Τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς και στρατηγικές ώστε να αντιμετωπίζουν και να εγκλιματίζονται στις εκάστοτε συνθήκες του περιβάλλοντος. Η καταπόνηση αναφέρεται στην επίδραση δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος, η οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν την κανονική λειτουργία φυσιολογικών μηχανισμών. Η έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον ανάπτυξης των φυτών μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας καταπόνησης.

Οι μηχανισμοί οι οποίοι συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα του φυτικού οργανισμού έναντι της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων προϋποθέτουν την αντίληψη του ερεθίσματος και τη μεταγωγή κατάλληλων σημάτων ώστε να συμβούν οι απαραίτητες μεταβολικές τροποποιήσεις και να εκφραστούν τα κατάλληλα γονίδια

(Καραμπουρνιώτης 2003). Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως στόχο την ενίσχυση της λειτουργίας των μηχανισμών πρόσληψης, την τροποποίηση του περιβάλλοντος της ριζόσφαιρας, την αλλαγή του προτύπου χρησιμοποίησης των διαθέσιμων ποσοτήτων θρεπτικών στοιχείων, την κινητοποίηση αποθεμάτων από ώριμα όργανα, την αλλαγή στο πρότυπο ανάπτυξης με μείωση του ρυθμού αύξησης ή τροποποίηση του λόγου υπέργειου προς υπόγειο μέρος, την εκτροπή του πρωτογενούς μεταβολισμού προς άλλες μεταβολικές οδούς και τον δευτερογενή μεταβολισμό (Λιακόπουλος, 2003).

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

Η έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων επιδρά αρνητικά στα μεταβολικά μονοπάτια και στη συγκέντρωση των μορίων τα οποία περιλαμβάνουν το στοιχείο, προκαλώντας ορισμένες διαταραχές στον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών. Τέτοιες είναι η αδυναμία βιοσύνθεσης ορισμένων συστατικών του κυττάρου, η δυσλειτουργία ενζυμικών συστημάτων και η απώλεια της λειτουργικότητας των μεμβρανών (Taiz and Zeiger, 1998).

### **1.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών**

Οι αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης, όπως οι τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων επηρεάζουν ιδιαίτερα τον δευτερογενή μεταβολισμό. Μια θεωρία που έχει διατυπωθεί για την επίδραση της τροφοπενίας στον δευτερογενή μεταβολισμό είναι η θεωρία ισορροπίας άνθρακα/θρεπτικών στοιχείων. 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 τροφοπενίας, περιορίζεται η βιοσύνθεση της αντίστοιχης τάξης μεταβολικών προϊόντων (Bryan et al., 1983; Hamilton et al., 2001). Μια δεύτερη θεωρία, είναι αυτή της ισορροπίας ανάπτυξης /διαφοροποίησης, η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι διαθέσιμοι πόροι στα φυτά χρησιμοποιούνται πρωταρχικά για την ανάπτυξή τους, και εναλλακτικά σε αμυντικούς μηχανισμούς, όπου κύριο ρόλο διαδραματίζουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες (Herms and Mattson, 1992). Τέλος μια τρίτη θεωρία, αυτή της βέλτιστης άμυνας, 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). Πέραν τις παραπάνω θεωρίες είναι

## **Εισαγωγή**

αναμφισβήτητο ότι η έλλειψη θρεπτικών οδηγεί στην αύξηση παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Gershenson, 1984), γεγονός είναι ιδιαίτερα τεκμηριωμένο στην περίπτωση των φαινολικών συστατικών (Gershenson, 1984; Haukioja et al., 1998; Dixon and Paiva, 1995). Η αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, φαίνεται ότι συμβάλλει στον επιτυχή εγκλιματισμό. Η συσσώρευση των φαινολικών προκαλεί καταστολή αυξητικών διαδικασιών, φαινόμενο που αποτελεί στρατηγική αντιμετώπισης της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Η περίσσεια φαινολικών συστατικών μπορεί ακόμη να αποτελέσει μια εναλλακτική οδό διοχέτευσης επιπλέον σκελετών. Τέλος, τα φαινολικά συστατικά αποτελούν παράγοντες άμυνας έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης όπως είναι τα παθογόνα και τα φυτοφάγα ζώα (Καραμπουρνιώτης, 2003). Λόγω της συσσώρευσης δευτερογενών μεταβολιτών, τα φυτά ενισχύουν τις αμυντικές τους γραμμές έναντι ενδεχόμενης απώλειας φυτικών οργάνων, η οποία πλέον καθίσταται καταστροφική υπό συνθήκες έλλειψης ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων.

### **1.6. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών**

Το βόριο αποτελεί ένα απαραίτητο μικροστοιχείο για την διατροφή των ανώτερων φυτών, ορισμένων θαλάσσιων φυκών και κυανοβακτηρίων. Ειδικότερα στα ανώτερα φυτά, είναι τεκμηριωμένα απαραίτητο για την ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου (Gupta 1979; Shorrocks 1997). Ωστόσο, νεώτερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η παρουσία βορίου επίσης συνεπάγεται ευνοϊκές επιδράσεις σε ζωικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Nielsen, 2000). Τα συμπτώματα της έλλειψης υποδεικνύουν ότι το στοιχείο αυτό παίζει βασικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και στην διατήρηση των αναπτυξιακών και αναπαραγωγικών διεργασιών των ανώτερων φυτικών οργανισμών. Η τροφопενία βορίου επιφέρει πληθώρα αλλαγών στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων, στην δομή και λειτουργία των μεμβρανών όπως και στον δευτερογενή μεταβολισμό, με την υπερπαραγωγή μορίων κυρίως της κατηγορίας των φαινολικών συστατικών (Cakmak and Romheld 1997; Goldbach, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998).

#### **1.6.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου**

Το βόριο είναι το χημικό στοιχείο με σύμβολο B και ατομικό αριθμό 5 και σθένος 3, αποτελεί μέλος της υποομάδας III των μεταλλοειδών, και παρουσιάζει ενδιάμεσες ιδιότητες, δηλαδή άλλοτε συμπεριφέρεται σαν αμέταλλο και άλλοτε σαν μέταλλο (Merschner, 1995). Στην φύση, το βόριο δεν βρίσκεται ελεύθερο, δηλαδή σε στοιχειακή μορφή αλλά δεσμευμένο με άλλα χημικά στοιχεία σε πετρώματα, όπως ο βόρακας. Το βόριο περιλαμβάνει δύο φυσικά, μη ραδιενεργά ισότοπα, το  $^{11}\text{B}$  (με συμμετοχή που κυμαίνεται από 79,7 έως 80,9%) και το  $^{10}\text{B}$  (με συμμετοχή

από 19,1 έως 20,3%), τα οποία διαμορφώνουν ένα μέσο ατομικό βάρος περίπου 10,81. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, λόγω του υψηλού δυναμικού ιονισμού, το βόριο δεν απαντάται σε στοιχειακή μορφή, 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 ( $B(OH)_3$ ). Το βορικό οξύ, στα υδατικά διαλύματα συμπεριφέρεται ως ασθενές μονοβασικό οξύ κατά Lewis με  $pK_a$  9,24, στους 25 °C. Στο κυτταρόπλασμα με  $pH \sim 7,4$ , το βορικό οξύ βρίσκεται κατά  $\sim 98\%$  σε αδιάστατη μορφή ( $B(OH)_3$ ) ενώ λιγότερο από το 2% βρίσκεται ως βορικό ανιόν. Στο αποπλαστικό χώρο όπου το  $pH$  είναι χαμηλότερο ( $pH \sim 5,5$ ), το ποσοστό του αδιάστατου βορικού οξέος φθάνει το 99.95%. Το Βόριο διακρίνεται σε δύο κλάσματα το διαλυτό και το αδιάλυτο στο νερό κλάσμα. Το πρώτο αντιπροσωπεύει το βόριο στο συμπλάστη και το δεύτερο το βόριο των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Το βορικό οξύ έχει την ικανότητα να σχηματίζει κυκλικά μόνο- και δι-εστερικά σύμπλοκα με πολυόλες, μόρια που διαθέτουν περισσότερα του ενός υδροξύλια στον ανθρακικό τους σκελετό (Shelp, 1993). Οι βορικοί εστέρες που προκύπτουν βρίσκονται σε διαρκή δυναμική ισορροπία διάσπασης (Friedman et al., 1974) 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). Υποκαταστάτες, ικανοί να σχηματίζουν σύμπλοκα με το βορικό οξύ είναι 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).

### **1.6.2. Το βόριο στο έδαφος**

Το βόριο στα περισσότερα εδάφη απαντάται σε συγκεντρώσεις της τάξης των  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  ή χαμηλότερες. Η περιεκτικότητα των περισσότερων εδαφών σε βόριο ανέρχεται σε  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  περίπου. Εδάφη με χαμηλότερη συγκέντρωση ( $<10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) χαρακτηρίζονται ως φτωχά σε βόριο ενώ εκείνα που περιέχουν  $10-100 \text{ mg kg}^{-1}$  περιλαμβάνουν τα πλούσια σε βόριο εδάφη (Power, 1997). 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 οξειδία, (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)

Το διαλυτό βόριο απαντάται στο έδαφος με τη μορφή βορικού οξέος  $B(OH)_3$ , ενώ σε υψηλές τιμές  $pH$  εμφανίζεται ως τετραεδρικό ανιόν  $B(OH)_4^-$  (Δροσόπουλος, 1998), γεγονός που δυσχεραίνει τη διάθεση του στα φυτά και την προσρόφηση

## **Εισαγωγή**

του από τα ορυκτά συστατικά του εδάφους (Goldberg, 1997). Η διαθεσιμότητα του βορίου στο έδαφος φαίνεται επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως την υφή του εδάφους, την ατμοσφαιρική υγρασία, τη θερμοκρασία και το pH του εδαφικού διαλύματος. Η εύκολη έκπλυση του βορίου από το έδαφος εξαρτάται από την ποσότητα του νερού, την ποιότητα και την υφή του εδάφους. Συνεπώς, τα λεπτά σε υφή εδάφη συγκρατούν το βόριο μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σε σχέση με τα χονδρόκοκκα εδάφη (Δροσόπουλος, 1992). Επίσης τα εδάφη πλούσια σε οργανική ουσία φαίνεται να είναι και πλούσια σε βόριο, σε σχέση με τα ξηρα εδάφη λόγω της περιορισμένης απελευθέρωσης βορίου από τα οργανικά σύμπλοκα καθώς και της περιορισμένης ικανότητας των φυτών να αντλήσουν το στοιχείο (Δροσόπουλος, 1992)

Τα δεδομένα για την πρόσληψη του Βορίου από το ριζικό σύστημα των φυτών φαίνεται να ήταν ασαφή. Νέες μελέτες αναφέρουν ότι παράλληλα με το μηχανισμό απορρόφησης του στοιχείου με παθητική μεταφορά, λειτουργούν και μηχανισμοί ενεργούς μεταφοράς μέσω εξειδικευμένων μεμβρανικών μεταφορέων (Dannel et al., 2002; Takano et al., 2002; Stavrianaou et al., 2006a). Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι ο μηχανισμός παθητικής μεταφοράς αδρανοποιείται 24 ώρες μετά τη μεταφορά του φυτού σε περιβάλλον επαρκές σε βόριο (Preffer et al., 1999). 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. Η λειτουργία της ενεργής μεταφοράς 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).

Το στοιχείο αφού προσροφηθεί στο εσωτερικό του φυτικού σώματος, μεταφέρεται από τα κύτταρα του ριζικού συστήματος στο υπέργειο μέρος του φυτού μέσω των αγγείων του ξύλου. Η ύπαρξη ομαλού διαπνευστικού ρεύματος, αλλά και η δυνατότητα ανακατανομής του βορίου μέσω του ηθμού καθορίζουν τη διακίνηση του βορίου από το υπόγειο προς το υπέργειο μέρος (Brown and Shelp, 1997). Ένας παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την διακίνηση του στοιχείου, είναι τα υψηλά επίπεδα αζώτου στο έδαφος και οι υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας (Goldberg, 1993). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αύξηση του ρυθμού των κυτταρικών διαιρέσεων και της δημιουργίας των κυτταρικών τοιχωμάτων.

### **1.6.3. Υποκυτταρική κατανομή του βορίου**

Το βόριο φαίνεται ότι δεν απαντάται αποκλειστικά σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα. Με βάση τα ως τώρα δεδομένα για τα χημικά χαρακτηριστικά του βορικού οξέος, απαντάται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Η κατανομή 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).

### **1.6.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού**

Κάθε φυτικός οργανισμός παρουσιάζει διαφορετική κινητικότητα βορίου μεταξύ των επιμέρους οργάνων και ιστών. Έτσι διακρίνονται σε φυτά με έντονη κινητικότητα βορίου και σε φυτά με μειωμένη κινητικότητα του στοιχείου (Brown and Shelp, 1997). Η διαφοροποίηση αυτή της κινητικότητας του στοιχείου καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η κατανομή του βορίου μεταξύ των οργάνων διαφορετικής ηλικίας καθώς και μεταξύ των οργάνων που διαφέρουν ως προς το ρυθμό διαπνοής. Παρατηρείται σε συνθήκες επάρκειας βορίου η συγκέντρωση του στοιχείου στα ώριμα όργανα να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα νεότερα, γεγονός που ανατρέπεται σε περίπτωση που η εξωτερική τροφοδοσία βορίου είναι ανεπαρκής (Stavrianakou et al., 2006b). Την ικανότητα επανεκκίνησης του βορίου από τα ώριμα στα εκπτυσσόμενα φύλλα διαθέτει και η ελιά (Liakopoulos et al., 2005). Άλλοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την κινητικότητα και την κατανομή του στοιχείου είναι τα σημεία εξάτμισης του νερού μέσω της διαπνοής, η τοπολογία εμφάνισης των συμπτωμάτων τροφοπενίας ή τοξικότητας, η συγκέντρωση του βορίου στον ηθμό και η συσχέτιση της με την περιεκτικότητα σε βόριο των αναπτυσσόμενων οργάνων και τέλος το πρότυπο αναδιανομής εξωγενούς χορηγούμενου βορίου με την χρήση του σταθερού ισότοπου <sup>10</sup>B.

Η ικανότητα επαναδιανομής του βορίου στο ηθμό φαίνεται να σχετίζεται με την δημιουργία συμπλόκων με πολυόλες μεταξύ των διακινούμενων φωτοσυνθετικών προϊόντων (Brown and Hu, 1996), γεγονός το οποίο δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό του βορίου ως δυσκίνητου θρεπτικού στοιχείου σε ορισμένα φυτά στα οποία τα διακινούμενα φωτοσυνθετικά προϊόντα δεν περιλαμβάνουν σακχαροαλκοόλες.

### **1.6.5. Ο ρόλος του βορίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών**

## Εισαγωγή

Η έλλειψη βορίου παρεμποδίζει την επιμήκυνση των αναπτυσσόμενων κυττάρων (Hu and Brown, 1994; Dell and Huang, 1997), γεγονός που γίνεται ορατό στις πρώτες τρεις μέρες ανεπάρκειας βορίου. Η αντίδραση αυτή παρατηρείται εντονότερα στα κύτταρα του ριζικού συστήματος (Marschner, 1995), και δικαιολογεί την επιβράδυνση της αύξησης των μεριστωματικών ιστών, ένα από τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα που προκαλεί η έλλειψη βορίου (Dugger, 1983; Marschner, 1995). Στο υπέργειο τμήμα, η ανάπτυξη του κορυφαίου μεριστωματικού ιστού εξαρτάται από την ομαλή τροφοδοσία σε βόριο ενώ σε περίπτωση έλλειψης του στοιχείου μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και ολική νέκρωση του κορυφαίου μεριστώματος. Τα φύλλα παρουσιάζουν ανώμαλη ανάπτυξη και αδυνατούν να εκπτυχθούν πλήρως (Hu and Brown, 1994), αποκτούν αρχικά έντονο πράσινο χρώμα, έπειτα αναπτύσσουν καστανούς χρωματισμούς, ενώ σε ακραίες συνθήκες έλλειψης εμφανίζουν χλωρώσεις και απορρίπτονται (Dell and Huang, 1997; Marschner, 1995). Η τροφопενία βορίου επιδρά αρνητικά και στην κυτταρική διαίρεση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η τροφопενία βορίου προκαλεί ανωμαλίες στην ανάπτυξη των αγγείων του ξύλου και των στοιχείων του ηθμού (Dell and Huang, 1997) ενώ σε άλλες δεν έχουν παρατηρηθεί ανάλογα συμπτώματα (Liakopoulos et al., 2005)

### **1.6.5.1. Ρόλος του βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα**

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί μία πολύπλοκη δομή, της οποίας ο βασικός ρόλος είναι η προστασία του φυτικού κυττάρου, η μηχανική στήριξη του φυτικού σώματος και η πραγματοποίηση πολυάριθμων φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρου και εξωτερικού μέσου αλλά και ενζυμικών αντιδράσεων. Η βασική του δομή εμπεριέχει μείγματα πολυσακχαριτών και απαρτίζεται από το πρωτογενές και το δευτερογενές τοίχωμα. Το πρωτογενές τοίχωμα σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αύξησης και αποτελείται από πηκτίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και πρωτεΐνες. Με την συνεχή ρύθμιση της σύστασης, αρχιτεκτονικής και την επέκταση της δομής του, το κυτταρικό τοίχωμα διασφαλίζει την ανάπτυξη και την ακεραιότητα του κυττάρου. Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους το τοίχωμα ενισχύεται από την εναπόθεση δευτερογενούς τοιχώματος. Το δευτερογενές τοίχωμα σχηματίζεται μετά την παύση της κυτταρικής ανάπτυξης και παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση αναλόγως τον ιστό στον οποίον ανήκει το κύτταρο. Πιστεύεται ότι το πρωτογενές τοίχωμα συνεισφέρει στη δομική σταθερότητα αλλά και στην μεταγωγή σημάτων, ενώ το δευτερογενές είναι υπεύθυνο για την μηχανική ενδυνάμωση του κυττάρου.

Το ποσοστό του βορίου που εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα, σε περίπτωση ανεπάρκειας βορίου κυμαίνεται στα 95-98% του κυτταρικού βορίου (Loomis and Durst, 1992; Match et al., 1993; Hu and Brown, 1994) και εξαρτάται από το είδος

του φυτού και τις συνολικές απαιτήσεις του στο στοιχείο (Matoh et al., 1996). Ο Warrington 1923 υποστηρίζει ότι το βόριο έχει σταθερό ρόλο στα φυτά και δεν βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση καθώς η σωστή λειτουργία των φυτικών κυττάρων απαιτεί συνεχή παρουσία βορίου. Έτσι και η ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση την επάρκεια βορίου και η έλλειψη του στοιχείου αυτού έχει επίπτωση στη λεπτή δομή και στις φυσικόμηχανικές του ιδιότητες του (Loomis and Durst, 1992; Brown and Hu, 1997; Matoh, 1997), επιπτώσεις παρατηρούνται και στο μεσοτοιχίο. Επίσης, υπό συνθήκες έλλειψης παρατηρείται διόγκωση του κυτταρικού τοιχώματος και ακανόνιστη, αδρή υφή (Matoh et al,1992) με συνέπεια την αλλαγή των μηχανικών χαρακτηριστικών οπότε και την αλλοίωση της ελαστικότητας του πορώδους (Fleischer et al , 1999) αλλά και της υδραυλικής αγωγιμότητας των κυττάρων (Findeklee. et al, 1997).

Οι επιπτώσεις της τροφοπενίας βορίου σε διάφορα είδη έχουν αρκετές ομοιότητες κυρίως στην αναστολή δραστηριότητας του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού και του ακραίου μεριστώματος της ρίζας (Hu and Brown, 1994). Επίσης έχει παρατηρηθεί, ύπο συνθήκες έλλειψης βορίου, να αλλάζει η δομή και η πυκνότητα του συστήματος Golgi το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ενσωμάτωση των πηκτικών πολυμερών στο κυτταρικό τοίχωμα (Northcote, 1986). Αυτό συνεπάγεται ότι η λειτουργία του βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα σχετίζεται με τη αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται ανάμεσα στο βόριο και τα πηκτικικά πολυμερή (Hu and Brown, 1994).

#### **1.6.5.2. Πηκτινικοί πολυσακχαρίτες**

Οι πηκτίνες είναι η τρίτη κύρια κατηγορία πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Πρόκειται για ένα ετερογενές μίγμα πολυσακχαριτών πλούσιων σε ουρονικά οξέα, ιδιαίτερα γαλακτουρονικό οξύ. Τα ουρονικά οξέα φέρουν μια καρβοξυλική ομάδα, αντί για την αλδεϋδική ομάδα των αλδοζών, στη θέση 6 του μορίου. Το πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος περιέχει αρκετούς διαφορετικούς τύπους πολυσακχαριτών που περιλαμβάνουν όξινα φορτισμένες πολυγαλακτουρονάνες και ραμνογαλακτουρονάνες αλλά και ουδέτερα πολυμερή όπως αραβινάνες, γαλακτάνες και αραβινογαλακτάνες (Reid, 1997). Οι κύριοι τύποι πηκτινών είναι η ομογαλακτουράνη (HG), η ραμνογαλακτουρονάνη I (RG-I) και η ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II) (Ridley et al., 2001). Οι HG είναι ομοπολυμερή με δομή α-1,4 γαλακτουρονάνης. Η HG είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τις RG-I και RG-II και πιθανά και με άλλα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος (O'Neil et al., 1996). Η RG-I είναι ετεροπολυμερής πηκτίνη με δομικές μονάδες το γαλακτουρονικό οξύ και τη ραμνόζη (Reid,1997). Εκτός από την ραμνόζη μπορεί να περιλαμβάνονται σε μικρότερες ποσότητες μείγματα αραβανάνης και γαλακτάνης. Η RG-II είναι ένας πολύπλοκος πολυσακχαρίτης της



## Εισαγωγή

πηκτίνης με μοριακό βάρος 5 kDa και εντοπίζεται σε μικρές ποσότητες κυρίως στα αγγειόπερμα και γυμνόσπερμα. Ο κεντρικός σκελετός της RG-II αποτελείται από μονάδες α-D-γαλακτοσυλ-πυρανοσυλ-ουρονικού οξέος (GalpA) πάνω στον οποίο προσδένονται τέσσερις πλάγιες αλυσίδες ολιγοσακχαριτών (A-D). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η RG-II εναποτίθεται σε πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα μέσω διεστερικών δεσμών με το βορικό οξύ (O'Neil et al., 1996, Kobayashi et al., 1997). Δύο αλυσίδες RG-II ενώνονται μεταξύ τους μέσω γεφυρών βορικού οξέος σχηματίζοντας διμερή, τα οποία συμβάλλουν στην διατήρηση και ρύθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος και είναι απαραίτητα για την αύξηση και ανάπτυξη του φυτού (O'Neil et al., 2001). Το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα περιέχει περίπου 50% πηκτίνη, αλλά η περιεκτικότητα ποικίλλει ανάλογα με το περιβάλλον, τον φυτικό ιστό, και το είδος.

### 1.6.5.3. Βόριο και πηκτίνη

Το βόριο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τα φυτά, ιδιότητα την οποία οφείλει στον καθοριστικό ρόλο του στο διμερισμό της RG-II (O'Neil et al., 2001). Έτσι, το βόριο συμμετέχει στη δημιουργία πλάγιων διακλαδώσεων μεταξύ των δομικών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός το οποίο φαίνεται να συμβάλλει στην διατήρηση της μηχανικής αντοχής και της ελαστικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την διάρκεια της κυτταρικής επιμήκυνσης. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι υπό τροφopenία βορίου, το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει χαμηλότερες ποσότητες ασβεστίου (Yamanouchi, 1971). Η δημιουργία των πλάγιων διακλαδώσεων πραγματοποιείται μέσω διεστερικών δεσμών του βορικού οξέος με τις ομάδες απιόζης της πρώτης και ενδεχομένως και της δεύτερης πλάγιας αλυσίδας της RG-II (Kobayashi et al., 1997). Σε συνθήκες επάρκειας βορίου, ο σχηματισμός διεστερικών δεσμών του διμερούς d-RG-II-B σταθεροποιεί τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και μειώνει τη διάμετρο των πόρων, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της διέλευσης των μακρομορίων. Η έλλειψη βορίου δεν επηρεάζει την παραγωγή πολυσακχαριτών στα κυτταρικά τοιχώματα αλλά ούτε την παραγωγή και έκκριση της RG-II στο τοίχωμα (Matoh T et al., 2000). Ωστόσο, σε συνθήκες έλλειψης βορίου, η δημιουργία του διμερούς μειώνεται με αποτέλεσμα η αύξηση του μεγέθους των πόρων να ευνοεί την απώλεια των πρόδρομων δομικών συστατικών και των αποπλαστικών πρωτεϊνικών μορίων (O'Neil et al., 1996). Ένας άλλος παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει το σχηματισμό συμπλόκων βορικού οξέως και πολυσακχαριτών είναι η διαβαθμίσεις του pH και η παρουσία δισθενών ιόντων (Loomis and Durst, 1992).

#### 1.6.5.4. Εμπλοκή του βορίου στο μεταβολισμό των φαινολικών συστατικών

Τα φαινολικά αποτελούν βασική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι εμπλέκονται σε μία σειρά από δομικούς, αναπτυξιακούς και αμυντικούς ρόλους στο φυτικό σώμα. Ορισμένα από τα πλέον διαδεδομένα φαινολικά συστατικά των ανώτερων φυτών είναι η λιγνίνη η οποία αποτελεί ένα μη καθορισμένης δομής άμορφο πολυμερές. Η λιγνίνη θεωρείται το αφθονότερο φαινολικό συστατικό στα ανώτερα φυτά και δεύτερο σε διάδοση πολυμερές μόριο στη βιόσφαιρα, μετά την κυτταρίνη (Whetten, 1995). Ορισμένα φαινολικά οξέα, κυρίως το ρ-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ απαντώνται στα κυτταρικά τοιχώματα ενωμένα με αιθερικούς ή εστερικούς δεσμούς στις αλυσίδες των πολυσακχαριτών. Ο φυσιολογικός ρόλος της παρουσίας των φαινολικών οξέων στα κυτταρικά τοιχώματα φαίνεται να περιλαμβάνει εκτός τον άλλον την αποτροπή ενζυμικής υδρόλυσης των ημικυτταρινών και την μηχανική ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων, ενώ ενδέχεται να αποτελούν θέσεις εναπόθεσης λιγνίνης ή δευτερογενούς πάχυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Wallace, 1994). Μία άλλη κατηγορία στην οποία συμμετέχουν τα φαινολικά είναι η κουτίνη και η σουβερίνη (Wallace, 1994; Itai, 1999) και οι επιεφυμενιδικοί κήροι (Kolattukudy, 1996; Karabourniotis et al. 2001; Liakopoulos et al., 2001).

Τα φαινολικά συστατικά φαίνεται να επιδρούν έμμεσα ή άμεσα στην αύξηση και τη διαφοροποίηση των φυτικών ιστών. Έχει αναφερθεί ότι το σινναμικό και ρ-κουμαρικό οξύ μπορεί να δρουν ως ρυθμιστές αύξησης (Hamilton et al., 2001). Ορισμένα φλαβονοειδή εμπλέκονται στο μεταβολισμό και την μεταφορά της αυξίνης. Οι κουμαρίνες μπορούν να δράσουν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης του γυρεοσωλήνα, των αντιδράσεων των στομάτων ή της αποκοπής των πετάλων και των άνθεων. Το σαλικικό οξύ εμπλέκεται σε πλήθος φυσιολογικών λειτουργιών ενώ επάγει την άνθηση σε ένα αριθμό φυτικών ειδών ενώ αποτελεί το ενδογενές σήμα που προκαλεί την έναρξη του φαινομένου της θερμογένεσης στα ανθικά μέρη των ειδών *Araceae* (Raskin, 1992). Σε ορισμένα είδη, η παρουσία φλαβονοειδών αποτελεί προϋπόθεση για την βλάστηση των γυρεόκοκκων και την επιμήκυνση του γυρεοσωλήνα.

Τα φαινολικά όπως προαναφέραμε διαδραματίζουν διάφορους ρόλους ανάμεσα σε αυτούς να είναι η άμυνα έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης καθώς και σε φαινόμενα αλληλεπίδρασης μεταξύ των φυτών και άλλων οργανισμών του περιβάλλοντος. Τα φαινολικά συστατικά είναι ενώσεις οι οποίες προέρχονται από τα αμινοξέα φαινιλανίνη και τυροσίνη τα οποία συντίθενται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του σικιμικού οξέως. Η PAL, ένα ένζυμο κλειδί για το μονοπάτι του σικιμικού οξέως, μετατρέπει την φαινυλαλανίνη

## Εισαγωγή

σε σιναμικό οξύ. Το ένζυμο επιδέχεται ταχεία ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο μετά από διέγερση από ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Dixon and Paiva , 1995).

Τα φαινορικά προστατεύουν το φυτό από την υπεριώδη και ορατή ακτινοβολία, μέσω των μεταβολιτών που περιέχουν στο χυμοτόπιο, στο κυτταρόπλασμα, στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά και στο στρώμα της εφυμενίδας, τα οποία απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή (Shirley,1996). Τα φλαβονοειδή φαίνεται να εμπλέκονται στην αναπαραγωγική διαδικασία ως γλυσοσυλιωμένα παράγωγα στο χυμοτόπιο διαμορφώνοντας χρωματισμούς σε πολλές φυτικές και αυξάνοντας την εκκυστικότητα των φυτικών οργάνων που εμπλέκονται στην επικονίαση και την διασπορά των σπερμάτων (Harborne and Williams, 2000). Τα φυτά αναπτύσσουν εκτός των άλλων μηχανισμούς για την προστασία τους από βιοτικούς εχθρούς. Τα φαινορικά συστατικά συμμετέχουν τόσο σε μηχανισμούς προϋπάρχουσας όσο και επαγόμενης άμυνας. Ένας άλλος μηχανισμός όπου εμπλέκονται τα φαινορικά συστατικά είναι η αλληλοπάθεια. Τέλος, άλλες φαινολικές ενώσεις παίζουν ρόλο στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών (Fisher and Long, 1992).

Σε συνθήκες έλλειψης βορίου στο φυτικό σώμα συσσωρεύονται φαινορικά συστατικά, γεγονός που οφείλεται στην επαγωγή σύνθεσης πρόδρομων μορίων και ενίσχυση της δραστηριότητας ενζύμων του μεταβολισμού των φαινολικών συστατικών (Pilbeam and Kirkby, 1983, Cakmak and Römheld, 1997) . Η βιοσύνθεση της PAL επάγεται στα δικότυλα φυτά σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου (Cakmak and Römheld, 1997, Ruiz et al.1998, Garcia et al., 1991). Πιστεύεται πως, σε συνθήκες επάρκειας βορίου, η κυτταροπλασματική συγκέντρωση βορίου είναι ικανή για την δημιουργία συμπλόκων με μόρια cis-διόλης συμπεριλαμβανομένων και φαινολικών συστατικών όπως το καφεϊκό οξύ και ανάλογες ενώσεις (Cakmak and Römheld,1997). Λόγω της συμμετοχής τους στα παραπάνω σύμπλοκα, τα πρόδρομα μόρια δεν είναι διαθέσιμα για περαιτέρω μετατροπές (Pilbeam and Kirkby, 1983). Αντίθετα, υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου προκαλείται απώλεια της διαμερισματοποίησης του κυττάρου εξαιτίας της διαταραχής της λειτουργίας των πλασματικών μεμβρανών η οποία οδηγεί σε διαρροή ουσιών αυξάνοντας την πιθανότητα επαφής με οξειδωτικά ένζυμα. Με τον τρόπο αυτό, ευνοείται η οξειδωση των φαινολικών συστατικών με συνέπεια την συσσώρευση οξειδομένων μορφών τους. Η οξειδωση των φαινολικών συστατικών προς κινόνες συνοδεύεται από την παραγωγή ROS (Cakmak and Römheld,1997). Για το λόγο αυτό, σε ορισμένες περιπτώσεις τροφοπενίας βορίου, η εκτεταμένη οξειδωση των φαινολικών συστατικών και παράλληλη εξασθένηση των αντιοξειδωτικής προστασίας, εάν συνδυαστούν με υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας

(Cakmak et al., 1995.,211), προκαλούν οξειδωτικές βλάβες και τελός τη νέκρωση των κυττάρων (Cakmak and Römheld,1997).

## **1.7. Η ελιά**

### **1.7.1. Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς**

Ιστορικά πολλοί υποστηρίζουν, ότι η καταγωγή της ελιάς είναι πιθανότατα από την περιοχή της Συρίας και της Μικράς Ασίας. Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται από τους προϊστορικούς χρόνους, όπου και θεωρείτο ιερό δένδρο. Οι καρποί και το λάδι έχουν υψηλής θρεπτικής αξίας, διαδραματίζοντας έτσι πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών όπου έχει αναπτυχθεί. Η ελαιοκαλλιέργεια καλύπτει παγκοσμίως έκταση 100 εκατομμυρίων στρεμμάτων, ενώ από την καλλιεργούμενη αυτή έκταση το 98% περίπου βρίσκεται στη λεκάνη της Μεσογείου (Ποντίκης, 2000).

Η ελιά παίζει σημαντικό ρόλο στη μεσογειακή διατροφή και επιδρά ευεργετικά στον ανθρώπινο οργανισμό, γεγονός που οφείλεται στο ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο κατέχει ιδιαίτερη διατροφική θέση, λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που του αποδίδονται στην ανθρώπινη υγεία οι οποίες σχετίζονται με την αντιμετώπιση οξειδωτικών βλαβών στα κύτταρα και κατά συνέπεια την προστασία του οργανισμού από παθήσεις όπως η αρτηριοσκλήρυνση (Vaughn et al.,1988) και ορισμένες μορφές καρκίνου ( Soler–Rivas, 2000; Pietta, 2000)

### **1.7.2. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της ελιάς**

Η ελιά είναι ένα αειθαλές καρποφόρο δένδρο , μέλος της οικογένειας Oleaceae, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη (Ποντίκης, 2000). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει περίπου 40 είδη και υποείδη καταμεμημένα σε Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Ωκεανία. Από όλα τα παραπάνω, το είδος *Olea europaea* παρουσιάζει την μεγαλύτερη εξάπλωση, και το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον . Ειδικότερα η *O. europaea* var *europaea* αποτελεί το αρχαιότερο καλλιεργούμενο υποείδος στη λεκάνη της Μεσογείου.

Η ελιά είναι δένδρο αιωνόβιο, με ύψος που μπορεί να φθάσει μέχρι και τα 20 μέτρα. Το ριζικό της σύστημα είναι επιπόλαιο, 20-70 εκατοστά, όπου σπάνια αγγίζει το ένα μέτρο και αναπτύσσεται κάθετα μέχρι τον τρίτο ή τέταρτο χρόνο ενώ αργότερα αντικαθίσταται από ένα άλλο θυσανώδες ριζικό σύστημα. Ο κορμός της ελιάς είναι κυλινδρικός, λείος και τεφροπράσινος στα νεαρά δενδρύλια ενώ στα πιο ώριμα είναι ρυτιδομένος, φελοποιημένος σε χρώμα σκούρας τέφρας. Τα φύλλα της ελιάς είναι απλά, διαταγμένα κατά εναλλαγή, επιμήκη, βραχύμισχα, λογχοειδή, παχιά και δερματώδη, και στην προσαξονικής τους επιφάνεια καλύπτονται με παχιά εφυμενίδα, ενώ στην αποαξονικής τους επιφάνεια φέρουν μεγάλο αριθμό τριχών και στομάτων. Οι οφθαλμοί της ελιάς διακρίνονται σε ξυλοφόρους, ανθοφόρους,

## **Εισαγωγή**

και μικτούς. Τα άνθη είναι μικρά, κιτρινόλευκα, σε βοτρυώδη ταξιανθίες και ανάλογα με την ποικιλία κυμαίνονται από 10-20 που βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων ή πλάγια των βλαστών της προηγούμενης βλαστικής περιόδου. Τέλος, ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη σφαιρική ή ελλειψοειδής, και αποτελείται από το περικάρπιο, το σαρκώδες εδώδιμο ενδοκάρπιο και τον πυρήνα. Ανάλογα με το βάρος του καρπού, οι διάφορες ποικιλίες της ελιάς χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, τις μικρόκαρπες, με βάρος καρπού μέχρι 2 γραμμάρια, τις μεσόκαρπες, μεταξύ 2 και 3,5 γραμμάρια και τις μεγαλόκαρπες, με βάρος καρπού πάνω από 3,5 γραμμάρια.

Η ελιά δεν ευδοκίμει ούτε στα ψυχρά ούτε στα θερμά κλίματα, αλλά απαιτεί ήπιο και γλυκό κλίμα, χωρίς πολλές και απότομες αλλαγές των καιρικών συνθηκών. Χρειάζεται γενικά ασβεστώδη εδάφη και αναπτύσσεται καλύτερα σε γόνιμο έδαφος, αλλά παρουσιάζει μεγάλη αντοχή και σε άγονα, ξερά και πετρώδη εδάφη. Γενικά η ελιά είναι δέντρο που αντέχει στην ξηρασία. Η αντοχή στην ξηρασία κυμαίνεται από ποικιλία σε ποικιλία

### **1.7.3. Η επίδραση της έλλειψης βορίου στην ανάπτυξη και φυσιολογία της ελιάς**

Η Ελιά αποτελεί ένα ιδιαίτερα απαιτητικό σε βόριο δένδρο(Fernandez–Escobar,1999). Η ανεπάρκεια βορίου σε ένα ελαιόδεντρο έχει άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις τόσο στην φυσιολογία του φυτού όσο και την ποσότητα και ποιότητα του προϊόντος (Γαβαλάς, 1978; Παναγόπουλος, 1997). Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της τροφοπενίας βορίου είναι ότι τα κορυφαία φύλλα, στους νέους βλαστούς, έχουν το ακραίο τμήμα τους χλωρωτικό, αρχικά πρασινοκίτρινο στη συνέχεια κίτρινοπορτοκαλί, λόγω της μειωμένης συγκέντρωσης χλωροφυλλών (Γαβαλάς, 1978). Σταδιακά, το σύμπτωμα αυτό εμφανίζεται και στα φύλλα της βάσης των βλαστών, τα οποία μπορεί να εμφανίσουν και ξήρανση στην κορυφή τους. Σε πιο προχωρημένο στάδιο της τροφοπενίας παρατηρείται μικροφυλλία, παραμόρφωση φύλλων, ροπαλόμορφο σχήμα και έντονη φυλλόπτωση. Ένα επίσης σύμπτωμα στα ελαιόδεντρα που πάσχουν έντονα από τροφοπενία βορίου είναι η ύπαρξη πληθώρας ξηρών κλαδίσκων σε όλη την κόμη, μια μορφή γνωστή ως 'σκούπα'. Σε κλάδους που εμφανίζουν συμπτώματα στα φύλλα, αν αφαιρεθεί λεπτό στρώμα του φλοιού, φαίνεται ένας καστανός χρωματισμός που οφείλεται σε νέκρωση του καμβίου. Το σύμπτωμα αυτό είναι χαρακτηριστικό και επιβεβαιώνει την έλλειψη του βορίου. Έτσι, δένδρα που υποφέρουν από έλλειψη βορίου φαίνονται από απόσταση σαν χλωρωτικά ενώ καθυστερούν σημαντικά την έναρξη της νέας βλάστησης την άνοιξη, της ανθοφορίας και της καρποφορίας και παρατηρείται σημαντική πτώση της παραγωγικότητας καθώς τα ελαιόδεντρα δεν παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και ικανοποιητικό φορτίο καρπών (Γαβαλάς,

1978; Bonggi and Pallioti, 1994; Tsadilas and Chatzoulakis, 1999). Φύλλα τροφοπενιακών δένδων περιέχουν βόριο σε συγκέντρωση κάτω από 20 ppm και έως 6-7 ppm, ενώ φύλλα από φυσιολογικά δένδρα περιέχουν βόριο συνήθως πάνω από 15-25 ppm ανάλογα την ποικιλία.

Η έλλειψη βορίου, όπως προαναφέραμε, επηρεάζει έντονα το δευτερογενή μεταβολισμό της ελιάς. Εκτός από την επαγωγή του μονοπατιού του σικιμικού οξέος και την αύξηση των ολικών φαινολικών, τα φύλλα παρουσιάζουν υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων φαινολικών ουσιών, οι οποίες πιθανόν να σχετίζονται με τη συγκεκριμένη τροφοπενία. Η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών στα φύλλα επηρεάζει, με τη σειρά της, ιδιαίτερα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των ελαιόδεντρων όπως το πάχος του ελάσματος, την ειδική φυλλική μάζα και την παρουσία ουσιών με αμυντικές ιδιότητες, όπως τα φαινολικά και τα ιριδοειδή (Liakopoulos et al., 2005; Liakopoulos and Karabourniotis, 2005).



## 2. Σκοπός της εργασίας

Οι παράμετροι της διατροφής των φυτών με βόριο έχουν άμεση επίδραση στο είδος και τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Σε γενικές γραμμές το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να ερμηνευτεί μέσω της επίδραση του βορίου σε βασικά ένζυμα του μεταβολισμού των αρωματικών ενώσεων, όπως η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης, καθώς και στην αύξηση της διάθεσης πρόδρομων μορίων προς τη βιοσυνθετική πορεία των φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, η διατροφή με βόριο μπορεί να επιδράσει πολύ εξειδικευμένα στη συγκέντρωση μεμονωμένων φαινολικών συστατικών γεγονός το οποίο δεν μπορεί να εξηγηθεί βάσει του παραπάνω γενικού μοντέλου. Έτσι, αναζητώνται εξηγήσεις βασισμένες σε σχέσεις δομής-λειτουργίας μεταξύ βορικού οξέος και πολυ-υδροξυ-φαινολικών συστατικών όπως ορισμένα φλαβονοειδή, το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του, ή πιο εξειδικευμένα, μόρια όπως η ολευροπαΐνη και ο ακτεοσίδης στο φυτό της ελιάς. Τα μόρια αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το βορικό οξύ σχηματίζοντας διεστερικά σύμπλοκα γεγονός το οποίο επηρεάζει ενδεχομένως τη διαθεσιμότητα των μορίων αυτών ως πρόδρομων μορίων στο μεταβολισμό των φαινολικών συστατικών. Η υπόθεση ότι το βορικό οξύ αλληλεπιδρά δομικά με ορισμένους μεταβολίτες δεν διατυπώνεται αποκλειστικά και μόνο για τα διαλυτά φαινολικά αλλά μπορεί να διατυπωθεί ακόμα καλύτερα για τα φαινολικά του κυτταρικού τοιχώματος. Σύμφωνα με τη σχετική υπόθεση εργασίας, φαινολικά με δομή όρθο-διφαινόλης μπορούν να προσδεθούν στο κυτταρικό τοίχωμα σε κατάλοιπα της πηκτίνης, όπως η απιόζη, μέσω βορικών διεστέρων. Όλες οι παραπάνω υποτιθέμενες δομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαινολικών συστατικών και βορίου θα μπορούσαν να γίνουν εμφανέστερες μέσω μελέτης της σύστασης των δευτερογενών μεταβολιτών υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύσταση φύλλων ελιάς σε διαλυτά φαινολικά συστατικά αλλά και σε φαινολικά του κυτταρικού τοιχώματος, για τα τελευταία μέσω δύο διαφορετικών αναλυτικών προσεγγίσεων, υπό τροφοπενία βορίου. Τα φαινολικά του κυτταρικού τοιχώματος μελετήθηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση (η οποία διασπά τους πάσης φύσεως εστερικούς δεσμούς μεταξύ φαινολικών συστατικών και καταλοίπων του κυτταρικού τοιχώματος) καθώς και μετά από επώαση με κατάλληλο βορονικό οξύ (το οποίο προκαλεί επιλεκτική υδρόλυση διεστερικών δεσμών του βορικού οξέος). Τα φαινολικά συστατικά μελετήθηκαν μέσω υγροχρωματογραφίας-ανίχνευσης συστοιχίας φωτοδιόδων.





### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1. Υδροπονική καλλιέργεια και πρόκληση τροφopenίας βορίου σε φυτά ελιάς

##### 3.1.1. Φυτικό υλικό και περιγραφή των συνθηκών καλλιέργειας

##### 3.1.1.1. Προετοιμασία του φυτικού υλικού και του υποστρώματος καλλιέργειας

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν φυτά ελιάς ποικιλίας 'Μανάκι', η οποία θεωρείται ευαίσθητη στην τροφopenία βορίου. Παρελήφθησαν υγιή ριζοβολημένα μοσχεύματα ηλικίας ενός έτους (Φυτώριο Ελιάς Γ. Κωστελένος, Πόρος Τροιζινίας) και επιλέχθηκαν 72 φυτά, με βάση την ομοιομορφία και τον αριθμό των φύλλων της υπέργειας βλάστησης, για τη διενέργεια του βασικού πειράματος. Τα φυτά χωρίστηκαν αρχικά σε δύο αναπτυξιακές ομάδες εκ των οποίων η πρώτη (Α) αφορούσε σε μονόκλωνα φυτά και η δεύτερη (Β) αφορούσε σε φυτά με δύο ή περισσότερους βλαστούς. Ένα φυτό από κάθε ομάδα φυτεύθηκε σε κοινό δοχείο καλλιέργειας. Ακολούθως τα δοχεία/ζεύγη φυτών χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των 12 επαναλήψεων. Κάθε ομάδα φυτών καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα με διαφορετική συγκέντρωση βορικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 23,0  $\mu\text{M}$  (φυτά μάρτυρες, B23), 0,5  $\mu\text{M}$  (φυτά B05) και 0,0  $\mu\text{M}$  βορικού οξέος (φυτά B0). Οι δύο τελευταίες συγκεντρώσεις αντιπροσωπεύουν τις μεταχειρίσεις με ανεπαρκή τροφοδοσία βορίου στο μέσο καλλιέργειας. Τα φυτά είχαν κατά μέσο όρο ύψος υπέργειου μέρους 16,3 cm, 5,9 ζεύγη ώριμων και 2,9 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 μετά την εισαγωγή της στα δοχεία καλλιέργειας, αρχικά με νερό βρύσης και ακολούθως με διάλυμα 0,6 N HCl (1 l). Τελικά, η άμμος ξεπλύθηκε από τα υπολείμματα του οξέος με απιονισμένο νερό (3 $\times$ 1 l). 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 τροφopenιών με ανόργανα στοιχεία συμπεριλαμβανομένου του βορίου (Hewitt, 1952). Μετρήσεις των θρεπτικών διαλυμάτων B23, B05 και B0 έδωσαν συγκεντρώσεις βορίου 27,2, 2,1 και 0,9  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα ενώ τα θρεπτικά διαλύματα απορροής από τα δοχεία καλλιέργειας έδωσαν συγκεντρώσεις 28,4, 2,2 και 1,0  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα.

### 3.1.1.2. Περιγραφή του συστήματος πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας

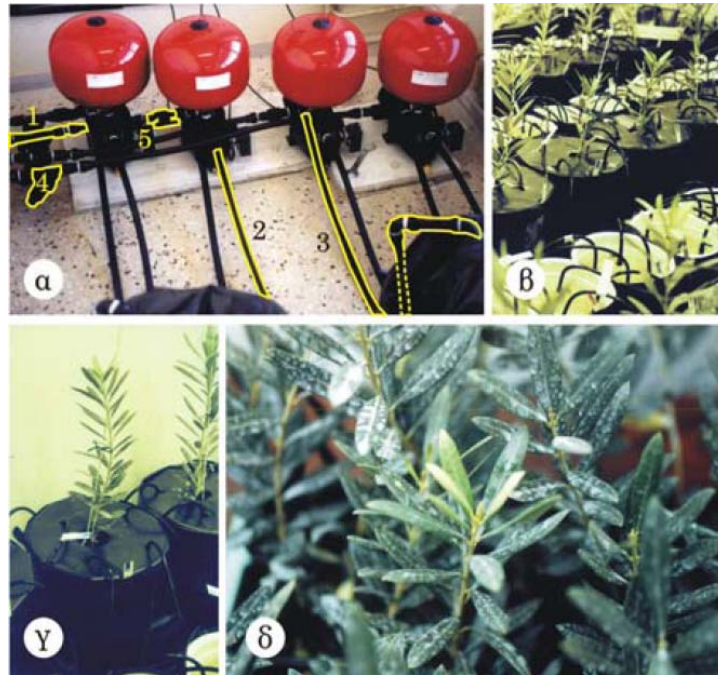
Για το σύστημα πειραματικής υδροπονίας χρησιμοποιήθηκε κλειστός θάλαμος ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών, ο οποίος διέθετε σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας του αέρα, φωτοπεριόδου και έντασης φωτισμού. Η επιφάνεια ανάπτυξης είχε διαστάσεις 2,0 x 2,3 m. Οι κλιματικές συνθήκες διαμορφώνονταν 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) αποτελείται 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 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Λόγω των μικρών απαιτήσεων παροχής και με σκοπό την αποφυγή επαναλαμβανόμενων εκκινήσεων κατά τη 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 βάνια στο 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 αποτελείται από ένα κεντρικό κορμό με βάνια και φίλτρο σίτας και κεντρικές σωληνώσεις 25, οι οποίες έφεραν σε καθορισμένα σημεία αυτορρυθμιζόμενους σταλάκτες τύπου TORO (The Toro company, Bloomington, MN, USA) παροχής 4 l h<sup>-1</sup> 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 ορθογωνίας 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).

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



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

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.

### 3.1.1.3. Συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας

Τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο σε τρεις σειρές (μια σειρά ανά μεταχείριση) και οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία και φωτοπερίοδος) επιλέχθηκαν έτσι ώστε να αντιστοιχούν στην περίοδο έκπτυξης της νέας βλάστησης. Για την έναρξη ή τη λήξη της φωτοπεριόδου οι λαμπτήρες θέτονταν σε λειτουργία ή εκτός λειτουργίας προοδευτικά, ώστε η μετάβαση από τη

## **Υλικά και Μέθοδοι**

σκοτοπερίοδο προς τη φωτοπερίοδο, με πλήρη ένταση ακτινοβολίας και αντίστροφα, να διαρκεί περίπου 1 h.

Τα φυτά αρδεύονταν με θρεπτικό διάλυμα Hoagland No 2 ημίσειας συγκέντρωσης, η σύσταση του οποίου ήταν (σε  $\mu\text{M}$ ):  $\text{KNO}_3$  6000;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2000;  $\text{MgSO}_4$  1000;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1000;  $\text{FeNaEDTA}$  50;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  23,0/2/0,5/0,0 (ανάλογα με την μεταχείριση) και  $\text{MnCl}_2$  4,6;  $\text{ZnSO}_4$  0,43;  $\text{CuSO}_4$  0,16;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  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  $\text{KOH}$  (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 6 αρδεύσεις ανά εικοσιτετράωρο (ανά τέσσερις ώρες), με διάρκεια άρδευσης 1 λεπτό. Με βάση τα παραπάνω, και δεδομένης της παροχής των σταλακτών, κάθε φυτό ελάμβανε 70 ml ανά άρδευση ή ~420 ml ανά εικοσιτετράωρο.

### **3.2. Πειραματική πορεία**

#### **3.2.1. Χρονοδιάγραμμα πειράματος, κατηγορίες δειγμάτων και πειραματικοί χειρισμοί**

Το πείραμα διήρκησε από τις 10/05/2010 έως τις 30/07/2010. Για τη διεξαγωγή των δειγματοληψιών καθορίστηκαν τρεις ηλικιακές κατηγορίες φύλλων ως: εκπυσσόμενα, πλήρως εκπτυγμένα και ώριμα. Οι δειγματοληψίες περιελάμβαναν τέσσερις επαναλήψεις (φύλλα από τρία τυχαία επιλεγμένα φυτά ανά επανάληψη).

### **3.3. Μετρήσεις παραμέτρων ανάπτυξης και βιοχημικών παραμέτρων**

Μετά τη λήξη του πειράματος ελήφθησαν μετρήσεις που αφορούσαν σε μορφολογικές και φυσιολογικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα έλαβαν χώρα μετρήσεις των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών (αριθμός φύλλων κάθε ηλικιακής κατηγορίας, μήκος βλαστού, νωπό βάρος φύλλων και βλαστού) και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση βορίου, διαλυτών και αδιάλυτων φαινολικών συστατικών στα φύλλα.

#### **3.3.1. Συγκέντρωση βορίου**

##### **3.3.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση ολικού βορίου**

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού βορίου έλαβε χώρα στα φύλλα των τριών ηλικιακών κατηγοριών σε τέσσερις επαναλήψεις. Το έλασμα των φύλλων κάθε κατηγορίας χωρίστηκε σε δύο μέρη και απορρίφθηκε η κεντρική νεύρωση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 70 °C για ξήρανση. Ακολούθησε λειοτρίβηση και

ζύγιση ~30-100 mg ξηρής ουσίας σε πορσελάνινες κάψες (εξευγενισμένες με πλύσεις διαλύματος HCl 0,6 N και απιονισμένου νερού) και στη συνέχεια ξηρή καύση σε θερμοκρασία 500 °C (ανύψωση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4,2 °C min<sup>-1</sup> 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.

### **3.3.1.2. 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 AcNH<sub>4</sub>/AcOH/Na<sub>2</sub>EDTA, 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 (0,000, 0,025, 0,250, 0,500 και 5,000 ppm B; 5 σημεία: R<sup>2</sup> 0,9995) και τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε διάλυμα 0,6 N HCl. Σε όλα τα στάδια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκεύη για την αποφυγή επιρύπανσης με βόριο.

### **3.3.2. Ανάλυση φαινολικών**

#### **3.3.2.1. Απομόνωση κυτταρικών τοιχωμάτων**

Για κάθε δείγμα (~50-500 mg νωπού βάρους, 211 mg κατά μέσο όρο) απομονώθηκαν τα κυτταρικά τοιχώματα (~10-100 mg ξηρού βάρους, 47 mg κατά μέσο όρο) όπως παρακάτω: τα φύλλα τεμαχίστηκαν και εκχυλίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) στο οποίο είχε προστεθεί L-ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 1% (w/w). Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (2600×g, 10 min) και εκχυλίσεις του ιζήματος σε απιονισμένο νερό, μεθανόλη, μεθανόλη:χλωροφόρμιο (1:1), ακετόνη και τέλος σε απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ασκορβικό οξύ και ξανά σε ακετόνη για ξήρανση. Χρησιμοποιήθηκαν 2×10 ml από κάθε έναν από τους παραπάνω διαλύτες. Τέλος τα κυτταρικά τοιχώματα ξηράνθηκαν στους 75 °C για 10 min και καταγράφηκε η ξηρή μάζα.

#### **3.3.2.2. Εκχύλιση εστεροποιημένων φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα**

Για την σαπωνοποίηση των εστεροποιημένων φαινολικών συστατικών, απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα υποβλήθηκαν σε αλκαλική υδρόλυση με εναιώρηση σε 6 ml διαλύματος KOH 4 N για 6 h. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε

## Υλικά και Μέθοδοι

υπό κενώ. Ακολούθως τα δείγματα οξινίστηκαν με διάλυμα HCl 6N (pH 1-2), και ακολούθως υποβλήθηκαν σε υγρή εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3 10 ml), παραλήφθηκαν οι οργανικές φάσεις, εκπλύθηκαν με νερό (3 20 ml) για την απομάκρυνση του HCl που είχε διαλυθεί στην οργανική φάση, συμπυκνώθηκαν έως ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (40 °C), επαναδιαλύθηκαν σε 4 ml MeOH 50% και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

### **3.3.2.3. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών προσδεδεμένων στο κυτταρικό τοίχωμα ως βορικοί διεστέρες**

Για την απομόνωση των φαινολικών συστατικών τα οποία ήταν προσδεδεμένα στα πολυμερή της πηκτίνης ως βορικοί διεστέρες, απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα υποβλήθηκαν σε επώαση σε εναιώρημα 5 ml διαλύματος 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος 10 mM για 20 h στους 40 °C. Μετά το πέρας της επώασης, παραλήφθηκαν τα υπερκείμενα με φυγοκέντρηση (2600xg, 10 min) και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

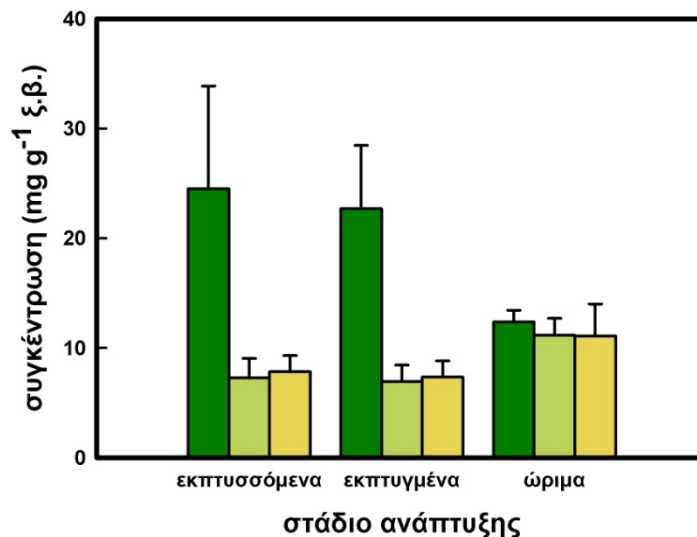
### **3.3.2.4. Ανάλυση φαινολικών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης**

Οι αναλύσεις έγιναν σε σύστημα Prominence (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με απαερωτή DGU-20A<sub>5</sub>, αντλία LC-20AD, ανιχνευτή UV-Vis συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A και θερμοστατούμενο διαμέρισμα στήλων CTO-20A. Όγκος 20 μl δείγματος εγχύθηκε σε στήλη Zorbax Stablebond-C<sub>18</sub>, 5 μm, 250 × 4,6 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) και διαχωρίστηκε σε γραμμικό gradient των εξής διαλυτών: A: 0,1 % (w/w) AcOH: B: MeOH με το ακόλουθο πρόγραμμα: αρχή, A:B 80:20 / 0,0-12,0 min, μετάβαση σε A:B 50:50 / 12,0-17,0 min, μετάβαση σε A:B 0:100 / 17,0-20,0 min, ισοκρατικό / 20,0-20,1 min, μετάβαση σε A:B 80:20 και λειτουργία της στήλης για 10 min στην αρχική σύσταση διαλυτών πριν ακολουθήσει η επόμενη ανάλυση. Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, ροή κινητής φάσης 1 ml min<sup>-1</sup>. Η παρακολούθηση της ανάλυσης έγινε στα 330 nm ενώ τα χρωματογραφήματα κατεγράφησαν στην περιοχή από 190 έως 800 nm με πλάτος σχισμής 1,2 nm και αναλύθηκαν με λογισμικό LC Solutions ver. 1.23 SP1 (Shimadzu Co.). Τα εκλουόμενα συστατικά χαρακτηρίστηκαν βάσει του φάσματος απορρόφησης και της κινητικότητάς τους και ποσοτικοποιήθηκαν βάσει της επιφάνειας των κορυφών έκλουσης.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1. Συγκέντρωση βορίου στα φύλλα των φυτών

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του ολικού βορίου στα φύλλα των φυτών για τις τρεις μεταχειρίσεις. Μεταξύ των ηλικιακών κατηγοριών εμφανίστηκε η αναμενόμενη διαβάθμιση συγκέντρωσης βορίου. Συγκεκριμένα, υπό συνθήκες επάρκειας βορίου (23  $\mu\text{M}$  B, B23), η συγκέντρωσή του στα φύλλα εμφανίστηκε μειούμενη από τα εκπυσσόμενα προς τα ώριμα φύλλα ενώ υπό συνθήκες έλλειψης βορίου (0,5 και 0,0  $\mu\text{M}$ , B05 και B0 αντίστοιχα) η συγκέντρωσή του εμφανίστηκε αυξανόμενη καθώς κινούμαστε από τα εκπυσσόμενα προς τα ώριμα φύλλα. Η συγκέντρωση βορίου των ώριμων φύλλων δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων ενώ στα νεαρά φύλλα η συγκέντρωση στην περίπτωση των ελλειματικών μεταχειρίσεων ήταν μικρότερη του ορίου τροφοπενίας για το στοιχείο (μικρότερη των 10  $\text{mg kg}^{-1}$  ξ.β.).



Εικόνα 2. Ολικό βόριο φύλλων ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23  $\mu\text{M}$  (μάρτυρας), πράσινο: 0,5  $\mu\text{M}$  και κίτρινο: 0,0  $\mu\text{M}$ ). Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

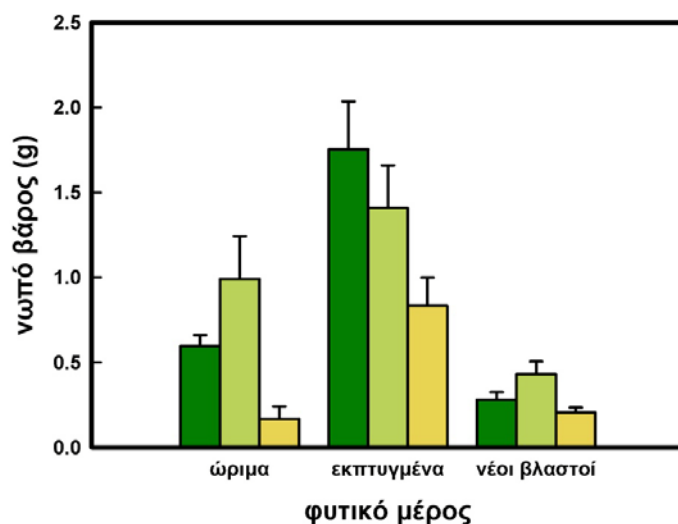
### 4.2. Παράμετροι ανάπτυξης των φυτών

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται το συνολικό ανά φυτό νωπό βάρος των φύλλων δύο ηλικιακών κατηγοριών (ώριμων και πλήρως εκπυγμένων) και καθώς και των νέων βλαστών για κάθε μεταχείριση. Στην περίπτωση των ώριμων φύλλων και των νεαρών βλαστών η διαβάθμιση της βιομάζας δεν ακολούθησε την διαβάθμιση της συγκέντρωσης όπως συμβαίνει συνήθως. Αυτό παρατηρήθηκε στην περίπτωση των νεαρών φύλλων όπου στα φυτά B23 (μάρτυρες) σημειώθηκε η υψηλότερη και στα πλέον τροφοπενιακά φυτά B0 η μικρότερη τιμή βιομάζας (περίπου στο ήμισι αυτής των φυτών μαρτύρων). Πάντως, ανεξάρτητα του προτύπου διαβάθμισης των τιμών

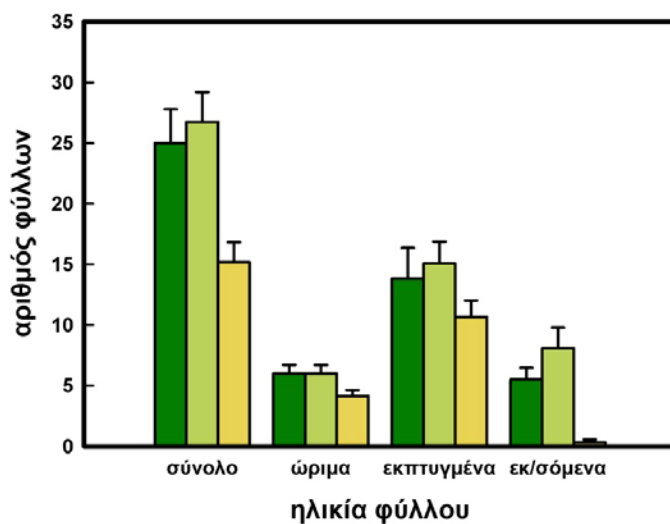


## Αποτελέσματα

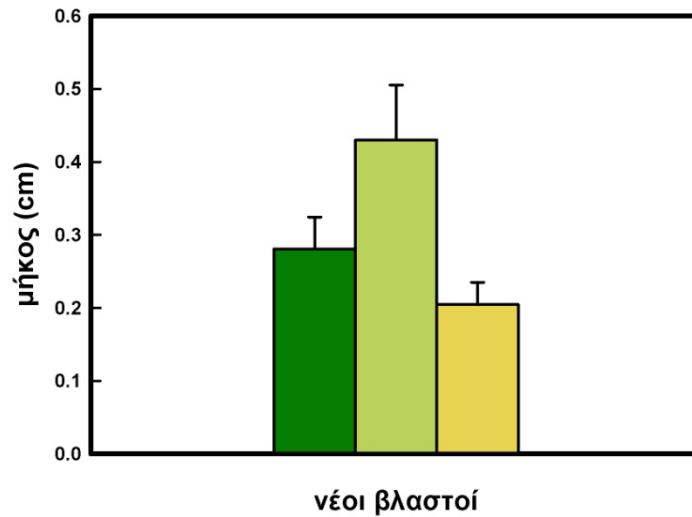
των παραμέτρων, τα φυτά Β0 τα οποία αναπτύχθηκαν χωρίς βόριο στο υπόστρωμα καλλιέργειας έδειξαν τις μικρότερες τιμές για όλες τις παραμέτρους μεταξύ όλων των μεταχειρίσεων υποδηλώνοντας την επίδραση της πλέον ελειμματικής σε βόριο μεταχείρισης.



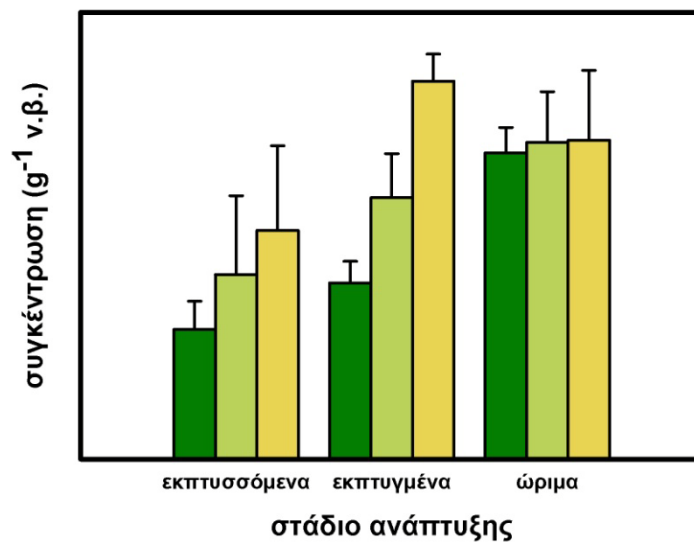
Εικόνα 3. Νωπό βάρος φύλλων δύο ηλικιακών κατηγοριών (ώριμων και πλήρως εκπτυγμένων) και νέων βλαστών για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23 μM (μάρτυρας), πράσινο: 0,5 μM και κίτρινο: 0,0 μM). Οι τιμές είναι μέσοι όροι δώδεκα επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 4. Αριθμός συνολικών φύλλων ανά φυτό καθώς και κάθε ενός από τα τρία στάδια ανάπτυξης για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23 μM (μάρτυρας), πράσινο: 0,5 μM και κίτρινο: 0,0 μM). Οι τιμές είναι μέσοι όροι δώδεκα επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 5. Συνολικό μήκος νέων βλαστών ανά φυτό για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23  $\mu\text{M}$  (μάρτυρας), πράσινο: 0,5  $\mu\text{M}$  και κίτρινο: 0,0  $\mu\text{M}$ ). Οι τιμές είναι μέσοι όροι δώδεκα επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 6. Συγκέντρωση ενός γλυκοσίδη φλαβονοειδούς των φύλλων ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23  $\mu\text{M}$  (μάρτυρας), πράσινο: 0,5  $\mu\text{M}$  και κίτρινο: 0,0  $\mu\text{M}$ ). Οι τιμές παρουσιάζονται ως απόκριση του ανιχνευτή της υγροχρωματογραφίας σταθμισμένη ανά μονάδα νωπού βάρους δείγματος. Οι τιμές είναι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων (κάθε επανάληψη αποτελείται από τέσσερα φύλλα από τέσσερα διαφορετικά φυτά)  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

Στην εικόνα 4 φαίνεται ο αριθμός των φύλλων ανά φυτό και ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε μεταχείριση. Όπως αναμενόταν, ο αριθμός των φύλλων στην πλέον ελλειματική μεταχείριση B0 ήταν μικρότερος των υπολοίπων. Ωστόσο δεν συμβαίνει το ίδιο με τη μεταχείριση B05 καθώς σε πολλές περιπτώσεις έδειξε

## **Αποτελέσματα**

οριακά περισσότερα φύλλα συγκριτικά με το μάρτυρα B23. Αξιοσημείωτη είναι η δραματική μείωση του αριθμού των εκπτυσσόμενων φύλλων στα φυτά B0.

Ανάλογη εικόνα με τον αριθμό των εκπτυγμένων φύλλων (εικόνα 4) έδειξε και το συνολικό μήκος των νέων βλαστών (εικόνα 5). Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό δεδομένου ότι στο μέρος αυτό του βλαστού φέρονται τα αντίστοιχα φύλλα. Επίσης στην περίπτωση του μήκους των βλαστών, η χαμηλότερη τιμή σημειώθηκε στα φυτά B0.

### **4.3. Σύσταση φαινολικών συστατικών των φύλλων**

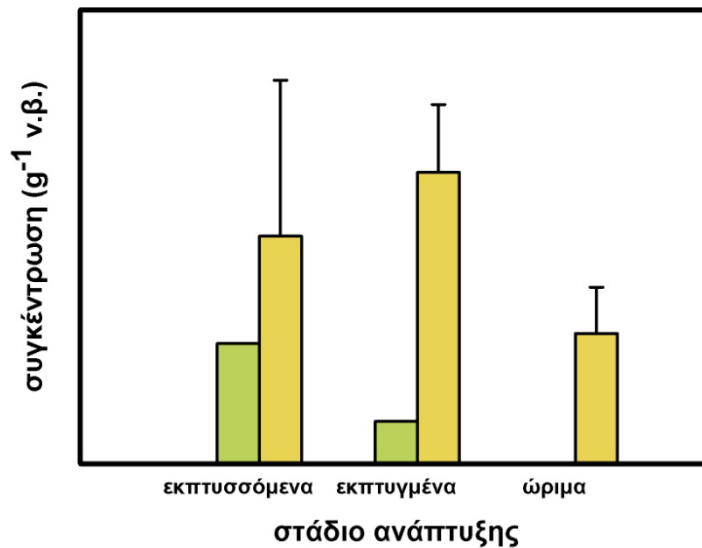
#### **4.3.1. Σύσταση διαλυτού κλάσματος**

Στην εικόνα 6 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ενός κυρίαρχου φλαβονοειδούς όσον αφορά στη συμμετοχή του στο σύνολο των φαινολικών συστατικών των φύλλων. Η ακριβής χημική δομή του μορίου δεν προσδιορίστηκε. Η επίδραση των μεταχειρίσεων στη συγκέντρωση του μορίου αυτού είναι η αναμενόμενη καθώς στις πιο ελλειματικές μεταχειρίσεις B05 και B0 παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση των εκπτυγμένων φύλλων ενώ απουσίαζε στην περίπτωση των ώριμων φύλλων.

Αντίθετα με την πλειοψηφία των διαλυτών φαινολικών συστατικών των φύλλων (όπως τα φλαβονοειδή, εικόνα 6) ο ακτεοσίδης του οποίου η συγκέντρωση για τις τρεις μεταχειρίσεις παρουσιάζεται στην εικόνα 7, αυξήθηκε δραματικά λόγω της τροφопενίας βορίου. Είναι ενδεικτικό πως απουσιάζει πλήρως στα φύλλα των φυτών B23. Ειδικά στα φυτά B05, εμφανίστηκε (σε χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα φύλλα των φυτών B0) τόσο στα εκπτυσσόμενα όσο και στα εκπτυγμένα φύλλα ενώ απουσίασε από τα ώριμα φύλλα. Η εικόνα 7 δείχνει την εξάρτηση της συγκέντρωσης από την ένταση της τροφопενίας όσο και από την ηλικία των φύλλων καθώς τα νεαρά, και πολύ περισσότερο τα εκπτυσσόμενα φύλλα, είναι περισσότερο επιρρεπή στην τροφопενία βορίου.

#### **4.3.2. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων**

Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των δύο συστατικών (κορυφές έκλουσης 1 και 2) τα οποία απελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα μετά από επώαση με το βορονικό οξύ 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ. Στις εικόνες 9 και 10 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των δύο μορίων τα οποία απελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα μετά από επώαση με το βορονικό οξύ 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ. Το συγκεκριμένο βορονικό οξύ θεωρείται πως μπορεί να διασπάσει τα σύμπλοκα του βορικού οξέος με cis-διόλες. Συνεπώς, σύμφωνα και με προηγούμενα πειράματα (Φραγγελάκης 2009, Κεσόγλου, 2010, Τσάση, 2010), τα δύο αυτά μόρια θεωρούνται ως προερχόμενα από την εκλεκτική διάσπαση διεστερικών συμπλόκων του βορικού οξέος μέσω των οποίων προσδένονται σε κατάλληλα κατάλοιπα του κυτταρικού τοιχώματος.

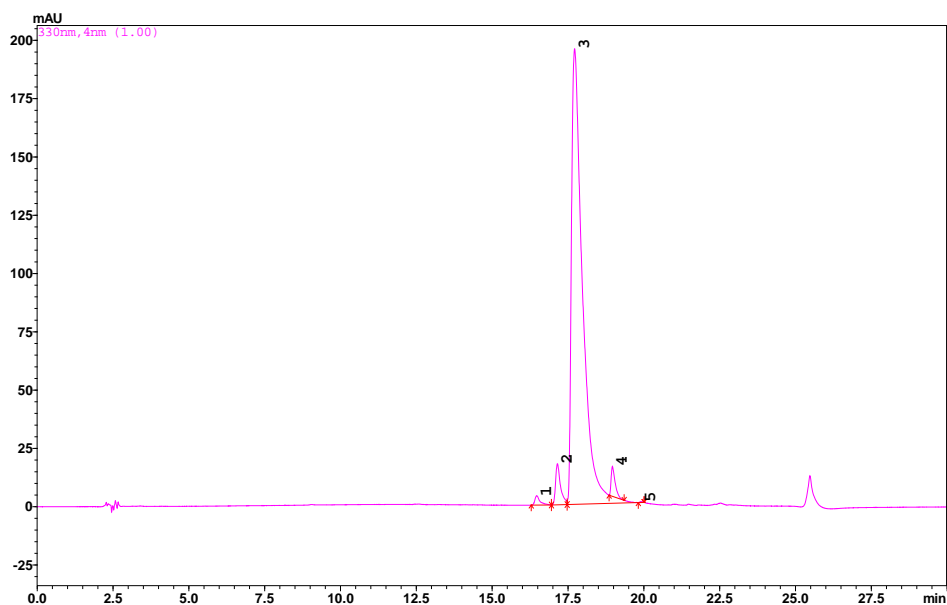


Εικόνα 7. Συγκέντρωση ακτεοσίδη των φύλλων ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23  $\mu\text{M}$  (μάρτυρας), πράσινο: 0,5  $\mu\text{M}$  και κίτρινο: 0,0  $\mu\text{M}$ ). Οι τιμές παρουσιάζονται ως απόκριση του ανιχνευτή της υγροχρωματογραφίας σταθμισμένη ανά μονάδα νωπού βάρους δείγματος. Οι τιμές είναι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων (κάθε επανάληψη αποτελείται από τέσσερα φύλλα από τέσσερα διαφορετικά φυτά)  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

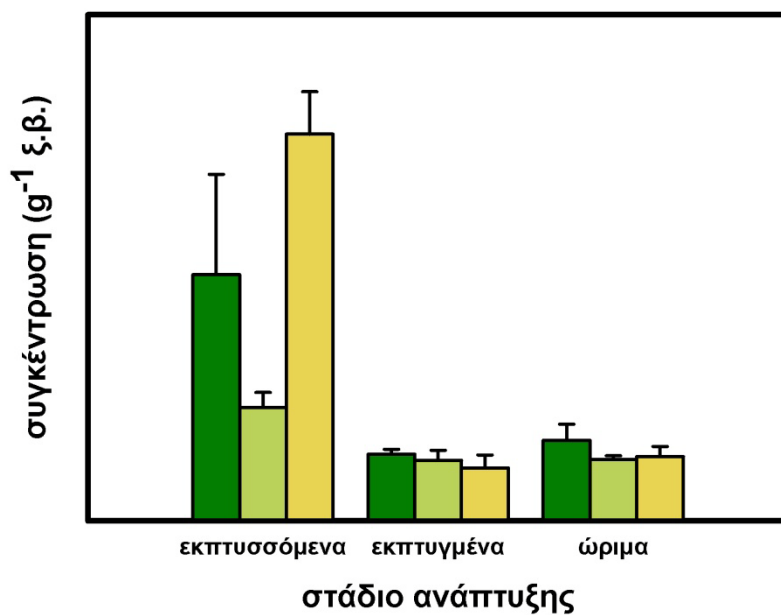
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι μεταχειρίσεις δεν επέδρασαν εμφανώς στη συγκέντρωση των δύο μορίων. Συγκεκριμένα, οι διαφορές στην περίπτωση των εκπτυσσόμενων φύλλων δεν ακολουθούν την διαβάθμιση της συγκέντρωσης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας των φυτών ενώ στα φύλλα των υπόλοιπων δύο ηλικιακών κατηγοριών δεν σημειώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές. Μεταξύ των ηλικιακών κατηγοριών, τα εκπτυσσόμενα φύλλα έδειξαν τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ εκπτυγμένων και ώριμων φύλλων.

Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των συστατικών τα οποία απελευθερώθηκαν από τα κυτταρικά τοιχώματα με αλκαλική υδρόλυση. Με απλή σύγκριση μεταξύ των χρωματογραφικών αναλύσεων μπορεί να διαπιστωθεί ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα συστατικά τα οποία απελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα με κάθε πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα, μέσω της αλκαλικής υδρόλυσης απελευθερώνεται ένας μεγάλος αριθμός συστατικών (εικόνα 11) εκ των οποίων μόνο δύο είναι κοινά με αυτά του χειρισμού με το βορονικό οξύ (εικόνα 8).

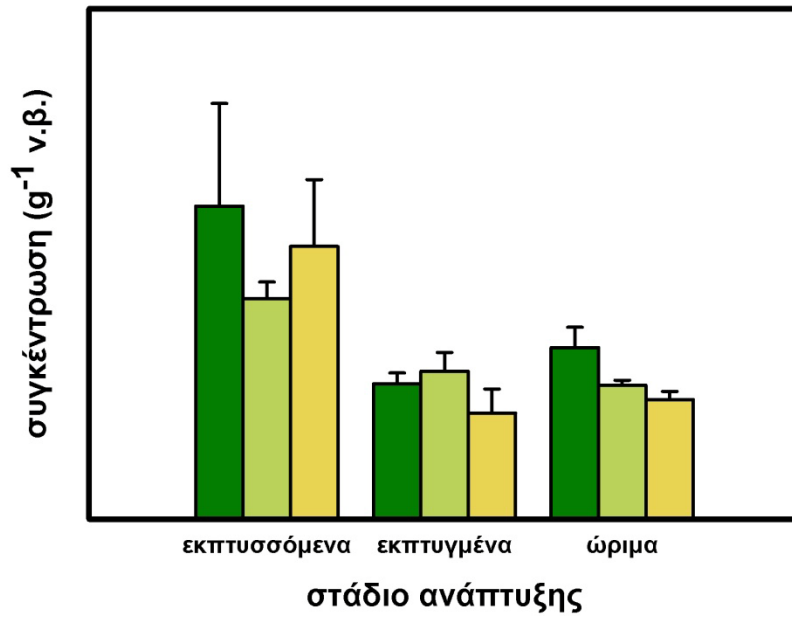
## Αποτελέσματα



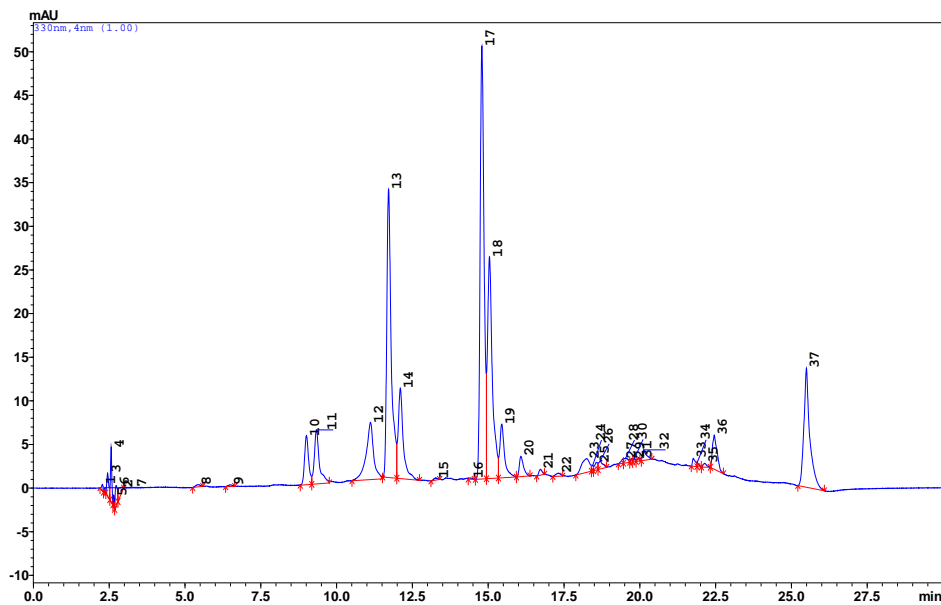
Εικόνα 8. Αντιπροσωπευτική χρωματογραφική ανάλυση συστατικών τα οποία απελευθερώθηκαν μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ από τα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων. Ανίχνευση στα 330 nm. 1: μόριο A315, 2: μόριο A331, 3: 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ, 4 και 5: άγνωστα.



Εικόνα 9. Συγκέντρωση μορίου το οποίο αναφέρεται ως δομή A315 το οποίο απελευθερώθηκε μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ από τα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23 μM (μάρτυρας), πράσινο: 0,5 μM και κίτρινο: 0,0 μM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως απόκριση του ανιχνευτή της υγροχρωματογραφίας σταθμισμένη ανά μονάδα ξηρού βάρους κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων (κάθε επανάληψη αποτελείται από τέσσερα έως οκτώ φύλλα από τέσσερα διαφορετικά φυτά) ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

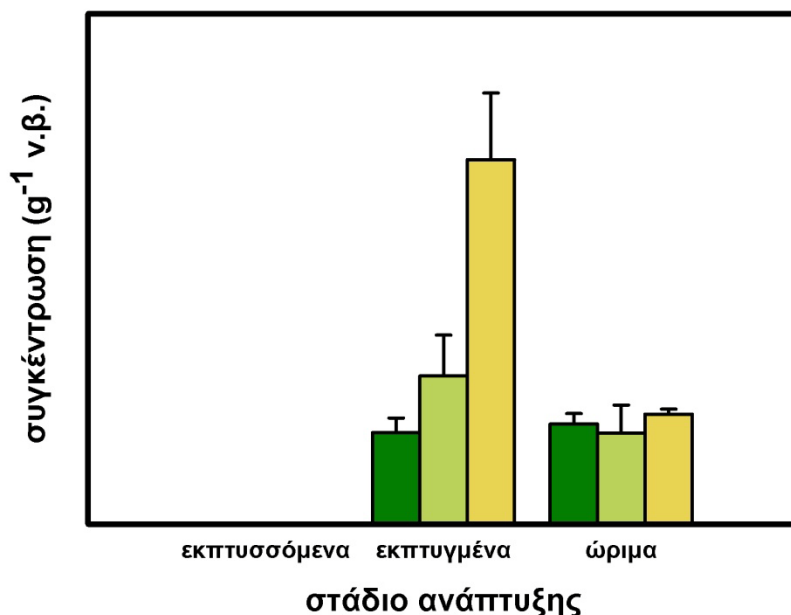


Εικόνα 10. Συγκέντρωση μορίου το οποίο αναφέρεται ως δομή A331 το οποίο απελευθερώθηκε μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ από τα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23 μM (μάρτυρας), πράσινο: 0,5 μM και κίτρινο: 0,0 μM). Οι τιμές παρουσιάζονται ως απόκριση του ανιχνευτή της υγροχρωματογραφίας σταθμισμένη ανά μονάδα ξηρού βάρους κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων (κάθε επανάληψη αποτελείται από τέσσερα έως οκτώ φύλλα από τέσσερα διαφορετικά φυτά) ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 11. Αντιπροσωπευτική χρωματογραφική ανάλυση συστατικών τα οποία απελευθερώθηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων των φύλλων. Ανίχνευση στα 330 nm. 21: μόριο A315, 22: μόριο A331.

## Αποτελέσματα



Εικόνα 12. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών τα οποία απελευθερώθηκαν μετά από αλκαλική υδρόλυση με NaOH από τα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων ανά ηλικιακή κατηγορία για κάθε συγκέντρωση βορίου στο θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης των φυτών (σκούρο πράσινο: 23  $\mu\text{M}$  (μάρτυρας), πράσινο: 0,5  $\mu\text{M}$  και κίτρινο: 0,0  $\mu\text{M}$ ). Οι τιμές παρουσιάζονται ως απόκριση του ανιχνευτή της υγροχρωματογραφίας σταθμισμένη ανά μονάδα ξηρού βάρους κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων (κάθε επανάληψη αποτελείται από τέσσερα έως οκτώ φύλλα από τέσσερα διαφορετικά φυτά)  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών τα οποία απελευθερώθηκαν από τα κυτταρικά τοιχώματα με αλκαλική υδρόλυση. Παρατηρείται ότι η τροφοπενία βορίου προκάλεσε αύξηση των φαινολικών συστατικών τα οποία είναι προσδεδεμένα μέσω κοινών εστερικών δεσμών με τα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος των εκπτυγμένων φύλλων. Ανάλογο αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε στα ώριμα φύλλα.

## 5. Συζήτηση

### 5.1. Επίδραση της τροφοπενίας βορίου στη συγκέντρωση βορίου στα φύλλα και την ανάπτυξη των φυτών

Είναι γνωστό ότι η κατανομή του βορίου στα φύλλα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικία τους (Feámez -Escobar et al. 1999; Liakopoulos et al. 2005; Liakopoulos et al. 2009). Συνήθως, τα αναπτυσσόμενα έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις. Το βόριο είναι ευκίνητο στοιχείο στο φυτό της ελιάς (Delgado et al. 1994, Perica et al. 2001a, 2001b) και το πρότυπο αυτό κατανομής σχετίζεται, εκτός από την παροχή βορίου από το έδαφος, με τη δυνατότητα επαναδιανομής του στοιχείου από τα ώριμα φύλλα. Αντίθετα, στα φυτά όπου το βόριο είναι δυσκίνητο, τα ώριμα φύλλα έχουν πάντα υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα νεαρά (Brown and Shelp, 1997). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα νεαρά–αναπτυσσόμενα αλλά και στα ώριμα φύλλα, η έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα ανάπτυξης προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης στα φύλλα. Στην περίπτωση των μεταχειρίσεων αυτών, το πρότυπο κατανομής του στοιχείου μεταξύ φύλλων διαφορετικής ηλικίας αντιστράφηκε ανάλογα με προηγούμενες αναφορές (Liakopoulos et al. 2009). Ωστόσο, το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων B05 και B0 όπου το βόριο ήταν σε ελλειμματική συγκέντρωση, δεν παρουσίασαν διαφορές, ενδεχομένως να σχετίζεται με φαινόμενα ομοιόστασης (Larcher 1995). Καθώς το βόριο αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα, η ανάπτυξη καθορίζεται από την ένταση της έλλειψης ενώ οι συγκεντρώσεις διατηρούνται σε παρόμοια επίπεδα στους αναπτυσσόμενους ιστούς. Σε αυτό το φαινόμενο συμβάλει επίσης η επανεκκίνηση του στοιχείου από τα ώριμα φύλλα διαδικασία ωστόσο η οποία δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη καθώς οι συγκεντρώσεις των ώριμων φύλλων ήταν παρόμοιες ανεξαρτήτως της μεταχείρισης.

Ένας μεγάλος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών συνδέει την τροφοπενία βορίου με την ανάσχεση της ανάπτυξης των νέων οργάνων (Dell and Huang 1997, Brown and Hu 1997, Blevins and Lukaszewski 1998). Στην παρούσα εργασία όλες οι αναπτυξιακές παράμετροι είχαν τις χαμηλότερες τιμές στην μεταχείριση B0. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε διαβάθμιση μεταξύ των μεταχειρίσεων B05 και B0. Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα, οι τιμές συγκεκριμένων αναπτυξιακών παραμέτρων ήταν υψηλότερες στα φυτά B05 συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Ενδεχομένως τα αποτελέσματα αυτά να οφείλονται αφενώς στην καχεξία αρκετών φυτών της μεταχείρισης B23 και αφετέρου στο γεγονός ότι οι πραγματικές συγκεντρώσεις του βορίου στα θρεπτικά διαλύματα ήταν ελαφρώς υψηλότερες των ονομαστικών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).



### 5.2. Επίδραση της τροφοπενίας βορίου στη σύσταση των φαινολικών συστατικών των φύλλων

Πολυάριθμες αναφορές συνδέουν την τροφοπενία βορίου με την αύξηση των φαινολικών συστατικών (Pilbeam and Kirkby 1983; Cakmak et al. 1995; Ruiz et al. 1998; Liakopoulos and Karabourniotis 2005). Συνήθως, στο φυτό της ελιάς, η συγκέντρωση των περισσότερων φαινολικών συστατικών των φύλλων λόγω τροφοπενίας αυξάνεται έως και 200% ανάλογα με την ένταση της τροφοπενίας και τη δομή του φαινολικού συστατικού (Liakopoulos and Karabourniotis 2005). Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει στην ελιά η αύξηση της συγκέντρωσης του ακτεοσίδη ενός φαινυλαιθανοειδούς γλυκοσίδη. Η συγκέντρωσή του στα φύλλα της ελιάς είναι υπό φυσιολογικές συνθήκες θρέψης πολύ χαμηλές ώστε συχνά δεν ανιχνεύεται στις συνήθεις χρωματογραφικές αναλύσεις. Ωστόσο, υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, η συγκέντρωσή του αυξάνεται αρκετές δεκάδες έως εκατοντάδες φορές με αποτέλεσμα να καθίσταται το κυρίαρχο συστατικό του διαλυτού κλάσματος (Liakopoulos and Karabourniotis 2005; Liakopoulos et al. unpublished). Ένας από τους σκοπούς της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση του και η εξέταση της ύπαρξης διαβάθμισης συγκέντρωσης με την κατεύθυνση της έλλειψης βορίου. Πράγματι, η δραματική αύξηση του μορίου αυτού διαπιστώθηκε σε όλα σχεδόν τα τροφοπενιακά φύλλα και επιπλέον η συγκέντρωσή του ήταν υψηλότερη στην πλέον ελλειμματική μεταχείριση B0. Όσον αφορά στη μεταχείριση B05, η συγκέντρωσή του ήταν υψηλότερη στα εκπτυσσόμενα φύλλα συγκριτικά με τα εκπτυγμένα πιθανώς επειδή στα πρώτα η επίπτωση της έλλειψης είναι δρυσύτερη λόγω απαιτήσεων των επιμηκυνόμενων κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η σύσταση των φαινολικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η εξέταση της επίδρασης της τροφοπενίας βορίου στο κλάσμα αυτό και, περαιτέρω, η εύρεση μεταβολών στη σύσταση οι οποίες πιθανώς να σχετίζονται με σχέσεις δομής-λειτουργίας μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών του αδιάλυτου κλάσματος. Η διευκρίνιση τέτοιων σχέσεων εντάσσεται σε μια ευρύτερη υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία ορισμένα φαινολικά συστατικά κατάλληλης δομής μπορεί να ενώνονται μέσω βορικών διεστέρων στα κατάλοιπα της πηκτίνης του κυτταρικού τοιχώματος. Εάν ισχύει το παραπάνω τότε, εκτός των φαινολικών συστατικών τα οποία προσδένονται μέσω συνηθισμένων εστερικών δεσμών απευθείας σε υδατάνθρακικά κατάλοιπα των πολυσακχαριτών, θα υφίστανται φαινολικά συστατικά προσδεδεμένα μέσω βορικών διεστέρων επί κατάλληλης δομής καταλοίπων της πηκτίνης με πιθανότερα αυτά της απιόζης. Με σκοπό τη διάκριση μεταξύ των δύο τύπων εστερικών δεσμών εφαρμόστηκε αλκαλική υδρόλυση σε απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα η οποία διασπά τους

συνήθεις εστερικούς δεσμούς (κλάσμα Α) και επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ (κλάσμα Β) το οποίο διασπά εκλεκτικά τους διεστερικούς δεσμούς που σχηματίζονται μέσω βορικού οξέος (Bassil et al., 2004). Στη συνέχεια έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο αυτών κλασμάτων καθώς και συσχέτιση μεταξύ τροφοπενίας βορίου και σύστασης κάθε κλάσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα δύο κλάσματα διέφεραν χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, στο κλάσμα Β βρέθηκαν μόνο δύο μόρια (Α315 και Α331) με χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης φαινολικών, συστατικών σύμφωνα και με προηγούμενα αποτελέσματα (Φραγγελάκης 2009; Τσάση, 2010). Αντίθετα στο κλάσμα Α βρέθηκαν πολυάριθμα φαινολικά συστατικά (καθώς και ποσότητες των Α315 και Α331) γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι τα φαινολικά συστατικά Α315 και Α331 προσδένονται με διαφορετικό τύπο εστερικού δεσμού συγκριτικά με τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και πιθανότατα μέσω βορικών διεστερικών δεσμών (Τσάση, 2010). Η επίδραση ωστόσο της τροφοπενίας βορίου στα συστατικά αυτά δεν ήταν εμφανής. Αναμενόταν η ποσότητα των δύο αυτών φαινολικών συστατικών να είναι μειωμένη δεδομένης της έλλειψης βορίου στα φύλλα των φυτών των μεταχειρίσεων Β05 και Β0. Μια πιθανή εξήγηση είναι το γεγονός ότι σε τροφοπενιακά φύλλα διαπιστώνεται συχνά πως οι ποσότητες του βορίου στο κυτταρικό τοίχωμα δεν επηρεάζονται αισθητά και συνεπώς δεν αναμένεται επίσης, υπό τις συνθήκες αυτές, επίδραση επί του σχηματισμού των διεστερικών δεσμών με τα παραπάνω φαινολικά συστατικά. Ίσως απαιτείται εντονότερη ένταση τροφοπενίας βορίου ώστε να μειωθεί ο βαθμός πρόσδεσης τέτοιων μορίων στο τοίχωμα. Από την άλλη μεριά, τα φαινολικά συστατικά που προσδένονται με συνήθεις εστερικούς δεσμούς στο κυτταρικό τοίχωμα παρουσίασαν αύξηση λόγω της τροφοπενίας βορίου γεγονός το οποίο διαπιστώνεται για πρώτη φορά. Η αύξηση παρατηρήθηκε στα εκπτυγμένα φύλλα τα οποία ολοκλήρωσαν την ανάπτυξή τους εντός των πειραματικών χειρισμών και όχι στα ώριμα φύλλα των οποίων η ανάπτυξη είχε ολοκληρωθεί πριν την εκτέλεση του πειράματος γεγονός αναμενόμενο. Η διαφορετική επίδραση της τροφοπενίας βορίου στα φαινολικά συστατικά των κλασμάτων Α και Β επίσης υποδηλώνει διαφορετική φύση των δεσμών μέσω των οποίων τα συστατικά αυτά προσδένονται στο τοίχωμα.



## 6. Βιβλιογραφία

- Bassil, E., Hu, H., Brown, P.H. 2004. Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiology*, 136: 3383-3395.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 481-500.
- Bongi, G., Loreto, F. 1989. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 90: 1408-1416.
- Brown P. H. and Shelp, B. J. (1997) Boron mobility in plants. *Plant and soil* 193, 85-101.
- Brown P.H. and Hu H. 1996. Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol – rich species. *Annals of Botany*, 77: 497–505
- Brown, P.H., Hu, H. 1997. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? *Plant and Soil*, 196: 211-215.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4: 205–223
- Bush, M.S., Marry, M., Huxham, I.M., Jarvis, M.C., McCann, M.C. 2001. Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213, 869-880
- Cakmak I. and Römheld V. 1997. Boron deficiency –induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil*, 193: 71–83
- 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
- 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
- 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., Huang, L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil*, 193: 103-120.
- Delgado, A., Benlloch, M., Fernandez-Escobar, R. 1994. Mobilization of boron in olive trees during flowering and fruit development. *HortScience*, 29: 616-618.
- 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., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1085-1097.

## Βιβλιογραφία

- Fernandez–Escobar R., Moreno R. and Garcia–Creus M. 1999. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate –bearing cycle. *Scientia Horticulturae*, 82: 25–45
- Findekle 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
- Fisher R.F. and Long S.R. 1992. Rhizobium – plantsignal exchange. *Nature*, 387: 655–660
- Fleischer A, O'Neill M.A. and Ehwald R. 1999. The pore size of non – graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross – linking of the pectic polysaccharide rhamno–galacturonan II. *Plant Physiology*, 121: 829–838
- Garcia P.C., Rivero R.M., López–Lefebre L.R., Sánchez E., Ruiz J.M. and Romero L. 2001. Response of oxidative metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 801–806
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Phytochemical adaptatons to stress*. B.N. Timmermann, C. Steelink and F.A. Loewus (eds), Plenum, New York, pp. 273-320
- 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.
- Goldberg S. 1993. Chemistry and mineralogy of boron in soils. In: *Boron and its role in crop production*, UC Gupta (ed), Boca Raton: CRC Press
- Goldberg S. 1997. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*, 193: 35–48
- 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.
- Harborne J.B. and Williams C.A. 2000. *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*, 55: 481–504
- Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Honkanen, T., Larsson, S., 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.
- 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. (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
- Itai C. 1999. Role of phytohormones in plant responses to stress. In: *Plant Responses to Environmental Stress*, HR Lerner (ed), New York: Marcel Dekker
- Karabourniotis G., Tzobanoglou D., Nikolopoulos D. and Liakopoulos G. 2001. Epicuticular phenolics over guard cells: Exploitation for in situ stomatal counting by fluorescence microscopy and combined image analysis. *Annals of Botany*, 87: 631–639
- Kobayashi, M., Ohno, K., and Match, T., (1997). Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. II. Characterization of the boron–polysaccharide complex. *Plant Cell Physiology*, 38, 676–683
- Kolattukudy P.E. 1996. Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: *Plant cuticles*, G Kerstiens (ed), Oxford: β ios Scientific Publishers
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S. and Karabourniotis, G. 2001. Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: Evidence for the chemical origin of the UV –induced blue fluorescence of stomata. *Annals of Botany*, 87: 641–648
- Liakopoulos, G., Karabourniotis, G. 2005. Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: a combined growth chamber and field study. *Tree Physiology*, 25: 307-315.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Filippou, M., Fasseas, C., Tsadilas, C., Drossopoulos, I., Karabourniotis, G. 2005. Boron remobilization at low boron supply in olive (*Olea europaea*) in relation to leaf and phloem mannitol concentrations. *Tree Physiology*, 25: 157-165.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Nikolopoulos, D., Karvonis, E., Vekkos, K.-A., Psaroudi, V., Karabourniotis, G. 2009. Quantitative relationships between boron and mannitol concentrations in phloem exudates of *Olea europaea* leaves under contrasting boron supply conditions. *Plant and Soil*, 323: 177-186.
- 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.
- Match T., Ishigaki K.-I., Mizutani M., Matsunaga W. and Takabe K. 1992. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for an intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant Cell Physiology*, 33: 1135–1141

## Βιβλιογραφία

- 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
- Matoh T., Takasaki M., Takabe K. and Kobayashi M. 1998. Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiology*, 39: 483–491
- 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.
- Merschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, London: Academic Press.
- Nielsen, F.H. 2000. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition* 16: 512-514
- Northcote D. H. Control of Pectin Synthesis and Deposition during Plant Cell Wall Growth, In MCFishman, J. Jen, eds, Chemistry and Function of Pectin, American Chemical Society Symposium series 310. American Chemical society Washington DC, pp134-140
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. and Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.*, 271, 22923–22930.
- Perica, S., Bellaloui, N., Greve, C., Hu, H., Brown, P.H. 2001a. Boron transport and soluble carbohydrate concentrations in olive. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 291-296.
- Perica, S., Brown, P.H., Connell, J.H., Nyomora, A.M.S., Dordas, C., Hu, H., Stangoulis, J. 2001b. Foliar boron application improves flower fertility and fruit set of olive. *HortScience*, 36: 714-716.
- 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. 1999. Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower? *Journal of Plant Physiology*, 155: 34–40
- 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 <sup>10</sup>B and <sup>11</sup>B adopting two independent approaches. *Physiologia Plantarum*, 113: 346-351
- Pietta P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035–1042

- Pilbeam D.J. and Kirkby E.A. 1983. The physiological role of boron in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 563–582
- Power, P.P. and Woods, W.G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. In: *Plant Soil* 193: 1-13.
- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439–463
- Reid J.S.G.(1997). Carbohydrate Metabolism: Structural Carbohydrates. In: *Plant Biochemistry* (Ed. P.M. Dey and J.B. Harborne), 205-236, Academic Press
- Ridley, B.L., O'Neill, M. A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57,929–967.
- Ruiz J.M., Bretones G., Baghour M., Ragala L., Belakbir A. and Romero L. 1998. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry*, 48: 267–272
- 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
- Shirley B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*, 1: 377–382
- 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
- Soler–Rivas C., Espin J.C. and Wichers H.J. 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1013–1023
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G. and Karabourniotis G. (2006a). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Diitrichia viscosa* (Asteracea). *Environmental and Experimental Botany*, 56: 293-300.
- Stedle, E. 2001. The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. 52:847–75
- 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
- Takasaki M., Kawaguchi S., Kobayashi M., Takabel K. and Match T. 1997. Immunocytochemistry of the borate – rhamnogalacturonan II complex in cell walls of radish roots. In: *Boron in Soils and Plants*, RW Bell and B Rerkasem (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers



## Βιβλιογραφία

- 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 nonstructural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 98: 117-124
- van Duin, M., J.A. Peters, A.P.G. Kieboom and H. van Bekkum. 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 <sup>11</sup>B NMR. *Tetrahedron*, 40: 2901-2911.
- Vaughn K.C., Lax A.R. and Duke S.O. 1988. Polyphenol oxidase – The chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum*, 72: 659–665
- Wallace G. and Fry S.C. 1994. Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151: 229–267
- Whetten R. and Sederoff R. 1995. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 1001–1013
- Yamanouchi M. 1971. The role of boron in higher plants. I. The relations between boron and calcium on the pectic substances in plants. *Journal of the Science of Soil Manure*, 42: 207–213
- Γαβαλάς Ν.Α. 1978. Η ανόργανος θρέψη και η λίπανση της ελιάς, Αθήνα: Εκδόσεις Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου
- 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. 1998. Φυσιολογία φυτών. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Δροσόπουλος, Ι. 1992. Στοιχεία ανόργανης διατροφής των φυτών. Εκδόσεις Γεωπονικό Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. 2003. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.
- Κεσόγλου, Κ. 2010. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ βορίου και φαινολικών συστατικών στα κυτταρικά τοιχώματα. Εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας), Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Λιακόπουλος, Γ. 2003. Ανατομικές και Φυσιολογικές Μεταβολές στα Φύλλα της Ελιάς (*Olea europaea* L.) υπό Συνθήκες Τροφοπενίας Βορίου. Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παναγόπουλος, Χ.Γ. 1997. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Ποντίκης, Κ.Α. 2000. Ειδική Δενδροκομία, Ελαιοκομία. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

- Τσάση, Γ. 2010. Διερεύνηση της υπαρξής συστατικών δομής ορθο-δι-φαινόλης στα κυτταρικά τοιχώματα και της συμμετοχή τους σε διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ. Εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας), Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Φραγγελάκης, Α. 2009. Φαινολικά συστατικά και βορικό οξύ στο κυταρικό τοίχωμα φύλλων ελιάς (*Olea europaea* L.): σχέση συνδεδεμένων μορίων ή απλή συνύπαρξη; Πτυχιακή Εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

