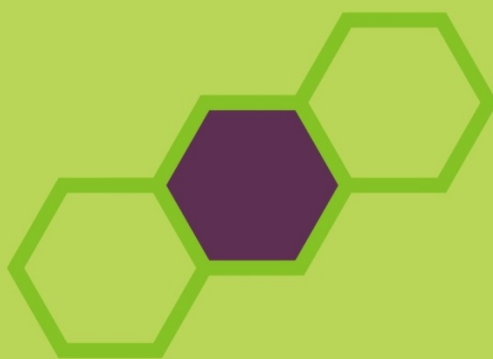


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**Αλληλεπιδράσεις μεταξύ βορίου
και φαινολικών συστατικών
στα κυτταρικά τοιχώματα**



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΕΣΟΓΛΟΥ

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

ΑΘΗΝΑ 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ βορίου και φαινολικών συστατικών στα
κυτταρικά τοιχώματα

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΕΣΟΓΛΟΥ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2010

Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και η εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκαν με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 18/19-06-2008).

ΠΕΝΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Μέλος)

Δημήτριος Μπουράνης, Καθηγητής (Μέλος)

Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια (Μέλος)

Γεώργιος Λιακόπουλος, Λέκτορας (Μέλος)

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	5
Πρόλογος.....	7
Εισαγωγή	9
I. Γενικά.....	9
I.1. Χημικές ιδιότητες του βορικού οξέος	9
I.2. Το βόριο στους οργανισμούς.....	10
I.3. Το βόριο στα ανώτερα φυτά	11
I.3.1. Χημικές μορφές στο έδαφος, πρόσληψη και διακίνηση του βορίου .	11
II. Φυσιολογικοί ρόλοι του βορίου στο φυτικό κύτταρο	12
II.1. Συμμετοχή στη λειτουργικότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης..	14
II.2. Συμμετοχή στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος.....	16
II.2.1. Χημική σύσταση και αρχιτεκτονική του κυτταρικού τοιχώματος	17
II.2.1.1. Μακρομοριακή σύσταση.....	21
Κυτταρίνη.....	21
Ημικυτταρίνες	21
Πηκτινικοί πολυσακχαρίτες.....	22
Ομογαλακτουρονάνη (HG)	23
Ραμνογαλακτουρονάνη I (RG-I)	23
Ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II).....	24
Λιγνίνη.....	25
Κουτίνη(υμενίνη).....	25
Σουβερίνη(φελλίνη)	25
II.2.1.2. Σύσταση σε φαινολικά συστατικά	26
II.2.2. Συσχέτιση του βορίου με το πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος.....	27
Σκοπός της εργασίας.....	29
Υλικά και Μέθοδοι	31
I. Φασματοσκοπικές μελέτες της δημιουργία συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών με ή χωρίς την παρουσία βορονικών οξέων	31
II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα	32
II.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας.....	32
II.2. Δειγματοληψίες	32
II.3. Απομόνωση και χειρισμοί των κυτταρικών τοιχωμάτων	32
II.4. Επώαση κυτταρικών τοιχωμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία βορονικών οξέων.....	33
II.5. Χρωματογραφική ανάλυση των μορίων που ελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα	33
II.6. Μέτρηση συγκέντρωσης βορίου μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης	34
II.7. Παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	34
II.8. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου.....	35
Αποτελέσματα.....	37
I. Φασματοσκοπικές μελέτες της δημιουργία συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών με ή χωρίς την παρουσία βορονικών οξέων	37
I.1. Επίδραση της προσθήκης βορικού ή βορονικών οξέων στο φάσμα απορρόφησης φαινολικών συστατικών	37
II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα	40
II.1. Χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων από διάφορους ιστούς ...	42
II.2. Ανταλλάξιμα μόρια μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ. 42	
II.3. Απελευθέρωση βορικού οξέος μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ	45
III. Παρασκευαστική απομόνωση κλασμάτων ανταλλάξιμων μορίων μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.....	46

Συζήτηση	49
I. Αξιολόγηση της χρήσης του 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος για την ποσοτική συμπλοκοποίηση φαινολικών συστατικών και συνεπαγόμενα της ικανότητας διάσπασης υφιστάμενων συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και μορίων ανάλογης δομής.....	49
II. Χρήση του 3-νιτροφαινυλ-βορονικού οξέος για την διάσπαση βορικών διεστέρων στο κυτταρικό τοίχωμα από διαφορετικούς ιστούς και ανάλυση των μορίων που απελευθερώνονται.....	50
III. Ενδείξεις περί της ύπαρξης ορθο-δι-υδρόξυ συστήματος στα υπό μελέτη μόρια	51
IV. Γενικό συμπέρασμα	52
Βιβλιογραφία	53
Περίληψη.....	61
Abstract.....	62

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θεωρώ ότι με το πέρας αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά όλους αυτούς που συνέβαλαν για την ολοκλήρωση της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη για την ευκαιρία που μου έδωσε με την ανάθεση της παρούσας μελέτης να ανακαλύψω ένα πολύ μικρό αλλά εκπληκτικό κομμάτι της ερευνητικής διαδικασίας και να το αγαπήσω. Τον ευχαριστώ επίσης για την απλοχέρη και συνάμα ειλικρινή βοήθεια που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της πραγματοποίησης αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κκ. Παναγιώτη Κατινάκη και Δημήτριο Μπουράνη, και την Επίκουρη καθηγήτρια κα Δήμητρα Μηλιώνη για τη συμμετοχή τους στην πενταμελή εξεταστική επιτροπή, την διόρθωση της μελέτης μου καθώς και για την ευγενική τους διάθεση.

Σ' αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Λέκτορα του εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την πολύπλευρη και παράλληλα καθοριστική συμβολή του στην περάτωση της μελέτης αυτής, τη μοναδική βοήθεια που μου παρείχε από την αρχή της διατριβής μου στην εργαστηριακή αλλά και θεωρητική επένδυση της όποτε κι αν απαιτήθηκε. Τον ευχαριστώ ακόμη για τις του επιστημονικές γνώσεις που έθεσε στη διάθεση μου, τις φιλικές και ενδιαφέρουσες συμβουλές του.

Η πειραματική αυτή εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την συμβολή της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας Ελένης Σκαλτσά και της διδάκτορος κας Αικατερίνης Αργυροπούλου του Τομέα Φαρμακογνωσίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. τις οποίες ευχαριστώ ιδιαίτερα για την καθοδήγηση στην παρασκευαστική απομόνωση των κλασμάτων των δύο μορίων και την λήψη και ερμηνεία των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$.

Στο μέλος ΕΕΔΙΠ, διδάκτορα κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο οφείλω ένα ευχαριστώ για τον ιδιαίτερο τρόπο του στο να διαμορφώνει ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο αλλά και την επιστημονική του υποστήριξη. Ευχαριστώ επίσης το Γεωπόνο κ. Γεώργιο Κωστελένο για την προμήθεια του φυτικού υλικού το οποίο αποτέλεσε τη βάση για την έναρξη της μελέτης αυτής.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον τότε προπτυχιακό και πλέον πτυχιούχο του Τμήματος της Βιοτεχνολογίας Ακύλα Φραγγελάκη για την πολύτιμη βοήθεια του σε μια σειρά πειραμάτων αλλά και το άριστο κλίμα συνεργασίας που είχαμε.

Κλείνοντας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ανθρώπους που βρεθήκαν αλλά και συνεχίζουν να βρίσκονται κοντά μου, συμμετέχοντας και παράλληλα στηρίζοντας με τον δικό τους μοναδικό και ιδιόρρυθμο τρόπο τις επιλογές μου. Η οικογένεια μου αποτελεί το σημαντικότερο μέρος αυτών και τους ευχαριστώ για τη αμέριστη στήριξη, την κατανόηση και ειδικότερα για την ανεξάντλητη αγάπη τους σε οποιοδήποτε βήμα της ζωής μου όλα αυτά τα χρόνια.

Εισαγωγή

I. Γενικά

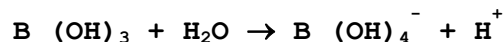
I.1. Χημικές ιδιότητες του βορικού οξέος

Το βόριο αποτελεί μέλος της υποομάδας III των μεταλλοειδών και έχει ενδιάμεσες ιδιότητες ανάμεσα στα μέταλλα και τα αμέταλλα (Merschner, 1995).

Παρότι η παρουσία του στη φύση δεν χαρακτηρίζεται από αφθονία, απαντάται στη λιθόσφαιρα αλλά και στην υδρόσφαιρα σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 5-10 mg/kg σε πετρώματα (Shorrocks, 1997), 3-30 μg/kg σε ποταμούς (Power and Woods, 1997) και περίπου 4,5 mg/L στα νερά των ωκεανών (Lemarchand et al., 2000).

Το βόριο συνιστά απαραίτητο μικροστοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών (Warrington, 1923) και η διαθεσιμότητα του στο έδαφος ή και στο αρδευτικό νερό αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για υψηλή παραγωγικότητα των φυτών (Tanaka and Fujiwara, 2008).

Σε υδατικά διαλύματα το βορικό οξύ συμπεριφέρεται ως ασθενές μονοβασικό οξύ κατά Lewis με K_a ίση με $6 \cdot 10^{10}$ και pK_a 9, 24 κατά την αντίδραση



Το βόριο στα βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών κυττάρων, απαντάται με τη μορφή του βορικού οξέος και ειδικότερα με τις δύο μορφές ιονισμού του, το αδιάστατο μόριο και το τετραϋδρόξυ-βορικό ανιόν. Δεν απαντώνται άλλα χημικά είδη του βορίου στα κύτταρα κυρίως λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων και των τιμών pH που επικρατούν (Power and Woods, 1997). Η επικρατούσα μορφή του βορικού οξέος στο κυτταρόπλασμα είναι το αδιάστατο μόριο κατά περίπου 98%, ενώ λιγότερο από το 2% ανιχνεύεται ως βορικό ανιόν. Στον αποπλαστικό χώρο τα ποσοστά αυτά παρουσιάζονται ελαφρώς τροποποιημένα (99,95 και 0,05% περίπου) λόγω των χαμηλότερων τιμών pH (Woods, 1996; Brown et al., 2002). Το βόριο διακρίνεται σε δύο κλάσματα, το υδατοδιαλυτό και το αδιάλυτο στο νερό κλάσμα. Το πρώτο κλάσμα αντιπροσωπεύει το βόριο του συμπλάστη ενώ το δεύτερο το βόριο των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Μεταξύ των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων των φυτών, το βορικό οξύ έχει την μοναδική ικανότητα να σχηματίζει σταθερά διεστερικά σύμπλοκα με πολυόλες, μόρια με περισσότερα του ενός υδροξύλια στον ανθρακικό τους σκελετό (Shelp, 1993). Πρόκειται για μια αυθόρμητη αντίδραση, η χημική ισορροπία της οποίας εξαρτάται από την τιμή του pH (Brown et al., 2002). Λόγω της αντίδρασης του βορικού οξέος με ζεύγη υδροξυλίων, τα παραγόμενα σύμπλοκα είναι κυκλικοί (τριγωνικοί) διεστέρες αν και απαντώνται σε ισορροπία με τις τετραεδρικές

Εισαγωγή

μορφές. Επιπλέον, λόγω της ύπαρξης δύο ζευγών όξινων υδροξυλίων στο βορικό ανιόν, σχηματίζονται τόσο μονο- όσο και δι-εστερικά σύμπλοκα (Van den Berg et al., 1994) με αποτέλεσμα το βορικό οξύ να δρα ως συνδετικό μόριο δύο διακριτών υποκαταστατών. Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητά του εστιάζεται το σύνολο των φυσιολογικών ρόλων του βορίου με κυρίαρχη τη συμβολή του στην δομική σταθερότητα του πλέγματος της ηκτινής μέσω της δημιουργίας διαδεσμών μεταξύ υπολειμμάτων απόζης των πλάγιων αλυσίδων γειτονικών πολυμερών της ραμνογαλακτουρονάνης II στα κυτταρικά τοιχώματα (Kobayashi et al., 1996; O'Neill et al., 1996; O'Neill et al., 2001).

Εκτός των αλκοολών, τόσο το βορικό οξύ όσο και το βορικό ανιόν σχηματίζουν σύμπλοκα και με άλλες ενώσεις που φέρουν δύο υδροξυλομάδες σε διαμόρφωση *cis* (Brown et al., 2002) όπως ορισμένα φαινολικά συστατικά (Κλουβάτου, 2006). Επιπλέον, την παραπάνω λειτουργικότητα διαθέτουν πολυάριθμα άλλα κυτταρικά συστατικά και επομένως μπορούν να σχηματίσουν διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ όπως οι ολιγοσακχαρίτες, τα γλυκολιπίδια και οι γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δομή των κυτταρικών μεμβρανών και στην κυτταρική επικοινωνία αντίστοιχα, οργανικά οξέα και άλλα σημαντικά κυτταρικά συστατικά όπως το ασκορβικό οξύ (Loomis and Durst, 1992; Blevins and Lukaszewski, 1998; Brown et al., 2002).

1.2. Το βόριο στους οργανισμούς

Το βόριο αποτελεί βασικό ιχνοστοιχείο το οποίο απαιτείται όχι μόνο από τα ανώτερα φυτά και άλλα είδη του φυτικού βασιλείου (κυανοβακτήρια, θαλάσσια φύκη κ.α.) για τη φυσιολογική ανάπτυξη τους (Loomis and Durst, 1992). Τα κυανοβακτήρια εξαρτώνται από την παρουσία του βορίου για τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου (Bonilla et al., 1990; Mateo et al., 1986). Τις τελευταίες δεκαετίες αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στην εύρεση ζωτικών λειτουργιών στις οποίες να συμμετέχει το βόριο σε οργανισμούς όπως οι ζυμομύκητες (Bennett et al., 1999), τα ζώα αλλά και ο άνθρωπος (Nielsen, 2002). Η βιολογική σημασία του βορίου για την ανάπτυξη εξειδικευμένων βακτηρίων όπως τα κυανοβακτήρια (Bonilla et al., 1990) αλλά και οι ακτινομυκήτες του γένους *Frankia* (Bolanos et al., 2002) έχει αποδειχθεί από μια σειρά πειραμάτων.

Αποδείξεις ότι το βόριο έχει σημαντικό βιολογικό ρόλο σε άλλους οργανισμούς εκτός του φυτικού βασιλείου προέκυψαν αρχικά από τους Smyth και Dagger το 1981 και αφορούσαν τα διάτομα και τα κυανοβακτήρια (Bonilla et al., 1990; Garcia-Gonzalez et al., 1991; Bonilla et al., 1997). Σχετικά πρόσφατα έχει δειχθεί η επίδραση του βορίου στη διέγερση της ανάπτυξης των ζυμών (Bennett et al., 1999), αλλά και το ότι καθίσταται δομικά απαραίτητο για μια σειρά από

οργανισμούς του ζωικού βασιλείου όπως το ψάρι-ζέβρα (*Dario rerio*) (Eckhert and Rowe, 1999), την πέστροφα (*Onchorhynchus mykiss*) (Eckhert, 1998; Rowe et al., 1998), τον βάτραχο (*Xenopus laevis*) (Fort et al., 1998) και το ποντίκι (Lanoue et al., 2000). Υπάρχουν επίσης ισχυρές ενδείξεις ότι το βόριο είναι τουλάχιστον ωφέλιμο-ευεργετικό για τον άνθρωπο (Nielsen, 2000).

Η ένδειξη ότι το βόριο κατέχει ένα ευρύ βιολογικό ρόλο στηρίζεται στην ανακάλυψη ότι είναι απαραίτητο για ζωικά είδη τα οποία δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα (Brown et al., 2002). Προσεκτικότερη μελέτη των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του βορίου στα βιολογικά συστήματα αλλά και των πειραματικών δεδομένων από φυτικά και ζωικά δείγματα, υποστηρίζουν ότι παίζει αποφασιστικό ρόλο στη δομή και λειτουργία των μεμβρανών (Brown et al., 2002; Wimmer et al., 2009). Στην περίπτωση των ανθρώπων, το βόριο έχει επίπτωση σε συγκεκριμένες λειτουργίες των μεμβρανών με συνέπεια τη μειωμένη ηλεκτρική δραστηριότητα του εγκεφάλου, μειωμένη γνωστική απόδοση ενώ παρατηρούνται αλλαγές στις συγκεντρώσεις και τη δραστηριότητα αρκετών μεμβρανικά σχετιζόμενων ορμονών (Nielsen, 2000).

1.3. Το βόριο στα ανώτερα φυτά

Το βόριο έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί πλέον ένα από τα ουσιώδη μικροστοιχεία και είναι απαραίτητο στα ανώτερα φυτά τόσο για την ανάπτυξή τους όσο και για την αναπαραγωγή. Τα φυτά σύμφωνα με τις απαιτήσεις που παρουσιάζουν σε βόριο διαχωρίζονται σε τέσσερις ομάδες. Τα γαλακτοφόρα είδη (σχηματίζουν γαλακτώδεις χυμούς) είναι αυτά που εμφανίζουν πολύ αυξημένες απαιτήσεις ενώ ακολουθούν τα ψυχανθή, έπονται τα δικότυλα και η οικογένεια Liliaceae των μονοκότυλων και τέλος κατατάσσονται τα αγρωστώδη τα οποία έχουν και τις χαμηλότερες απαιτήσεις (Mengel and Kirkby, 2001). Το ερώτημα γιατί τα γαλακτοφόρα είδη εμφανίζουν υψηλότερες απαιτήσεις σε βόριο, παραμένει προς το παρόν αναπάντητο.

1.3.1. Χημικές μορφές στο έδαφος, πρόσληψη και διακίνηση του βορίου

Το βόριο στο έδαφος απαντάται ως α) συστατικό των πρωτογενών ορυκτών, β) συστατικό των δευτερογενών ορυκτών, γ) προσροφημένο στην άργιλο, στην οργανική ουσία και σε ένυδρα οξειδία, δ) διαλυτό στο εδαφικό διάλυμα (αποτελεί συνήθως το 10% του ολικού εδαφικού βορίου), και ε) αφομοιωμένο στη βιομάζα (Power and Woods, 1997). Η διαθεσιμότητα του βορίου στο έδαφος επηρεάζεται από την υφή του εδάφους, την ατμοσφαιρική υγρασία, τη θερμοκρασία και το pH του εδαφικού διαλύματος, σε υψηλές τιμές του οποίου η διαθεσιμότητα βορίου μειώνεται πιθανώς λόγω του σχηματισμού του ανιόντος $B(OH)^{4-}$ (Goldberg, 1997). Το βόριο του εδάφους απομακρύνεται ευχερώς με έκπλυση, φαινόμενο που

Εισαγωγή

εξαρτάται από την ποσότητα του ύδατος και από την υφή του εδάφους. Εκτός αυτού, η οργανική ουσία του εδάφους κατακρατεί μια σημαντική ποσότητα διαθέσιμου βορίου και επομένως, εδάφη πλούσια σε οργανική ουσία εμφανίζονται πλούσια σε βόριο. Αντίθετα, τα ξηρά εδάφη παρουσιάζουν μειωμένη διαθεσιμότητα σε βόριο, λόγω της περιορισμένης απελευθέρωσης βορίου από τα οργανικά σύμπλοκα καθώς και της περιορισμένης ικανότητας των φυτών να αντλήσουν το στοιχείο (Δροσόπουλος, 1992).

Η μεταφορά του βορίου από το εδαφικό διάλυμα στα κύτταρα της ρίζας επιτελείται μέσω μαζικής ροής και διάχυσης, με την πρώτη να κρίνεται περισσότερο σημαντική. Για τον λόγο αυτό, η τροφοδοσία των φυτών με βόριο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επάρκεια υγρασίας και τον διαπνευστικό ρυθμό. Τα κύτταρα των ριζών απορροφούν το αδιάστατο βορικό οξύ από το έδαφος κυρίως μέσω παθητικής μεταφοράς. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις η απορρόφηση σημαντικών ποσοτήτων του βορικού οξέος οφείλεται σε μηχανισμούς ενεργού μεταφοράς (Dannel et al., 2002; Takano et al., 2002; Stavrianakou et al., 2006). Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η μεταφορά του βορίου από τα κύτταρα του ριζικού συστήματος στα υπέργεια μέρη 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). Επίσης, η τροφοδοσία εξαρτάται από παράγοντες που αυξάνουν τον ρυθμό παραγωγής βιομάζας, όπως είναι τα υψηλά επίπεδα αζώτου στο έδαφος και οι υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας (Goldberg, 1993) λόγω αύξησης του ρυθμού πραγματοποίησης των κυτταρικών διαιρέσεων και της δημιουργίας των κυτταρικών τοιχωμάτων.

II. Φυσιολογικοί ρόλοι του βορίου στο φυτικό κύτταρο

Η διατύπωση πιθανών ρόλων του βορίου στα ανώτερα φυτά προκύπτει κατ' αρχάς έμμεσα από την πληθώρα των συμπτωμάτων που κάνουν την εμφάνιση τους σε συνθήκες έλλειψης του στοιχείου ορισμένα από τα οποία αναφερθήκαν αρχικά από τους Parr και Loughman (1983).

Αρκετές φυσιολογικές διαταραχές παρατηρούνται έως αποτέλεσμα της έλλειψης του βορίου, όπως στη διαδικασία της μεταφοράς των σακχάρων, στη λιγνινοποίηση, στη δομή και τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων, στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και του RNA, στην αναπνοή, στον μεταβολισμό της αυξίνης και των φαινολικών συστατικών και στην ακεραιότητα των μεμβρανών. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι η τροφοπενία του βορίου εξασθενεί τον μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος (Lukaszewski and Blevins, 1996) και

επάγει τη συσσώρευση ενεργών μορφών οξειγόνου (Marschner, 1995). Παρόλα αυτά, κανένα πειραματικό δεδομένο δεν έχει παρουσιάσει έως τώρα το βόριο ως συστατικό των ενζύμων ή ότι έχει άμεσο ρόλο στην ενεργοποίηση τους.

Ο μεταβολισμός του ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης, βασικά συστατικά του μηχανισμού αντιοξειδωτικής προστασίας των φυτών έναντι των τοξικών ενεργών μορφών οξειγόνου (ROS), επηρεάζονται από τις συνθήκες έλλειψης βορίου καθώς τα επίπεδά τους σε φύλλα και ρίζες μειώνονται κάτω από αυτές τις συνθήκες (Lukaszewski and Blevins, 1996; Cakmak and Romheld, 1997).

Μακροσκοπικά, συμπτώματα τα οποία εμφανίζονται υπό τροφопενία βορίου στα ανώτερα φυτά περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των ριζών και διαταραχές στην διανομή σακχάρων, στην ανάπτυξη των γυρεοσωλήνων (Blevins and Lukaszewski, 1998; Goldbach and Wimmer, 2007), στον μεταβολισμό του αζώτου (Camacho-Cristobal and Gonzalez-Fontes, 1999, 2007), στην ιοντική ροή δια μέσου των μεμβρανών (Blaser-Grill et al., 1989; Goldbach et al., 2001) αλλά και στην συσσώρευση πολυαμινών και φαινολικών συστατικών στους ιστούς (Camacho-Cristobal et al., 2002, 2004, 2005).

Με βάση τα συμπτώματα αυτά, έχει συγκροτηθεί ένας μακροσκελής κατάλογος ενδεχόμενων ρόλων στους οποίους εμπλέκεται το βόριο στην αύξηση και ανάπτυξη ανώτερων φυτών. Πρωταρχικός και πλήρως διευκρινισμένος ρόλος του βορίου είναι αυτός του δομικού στοιχείου των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω της συμπλοκοποίησης του με το πηκτινικό κλάσμα. Ο ρόλος αυτός είναι ιδιαίτερα εμφανής σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς με ακραίο παράδειγμα τον αναπτυσσόμενο γυρεοσωλήνα, ο οποίος απαιτεί όχι μόνο υψηλή τροφοδοσία με βόριο για ταχεία σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος αλλά ενδεχομένως και των μεμβρανών μέσω της ταχείας συνένωσης των κυστιδίων που προέρχονται από το σύστημα Golgi. Αρκετά από τα συμπτώματα της έλλειψης βορίου μπορούν εν μέρει να εξηγηθούν βάσει της συμμετοχής του βορικού οξέος στον σχηματισμό των διμερών της ραμνογαλακτουρονάνης II (dRG-II-B) των κυτταρικών τοιχωμάτων (Hu et al., 1996; Bolanos et al., 2004). Άλλοι ρόλοι, φαίνεται πως μπορεί να σχετίζονται με τον σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ του βορικού οξέος και άλλων κυτταρικών συστατικών. Γενικότερα, η ιδιότητα αυτή του βορίου πιστεύεται πως μπορεί μελλοντικά να εξηγήσει την εμπλοκή του στοιχείου σε διαφορετικές και ετερόκλητες μεταξύ τους φυσιολογικές λειτουργίες. Η ικανότητα του βορίου με τη μορφή του βορικού οξέος να αντιδρά με ομάδες υδροξυλίων θεωρείται το κλειδί στην κατανόηση των λειτουργιών του στοιχείου (Bolanos et al., 2004), και η έρευνα εστιάζεται στην ανακάλυψη σύμπλοκων ενώσεων του σε βιολογικά συστήματα. Ολιγάριθμα μη δομικά μόρια ικανά να δεσμεύσουν το βόριο έχουν

Εισαγωγή

ανιχνευθεί *in vivo* και απομονωθεί όπως αυτό με την σακχαροαλκοόλη σορβιτόλη, η ύπαρξη του οποίου έδωσε ικανοποιητική ερμηνεία για την υψηλή κινητικότητα του στοιχείου στον ηθμό φυτών στα οποία μεταξύ των διακινούμενων φωτοσυνθετικών προϊόντων περιλαμβάνονται σακχαροαλκοόλες (Hu et al., 1997; Liakoroulos et al., 2009). Ειδικότερα, γίνεται ολοένα και περισσότερο αποδεκτό το ενδεχόμενο ότι οι επιπτώσεις της έλλειψης βορίου σχετίζονται πιθανότατα με την αδυναμία σχηματισμού συμπλόκων με ενώσεις που διαθέτουν τη διαμόρφωση *cis*-διολης όπως πηκτινικά συστατικά, γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια μεμβρανών, σακχαροαλκοόλες και ορθοδιφαινόλες (Dugger, 1983; Marschner, 1995; Romheld and Marschner, 1991; Shelp, 1993).

Το βόριο θεωρείται επίσης υπεύθυνο για μεταβολές στον μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων. Τουλάχιστον με τα μέχρι τώρα γνωστά, η έλλειψή του επιφέρει τη συσσώρευση φαινολικών ενώσεων, μέσω της διέγερσης της αμμωνιακής λύσης της φαινυλαανίνης (PAL) (Cakmak et al., 1995; Pfeffer et al., 1998; Ruiz et al., 1998; Camacho-Cristobal et al., 2002). Η έλλειψη του στοιχείου στα ανώτερα φυτά συνοδεύεται όχι μόνο από ποσοτικές αλλά και ποιοτικές αλλαγές στη δεξαμενή των φαινολικών συστατικών (Camacho—Cristobal et al., 2002, 2004; Liakoroulos and Karabourniotis, 2005; Karioti et al., 2006).

II.1. Συμμετοχή στη λειτουργικότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Ο ρόλος του βορίου σε ότι αφορά τις μεμβράνες, αρχικά στηρίχθηκε στο γεγονός ότι σε περίπτωση έλλειψης, διαταράσσονται ορισμένες μεμβρανικές λειτουργίες όπως έχει παρατηρηθεί τόσο σε βατράχους αλλά και σε ψάρια, είδη στα οποία το βόριο συμβάλλει στη φυσιολογική αναπαραγωγική διαδικασία ενώ τυχόν έλλειψή του, προκαλεί δυστροφία των φωτοϋποδοχέων των οφθαλμών (Eckhert and Rowe, 1999). Στα φυτά, ορισμένα τουλάχιστον από τα συμπτώματα όπως η παρεμπόδιση της ενεργότητας της NADH-εξαρτώμενης οξειδο-αναγωγάσης στην πλασματική μεμβράνη εντοπίζεται άμεσα, λίγο μετά την διαμόρφωση συνθηκών έλλειψης βορίου (Barr et al., 1993; Findekleee et al., 1997). Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδώσει στο βόριο ρόλους στη λειτουργία ενζύμων και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, στη διαδικασία μεταφοράς μορίων δια μέσου της μεμβράνης αλλά και στην ίδια την ακεραιότητά της (Cakmak and Romheld, 1997; Goldback et al., 2001; Brown et al., 2002). Για παράδειγμα, η έλλειψη του βορίου διαταράσσει το δυναμικό των μεμβρανών γεγονός που αποδίδεται στην μείωση της δραστηριότητας των αντλιών πρωτονίων (Blaser-Grill et al., 1989), οδηγεί στη μείωση της ενεργότητας της αναγωγάσης του σιδήρου (Goldbach et al., 1991; Ferrol and Donaire, 1992), επιδρά στην μεμβρανική περατότητα όπως μετράται από τον ρυθμό διαρροής καλίου και σακχάρων, αμινοξέων και

φαινολικών συστατικών (Parr and Louhman, 1983; Goldbach, 1985; Cakmak et al., 1995; Wang et al., 1999), επιφέρει βλάβες στην περιβακτηριδιακή μεμβράνη των φυματίων (Bolanos et al., 1994) ή οδηγεί σε αλλαγή των επιπέδων του ασβεστίου (Ca^{+2}) στη μεμβράνη (Muhling et al., 1998; Wimmer and Goldbach, 1999). Όλες οι παραπάνω επιδράσεις της έλλειψης εντάσσονται στην υπόθεση της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ του βορίου και συστατικών των μεμβρανών (Goldbach and Wimmer, 2007; Wimmer et al., 2009). Ορισμένες μεμβρανικές επιδράσεις της έλλειψης βορίου εμφανίζονται ή επιτείνονται όταν η τελευταία συνδυάζεται με υψηλούς ρυθμούς αύξησης (Pfeffer et al., 1998).

Παρότι τα συμπτώματα της απουσίας το βορίου κάνουν την εμφάνιση τους σε σύντομο χρονικό διάστημα, οι ακριβείς μηχανισμοί κάτω από τους οποίους η έλλειψη αυτή επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης δεν είναι ακόμη γνωστοί (Blevins and Lukaszewski, 1998; Brown et al., 2002; Goldbach and Wimmer, 2007). Πιθανολογείται ότι ορισμένα μόρια των μεμβρανών, όπως γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια περιέχουν υποκαταστάτες υδροξυλίων που μπορούν εν δυνάμει να σχηματίσουν σύμπλοκα με το βόριο και είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των μεμβρανών (Goldbach et al., 2001; Brown et al., 2002; Wimmer et al., 2009; Goldbach and Wimmer, 2007). Η ύπαρξη ωστόσο των συμπλόκων αυτών δεν έχει μέχρι τώρα αποδειχθεί. Πρόσφατα, σε πειράματα που έγιναν σε τμήματα ριζών του *Arabidopsis thaliana*, προέκυψαν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η απουσία του βορίου προκαλεί ταχεία παρεμπόδιση της έκφρασης αρκετών γονιδίων των (AGP) πρωτεϊνών αραβινογαλακτάνης (Camacho-Cristobal et al., 2008). Επίσης, πρόσφατα απομονώθηκε μια σειρά μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με το βόριο. Υπό το φως των αποτελεσμάτων αυτών, μπορεί πλέον να διερευνηθεί εντατικά η υπόθεση ότι το βόριο μπορεί να βοηθά στην χωροταξική διευθέτηση και επομένως και στην λειτουργικότητα των γλυκοπρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη (Wimmer et al., 2009). Η συσχέτιση του βορίου με την διαδικασία της δέσμευσης του αζώτου αλλά και τη συμβιωτική σχέση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων του γένους *Rhizobium* με τα ψυχανθή έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών. Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα κυτταρικά τοιχώματα αλλά και στην στην διαμεμβρανική μεταφορά διαμέσου της περιβακτηριδιακής μεμβράνης των φυματίων (Bolanos et al., 1994; Cakmak and Romheld, 1997; Bonilla et al., 1997; Bolanos et al., 2001) λόγω έλλειψης βορίου, έχουν ανάγει το στοιχείο αυτό σε απαραίτητο παράγοντα για την εγκαθίδρυση και λειτουργία της συμβιωτικής σχέσης των ψυχανθών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Συστατικά μόρια με δομή *cis*-διολης της περιβακτηριδιακής μεμβράνης του βακτηρίου, είναι διαθέσιμα για σχηματισμό συμπλόκων με το βόριο. Τα

Εισαγωγή

τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί ότι η σταθερότητα και η λειτουργία ορισμένων γλυκοπρωτεϊνών εμπλεκόμενων στη συμβιωτική ωρίμανση, εξαρτώνται από την παρουσία του βορίου (Bonilla et al., 2009). Επί παραδείγματι, σε τροφопενία βορίου, γλυκοπρωτεΐνες της σειράς της λεκτίνης PsNLEC1 της περιβακτηριδιακής μεμβράνης, δεν γλυκοζυλιώνονται φυσιολογικά, γεγονός που υποδηλώνει πως το βόριο εμπλέκεται είτε στη γλυκοζυλίωση είτε στη σταθεροποίηση των γλυκοζιδικών τμημάτων της PsNLEC1 (Bolanos et al., 2001). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι στις συνθήκες αυτές τα κυτταρικά τοιχώματα των φυματίων παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών τύπου υδροξυπρολίνης, όπως η ENOD2, γεγονός που προκαλεί υψηλό ρυθμό διάχυσης του οξυγόνου στα φυμάτια και τελικώς αδρανοποίηση της νιτρογενάσης (Bonilla et al., 1997). Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι το βόριο ασκεί δράση στις μεμβράνες όχι μόνο μέσω της σταθεροποίησης των μορίων με διαμόρφωση *cis*-διόλης (Bolanos et al., 2004), αλλά και μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων εμπλεκόμενων στη μεμβρανική δομή και λειτουργία (Camacho-Cristobal et al., 2008).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει επίσης έναν πιθανό ρόλο του βορίου στη δομή του κυτταρικού σκελετού και στις σχετιζόμενες με αυτόν διαδικασίες (Yu et al., 2001, 2003; Bassil et al., 2004). Συγκεκριμένα η απουσία του βορίου έδειξε ότι αυξάνει τα επίπεδα της ακτίνης και της σωληνίνης στις ρίζες του *Arabidopsis thaliana* (Yu et al., 2001), και μεταβάλλει τα πρότυπα του πολυμερισμού του κυτταρικού σκελετού στο ακραίο ριζικό μερίστωμα των κυττάρων σε φυτά αραβόσιπου (Yu et al., 2003). Η συσσώρευση των πρωτεϊνών του κυτταρικού σκελετού πιθανολογείται ως μια αντίδραση εγκλιματισμού, συμβάλλοντας στη μηχανική ενίσχυση των κυττάρων των περιφερειακών ριζών στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω (Yu et al., 2003). Τεχνητή διάσπαση των συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και κυτταρικών υποκαταστατών είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της πρόσφυσης της πλασματικής μεμβράνης, την κατάρρευση του πυρήνα προς το κυτταρικό τοίχωμα και την διατάραξη της δομής των κυτταροπλασματικών δοκίδων (Bassil et al., 2004).

II.2. Συμμετοχή στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος

Αναφέρθηκε παραπάνω η ιδιότητα του βορίου να δεσμεύεται από τις πηκτίνες του κυτταρικού τοιχώματος και να σχηματίζει σύμπλοκα διμερή μόρια *in vivo*. Το φαινόμενο αυτό συνδέεται άμεσα τόσο με την συγκέντρωση του βορίου, η οποία φαίνεται να εξαρτάται από το περιεχόμενο σε πηκτίνη, όσο και με την σταθερότητα που δύναται να προσφέρει το βόριο στα τοιχώματα.

Η εμπλοκή του βορίου είναι φανερή από την αλλοίωση της λεπτής δομής και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του κυτταρικού τοιχώματος και του μεσοτοιχίου υπό

συνθήκες έλλειψης (Hu and Brown, 1994; Loomis and Durst, 1992). Τα κυτταρικά τοιχώματα έχουν την τάση να διογκώνονται και να αποκτούν αδρή υφή (Matoh et al., 1992) ενώ αλλοιώνονται τα μηχανικά χαρακτηριστικά τους όπως η διάμετρος των πόρων, η ελαστικότητα και η υδραυλική αγωγιμότητα των κυττάρων (Fleischer et al., 1999; Ryden et al., 2003). Υπό τις συνθήκες αυτές, σημειώνεται επίσης αλλαγή στην έκφραση γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν τις ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος, μόλις 6 ή 24 ώρες από την απομάκρυνση του βορίου από το μέσο καλλιέργειας (Camacho-Cristobal et al., 2008) γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος με συνέπεια την επιμήκυνση του κυττάρου (Cosgrove, 1999).

II.2.1. Χημική σύσταση και αρχιτεκτονική του κυτταρικού τοιχώματος

Γενικά το κυτταρικό τοίχωμα συγκροτείται από δυο διαφορετικά δομικά στοιχεία, τα σκελετικά στοιχεία και την θεμελιώδη μάζα, που αποτελείται από γεμιστικά υλικά (πηκτίνες και ημικυτταρίνες) και χαρακτηρίζεται ως μια άμορφη-ισότροπη, διογκούμενη πηκτή. Τα σκελετικά στοιχεία δομούνται από κυτταρίνη οργανωμένη υπό μορφή μικροϊνιδίων. Οι τρεις αυτές κατηγορίες πολυμερών ενώσεων, μαζί με τη λιγνίνη και ορισμένες πρωτεΐνες, αποτελούν τα βασικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται και η εναπόθεση άλλων λιπόφιλων ουσιών όπως της κουτίνης(υμενίνη), η σουβερίνης(φελλίνη) και των κηρών. Ωστόσο, η εναπόθεση των παραπάνω συστατικών δεν γίνεται ομοιογενώς, τόσο σε επίπεδο δομής όσο και χρονικά κατά την βιογένεση του κυτταρικού τοιχώματος. Αντίθετα, η σχετική συμβολή των παραπάνω συστατικών καθώς και η αρχιτεκτονική του τοιχώματος αλλάζουν μεταξύ τριών διακριτών φάσεων βιογένεσης στις οποίες σχηματίζονται αντίστοιχα τρία διαφορετικά στρώματα στα ώριμα κυτταρικά τοιχώματα.

Οι τρεις τύποι στρωμάτων του τοιχώματος είναι το μεσοτοίχιο, το πρωτογενές και το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Το **μεσοτοίχιο** (μέση πλάκα) είναι η στοιβάδα εκείνη η οποία εξασφαλίζει τη συγκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και η οποία εντοπίζεται μεταξύ των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων γειτονικών κυττάρων. Το κυτταρικό τοίχωμα που σχηματίζεται μετά την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης στην περιοχή του φραγμοπλάστη ονομάζεται **πρωτογενές** και η εξέλιξη του συνδέεται με τη διαφοροποίηση του κυττάρου το οποίο περιβάλλει. Ο σχηματισμός του πρωτογενούς τοιχώματος επιτυγχάνεται με την εναπόθεση υλικών τα οποία προέρχονται από το όργανο Golgi υπό μορφή κυστιδίων(Lerouxel et al., 2006). Τα κυστιδία αποθέτουν το περιεχόμενο τους αρχικά στο επίπεδο της κυτταρικής πλάκας σχηματίζοντας το μεσοτοίχιο, αποτελούμενο από πηκτινικά συστατικά και ακολουθεί η βιοσύνθεση

Εισαγωγή

των μικροϊνιδίων κυτταρίνης και στις δυο πλευρές αυτού ώστε να δημιουργηθεί το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα.

Στη σύσταση του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος κυριαρχούν ιδιαίτερα οι πηκτίνες και οι ημικυτταρίνες ενώ ένα μικρότερο ποσοστό αποτελεί η κυτταρίνη. Αναλυτικότερα, η κυτταρίνη σε ένα τυπικό κύτταρο καταλαμβάνει ποσοστό μεταξύ 10-25% της ξηρής ουσίας του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος. Ωστόσο σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να κυμανθεί σε ποσοστά από 5% έως 45% του ξηρού βάρους του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος. Άλλες δομικές ομάδες ουσιών με υψηλή ποσοστιαία αναλογία στη συγκρότηση του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος, είναι οι ημικυτταρίνες που συμμετέχουν με ένα ποσοστό 25-50% και μαζί με τις πηκτίνες (10-35%) και τις πρωτεΐνες (10%), καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο όγκο του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Esau, 1977; Goodwin and Mercer, 1983; Salisbury and Ross, 1992). Ένα άλλο πολυμερές του τοιχώματος είναι η καλλόζη, μια αδιακλάδωτη β-1,3 γλυκάνη με ελικοειδή δευτεροταγή δομή η οποία αποτίθεται συχνά σε συμπαγείς μάζες, ελεύθερη από άλλες τοιχωματικές ουσίες. Το μόριο της καλλόζης ανιχνεύεται σε ειδικές περιπτώσεις. Η πιο γνωστή περίπτωση είναι η παρουσία της στον ηθμοσωλήνα του φλοιώματος ως εσωτερική στρώση. Ο σχηματισμός της καλλόζης είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης τραυμάτων στον φυτικό οργανισμό. Η καλλόζη βρίσκεται και σε πληθώρα άλλων εξειδικευμένων ιστών συμπεριλαμβανομένου του γυρεοσωλήνα, των τραχειϊδων των γυμνόσπερμων και των δευτερογενών τοιχωμάτων των ινών του βαμβακιού (Brett and Waldron, 1996).

Γενικότερα, διακρίνονται δυο τύποι τοιχωμάτων βασιζόμενοι στις σχετικές αναλογίες και ποσότητες των πηκτινών και τη δομή και την περιεκτικότητα των ημικυτταρινούχων πολυσακχαριτών. Ο τύπος I (Carpita and Gibeau, 1993) απαντάται στα δικότυλα και περιέχει ξυλογλυκάνη και/ή γλυκομαννάνη και 20-35% πηκτίνη. Ο τύπος αυτός του κυτταρικού τοιχώματος εντοπίζεται επίσης και στα μη αγρωστώδη μονοκότυλα και τα γυμνόσπερμα. Ο τύπος II απαντάται στα Poaceae και χαρακτηρίζεται εκτός των άλλων από υψηλή περιεκτικότητα σε αραβινοξυλάνη και περιεκτικότητα σε πηκτίνες μικρότερη από 10% (Carpita, 1996).

Οι πρωτεΐνες του τοιχώματος είναι τόσο δομικές όσο και λειτουργικές και ταξινομούνται σε κατηγορίες σύμφωνα με το επικρατέστερο αμινοξύ που περιέχουν. Γενικά οι γλυκοπρωτεΐνες είναι σύμπλοκα μόρια πρωτεϊνών και ολιγοσακχαρικών αλυσίδων οι οποίες ενδέχεται να εμπλέκονται σε δεσμούς μεταξύ μεμβρανών και κυτταρικού τοιχώματος (Pont-Lezica et al., 1993; Canut et al., 1998). Οι κυριότερες από αυτές περιέχουν το σπάνιο αμινοξύ υδροξυπρολίνη και έτσι η ομάδα υιοθετεί το χαρακτηρισμό HRGPs (γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε

υδροξυπρολίνη), με περισσότερο γνωστή την εξτενσίνη η οποία έχει σταθεροποιητικό και προστατευτικό ρόλο στο τοίχωμα. Μια άλλη κατηγορία είναι οι πρωτεΐνες που φέρουν αραβινογαλακτάνες (AGPs), με πιθανό ρόλο στην αύξηση των ριζών και στον έλεγχο της έκτασης και της αμοιβαίας συγκόλλησης των επιδερμικών κυττάρων. Υπάρχουν ακόμη οι πρωτεΐνες της γλυκίνης (GPRs), οι οποίες εκφράζονται ως απάντηση της περιβαλλοντικής καταπόνησης και οι πρωτεΐνες της προλίνης (PRGPs) που εμπλέκονται στη δέσμευση του αζώτου από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια στην παραγωγή των φυματίων (Showalter, 1993).

Τέλος οι λεκτίνες στα μέλη της οικογένειας Solanaceae εμπλέκονται στη μεταφορά σακχάρων και στην κυτταρική διαίρεση (Brett and Waldron, 1996; Showalter, 1993).

Εκτός από τις δομικές πρωτεΐνες, το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει και ενζυμικές πρωτεΐνες όπως φωσφατάσες, υπεροξειδάσες, γλυκοσυλτρανσφεράσες, γλυκοσυλυδρολάσες και ενδογλυκανάσες. Ορισμένες από αυτές έχουν ρόλο στη χημική διαφοροποίηση του κυτταρικού τοιχώματος κατά την οντογένεση ή αποδόμησή του.

Συμπερασματικά, η δομή του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος βασίζεται σε μικροϊνίδια τα οποία παρουσιάζουν κρυσταλλικές και παρακρυσταλλικές περιοχές και ενώνονται μεταξύ τους με τη μεσολάβηση διαφόρων ημικυτταρινών και πρωτεϊνών, οι οποίες προσδίδουν τα συνολικά χαρακτηριστικά της δομής του.

Επίσης, στο πρωτογενές τοίχωμα απαντώνται δομικές γλυκοπρωτεΐνες, φαινολικό εστέρες και ομάδες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό ιοντικών και ομοιοπολικών δεσμών με ανόργανα στοιχεία όπως ασβέστιο και βόριο ενώ η παρουσία της λιγνίνης σε αυτό είναι ελάχιστη.

Σε ορισμένα κύτταρα, η διαδικασία της προσθήκης υλικών συνεχίζεται και μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος και της αύξησης του κυττάρου, διαμορφώνοντας με τον τρόπο αυτό ένα παχύτερο τοίχωμα το οποίο διαφέρει από το πρωτογενές ως προς τη δομή, τη χημική σύσταση και τις μηχανικές ιδιότητες. Το στρώμα αποτελεί το **δευτερογενές κυτταρικό** τοίχωμα. Εντούτοις δεν διαθέτουν όλοι οι τύποι κυττάρων δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα. Το παρέγχυμα και το κολλέγχυμα μπορεί να διαθέτουν μόνο πρωτογενές τοίχωμα (Popper, 2008). Το δευτερογενές τοίχωμα διαφέρει από το πρωτογενές τόσο στην χημική σύσταση όσο και στη διάταξη των μικροϊνιδίων της κυτταρίνης η οποία εμφανίζεται περισσότερο κανονικοποιημένη. Το δευτερογενές τοίχωμα εμφανίζει στρωμάτωση στην κατασκευή του. Αποτελείται από παράλληλα μικροϊνίδια, τα οποία διευθετώνται είτε παράλληλα, είτε υπό γωνία σε σχέση με τον άξονα του κυττάρου. Στις τραχειΐδες και στις ξυλώδεις ίνες, μπορούν να διακριθούν τρεις στρώσεις του: η εξωτερική (S1), η κεντρική (S2) η

Εισαγωγή

οποία είναι και η παχύτερη και η εσωτερική (S3). Σε καθεμία από αυτές, τα μικροϊνίδια έχουν πολύ πυκνή διάταξη και την ίδια διεύθυνση, αλλά διαφορετική μεταξύ διαδοχικών στρώσεων (Goodwin and Mercer, 1983). Η ενυδατωμένη φύση των μικροϊνιδίων προσδίδει ελαστικότητα στο τοίχωμα και το καθιστά διαπερατό στο νερό και σε διαλυμένες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των εν διαλύσει αερίων. Η πίεση του κυτταρικού περιεχομένου στα τοιχώματα προκαλεί ελαστική παραμόρφωση και συμβάλλει στη διόγκωση των φυτικών ιστών. Η διόγκωση αυτή είναι σημαντικός παράγοντας στην παροχή μηχανικής υποστήριξης στους μη ξυλώδεις ιστούς των φυτών. Το δευτερογενές τοίχωμα, ανάλογα με τους ιστούς και την κατηγορία του φυτού, υφίσταται αλλαγές που οφείλονται στην απόθεση σε αυτό διαφορετικών ουσιών.

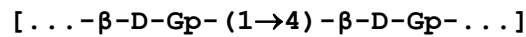
Η κυτταρίνη καλύπτει ένα μεγάλο ποσοστό της σύστασης του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος και κυμαίνεται μεταξύ 40% και 80% του συνολικού του όγκου, οι ημικυτταρίνες μεταξύ 10 και 40% και η λιγνίνη μεταξύ 5 και 25% (Salisbury and Ross, 1992; Bidlack, 1990). Λόγω της παράλληλης διευθέτησης των πολυμερών της κυτταρίνης στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα, ο βαθμός της κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης είναι πολύ μεγαλύτερος από ότι στο πρωτογενές.

Η εναπόθεση λιγνίνης, πολυμερούς φαινολικών αλκοολών και συγκεκριμένα της κωνιφερυλικής αλκοόλης και της σιναπικής αλκοόλης στα αγγειόσπερμα, και της κωνιφερυλικής και κουμαρυλικής αλκοόλης στα γυμνόσπερμα, ισχυροποιεί τα κυτταρικά τοιχώματα. Η λιγνίνη αποτελεί το αφθονότερο προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού και βρίσκεται κυρίως στο σκληρέγχυμα στις τραχεΐδες και στα αγγεία του ξυλώματος (Boudet, 1998). Έχει πειραματικά αποδειχθεί ότι οι εστερικοί δεσμοί που συνδέουν την αραβινόζη με τη λιγνίνη αποτελούν τον αφθονότερο λιγνινο-ημικυτταρινικό σύνδεσμο στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα (Chesson et al., 1983). Επιπλέον της λιγνίνης, και άλλα φαινολικά συστατικά απαντώνται στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα όπως τα υδροξυκινναμικά οξέα και ειδικότερα το φερουλικό οξύ και το p-κουμαρικό οξύ σε αναλογίες περίπου 3-4% (Saulnier et al., 1999). Τα οξέα αυτά είναι δεσμευμένα μέσω εστερικών ή αιθερικών δεσμών σε μονάδες αραβινόζης των γλυκουρονοαραβινοξυλανών (Ishii, 1997; Lam et al., 2001; Ralph et al., 2004). Μπορούν επίσης να είναι ενωμένα με ημικυτταρινικά πολυμερή (π.χ. στα Poaceae) ή με πηκτινικά συστατικά (π.χ. στα δικότυλα, βλ. Kroon and Williamson, 1999; Wallace and Fry, 1994). Στο δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα μπορούν να εναποτεθούν ουσίες όπως η κουτίνη και η σουβερίνη, οι οποίες χάρη στη λιπόφιλη φύση τους, σχηματίζουν, μαζί με τους κηρούς, την υδρόφοβη εφυμενίδα στους επιδερμικούς ιστούς.

II.2.1.1. Μακρομοριακή σύσταση

Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη εναποτίθεται σε οργανωμένες μορφές μικροϊνιδίων, και αποτελεί ομοπολυσακχαρίτη, παράγωγο της β-D-γλυκόζης, με γενικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$. Η δομή της είναι γραμμική και τα μόρια της γλυκόζης που την απαρτίζουν συνδέονται με β(1-4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς ακριβώς όπως και στην κελλοβιόζη:



Οι παράλληλες αλυσίδες έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν πολυάριθμους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους (Rowell et al., 2005). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η κρυσταλλοποίηση των πολλαπλών αλυσίδων κυτταρίνης σε αδιάλυτα μικροϊνίδια τα οποία συμβάλλουν στις φυσικές ιδιότητες του μορίου και στον ρόλο τον οποίο αναλαμβάνει στη δομική και μηχανική ενδυνάμωση του κυτταρικού τοιχώματος (Taylor, 2008). Ο βαθμός πολυμερισμού της φυσικής κυτταρίνης στα κυτταρικά τοιχώματα, εκτιμάται ότι είναι 12.000-15.000 (Goring and Timell, 1962). Ένα μόριο κυτταρίνης συνίσταται από μια γραμμική αλυσίδα από τουλάχιστον 500 μόρια γλυκόζης. Η στερεοχημεία του γλυκοσιδικού δεσμού της κυτταρίνης έχει ως αποτέλεσμα τη στροφή κάθε μονομερούς κατά 180° ως προς το αμέσως προηγούμενό του. Τα μονομερή της γλυκόζης βρίσκονται στην πλέον κατάλληλη ενεργειακά μορφή στην οποία όλες οι υδροξυλικές ομάδες που ανήκουν στον δακτύλιο της πυρανόζης και η ομάδα C6 τοποθετούνται στο επίπεδο του δακτυλίου. Λόγω της διαμόρφωσης αυτής προκύπτει ένα τεταμένο γραμμικό μόριο, η δομή του οποίου σταθεροποιείται με πολυάριθμους διαμοριακούς, κυρίως υδρογονικούς δεσμούς. Διαμοριακοί υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των γειτονικών μορίων κυτταρίνης συγκρατούν σταθερά τα γειτονικά μόρια, έτσι ώστε να σχηματίζονται παράλληλες δομές από 60 ως 70 αλυσίδες κυτταρίνης με την ίδια πολικότητα. Αυτά τα υψηλής τάξης κρυσταλλικά συσσωματώματα έχουν μήκος πολλών μικρομέτρων και ονομάζονται μικροϊνίδια κυτταρίνης. Το μέγεθος των μορίων της φυσικής κυτταρίνης ποικίλλει. Το μοριακό βάρος της κυτταρίνης διαφέρει ανάμεσα στα δυο κυτταρικά τοιχώματα με το δευτερογενές να παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού σε σχέση με το πρωτογενές (Brett, 2000 ;Brown, 2004).

Ημικυτταρίνες

Διακρίνονται σε β-κυτταρίνες (με βαθμό πολυμερισμού 15-90) και σε γ-κυτταρίνες (με βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 15). Οι ημικυτταρίνες είναι γραμμικές ή διακλαδισμένες πολυμερείς ενώσεις δύο ή περισσότερων απλών σακχάρων. Πρόκειται για τις εξόζες γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ουρονικό οξύ

Εισαγωγή

και τις πεντόζες ξυλόζη και αραβινόζη. Οι ημικυτταρίνες αντιπροσωπεύουν συστατικά της θεμελιώδους μάζας και συνδέονται σταθερά είτε μεταξύ τους είτε με τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης (Albersheim, 1975), έτσι ώστε να περιβάλλουν τα σκελετικά υλικά και να διαπλέκονται με δεσμούς υδρογόνου σχηματίζοντας ένα πολύπλοκο πλέγμα. Κοινό χαρακτηριστικό των ημικυτταρινών, αποτελεί ένα επίμηκες γραμμικό ομοπολυμερές με β-1-4 δεσμούς από το οποίο ξεκινούν κοντές πλευρικές αλυσίδες άλλων σακχάρων (Fry, 1989). Το σάκχαρο της κύριας αλυσίδας των μορίων των ημικυτταρινών σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου κατά μήκος της εξωτερικής πλευράς των μικροϊνιδίων κυτταρίνης. Τα σάκχαρα της κύριας αλυσίδας και αυτά των πλευρικών αλυσίδων διαφέρουν, ανάλογα με το φυτικό είδος και το στάδιο ανάπτυξης.

Η κυρίαρχη μορφή ημικυτταρίνης στα περισσότερα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα είναι η ξυλογλυκάνη. Άλλες ημικυτταρίνες οι οποίες βρίσκονται στα πρωτογενή αλλά και στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα είναι η γλυκορουνοξυλάνη, η αραβινοξυλάνη, οι γλυκομαννάνες και οι γαλακτομαννάνες.

Η ξυλογλυκάνη (απαντώμενη κυρίως στα δικότυλα και σπανιότερα στα μονοκότυλα) προσκολλάται ισχυρά στη κυτταρίνη και έτσι αυξάνει τη δομική συνοχή του δικτύου (Hayashi, 1989). Στα μονοκότυλα, η κύρια ημικυτταρίνη αντιπροσωπεύεται από την ομάδα των ξυλανών, συχνά εμφανιζόμενες ως ενώσεις του φερουλικού οξέος, οι οποίες προσδίδουν στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα ευκαμψία και αντοχή στην ενζυμική αποδόμηση (Brett and Waldron, 1996).

Πηκτινικοί πολυσακχαρίτες

Η τρίτη κύρια κατηγορία πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος οι πηκτίνες, συνίσταται από ετερογενείς διακλαδιζόμενους πολυσακχαρίτες (Reid, 1997) οι οποίοι φέρουν πολυάριθμα αρνητικά φορτισμένα υπολείμματα γαλακτουρονικού οξέος. Λόγω του αρνητικού τους φορτίου είναι ισχυρά ενυδατωμένα και προσροφούν μεγάλο ποσοστό κατιόντων μέσω ηλεκτροπροσρόφησης. Ειδικότερα, η συσχέτιση των μορίων πηκτίνης με ιόντα Ca^{+2} θεωρείται ουσιώδης για την συνοχή των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Οι πηκτίνες περιέχουν ως κύριες δομικές μονάδες το γαλακτουρονικό οξύ και τη ραμνόζη. Οι δομικές μονάδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν ομοπολυμερείς και ετεροπολυμερείς πηκτίνες. Οι ομοπολυμερείς πηκτίνες με δομική μονάδα το γαλακτουρονικό οξύ (GalA) ονομάζονται ομογαλακτουρονάνες (HG). Οι ετεροπολυμερείς πηκτίνες με δομικές μονάδες το γαλακτουρονικό οξύ και την ραμνόζη (Rha) ονομάζονται ραμνογαλακτουρονάνες (RG) και μπορεί να συμπεριλαμβάνουν σε μικρότερη αναλογία γαλακτόζη και αραβινόζη (Reid, 1997). Συνήθως στο κυτταρικό τοίχωμα οι πηκτίνες απαντώνται ως μίγματα με αραβινάνες και γαλακτάνες και περιέχουν

ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Οι πηκτίνες συμμετέχουν στη διαμόρφωση της πορώδους υφής του κυτταρικού τοιχώματος.

Ομογαλακτουρονάνη (HG)

Η συμμετοχή της HG ανέρχεται περίπου στο 60% των πηκτινών του τοιχώματος (Ridley et al., 2001). Η ραμνογαλακτουρονάνη-I (RG-I) αποτελεί κύριο συστατικό του μεσοτοιχίου αλλά και του πρωτογενούς τοιχώματος των δικότυλων φυτών (Bush et al., 2001). Από την άλλη μεριά, η ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II) αποτελεί ίσως τον πολυπλοκότερο πολυσακχαρίτη του φυτικού βασιλείου. Είναι παρούσα στα περισσότερα ανώτερα φυτά, αν όχι σε όλα (O'Neill et al., 2004). Σημαντική είναι η ιδιότητα της να συνδέεται με μόρια βορικού οξέος. Συγκεκριμένα, δύο μονάδες ραμνογαλακτουρονάνης II (RG-II) σχηματίζουν διμερές σύμπλοκο με ένα μόριο βορικού οξέος στα κυτταρικά τοιχώματα το οποίο προσδίδει στο πηκτινικό δίκτυο και κατ' επέκταση στο κυτταρικό τοίχωμα σταθερότητα και ευκαμψία.

Είναι ένα πολυμερές με σκελετό α(1-4)-D-γαλακτουρονικού οξέος και αποτελεί το 60% περίπου των πηκτινών του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Ridley et al., 2001). Η HG είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ραμνογαλακτουρονάνη I αλλά και την ραμνογαλακτουρονάνη II, πιθανώς και με άλλα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος. Απαντάται πολύ συχνά στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα αλλά και στο μεσοτοιχίο του είδους *Solanum tuberosum* (Bush et al., 2001). Στα τοιχώματα των φύλλων του *Arabidopsis thaliana* φτάνει έως και στο 23% (Zabackis et al., 1995) ενώ στο *Acer pseudoplatanus* (σφεντάμι) στο 10% των κυτταρικών τοιχωμάτων (Talmadge et al., 1973). Μονομερή του γαλακτουρονικού οξέος μπορούν να υποστούν μεθυλοεστεροποίηση στον C6 του καρβοξυλίου ή ακετυλίωση στο O2 ή O3 (Ridley et al., 2001). Η μορφή και ο βαθμός της μεθυλοεστεροποίησης και της ακετυλίωσης ποικίλει (Caffall and Mohnen, 2009), εξαρτάται από το φυτικό είδος και το στάδιο ανάπτυξης (Willats et al., 2001) και καθορίζουν τα μηχανικά χαρακτηριστικά του τοιχώματος. Οι ελεύθερες ομάδες καρβοξυλίου της ομογαλακτουρονάνης είναι αρνητικά φορτισμένες και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ιόντα Ca^{+2} σχηματίζοντας σταθερής μορφής πηκτή με τα άλλα πηκτινικά μόρια (Liners et al., 1989).

Ραμνογαλακτουρονάνη I (RG-I)

Αποτελεί μείζον συστατικό του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος των δικότυλων. Η δομή της RG-I συνίσταται σε έναν σκελετό α-γαλακτουρονικού οξέος και α-ραμνόζης με αναλογία 1:1. Το πολυμερές αυτό βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα προσδεδεμένο με την HG.

Εισαγωγή

[...-α-D-GalA-(1→2)-α-L-Rha-(1→4)-α-D-GalA-(1→2)-α-L-Rha-...]

Ο σκελετός της RG-I μπορεί να έχει υποκαταστάτες στον C4, ουδέτερους και όξινους ολιγοσακχαρίτες, γραμμικούς ή διακλαδιζόμενους, αποτελούμενους από αραβινόζη και γαλακτόζη. Μερικές από αυτές τις πλευρικές αλυσίδες μπορεί να καταλήγουν σε φουκόζη, σε γλυκόζη ή σε 4-O-μέθυλο-β-D-γλουκουρονικό οξύ. Οι πλευρικές αλυσίδες της RG-I στα Chenopodiaceae συχνά εστεροποιούνται με φερουλικό και κουμαρικό οξύ (Brett and Waldron, 1996).

Ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II)

Πρόκειται για ένα δομικό ηηκτινικό πολυμερές το οποίο ανιχνεύεται σε μικρές ποσότητες στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγειόσπερμων και των γυμνόσπερμων. Θεωρείται ο πολυπλοκότερος πολυσακχαρίτης των φυτών και κατέχει σημαντικότατο ρόλο στη δομή και την ανάπτυξη των ανώτερων φυτών. Έχει αποδειχθεί ότι η RG-II εναποτίθεται στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα ως διμερές μέσω διεστερικών διαδεσμών με το βορικό οξύ (O'Neill et al., 1996; Kobayashi et al., 1997). Ο σχηματισμός των διμερών προκύπτει από τη συνένωση δύο αλυσίδων RG-II οι οποίες με τη σειρά τους είναι συνενωμένες με άλλες ηηκτινικές αλυσίδες σχηματίζοντας τελικά ένα τρισδιάστατο πλέγμα. Το πλέγμα αυτό συμβάλλει στις μηχανικές ιδιότητες του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος και είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη του φυτού (O'Neill et al., 2001). Η RG-II απελευθερώνεται όταν επιδράσουν στα κυτταρικά τοιχώματα ηηκτινολυτικά ένζυμα και κυρίως ενδοπολυγαλακτουρονάση. Εμφανίζει βαθμό πολυμερισμού γύρω στο 60 και περιέχει γαλακτουρονικό οξύ, ραμνόζη, αραβινόζη και γαλακτόζη σε αναλογία 10:7:5:5, μαζί με άλλα σάκχαρα σε μικρότερες ποσότητες όπως ακερικό οξύ, απιόζη και 3-δυοξυ-μαννο-οκτουλοσονικό οξύ. Ο σκελετός της αποτελείται από τουλάχιστον 7 μόρια α-D-γαλακτουρονικού οξέος, και τέσσερις πλευρικές αλυσίδες, κάθε μια με διαφορετική δομή. Η αλυσίδα A φέρει 9 κατάλοιπα με σημαντικότερο αυτό της απιόζης με την οποία προσδένεται στο 5ο κατάλοιπο του βασικού σκελετού. Η αλυσίδα A και συγκεκριμένα το κατάλοιπο της απιόζης είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του διμερούς της RG-II μέσω γεφυρών βορικού οξέος. Η αλυσίδα B φέρει επίσης ένα κατάλοιπο απιόζης αλλά δεν είναι επί του παρόντος γνωστό εάν συμμετέχει στον σχηματισμό ανάλογων διμερών (Ridley et al., 2001). Ο σχηματισμός των διμερών εξαρτάται από την τιμή του pH (O'Neill., 1996). Η προσρόφηση του βορίου αυξάνεται με την αύξηση του pH του διαλύματος μεταξύ των τιμών 4,5-10,5 με μια κορυφή στο pH=10,0-10,5 ενώ περαιτέρω αύξηση του pH πέραν του 10,5 δεν έχει επίπτωση στην προσρόφηση. Η προσρόφηση αυτού του τύπου είναι χαρακτηριστική για σύμπλοκα του βορικού οξέος (Goldberg and Grieve, 2003). Σε φυσιολογικές τιμές του pH, ο σχηματισμός του διμερούς dRG-II-B εμπλουτίζεται από ορισμένα

δισθενή κατιόντα αλλά και ένζυμα τα οποία δρουν καταλυτικά στην *in vivo* αλληλομετατροπή μεταξύ της μονομερούς μορφής mRG-II και της διμερούς μορφής dRG-II-B.

Λιγνίνη

Η λιγνίνη είναι ένα μεγαλομοριακό αρωματικό πολυμερές, που προκύπτει από την μη-ενζυμική οξειδωση ή ενζυμική αφυδρογόνωση των υδροξυκινναμικών αλκοολών (μονολιγνολών και συγκεκριμένα την κονυφεριλική, σιναπική και κουμαρυλική αλκοόλη) μέσω ενζύμων όπως οι λακκάσες, οι υπεροξειδάσες και οι φαινολοξειδάσες. Αποτελεί το βασικότερο μη υδατανθρακικής φύσης συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος και συναντάται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 15-35% του ξηρού βάρους του. Η λιγνίνη είναι άμορφη, αδιάλυτη και εξαιρετικά ανθεκτική ουσία. Η χημική της σύσταση της ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη φυτών. Κατά τον σχηματισμό της εκτοπίζει βαθμιαία το νερό και αποτίθεται σταδιακά στους μεσοϊνιδιακούς χώρους. Ουσιαστικά, καλύπτοντας τα μικροϊνίδια της κυτταρινής και τα υπόλοιπα σκελετικά στοιχεία του τοιχώματος αυξάνει την δομική σταθερότητα και ακαμψία του ενώ μειώνει την αποσυνθετική δράση των χημικών μέσων και την εύκολη διείσδυση των παθογόνων. Επίσης σημαντική είναι και η αδιαβροχοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων με συνέπεια την μείωση των απωλειών νερού (Boudet, 1998).

Κουτίνη(υμενίνη)

Η κουτίνη αποτελεί το ένα από τα δύο κύρια πολυμερή, συστατικά της εφυμενίδας των φυτών. Η κουτίνη αποτελείται από ωμέγα υδροξυοξέα και λιπαρά οξέα, τα παράγωγα των οποίων συνδέονται μεταξύ τους μέσω εστερικών δεσμών (Walton, 1990;Kolattakudy, 1996). Υπάρχουν δύο κύριες δομικές μονάδες της κουτίνης, αυτές των C16 και αυτές των C18. Η ομάδα των C16 περιλαμβάνει το 16-υδροξυ-παλμιτικό οξύ και το 9, 16 ή 10, 16-διυδροξυ-παλμιτικό οξύ. Η ομάδα των C18 περιλαμβάνει το 18-υδροξυολεϊκό οξύ, το 9, 10-εποξυ-18-υδροξυστεαρικό οξύ και το 9, 10, 18-τριυδροξυστεαρικό οξύ (Heredia and Dominguez, 2009).

Σουβερίνη(φελλίνη)

Πρόκειται για ένα υδρόφοβο μίγμα πολυμερών ενώσεων αποτελούμενο από οργανικά οξέα με φαινολικό δακτύλιο. Η χημική της σύσταση είναι παρόμοια με αυτή της κουτίνης και εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε δικαρβοξυλικά, λιπαρά οξέα και φαινολικές ενώσεις. Σε αδρές γραμμές συγκροτείται από δύο συστατικά, το πολυαλειφατικό και το πολυαρωματικό. Η ακριβής σύσταση της διαφέρει ανάμεσα στα φυτικά είδη. Ορισμένα μονομερή είναι διαδεδομένα όπως αλειφατικά οξέα, α-υδροξυοξέα και α,ω-διοξέα, ενώ τα πολυαρωματικά μονομερή είναι

Εισαγωγή

υδροξυκιναμικά οξέα και παράγωγα τους (Gandini et al., 2006). Κύρια λειτουργία της φελλίνης είναι η αποτροπή της κίνησης του νερού διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων στα οποία εναποτίθεται.

II.2.1.2. Σύσταση σε φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά των φυτών ανήκουν στην ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών. Η βασική κατηγορία φαινολικών συστατικών, τα φαινυλοπροπανοειδή με σκελετό C₆-C₃, παράγονται μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης και αφυδάτωσης από το πρόδρομο μόριο το αμινοξύ φαινυλαλανίνη το οποίο απαμινώνεται και προκύπτει το κινναμικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), ένα ένζυμο που έχει μελετηθεί εντατικά. Μέσω του σχηματισμού του κινναμικού οξέος παράγονται στη συνέχεια απλά αλλά και σύνθετα φαινολικά συστατικά όπως τα φαινυλοπροπανοειδή C₆-C₃ κύριοι εκπρόσωποι των οποίων είναι το φερουλικό, το p-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ αλλά και παράγωγα αυτών με σκελετό C₆, όπως το σαλικυλικό και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Dixon and Paiva, 1995). Από τον συνδυασμό του κινναμικού και του μαλονικού οξέος (το οποίο προέρχεται από το ομώνυμο βιοσυνθετικό μονοπάτι) προκύπτουν τα φλαβονοειδή με σκελετό C₆-C₃-C₆ (Shirley, 1996). Ορισμένα φαινολικά συστατικά των φυτών είναι διαλυτά μόνο σε οργανικούς διαλύτες, ορισμένα είναι υδατοδιαλυτά, ενώ υπάρχουν και πολυμερή τα οποία είναι αδιάλυτα. Τα φαινολικά συστατικά των φυτών αποτελούν μία ετερογενή ομάδα η οποία συμμετέχει σε ζωτικές λειτουργίες ανάπτυξης και άμυνας. Εκτός από τη μηχανική υποστήριξη που προσφέρουν, απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία και μειώνουν τους ρυθμούς ανάπτυξης των γειτονικών ανταγωνιστικών φυτών λειτουργώντας ως αλληλοπαθητικές ουσίες. Ορισμένα εξ αυτών παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων.

Τα φαινολικά συστατικά που εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες: α) στη λιγνίνη, πολυμερές των μονολιγνολών και β) στα μικρού μοριακού βάρους υδροξυκινναμικά οξέα τα οποία δεσμεύονται σε συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Wallace and Fry, 1994). Τα φαινολικά των κυτταρικών τοιχωμάτων πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικούς ρόλους στην εξασφάλιση της μηχανικής στήριξης, της ρύθμισης της ανάπτυξης και της μορφογένεσης και στην αντιμετώπιση αβιοτικών καταπονήσεων και προσβολών από παθογόνα (Lewis and Yamamoto, 1990 ;Wallace and Fry, 1994 ;Baucher et al., 1998).

Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται προσδεμένα στους πολυσακχαρίτες των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω εστερικών ή αιθερικών δεσμών (Sanchez et al., 1996). Για παράδειγμα στα μονοκότυλα φυτά, το φερουλικό οξύ συνδέεται με τις

αραβινοξυλάνες (Kato and Nevins, 1985; Hartley and Ford, 1989; Hartley et al., 1990b), ενώ στα δίκotyλα φυτά με πηκτινικές πλάγιες αλυσίδες αραβινάνης και γαλακτάνης (Fry, 1982). Το φερουλικό και το p-κουμαρικό οξύ αναφέρονται επίσης ως τα κύρια υδροξυκιναμικά συστατικά που εναποτίθενται στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα των γυμνόσπερμων (Strack et al., 1997).

Το φερουλικό οξύ μπορεί να υποστεί διμερισμό με τη βοήθεια των υπεροξειδασών, αντίδραση από την οποία προκύπτει το δεϋδροφερουλικό οξύ το οποίο διασυνδέεται με τους πολυσακχαρίτες της θεμελιώδους μάζας. Το 5,5-δεϋδροφερουλικό οξύ, το οποίο αναφέρεται ως διφερουλικό οξύ, ήταν το πρώτο οξύ της κατηγορίας που ανιχνεύθηκε προσδεδεμένο στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος (Kato and Nevins, 1985; Wallace and Fry, 1994). Άλλα δεϋδροφερουλικά οξέα με σύζευξη μέσω 8-5', 8-8', 8-O-4' και 4-O-5' δεσμών σχηματίζονται από την επίδραση των υπεροξειδασών στα κυτταρικά τοιχώματα των αγρωστωδών (Ralph et al. 1994). Επίσης στα μονοκότυλα και στα δίκotyλα φυτικά είδη σχηματίζονται κυκλοδιμερή μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων, με δομικά μόρια το p-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ (Hartley et al., 1990 ; Hanley et al., 1993; Turner et al., 1993). Οι αντιδράσεις αυτές έχουν χαρακτηριστεί ως μηχανισμός που ευθύνεται για τη διασύνδεση υδατανθρακικών αλυσίδων (Hartley et al., 1988, 1990a; Eraso and Hartley, 1990). Σε ορισμένα φυτά οι γέφυρες διφερουλικού αναγνωρίζονται ως σημαντικά δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα τοιχώματα των αγρωστωδών (όπως το σιτάρι, το καλαμπόκι αλλά και τροπικά είδη όπως τα μπαμπού) περιέχουν πάνω από 3% φερουλικό οξύ εστεροποιημένο στο υδροξύλιο του C5 του καταλοίπου της α-L-αραβινοφουρανόζης (Kato et al., 1983 ; Smith and Hartley, 1983; Kato and Nevins, 1986). Μερικά δίκotyλα όπως τα τεύτλα και το σπανάκι περιέχουν άνω του 1% φερουλικό οξύ, εστεροποιημένο είτε με α-L-αραβινόζη στον C2 ή με β-D-γαλακτόζη στον C6 σε ουδέτερες πλευρικές αλυσίδες των πηκτινών (Fry, 1982; Ishii and Tobita, 1993; Colquhoun et al., 1994).

II.2.2. Συσχέτιση του βόριου με το πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος

Η διαπίστωση ότι το βόριο αποτελεί ζωτικής σημασίας μικροστοιχείο για τα ανώτερα φυτά οφείλεται στον Warington (1923). Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι το βόριο σχετίζεται άμεσα με τις πηκτίνες του κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης, οι απαιτήσεις των φυτών σε B και η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων σε πηκτινικά πολυμερή αποτελούν άμεσα συσχετιζόμενες παραμέτρους (Hu et al., 1996). Είναι γνωστό πλέον ότι τα δίκotyλα και τα μη αγρωστώδη μονοκότυλα παρουσιάζουν υψηλότερες απαιτήσεις σε βόριο σε σχέση

Εισαγωγή

με τα αγρωστώδη (Loomis and Durst, 1992; Shelp et al., 1995; Welch, 1995). Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι απαιτήσεις των φυτών σε βόριο σχετίζονται με το πηκτινικό περιεχόμενο των κυτταρικών τοιχωμάτων, δεδομένου ότι τα αγρωστώδη περιέχουν τρεις φορές λιγότερη πηκτίνη συγκριτικά με τα δικότυλα και τα μη αγρωστώδη μονοκότυλα φυτικά είδη (Hu et al., 1996).

Αρχικά διατυπώθηκε η υπόθεση ότι το βόριο με τη μορφή του βορικού οξέος μπορεί να συμβάλλει στη σταθεροποίηση των μικροϊνιδίων των κυτταρικών τοιχωμάτων (Torssell, 1956) ή ότι το βόριο μπορεί να εμπλέκεται στη διατήρηση της σταθερότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής επιμήκυνσης μέσω του αναστρέψιμου σχηματισμού πηκτής των υδατανθρακικών γेमιστικών συστατικών που περιβάλλει τα μικροϊνίδια της κυτταρίνης (Teasdale and Richards, 1990). Τελικά βρέθηκε ότι το βορικό οξύ ενώνεται με την απιόζη της Α πλάγιας αλυσίδας του πηκτινικού πολυμερούς RG-II (Kobayashi et al., 1996; Ishii and Matsunaga, 1996; Kobayashi et al., 1997; βλ. ενότητα II.2.1.1.). Παράλληλα, αποδείχθηκε ότι ο παραπάνω ρόλος είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική ανάπτυξη (O'Neill et al., 1996; O'Neill et al., 2001; O'Neill et al., 2004). Οι μηχανικές ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μακρομοριακό πηκτινικό δίκτυο και η οργάνωση του τελευταίου από τον βαθμό διμερισμού της RG-II (Ishii et al., 1999). Πέραν τούτου ο σχηματισμός των εστερικών διαδεσμών απαιτείται για να αποτρέψει τη ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων όταν τα κύτταρα θα εισέλθουν στη στατική φάση της ανάπτυξης τους (Ishii and Matsunaga, 1996). Τα διμερή της RG-II επηρεάζουν επίσης το μέγεθος των πόρων του τοιχώματος αλλά και την ελαστικότητα του πηκτινικού δικτύου (Ishii and Matsunaga, 1996; Fleischer et al., 1999). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι περισσότερο από το 95% των μορίων της RG-II απαντώνται ως διμερή σύμπλοκα με το βορικό οξύ (O'Neill et al., 2004).

Σκοπός της εργασίας

Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, το βορικό οξύ θα μπορούσε θεωρητικά να αλληλεπιδράσει *in muro* με φαινολικά συστατικά με τρόπο ανάλογο με αυτόν του σχηματισμού συμπλόκων των διμερών της ραμνογαλακτουρονάνης-II μεταξύ των καταλοίπων απιόζης των πλάγιων αλυσίδων του πηκτινικού αυτού πολυμερούς μέσω βορικών διεστέρων. Η πιθανότητα να υπάρχουν σύμπλοκα μεταξύ φαινολικών συστατικών ή ανάλογης δομής μορίων χαμηλού μοριακού βάρους και – πιθανότατα – καταλοίπων απιόζης των αλυσίδων Α της ραμνογαλακτουρονάνης II ενισχύεται από:

(α) την ύπαρξη κατάλληλων καταλοίπων στις αλυσίδες των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος ώστε να προσφέρουν την μια από τις δύο πλευρές για τη δημιουργία του διαδεσμού. Με βάση την υπάρχουσα γνώση, είναι πιθανή η δημιουργία συμπλόκων του βορικού οξέος στα οποία η μια πλευρά συνδέεται με την RG-II ενώ η άλλη με υποκαταστάτη διαφορετικό της RG-II και στην προκειμένη περίπτωση κάποιο φαινολικό συστατικό.

(β) η ύπαρξη φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα τα οποία επίσης φέρουν ομάδες υδροξυλίου σε γειτονικά άτομα άνθρακα (δομή *ortho*-). Παρόλο που οι συνηθέστερες δομές που έχουν χαρακτηριστεί είναι το *p*-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ, μόρια τα οποία δεν φέρουν *ortho*-*di*-υδροξύ σύστημα, υπάρχουν αναφορές και για την παρουσία καφεϊκού και δεϋδρο-*di*-μερών καφεϊκού οξέος στο κυτταρικό τοίχωμα (Gibbons et al., 1999; Yang and Uchiyama, 2000). Τα παραπάνω μόρια διαθέτουν δομή *ortho*-*di*-φαινόλης και μπορούν θεωρητικά να σχηματίσουν σύμπλοκα με το βορικό οξύ *in muro*.

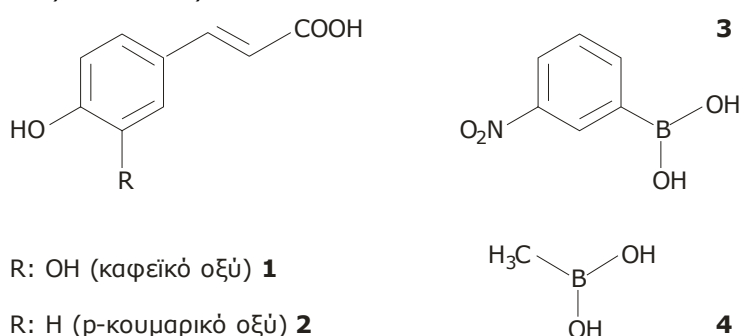
(γ) η δυνατότητα του βορικού οξέος να δημιουργεί σύμπλοκα με τα παραπάνω φαινολικά. Η συμπλοκοποίηση του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά που φέρουν *ortho*-*di*-υδροξύ σύστημα είναι θεωρητικά δυνατή (Dembitsky et al., 2002). Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει τον σχηματισμό σταθερών συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών όπως το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ καθώς και με τον φαινυλαιθανοειδή γλυκοζίτη ακτεοσίδη (Κλουβάτου, 2006). Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός των συμπλόκων αυτών συνοδεύεται από βαθυχρωμική μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης των παραπάνω φαινολικών.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης συμπλόκων μεταξύ μορίων χαμηλού μοριακού βάρους και πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος μέσω βορικού οξέος και ο χημικός χαρακτηρισμός των παραπάνω συμπλόκων μέσω χημικών και φασματοσκοπικών τεχνικών.

Υλικά και Μέθοδοι

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

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



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

II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα

II.1. Φυτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

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

II.2. Δειγματοληψίες

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

II.3. Απομόνωση και χειρισμοί των κυτταρικών τοιχωμάτων

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

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

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

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

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο υπερκείμενο της επώασης χρησιμοποιώντας σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) εξοπλισμένο με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού UV-970 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Ο διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη Zorbax Stablebond SB-C18 column (5 μm μέγεθος σφαιριδίων, διαστάσεις 250×4,6 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) σε θερμοκρασία δωματίου. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με βαλβίδα εισαγωγής 7725i (Reodyne, Rohnhert Park, California, USA) χωρητικότητας 20μl. Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου ενώ τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην κινητή φάση ήταν: Α: 1% H₃PO₄, Β: 50% μεθανόλη σε 1% H₃PO₄ και Γ: μεθανόλη. Η διαδοχή της σύστασης της κινητής φάσης ήταν ως εξής: αρχική σύσταση (Α:Β:Γ) 60:40:0, 0-12 min γραμμικό gradient προς 0:100:0, 12-17 min γραμμικό gradient προς 0:0:100, 17-20 min ισοκρατικό. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹ και η ανίχνευση έγινε στα 300 και 330 nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Borwin Chromatographic Software, ver. 1.21.60 (JMBS Development, Fontaine, France). Οι κορυφές έκλυσης αναγνωρίστηκαν με σύγκριση με πρότυπες ουσίες, με βάση το χρόνο συγκράτησης, τα φάσματα απορρόφησης και με συγχρωματογράφιση. Η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με παύση ροής χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή. Η συγκέντρωση των εκλυόμενων συστατικών μετρήθηκε μέσω του εμβαδού των κορυφών και εκφράστηκε ως ισοδύναμο

Υλικά και Μέθοδοι

καφεϊκού οξέος με χρήση καμπύλης αναφοράς η οποία κατασκευάστηκε στα 330 nm από πρότυπα διαλύματα καφεϊκού οξέος συγκεντρώσεων 0.28-22.50 mg l⁻¹ (6 σημεία, r²=0.999).

II.6. Μέτρηση συγκέντρωσης βορίου μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Για το χρωματογραφικό προσδιορισμό του βορικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Matoh et al. (1997) όπως τροποποιήθηκε από τους Stavrianakou et al. (2006a). Η συγκέντρωση του βορίου με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης προσδιορίστηκε στο υπερκείμενο της επώασης. Για την προετοιμασία των δειγμάτων όγκος έως 100 μl δείγματος αραιώθηκε έως 1000 μl με νερό και αντέδρασε με 50 μl αντιδραστηρίου CA (150 mg χρωμοτροπικού οξέος, 186 mg EDTA-2Na/5 ml H₂O) και 50 μl αντιδραστηρίου TBA (1,61 g βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο/5 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 1M, pH 4,8). Το μείγμα παρέμεινε για 10 min και ακολούθως διηθήθηκε με φίλτρο μεμβράνης 0, 2 μm Chromafil CA-20/25 (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, το βορικό οξύ αναλύεται χρωματογραφικά και ανιχνεύεται στα 350 nm ως σύμπλοκο με το χρωμοτροπικό οξύ. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε στήλη ανάστροφης φάσης APEX ODS 5 μm, 250 x 4,6 mm (Jones Chromatography Limited, Mid Glamorgan, UK) συνδεδεμένη σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης τύπου Jasco NLG980-02/PU980/UV970 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Όγκος 20 μl του μείγματος αντίδρασης διαχωρίστηκε με κινητή φάση η οποία προετοιμάστηκε ως ακολούθως: 3,5 g βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο και 33 ml 1M HCl σε 550 ml MeOH και ακολούθως αραιώση στα 1000 ml με H₂O. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹ και η ανίχνευση έγινε στα 350 nm. Η παραπάνω μέθοδος έδωσε κατώτατο όριο μέτρησης ως 0,02 ppm B. Για την επίτευξη του ορίου αυτού η διαδικασία απαλλάχτηκε των προσμειξεων με τη χρήση εξευγενισμένων σκευών και νερού Ultrapure (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, μέγιστη [B]<0, 2 ppb) για την προετοιμασία όλων των αντιδραστηρίων.

Λόγω της ανίχνευσης του συμπλόκου βορικού οξέος-χρωμοτροπικού οξέος στα 350 nm, η μέθοδος είναι κατάλληλη για τη μέτρηση ιχνοποσοτήτων βορικού οξέος, ενώ πλεονεκτεί και όσον αφορά στον ελάχιστο όγκο δείγματος, έως και 100 μl, ο οποίος απαιτείται για τη διεξαγωγή της.

II.7. Παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με αντλία PU-980 και ανιχνευτή υπεριώδους -ορατού UV-970. Το δείγμα εκχύθηκε τμηματικά ανά 450 μl σε

ημιπαρασκευαστική στήλη ανάστροφης φάσης Kromasil 100-C₁₈, 10 μm, 250 × 10 mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany) και διαχωρίστηκε ισοκρατικά σε μίγμα MeOH:1 % (w/w) AcOH 10:90 (v/v). Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου. Ο ρυθμός ροής ήταν 1,5 ml min⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου και η ανίχνευση έγινε στα 330 nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού Borwin Chromatographic Software, ver. 1. 21. 60 (JMBS Development, Fontaine, France).

II.8. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου

Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Bruker DRX 400 (399.95 MHz για ¹H-NMR). Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε CDCl₃ δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (7.24 ppm για ¹H-NMR).

Αποτελέσματα

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

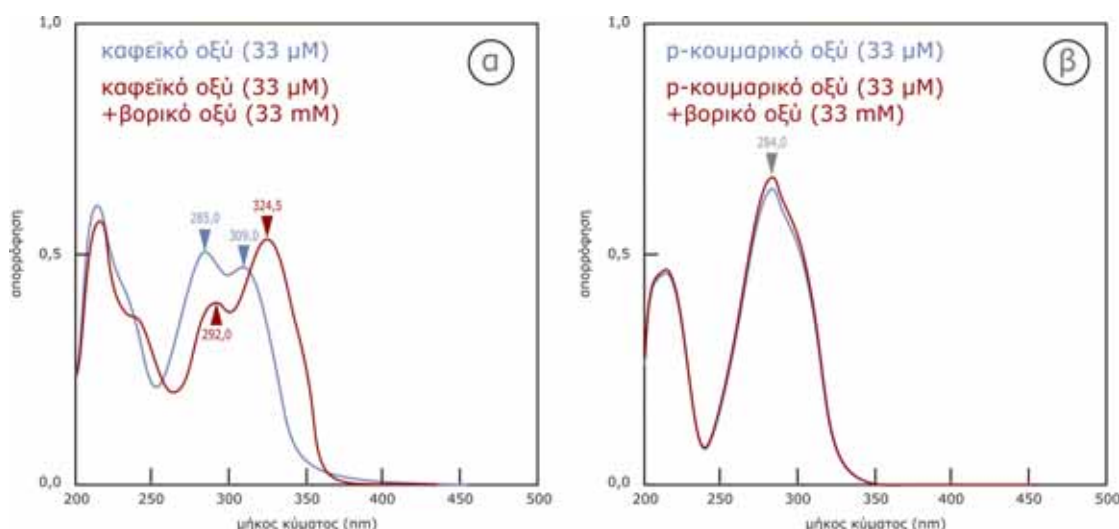
Στα πειράματα της κατηγορίας αυτής μελετήθηκε η ικανότητα των βορονικών οξέων να αποσπούν το καφεϊκό οξύ από διεστερικά του σύμπλοκα με το βορικό οξύ. Η χρήση του καφεϊκού οξέος ως προτύπου φαινολικού συστατικού στηρίχθηκε στο γεγονός ότι αφενώς απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα και αφετέρου ότι κατέχει δομή ορθο-δι-φαινόλης. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι στα πειράματα της παρούσας εργασίας δεν ανιχνεύτηκε καφεϊκό οξύ. Ως βορονικό οξύ χρησιμοποιήθηκε το 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ (3-NBA) το οποίο είναι δραστικό στην διάσπαση των συμπλόκων του βορικού οξέος ως ισχυρότερο οξύ από αυτό. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε το μεθυλοβορονικό οξύ (MBA) το οποίο ως οξύ ασθενέστερο του βορικού οξέος δεν είναι δραστικό και προσφέρεται ως μάρτυρας.

1.1. Επίδραση της προσθήκης βορικού ή βορονικών οξέων στο φάσμα απορρόφησης φαινολικών συστατικών

Στην εικόνα 4 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού και του ρ-κουμαρικού οξέος (το οποίο δεν διαθέτει ορθο-δι-υδρόξυ σύστημα και χρησιμοποιείται ως μάρτυρας) καθώς και οι αλλαγές που υφίστανται όταν στο διάλυμά τους προστεθεί βορικό οξύ σε συγκεκριμένη γραμμομοριακή αναλογία. Παρατηρούμε ότι η προσθήκη βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1 με το καφεϊκό οξύ (στις αναλογίες δεύτερο αναφέρεται πάντα το καφεϊκό οξύ) προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση (BM) ίση με 15,5 nm ως αποτέλεσμα του σχηματισμού διεστερικού συμπλόκου (εικόνα 4α). Αντίθετα, δεν σημειώνεται BM με την προσθήκη βορικού οξέος σε διάλυμα ρ-κουμαρικού οξέος σε αναλογία 1000:1 (εικόνα 4β).

Η προσθήκη MBA σε διάλυμα καφεϊκού οξέος σε αναλογία 1:1 δεν προκαλεί BM, όπως αναμένεται, (εικόνα 5α), ενώ περιορισμένη BM (κατά 4 nm) προκαλείται μόνο εάν η αναλογία ανέλθει στο 100:1 (εικόνα 5β). Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί πως η BM του φάσματος του καφεϊκού οξέος με την προσθήκη 100-πλάσιας συγκέντρωσης βορικού οξέος είναι 6 nm, δηλαδή υψηλότερη κατά 2 nm (Κλουβάτου, 2006). Υπό ταυτόχρονη παρουσία MBA και βορικού οξέος (εικόνες 5γ, 5δ) δεν παρατηρείται αξιόλογη αλλαγή στην BM του φάσματος του καφεϊκού οξέος συγκριτικά με το φάσμα του υπό την παρουσία βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1.

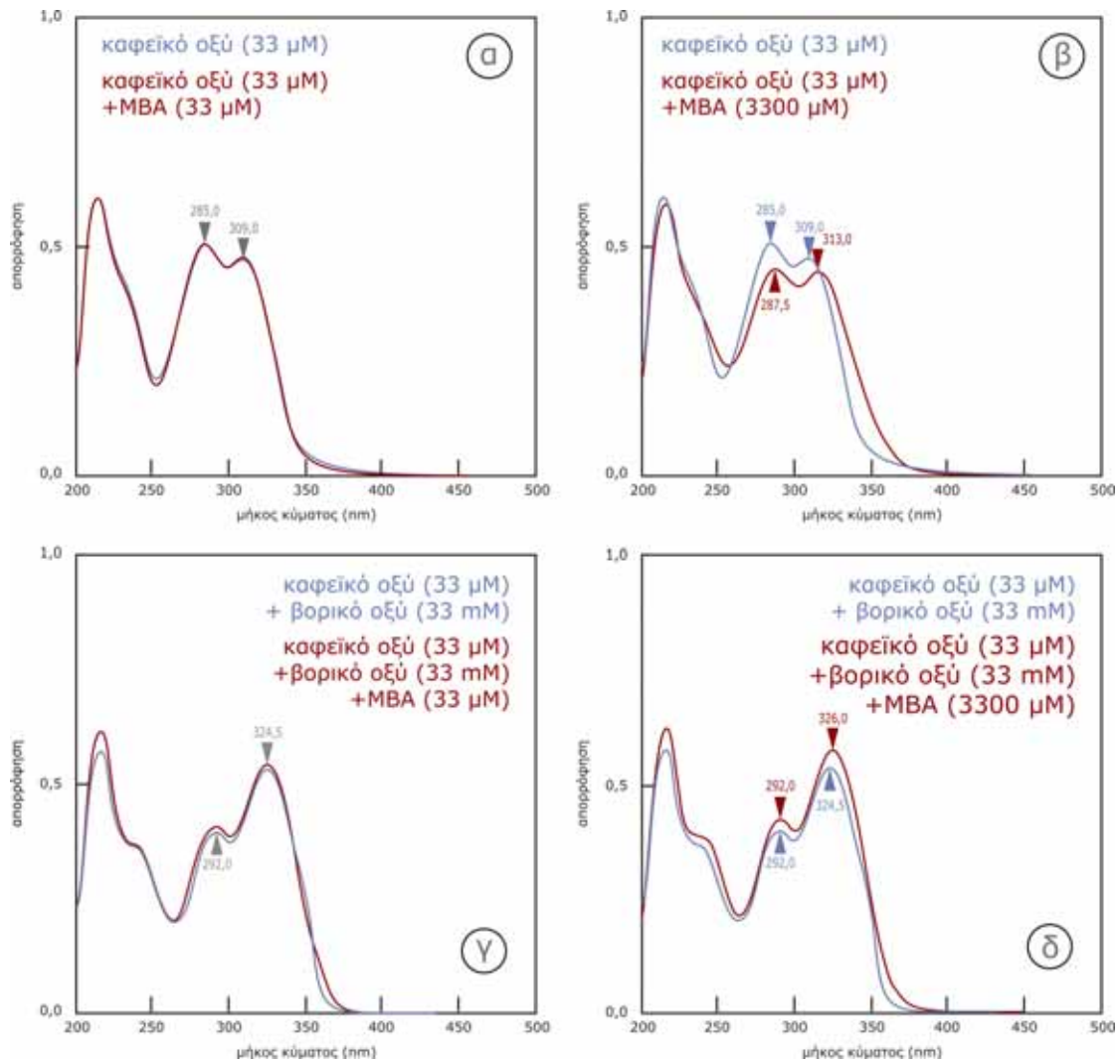
Αποτελέσματα



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

Ειδικότερα, η προσθήκη MBA σε αναλογία 100:1 προκαλεί επιπλέον μετατόπιση κατά 1,5 nm (εικόνα 5δ), η οποία αντιστοιχεί σε συνολική BM κατά 17 nm σε σχέση με το φάσμα του καφεϊκού οξέος (συγκρ. εικόνες 5α και 5δ).

Η μελέτη της επίδρασης του 3-NBA στο φάσμα του καφεϊκού οξέος παρουσιάζει δυσκολία λόγω της εμφάνισης απορρόφησης στην περιοχή των 277 nm οφειλόμενο στο ισχυρό χρωμοφόρο του νιτροβενζολίου του μορίου του 3-NBA (βλ. ένθετο φάσμα, εικόνες 6α και 6β). Με σκοπό την λήψη φασμάτων του καφεϊκού οξέος σε μίγμα του με το 3-NBA κρίθηκε σκόπιμη η χρήση φωτομετρικών μαρτύρων με ίση με το φωτομετρούμενο διάλυμα συγκέντρωση 3-NBA. Ωστόσο, επειδή οι παραπάνω φωτομετρήσεις ήταν ενδεχόμενο να παρουσιάζουν υψηλό υπόβαθρο απορρόφησης, λόγω της υψηλής απόλυτης τιμής απορρόφησης του φωτομετρικού μάρτυρα, με αποτέλεσμα την χαμηλή τιμή του λόγου σήματος προς θόρυβο, τα μίγματα παρασκευάστηκαν μειώνοντας την συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος περίπου στο 1/3 και συνακόλουθα και αυτή του 3-NBA η οποία περιέχεται επίσης και στον φωτομετρικό μάρτυρα (εικόνες 6γ και 6δ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η προσθήκη του - ισχυρότερου οξέος συγκριτικά με το βορικό οξύ - 3-NBA σε ισομοριακή αναλογία με το καφεϊκό οξύ προκαλεί ισχυρή BM (κατά 13 nm) στο φάσμα του καφεϊκού οξέος (εικόνα 6γ) ενώ το 3-NBA σε αναλογία μόλις 2:1 προκαλεί μεγιστοποίηση της BM (κατά 18 nm, εικόνες 6γ και 6δ) αφού



Εικόνα 5. (α, β): Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος σε συγκέντρωση 33 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) μετά την προσθήκη MBA σε γραμμομοριακή αναλογία MBA:φαινολικού συστατικού ίση με 1:1 (α, κόκκινο ίχνος) ή 100:1 (β, κόκκινο ίχνος). Στις εικόνες α και β, με μπλε ίχνος φαίνεται το φάσμα του καφεϊκού οξέος για λόγους σύγκρισης. Όταν στο διάλυμα προστεθεί MBA παρατηρείται μικρή βαθυχρωμική μετατόπιση μόνο στην περίπτωση που η γραμμομοριακή αναλογία είναι 100:1 (συγκρ. εικόνες α και β). (γ, δ): Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος σε συγκέντρωση 33 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) μετά την συνδυασμένη προσθήκη βορικού οξέος και MBA σε γραμμομοριακή αναλογία βορικό οξύ:MBA:καφεϊκό οξύ ίση με 1000:1:1 (γ, κόκκινο ίχνος) ή 1000:100:1 (δ, κόκκινο ίχνος). Στις εικόνες γ και δ, με μπλε ίχνος φαίνεται το φάσμα του καφεϊκού οξέος μετά την προσθήκη βορικού οξέος σε αναλογία βορικό οξύ: καφεϊκό οξύ ίση με 1000:1 για λόγους σύγκρισης. Παρατηρείται πως η προσθήκη MBA προκαλεί επιπρόσθετο βαθυχρωμικό φαινόμενο μικρής κλίμακας (κατά 1,5 nm, εικόνα δ) μόνο εάν προστεθεί σε αναλογία 100:1 αυτής του καφεϊκού οξέος (συγκρ. εικόνες γ και δ).

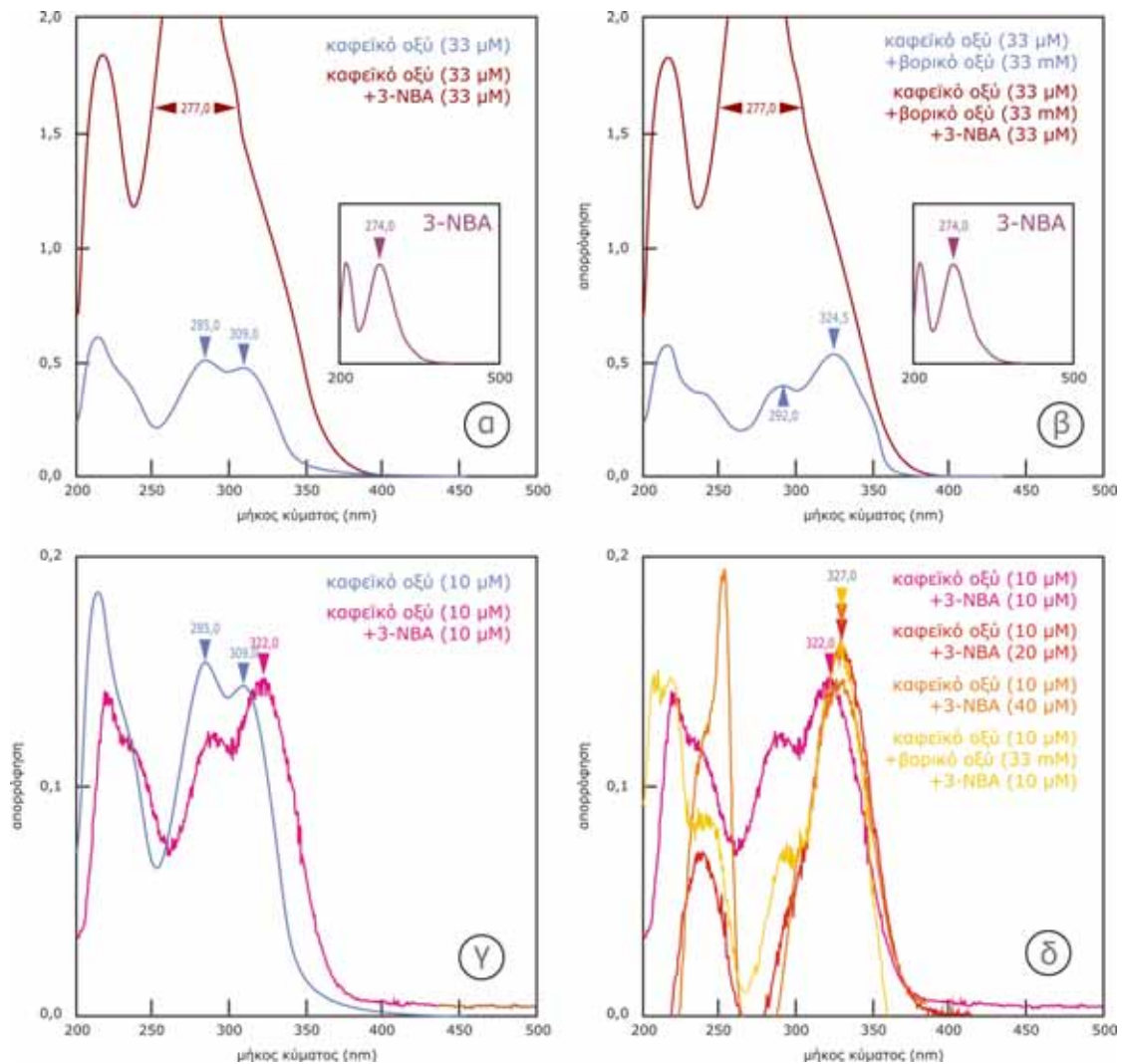
Αποτελέσματα

περαιτέρω προσθήκη 3-NBA (συγκεκριμένα 4:1, εικόνα 6δ) δεν προκαλεί επιπρόσθετη ΒΜ. Ας σημειωθεί πως η παρατηρούμενη ΒΜ είναι κατά 2,5 nm υψηλότερη από αυτή που προκαλείται με προσθήκη βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1. Έτσι, θεωρείται πως η προσθήκη διπλάσιας αναλογίας 3-NBA προκαλεί συμπλοκοποίηση του συνόλου του καφεϊκού οξέος, κατάσταση η οποία στην περίπτωση του βορικού οξέος επιτυγχάνεται μόνο με πολύ υψηλότερες γραμμομοριακές αναλογίες. Επίσης, η ταυτόχρονη παρουσία 3-NBA και βορικού οξέος (εικόνα 6δ) δεν προκαλεί υψηλότερη, της περίπτωσης της προσθήκης 3-NBA σε αναλογία 2:1, ΒΜ, γεγονός το οποίο ενισχύει το συμπέρασμα ότι η συμπλοκοποίηση του καφεϊκού οξέος με την προσθήκη 3-NBA σε αναλογία 2:1 είναι πλήρης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το 3-NBA είναι ικανό σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ακόμη και σε ισομοριακή αναλογία) να δημιουργήσει ισχυρά διεστερικά σύμπλοκα με το καφεϊκό οξύ. Αντίθετα, το συγκριτικά πολύ ασθενέστερο MBA δεν μπορεί να σχηματίσει ανάλογα σύμπλοκα με το καφεϊκό οξύ, και οπωσδήποτε όχι σε αναλογίες μικρότερες του 100:1 ενώ το βορικό οξύ απαιτεί αναλογίες της τάξης του 100:1 ή και ακόμα υψηλότερες (Κλουβάτου, 2006). Συμπερασματικά, το 3-NBA μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απόσπαση υποκαταστατών όπως το καφεϊκό οξύ, ή υποκαταστατών με παρόμοια δομή, από υφιστάμενα σύμπλοκα με το βορικό οξύ όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

II. Πειράματα με απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα

Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι το 3-NBA μπορεί να δράσει ως ανταγωνιστικός υποκαταστάτης του βορικού οξέος στα διεστερικά σύμπλοκα που σχηματίζει το τελευταίο με τα φαινολικά συστατικά που διαθέτουν ορθο-δι-υδροξυ-σύστημα όπως το καφεϊκό οξύ και συνεπώς να αποσπάσει ανάλογα μόρια από το κυτταρικό τοίχωμα εάν τυχόν υπάρχουν. Στα πειράματα της ενότητας αυτής κυτταρικά τοιχώματα που απομονώθηκαν από διαφορετικούς ιστούς ελιάς (φύλλα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και ρίζα) επώαστηκαν με το βορικό οξύ. Με τον παραπάνω χειρισμό, εάν υφίστανται φαινολικά συστατικά ή συστατικά ανάλογης δομής προσδεδεμένα μέσω βορικών διεστέρων σε κατάλοιπα του κυτταρικού τοιχώματος, αυτά αναμένεται να απελευθερωθούν στο διάλυμα επώασης. Επίσης θα πρέπει να απελευθερωθεί και το βορικό οξύ το οποίο συμμετέχει στα ίδια σύμπλοκα.



Εικόνα 6. (α, β): Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος σε συγκέντρωση 33 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) απουσία (α) ή παρουσία (β) βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1 μετά την προσθήκη 3-NBA σε γραμμομοριακή αναλογία (3-NBA:καφεϊκού οξέος) ίση με 1:1 (α και β, κόκκινο ίχνος). Στις εικόνες α και β, με μπλε ίχνος φαίνεται το φάσμα του καφεϊκού οξέος (α) ή του καφεϊκού οξέος παρουσία βορικού οξέος (β) για λόγους σύγκρισης. Στις εικόνες α και β, στο ένθετο φάσμα φαίνεται το φάσμα απορρόφησης του 3-NBA. Στις εικόνες α και β, τα φάσματα των διαλυμάτων τα οποία περιέχουν 3-NBA δεν μπορούν να μελετηθούν ως προς το καφεϊκό οξύ λόγω υψηλής απορρόφησης του 3-NBA. (γ, δ): Φάσματα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος σε συγκέντρωση 10 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34) απουσία (γ και δ) ή παρουσία (δ, κίτρινο ίχνος) βορικού οξέος σε αναλογία 1000:1 μετά την προσθήκη 3-NBA σε γραμμομοριακές αναλογίες (3-NBA:καφεϊκού οξέος) ίσες με 1:1 (γ, ιώδες ίχνος και δ, ιώδες ίχνος και δ, κίτρινο ίχνος), 2:1 (δ, κόκκινο ίχνος) ή 4:1 (δ, πορτοκαλί ίχνος). Στην εικόνα γ, με μπλε ίχνος φαίνεται το φάσμα του καφεϊκού οξέος για λόγους σύγκρισης. Στις εικόνες γ και δ, η ισχυρή απορρόφηση του 3-NBA αφαιρείται αυτόματα καθώς έχει προστεθεί ισομοριακή συγκέντρωση του 3-NBA και στους φωτομετρικούς μάρτυρες. Παρατηρείται πως η προσθήκη 3-NBA σε ισομοριακή αναλογία με το καφεϊκό οξύ προκαλεί βαθυχρωμική μετατόπιση στο φάσμα του τελευταίου ίση με 13 nm (εικόνα γ) ενώ αυτή μεγιστοποιείται στα 18 nm μόλις σε αναλογία 3-NBA:καφεϊκού οξέος ίση με 2:1 (εικόνα δ). Τόσο η περαιτέρω προσθήκη 3-NBA (σε αναλογία 4:1) όσο και η ταυτόχρονη προσθήκη βορικού οξέος (σε αναλογία 1000:1) δεν προκαλούν επιπλέον βαθυχρωμική μετατόπιση (εικόνα δ).

Αποτελέσματα

II.1. Χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων από διάφορους ιστούς

Σύμφωνα με τον πίνακα 1, η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων ανά νωπό βάρος ρίζας είναι περίπου ίση με αυτή των φύλλων που έχουν εκπτυχθεί σε ποσοστό μικρότερο ή ίσο με το 50% της πλήρους έκπτυξης. Μεταξύ φύλλων διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων, η αναλογία Ξ.Β. κυτταρικών τοιχωμάτων ανά Ν.Β. φύλλων είναι υψηλότερη για τα ώριμα φύλλα συγκριτικά με αυτά όλων των νεαρών αναπτυξιακών σταδίων γεγονός που οφείλεται στην συνεχή εναπόθεση πολυμερών υλικών στο πρωτογενές τοίχωμα και επιπλέον στη δημιουργία του δευτερογενούς τοιχώματος και περαιτέρω στην εναπόθεση λιγνίνης σε ορισμένες κατηγορίες κυττάρων κατά τη διαδικασία ωρίμανσης.

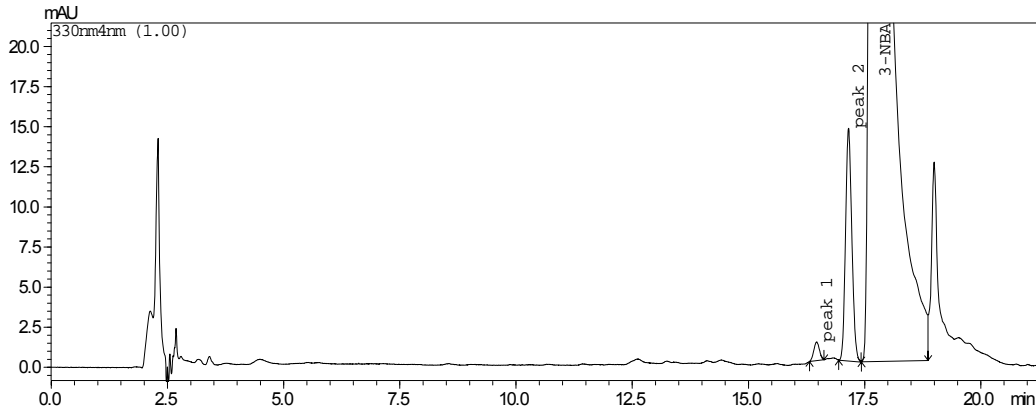
Πίνακας 1. Αναλογία Ξ.Β. κ.τ./Ν.Β. φύλλων και ρίζας σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου). Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($P < 0.05$).

κατηγορία ιστού		αναλογία (mg Ξ.β. g ⁻¹ ν.β.)
ρίζα	a	104 \pm 3
εκπτυσσόμενα φύλλα (>50% της πλήρους έκπτυξης)	a	102 \pm 3
εκπτυσσόμενα φύλλα (50 έως 75% της πλήρους έκπτυξης)	a	116 \pm 4
πλήρως εκπτυγμένα φύλλα	b	161 \pm 20
ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους	c	197 \pm 9

II.2. Ανταλλάξιμα μόρια μετά από επώαση με 3-νιτροφαινολυβορονικό οξύ

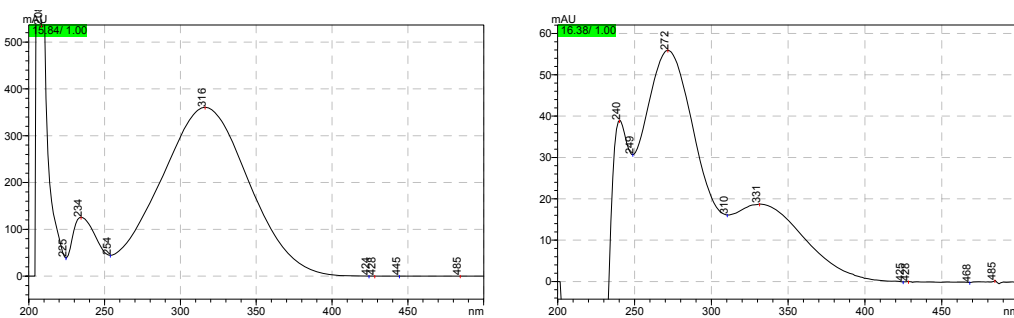
Μετά από την επώαση των δειγμάτων των κυτταρικών τοιχωμάτων και χρωματογραφική ανάλυση του υπερκείμενου διαπιστώθηκε η παρουσία δύο μορίων τα οποία προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα (εικόνα 7) καθώς τα μόρια αυτά δεν ανιχνεύονται όταν στο διάλυμα δεν έχει εναιωρηθεί το παραπάνω υλικό. Επιπλέον, είναι πιθανό ότι τα μόρια αυτά βρίσκονταν προσδεδεμένα στα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ καθώς δεν ανιχνεύθηκαν στο υπερκείμενο της επώασης κυτταρικού τοιχώματος με το ασθενέστερο του βορικού οξέος μεθυλοβορονικό οξύ (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Τα φάσματα απορρόφησης των δύο μορίων φαίνονται στην εικόνα 8. Το μόριο 1 εμφανίζει δύο μέγιστα απορρόφησης στα 234 και 316 nm γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό υποκατεστημένου βενζοϊκού δακτυλίου. Το φάσμα του μορίου 1 σε συνδυασμό με την ύπαρξη αρωματικών πρωτονίων, όπως προκύπτει από τα φάσματα ¹H-NMR (εικόνα 11), υποδεικνύει δομή φαινολικού συστατικού. Λόγω των συνθηκών της υπεριώδους φασματοσκοπικής ανάλυσης (βλ. Υλικά και



Εικόνα 7. Χρωματογραφική ανάλυση του υπερκειμένου εναιωρήματος κυτταρικών τοιχωμάτων από φύλλο ελιάς μετά από επώαση με 10 mM 3-NBA σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,34). Η ανίχνευση πραγματοποιείται με απορρόφηση στα 330 nm. Για χρωματογραφικές συνθήκες βλ. Υλικά και Μέθοδοι. Αναλύονται τρία μόρια: μόριο 1 (peak 1) και 2 (peak 2): συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (βλ. φάσματα UV-Vis, εικόνα 8) και η κορυφή έκλουσης που αντιστοιχεί στο 3-NBA. Η κορυφή έκλουσης στα δεξιά του 3-NBA είναι άγνωστο χημικό είδος και έχει φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του 3-NBA.

Μέθοδοι), αναμένεται πως το μέγιστο απορρόφησης του μορίου 1 θα βρίσκεται ακόμα υψηλότερα εάν ληφθεί σε μεθανόλη. Το μόριο 2 έδωσε δύο μέγιστα απορρόφησης στα 272 και 331 nm γεγονός το οποίο είναι ενδεικτικό της παρουσίας δύο χρωμοφόρων ομάδων στο μόριο. Το φάσμα του μορίου 2 σε συνδυασμό με την ύπαρξη αρωματικών πρωτονίων, όπως προκύπτει από τα φάσματα ¹H-NMR (εικόνα 11), υποδηλώνει πως μπορεί να πρόκειται για φλαβονοειδές ή άλλο φαινολικό συστατικό.



Εικόνα 8. Φάσματα απορρόφησης των μορίων 1 και 2 που απελευθερώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία 3-NBA (10 mM) για 18 h. Τα φάσματα ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης του υπερκειμένου της επώασης με πείραμα παύσης ροής. Διαλύτης: μεθανόλη σε 1% H₃PO₄.

Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων στα δύο μόρια τα οποία απελευθερώθηκαν μετά από την επώαση καθώς και η σχετική τους αναλογία. Παρατηρείται πως τα δύο μόρια είναι παρόντα στα κυτταρικά τοιχώματα όλων των ιστών που εξετάστηκαν. Επίσης, σε όλους τους ιστούς, το μόριο 2 εμφανίζει υψηλότερες συγκεντρώσεις (με την παραδοχή ότι οι συντελεστές μοριακής απόσβεσης των δύο μορίων στα 300 nm δεν διαφέρουν) ενώ η αναλογία τους είναι σχεδόν σταθερή και ίση με 1,9 περίπου (μόριο 2:μόριο 1, πίνακας 2). Η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων στα δύο μόρια είναι ιδιαίτερα υψηλή στα εκπυσσόμενα φύλλα (περίπου τριπλάσια συγκριτικά με την περιεκτικότητα τους στα ώριμα φύλλα) ενώ στα κυτταρικά τοιχώματα της ρίζας μετρήθηκαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων ιστών ρίζας και φύλλων διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων, στα μόρια 1 και 2 καθώς και η μεταξύ των μορίων αναλογία. Τα μόρια 1 και 2 απελευθερώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία 3-NBA (10 mM) για 18 h. Οι τιμές συγκέντρωσης έχουν εκφραστεί ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος και είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου). Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($P < 0.05$).

κατηγορία ιστού		περιεκτικότητα μορίου 1 (mg καφεϊκού g ⁻¹ ξ.β.)
ρίζα	a	0,205 \pm 0,030
εκπυσσόμενα φύλλα (>50% της πλήρους έκπτυξης)	b	0,337 \pm 0,025
εκπυσσόμενα φύλλα (50 έως 75% της πλήρους έκπτυξης)	b	0,274 \pm 0,025
πλήρως εκπτυγμένα φύλλα	b	0,196 \pm 0,030
ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους	a	0,114 \pm 0,012

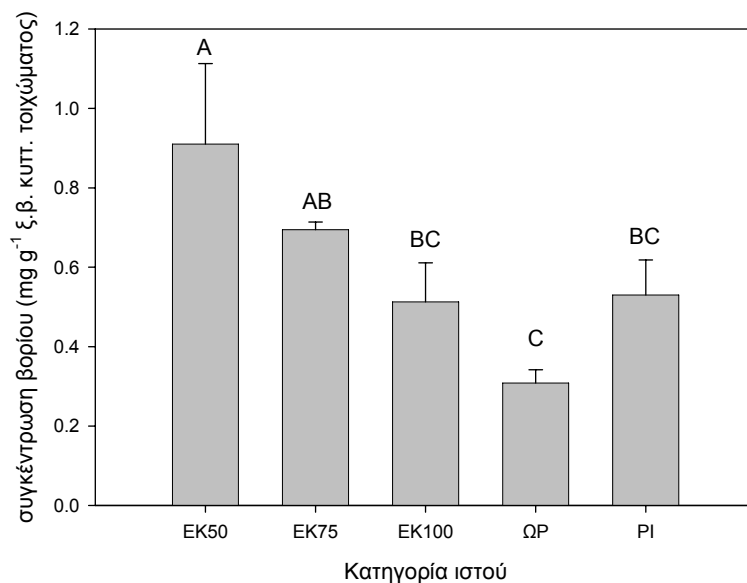
κατηγορία ιστού		περιεκτικότητα μορίου 2 (mg καφεϊκού g ⁻¹ ξ.β.)
ρίζα	a	0,399 \pm 0,055
εκπυσσόμενα φύλλα (>50% της πλήρους έκπτυξης)	b	0,599 \pm 0,035
εκπυσσόμενα φύλλα (50 έως 75% της πλήρους έκπτυξης)	b	0,537 \pm 0,052
πλήρως εκπτυγμένα φύλλα	b	0,375 \pm 0,057
ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους	a	0,210 \pm 0,019

κατηγορία ιστού	αναλογία μορίων (μόριο 2:μόριο1)
ρίζα	1,94
εκπυσσόμενα φύλλα (>50% της πλήρους έκπτυξης)	1,78
εκπυσσόμενα φύλλα (50 έως 75% της πλήρους έκπτυξης)	1,96
πλήρως εκπτυγμένα φύλλα	1,92
ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους	1,84

II.3. Απελευθέρωση βορικού οξέος μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ

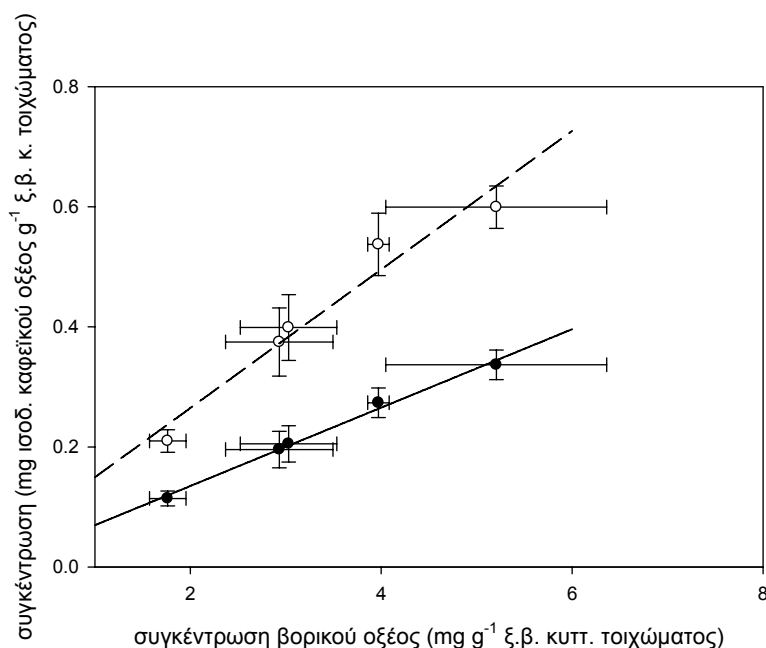
Η επώαση δειγμάτων απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων με το βορονικό οξύ 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση στο διάλυμα επώασης ποσοτήτων βορικού οξέος οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις βορικού οξέος ανά μονάδα ξηρού βάρους κυτταρικών τοιχωμάτων το οποίο είναι ανταλλάξιμο υπό τις παραπάνω συνθήκες επώασης (εικόνα 9). Η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων σε ανταλλάξιμο βορικό οξύ είναι ιδιαίτερα υψηλή στα εκπτυσσόμενα φύλλα (περίπου τριπλάσια συγκριτικά με την περιεκτικότητά τους στα ώριμα φύλλα) ενώ στα κυτταρικά τοιχώματα της ρίζας μετρήθηκε ενδιάμεση συγκέντρωση (εικόνα 9).

Λόγω της πιθανής δομικής συσχέτισης μεταξύ βορικού οξέος και συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος τα οποία απελευθερώνονται μετά από επώαση με 3-NBA, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ συγκεντρώσεων καθενός από τα δύο μόρια με αυτή του βορικού οξέος ανά ζεύγη για κάθε είδος ιστού. Στην εικόνα 10 φαίνεται η



Εικόνα 9. Συγκέντρωση βορίου που διαλυτοποιείται από το κυτταρικό τοίχωμα φύλλων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης (εκπτυσσόμενα φύλλα: EK50: με επιφάνεια ελάσματος μικρότερη του 50% της πλήρους έκπτυξης, EK75: επιφάνεια ελάσματος μεταξύ 50 και 75% της πλήρους έκπτυξης, E100: πλήρως εκπτυγμένα φύλλα, ΩΡ: ώριμα φύλλα ηλικίας ενός έτους) ή ρίζας (ΡΙ) μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία 3-NBA (10 mM) για 18 h. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω καμπύλης αναφοράς και εκφραστηκε ως βορικό οξύ ανά μονάδα ξηρού βάρους κυτταρικού τοιχώματος. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (\pm τυπικό σφάλμα του μέσου). Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Αποτελέσματα



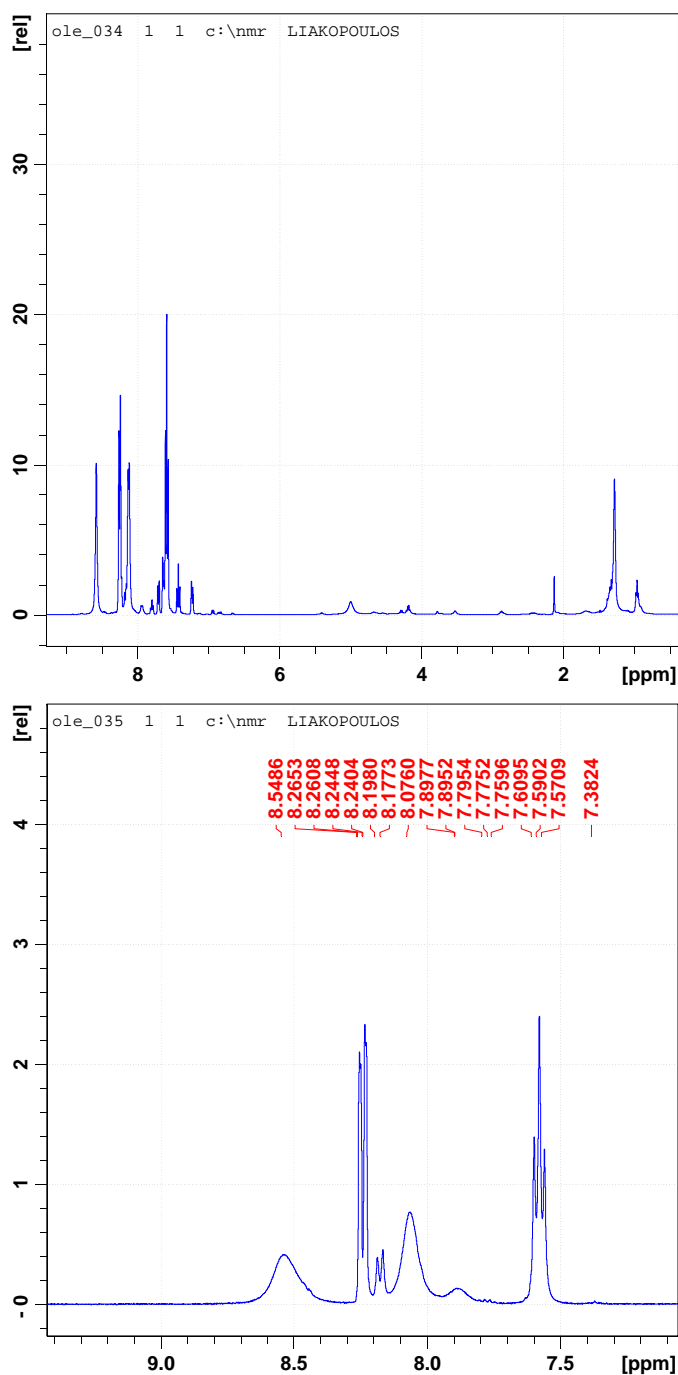
Εικόνα 10. Γραμμική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης βορικού οξέος και συγκέντρωσης του μορίου 1 (μαύρα σύμβολα, συνεχής γραμμή, $y=0.065x+0.004$, $r^2=0.99$, $P<0.001$) ή του μορίου 2 (ανοικτά σύμβολα, διακεκομμένη γραμμή, $y=0.115x+0.034$, $r^2=0.95$, $P<0.01$) τα οποία διαλυτοποιούνται από το κυτταρικό τοίχωμα φύλλων ή ρίζας μετά από επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία του 3-NBA (10 mM) για 18 h.

στατιστικά σημαντική, ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των παραπάνω συγκεντρώσεων για κάθε ένα από τα δύο μόρια.

III. Παρασκευαστική απομόνωση κλασμάτων ανταλλάξιμων μορίων μετά από επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Για την περαιτέρω μελέτη των δύο μορίων τα οποία απελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα μετά από επίδραση του 3-NBA κρίθηκε σκόπιμη η παρασκευαστική απομόνωσή τους ώστε να καταστεί δυνατή η φασματοσκοπική τους ανάλυση μέσω ¹H-NMR. Παρόλο που η σύσταση του υδρολύματος είναι σχετικά απλή και εν μέρει γνωστή, η λήψη φάσματος ¹H-NMR στο αρχικό υδρόλυμα δεν έδωσε αξιοποιήσιμα αποτελέσματα πέραν της εύρεσης του ίδιου του 3-NBA (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Επίσης, η πιθανή ύπαρξη συμπλόκων μεταξύ του 3-NBA και των δύο υπό μελέτη μορίων είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία απόδοσης των σημάτων σε συγκεκριμένα πρωτόνια. Για την αντιμετώπιση των παραπάνω έγινε αρχικά καθαρισμός του επώασματος από το 3-NBA και ακολούθως διαχωρισμός σε δύο κλάσματα κάθε ένα εκ των οποίων ήταν εμπλουτισμένο σε ένα εκ των δύο υπό μελέτη μορίων. Ο καθαρισμός στηρίχθηκε

στην ικανότητα του 3-NBA να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με πολυόλες και συγκεκριμένα την μαννιτόλη. Έτσι, προστέθηκε μαννιτόλη σε μεγάλη ποσότητα (περίπου 500 mM) ώστε να εξασφαλιστεί η ποσοτική συμμετοχή του 3-NBA σε σύμπλοκα με την μαννιτόλη (και ταυτόχρονα να περιοριστεί λόγω μετατόπισης της χημικής ισορροπίας η συμμετοχή του 3-NBA σε τυχόν σύμπλοκα με τα δύο υπό



Εικόνα 11. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ουσιών 1 (OLE34-1-1) και 2 (OLE-35-1-1) (CDCl_3 , 400 MHz).

Αποτελέσματα

μελέτη μόρια). Στη συνέχεια, η απομάκρυνση του συμπλόκου μαννιτόλης-3-NBA στηρίχθηκε στην διαφορά πολικότητας μεταξύ του παραπάνω συμπλόκου και των υπό μελέτη μορίων. Για το λόγο αυτό, το διάλυμα εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη σε διφασικό σύστημα με οξικό αιθυλεστέρα, διαδικασία η οποία απομάκρυνε το 84% της αρχικής ποσότητας του 3-NBA στην υδατική φάση. Παράλληλα ανακτήθηκαν στην οργανική φάση τα υπό μελέτη μόρια 1 και 2 σε ποσοστά 97 και 98% αντίστοιχα.

Μετά τον καθαρισμό του επώασματος εκτελέστηκε παρασκευαστική χρωματογραφία η οποία απέδωσε δύο κλάσματα, τα OLE34-1-1 και OLE-35-1-1, τα οποία αντιστοιχούν στα μόρια 1 και 2. Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπική ανάλυση η οποία έδειξε την ύπαρξη αρωματικών πρωτονίων στην περιοχή 6.5 έως 8.5 ppm (εικόνα 11). Η περαιτέρω ανάλυση και η απόδοση των σημάτων σε συγκεκριμένης μοριακής δομής πρωτόνια δεν κατέστη δυνατή ελλείψει δεδομένων της μάζας των μορίων και περαιτέρω φασματοσκοπικών αναλύσεων μέσω NMR, κυρίως φασμάτων ^{13}C -NMR και πρωτονίου δύο διαστάσεων. Τα πειράματα αυτά δεν περιελήφθηκαν στην παρούσα εργασία.

Συζήτηση

Η παρούσα εργασία κινήθηκε σε τρεις άξονες: α) Στην διαπίστωση ότι είναι μεθοδολογικά δυνατός ο ποσοτικός σχηματισμός διεστέρων μεταξύ ενός κατάλληλης δομής βορονικού οξέος και ενός συστατικού με δομή διόλης ανεξαρτήτως της παρουσίας ή μη του βορικού οξέος, β) στη χρήση βορονικών οξέων για την διάσπαση βορικών διεστέρων στο κυτταρικό τοίχωμα προερχόμενο από διαφορετικούς ιστούς ελιάς και την απελευθέρωση τυχόν υποκαταστατών χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίοι έχουν κατάλληλη δομή ώστε να συμμετέχουν σε διεστερικά σύμπλοκα προσδεδεμένοι μέσω γεφυρών βορικού οξέος σε κατάλοιπα συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος και γ) στην απομόνωση και φασματοσκοπική ανάλυση των δύο μορίων (τα οποία τελικά απελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα φύλλων ελιάς με τους παραπάνω χειρισμούς) με σκοπό την εύρεση της μοριακής τους δομής. Οι τρεις αυτοί πειραματικοί άξονες απαντούν εν μέρει στο βασικό ερώτημα το οποίο τέθηκε στα πλαίσια της υπόθεσης εργασίας.

I. Αξιολόγηση της χρήσης του 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος για την ποσοτική συμπλοκοποίηση φαινολικών συστατικών και συνεπαγόμενα της ικανότητας διάσπασης υφιστάμενων συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και μορίων ανάλογης δομής

Είναι γνωστό ότι μόρια με δομή ορθο-διόλης όπως οι ορθο-δι-φαινόλες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με το βορικό οξύ (Dembitsky et al., 2002). Ταυτόχρονα, τα μόρια αυτά διαθέτουν χρωμοφόρες ομάδες με αποτέλεσμα την αλλαγή των φασματοσκοπικών τους ιδιοτήτων με τον σχηματισμό του συμπλόκου. Στην παρούσα εργασία, ως παράμετρος η οποία σχετίζεται με το βαθμό συμπλοκοποίησης του καφεϊκού οξέος χρησιμοποιήθηκε η βαθυχρωμική μετατόπιση (BM) του φάσματος απορρόφησης σε σύγκριση με το φάσμα που δίνει το μη συμπλοκοποιημένο μόριο (Jurđ, 1956). Προηγούμενα αποτελέσματα έχουν δείξει πως το μέγεθος της BM σχετίζεται ποσοτικά με την γραμμομοριακή αναλογία μεταξύ φαινολικών συστατικών με ορθο-δι-υδρόξυ σύστημα και βορικού οξέος (Κλουβάτου, 2006). Οι παραπάνω ιδιότητες επιτρέπουν την έμμεση εκτίμηση του ποσοστού των μορίων του φαινολικού συστατικού το οποίο βρίσκεται υπό μορφή συμπλόκου. Το γεγονός ότι η BM σχετίζεται εξειδικευμένα με την δημιουργία διεστερικού συμπλόκου μεταξύ μορίων τα οποία διαθέτουν ορθο-δι-υδρόξυ σύστημα και του βορικού οξέος επιβεβαιώνεται επίσης με την απουσία BM όταν στη θέση του καφεϊκού οξέος χρησιμοποιηθεί το ανάλογο μόριο *p*-κουμαρικό οξύ. Στο

Συζήτηση

φαινολικό αυτό, κατά τα άλλα όμοιο με το καφεϊκό οξύ, απουσιάζει το ένα από τα δύο γειτονικά υδροξύλια του βενζοϊκού δακτυλίου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μέγιστη ΒΜ και συνεπώς το υψηλότερο ποσοστό συμπλοκοποίησης του καφεϊκού οξέος επιτυγχάνεται με τη χρήση του 3-NBA όπως αναμένεται και ειδικότερα με γραμμομοριακές αναλογίες από 1:1 έως 2:1 μεταξύ του 3-NBA και του καφεϊκού οξέος. Στον αντίποδα, το βορονικό οξύ MBA ως ασθενέστερο οξύ του βορικού, με pK_a μεγαλύτερη του βορικού οξέος, έδωσε μικρές τιμές ΒΜ και μόνο σε αναλογία 100:1. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν αποδεικνύουν άμεσα πως το 3-NBA μπορεί να αποσπάσει τους υποκαταστάτες από υφιστάμενα σύμπλοκα μεταξύ αυτών και του βορικού οξέος. Ωστόσο, κάτι τέτοιο υποδηλώνεται από το γεγονός ότι ανάλογου μεγέθους ΒΜ με τη χρήση μόνο βορικού οξέος επιτυγχάνεται με πολύ μεγαλύτερες γραμμομοριακές αναλογίες της τάξης του 1000:1. Συμπερασματικά, εκτιμάται πως η χρήση του 3-NBA μπορεί να παρεμποδίσει ή να διασπάσει υφιστάμενα σύμπλοκα του βορικού οξέος σε υλικά βιολογικής προέλευσης όπως το κυτταρικό τοίχωμα σε συμφωνία με αναφορές για την χρήση βορονικών οξέων ανάλογης ισχύος (ανάλογης τιμής pK_a συγκριτικά με αυτή του βορικού οξέος) σε βιολογικά συστήματα (Bassil et al., 2004).

II. Χρήση του 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος για την διάσπαση βορικών διεστέρων στο κυτταρικό τοίχωμα από διαφορετικούς ιστούς και ανάλυση των μορίων που απελευθερώνονται

Η επίδραση 3-NBA σε απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα ιστών ελιάς (φύλλων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ρίζας) είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο διακριτών μορίων καθώς και βορικού οξέος στο μέσο επώασης. Τα υπό μελέτη μόρια απελευθερώθηκαν από δείγματα όλων των κατηγοριών ιστών που εξετάστηκαν. Συμπεραίνεται πως τα μόρια αυτά προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα καθώς ανιχνεύονται μόνο εάν στο διάλυμα επώασης εναιωρηθεί το παραπάνω υλικό. Επιπλέον, υφίστανται ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η φύση των δεσμών μέσω των οποίων βρίσκονται προσδεδεμένα στο τοίχωμα είναι αυτή των βορικών διεστερικών δεσμών. Πιο συγκεκριμένα, ο χειρισμός με το, ισχυρότερο οξύ του βορικού, 3-NBA έχει σαν αποτέλεσμα την επιλεκτική διάσπαση των εστερικών δεσμών μεταξύ του βορικού οξέος και των μορίων αυτών σύμφωνα με αυτά που έχουν εκτεθεί παραπάνω. Ανάλογο αποτέλεσμα δεν υπήρξε όταν στη θέση του 3-NBA χρησιμοποιήθηκε το, ασθενέστερο οξύ του βορικού, MBA. Ανάλογα αποτελέσματα για την επιλεκτική δράση των βορονικών οξέων, σε διαφορετικό όμως βιολογικό υλικό, έχουν ληφθεί και από τους Bassil et al. (2004). Επιπλέον ένδειξη για την παραπάνω φύση των δεσμών με τους οποίους

προσδένονται τα δύο υπό μελέτη μόρια στο τοίχωμα παρέχει η ταυτόχρονη απελευθέρωση βορικού οξέος στο διάλυμα επώασης.

Η συγκέντρωση τόσο των δύο υπό μελέτη μορίων όσο και του βορικού οξέος μετά την επώαση με 3-NBA ήταν εξαρτώμενη από το είδος του ιστού. Αξιοσημείωτα, υψηλότερες συγκεντρώσεις ανά ξηρό βάρος κυτταρικών τοιχωμάτων ελήφθησαν στην περίπτωση των νεαρών φύλλων (εκπτυγμένα σε ποσοστό έως 50% της πλήρους έκπτυξης) και οι συγκεντρώσεις έβαιναν μειούμενες με την αύξηση της ηλικίας των φύλλων. Τόσο η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών ως συνόλου (Karabourniotis et al., 1995), ενδεχομένως και αυτών που διατίθενται για τη δημιουργία συμπλόκων σαν αυτά της υπόθεσης εργασίας, όσο και η συγκέντρωση του βορικού οξέος (Fernandez-Escobar et al., 1999), είναι υψηλότερες στα νεαρά φύλλα της ελιάς συγκριτικά με τα ώριμα. Επίσης, τα κυτταρικά τοιχώματα των νεαρών ιστών παρουσιάζουν υψηλότερη αναλογία σε πηκτινικά πολυμερή συγκριτικά με τα ωριμότερα λόγω μεγαλύτερης συμμετοχής της μέσης πλάκας και του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος, στρωμάτων πλούσιων σε πηκτίνη, στην δομή. Ενδείξεις για την δομική σχέση μεταξύ βορικού οξέος και κάθε ενός από τα δύο υπό μελέτη μόρια παρέχει το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις τους συσχετίζονται γραμμικά υποδηλώνοντας μοριακή στοιχειομετρία. Ωστόσο, οι ποσότητες του βορικού οξέος που απελευθερώνονται μετά την επώαση με 3-NBA δεν αναμένεται να προέρχονται αποκλειστικά από τη διάσπαση των υποτιθέμενων συμπλόκων καθώς είναι βέβαιη η διάσπαση των διαπιστωμένων συμπλόκων των διμερών των αλυσίδων της ραμνογαλακτουρονάνης II με το βορικό οξύ. Για τον λόγο αυτό δεν μπορεί να γίνει απευθείας γραμμομοριακή αντιστοίχιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο υπό μελέτη μορίων και αυτής του βορικού οξέος υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες.

III. Ενδείξεις περί της ύπαρξης ορθο-δι-υδρόξυ συστήματος στα υπό μελέτη μόρια

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ισχύ της υπόθεσης εργασίας αποτελεί η δυνατότητα των μορίων αυτών να σχηματίζουν σύμπλοκα με το βορικό οξύ. Χωρίς την επιβεβαίωση της παραπάνω ιδιότητας των υπό μελέτη μορίων δεν μπορεί, επιπλέον, να εξηγηθεί και η προέλευσή τους υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες. Η δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων σχετίζεται με την μοριακή τους δομή και συγκεκριμένα με την ύπαρξη ομάδων υδροξυλίου σε γειτονικά άτομα άνθρακα και μάλιστα σε τέτοια στερεοδιαμόρφωση ώστε να ευνοείται ο σχηματισμός ισχυρών και σταθερών συμπλόκων με το βορικό οξύ. Τη δυνατότητα αυτή παρέχουν μόρια με δομή ορθο-δι-φαινόλης, ανάλογη με αυτή του καφεϊκού

Συζήτηση

οξέος και άλλων φαινολικών συστατικών καθώς η υποκατάσταση του αρωματικού σκελετού φέρει τις δύο ομάδες υδροξυλίου στο ίδιο επίπεδο που τυγχάνει να είναι αυτό του βενζοϊκού δακτυλίου. Συχνά η στερεοδιαμόρφωση αυτή αναφέρεται και ως *cis* διαμόρφωση.

Ενδείξεις υπέρ της ύπαρξης φαινολικού δακτυλίου παρέχουν τα φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες όπου διαπιστώνεται η ύπαρξη ισχυρών χρωμοφόρων ομάδων της παραπάνω δομής. Είναι γνωστό ότι το φάσμα απορρόφησης του υποκατεστημένου βενζοϊκού δακτυλίου αλλάζει, εμφανίζοντας περισσότερα μέγιστα και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, όσο αυξάνεται ο βαθμός υποκατάστασης. Τα φάσματα που ελήφθησαν για τα δύο υπό μελέτη μόρια συνηγορούν για δομή ορθο-δι-φαινόλης, χωρίς ωστόσο να την αποδεικνύουν. Παράλληλα, η φασματοσκοπική ανάλυση, μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, των απομονωμένων κλασμάτων των δύο συστατικών έδειξε πέραν αμφιβολίας την ύπαρξη αρωματικού συστήματος καθώς στα φάσματά τους κυριαρχούν τα σήματα πρωτονίων με χημική μετατόπιση στην αρωματική περιοχή.

IV. Γενικό συμπέρασμα

Συνολικά, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης συμπλόκων επιπλέον αυτών που σχηματίζουν οι αλυσίδες της ραμνογαλακτουρονάνης II στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα φυσιολογικά-βιοχημικά δεδομένα υποδηλώνουν πως τα συστατικά αυτά δύναται να εντοπίζονται στο πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος και πως προσδένονται συγκεκριμένα μέσω βορικών διεστέρων. Επιπρόσθετα, βάσει των δεδομένων της βιβλιογραφίας, τα μόρια αυτά είναι πιθανόν να προσδένονται σταθερά στην απιόζη των πλάγιων αλυσίδων του παραπάνω πηκτινικού πολυμερούς. Εάν αυτό αληθεύει θα πρέπει να διερευνηθεί εάν πρόκειται για την απιόζη της A αλυσίδας ή / και αυτή της B αλυσίδας η οποία δεν έχει επιβεβαιωθεί εάν συμμετέχει σε διμερή ραμνογαλακτουρονάνης II. Τέλος, τα έως τώρα δεδομένα της μοριακής δομής συνάδουν με τις χημικές ιδιότητες που θα πρέπει να έχουν τα υπό μελέτη μόρια.

Βιβλιογραφία

- Albersheim, P. (1975). The Walls of Growing Plant Cells. *Sci. Amer.* 232: 81-95.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) Molecular biology of the Cell. New York: Garland Science ,4th edition.
- Bolsover, S.R., Hyams, J. S., Shephard, E.A., White, H. A., Wiedemann, C.G. (2004). Cell Biology. A Short Course. 2nd edition.
- Barr, R., Bottger, M., and Crane, F.L. (1993). The effect of boron on plasma membrane electron transport and associated proton secretion by cultured carrot cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31, 31-39.
- Bassil, E., Hu, H. N., 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 Physiol.* 136, 3383-3395.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17, 125-197.
- Bennett, A., Rowe, R. I., Soch N., and Eckhart C. D. (1999). Boron Stimulates Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth *J. Nutr.* 129, 2236-2238.
- Bidlack, J.E., (1990). Cell Wall Components and Lignin Biosynthesis in Forages. Ph.D. *Dissertation, Iowa State Univ., Ames, IA.*
- Blaser-Grill, J., Knoppik, D., Amberger, A., Goldbach, H. (1989). Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant Physiol.* 90, 280-284.
- Blevins, D. G. and Lukaszewski, K. M. (1998). Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 481-500.
- Bolaños, L., Cebrian, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Bonilla, I., (2001). Lectin-like glycoprotein PsNLEC-1 is not correctly glycosylated and targeted in boron-deficient pea nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 663-670.
- Bolaños, L., Esteban, E., de Lorenzo, C., Fernández-Pascual, M., de Felipe, M.R., Gàrate, A. and Bonilla, I. (1994). Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) Rhizobium nodules. *Plant Physiol.*, 104, 85-90.
- Bonilla, I., Garcia-Gonzalez, M., Mateo, P. (1990). Boron requirement in cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. *Plant Physiol* 94, 1554-1560.
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., and Blevins, D. (2004a). Why boron? *Plant Physiol. and Biochem.* 42, 907-12.
- Bonilla, I., Mergold-Villaseñor, C., Campos, M. E., Sánchez, N., Pérez, H., López, L., Castrejón, L., Sánchez, F. and Cassab, G. I. (1997a). The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyprolin-/proline-rich proteins. *Plant Physiol.* 115, 1329-1340.
- Bolaños, L., Redondo-Nieto, M., Bonilla, I. and Wall, L. G. (2002). Boron requirement in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiotic relationship. Its essentiality for *Frankia* BCU110501 growth and nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* 115, 563-570.
- Bolaños, L., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Brewin, N.J. and Bonilla, I. (2004b). Cell surface interactions of Rhizobium and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 216-23.
- Boudet, A.-M. (1998). A new view of lignification. *Trends in Plant Science* 3, 67-71.
- Brett, C. T. and Waldron, K. W. (1996). Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls; Kluwer Academic: New York, 272pp.

Βιβλιογραφία

- Brett, C.T.(2000). Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int Rev Cytol.* 199, 161-99.
- Brown, Jr. R.M. (2004).Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science. Part A. Polymer Chemistry* 42, 487–495.
- 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 Biol.*,4, 205–223.
- Brown, P.H. and Shelp, B.J.(1997). Boron mobility in plants. *Plant and Soil*, 193, 85–101.
- 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.
- Caffall K. H., Mohnen D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 1879-1900.
- 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. *Physiol. Plant.*, 95, 11–18.
- Cakmak, I. and Römheld, V. (1997). Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*, 193,71–83
- Camacho-Cristobal, J.J., Anzelotti, D., Gonzalez-Fontes, A. (2002).Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency.*Plant Physiol. and Biochem.* 40, 997–1002.
- Camacho-Cristobal, J.J. and Gonzalez-Fontes, A. (1999). Boron deficiency causes a drastic decrease in nitrate content and nitrate reductase activity, and increases the content of carbohydrates in leaves from tobacco plants. *Planta*, 209,528–536.
- Camacho-Cristobal, J.J. and Gonzalez-Fontes, A.(2007).Boron deficiency, decreases plasmalemma H⁺-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. *Planta* 226, 443–451.
- Camacho-Cristobal, J.J., Herrera-Rodriguez, M.B., Beato, V.M., Rexach, J., Navarro-Gochicoa, M.T., Maldonado, J.M. et al. (2008).The expression of several cell wall-related genes in *Arabidopsis* roots is down-regulated under boron deficiency. *Env. Exp. Bot.* 63, 351–358.
- Camacho-Cristobal, J.J., Lunar, L., Lafont, F., Baumert, A., Gonzalez-Fontes, A. (2004). Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves. *J.Plant Physiol.* 161, 879–881.
- Camacho-Cristobal, J.J., Maldonado, J.M., Gonzalez-Fontes, A.(2005). Boron deficiency increases putrescine levels in tobacco plants. *J.Plant Physiol.*162, 921–928.
- Canut, H. A., Carrasco, J. P., Galaud, C., Cassan, H., Bouyssou, N., Vita, P., Ferrara L. R. Pont (1998). High affinity RGD-binding sites at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* links the cell wall. *Plant Journal* 16, 63-71.
- Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M.(1993).Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30.
- Carpita, N.C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 445-476.
- Chesson,A., Gordon,A.H., and Lomax, J.A.(1983). Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *J.Sci. Food Agric.* 34, 1330-1340.
- Colquhoun, I.J. , Ralet, M-C., Thibault, J -F., Faulds, C.B. and Williamson, G.,(1994). Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 243–256.
- Cosgrove, D.J.(1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. R v. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50,391-417.

- Cosgrove, D.J. (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Dannel, F., Pfeffer, H., Römheld, V. (2002). Update on boron in higher plants - Uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biology*, 4: 193-204.
- Dannel, F., Römheld, V.(2002). Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4, 205-223.
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I. and Srebnik, M. (2002). Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science*, 163, 931-942.
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L.(1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Dugger, W.M. (1983). Boron in plant metabolism. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, new series, Vol. 15. Eds. A. Lauchli and R.L. Bielecki. Springer-Verlag, Berlin, pp 626-650.
- Eckhert, C. D. and Rowe, R. I.(1999). Embryonic dysplasia and adult retinal dystrophy in boron-deficient zebrafish. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 12, 213-219.
- Eckhert, C. D.(1998). Boron stimulates embryonic trout growth. *J Nutr.*198, 2488-2493.
- El-Shintinawy, F. (1999). Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves. *Photosynthetica*, 36, 565-573.
- Eraso, F. and Hartley, R.D.(1990).Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls-possible factors influencing wall degradability. *J Sci Food Agric* 51, 163-170.
- Esau, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*, 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Fernández-Escobar, R., Moreno, R., García-Creus, M. (1999). Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Scientia Horticulturae*, 82, 25-45.
- Ferrol, N., Donaire, J.P. (1992). Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Science*, 86, 41-47.
- Findeklee, P., Wimmer, M., 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*, R.W. Bell and B. Rerkasem (eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 221-227.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A., Ehwald, R.(1999). The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiology*, 121, 829-838.
- Fort,D.J.,Propst,T.L.,Stover,E.L. and Strong,P.L.(1998).Adverse reproductive and developmental effects in *Xenopus* from insufficient boron. *Biological Trace Element Research* 66, 237-259.
- Fry, S.C.(1982). Phenolic components of the primary cell wall. *Biochem. J.* 203,493-502.
- Fry, S.C.(1982). Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochemical Journal*, 203,493-504.
- Fry, S.C.(1989). Dissecting the complexity of the plant cell wall. *Plants Today* 2, 126-132.
- Gandini, A., Neto, C.P., Silvestre, A.J.D.(2006). Suberin:A promising renewable resource for novel macromolecular materials. *Prog. Polym. Sci.* 31 ,878-892.
- García-González, M., Mateo, P. and Bonilla, I. (1991) Boron requirement for envelope structure and function in *Anabaena* PCC 7119 heterocysts. *J. Exp. Botany* 42: 925-929.
- Gibbons, S., Mathew, K.T., Gray, A.I. (1999). A caffeic acid ester from *Halocnemum strobilaceum*. *Phytochemistry*, 51, 465-467.
- Goldbach, H.E., Blaser-Grill, J., Lindemann, N., Porzelt, M., Hörmann, C., Lupp, B. and Gessner, B. (1991). Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic processes. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 10, 2211-2229.
- Goldbach, H. E. and Wimmer, M. A.(2007). Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2007, 170, 39-48.

Βιβλιογραφία

- Goldbach, H.E., Yu,Q.,Wingender, R., Schulz,M.,Wimmer,M., Findekle, P. et al. (2001). Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 173–181.
- Goldbach, H.E.(1985) Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of ³²P and ¹⁴C-glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. *J.Plant Physiol.* 118,431-43.
- Goldberg, S. and Grieve,C.M.(2003) Boron adsorption by maize cell walls. *Plant and Soil* 251: 137–142.
- Goldberg, S. (1993). Chemistry and mineralogy of boron in soils. Boron and its role in crop production, UC Gupta (ed.), Boca Raton: CRC Press, pp. 1-44.
- Goldberg S. 1997. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*, 193: 35–48.
- Goodwin, T.W. and Mercer, E. I. (1983) Introduction to plant biochemistry, 2nd ed. Pergamon Press, New York, New York, USA.
- Goring,D.A. and Timell, T.E.(1962) Molecular weight of native celluloses. *Tappi*,45,454-460.
- Hanley, A.B., Russell,W.R. and Chesson, A.,(1993). Formation of substituted truxillic and truxinic acids in plant cell walls-a rationale. *Phytochem.* 33,957–960.
- Hartley, R.D. and Ford, C.W. (1989). Phenolic constituents in plant cell walls and wall biodegradability. In: Lewis, N.G. & Paice, M.G., (ed), Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation 399, *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 137–145. *Amer. Chem.Soc., Washington, DC.*
- Hartley, R.D., Morrison, III W.H., Himmelsbach, D.S. and Borneman, W.S. (1990).Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in Gramineous plants. *Phytochemistry* 29, 3705–3709.
- Hartley, R.D., Whatley, F.R., Harris, P.J.(1988). 4:4'-Dihydroxitruilic acid as a component of cell walls of *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* 27, 349-351.
- Hayashi, T.(1989) Xyloglucans in the Primary Cell Wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 139-168.
- Heredia, A. and Dominguez, E.(2009).The plant cuticle: a complex lipid barrier between the plant and the environment. An overview. In: Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. C. Dishovsky and A. Pivovarov (eds.). Springer, Netherlands, pp. 109-116.
- Hu, H., Brown, P.H., Labavitch, J.M.(1996). Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany*, 47, 227-232.
- Hu, H., and Brown, P.H.(1997).Absorption of boron by plants roots. *Plant and Soil* 193: 49-58.
- 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.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A., Darvill, A. and Albersheim, P.(1999).The Plant Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II Self-assembles into a Covalently Cross-linked Dimer. *The Journal of biological chemistry*.Vol. 274, No. 19, 13098–13104.
- Ishii, T. and Matsunaga, T. (1996). Isolation and characterization of a boron rhamnogalacturonan II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr Res.*, 284, 1–9.
- Ishii, T. and Tobita, T. (1993) Structural characterisation of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls. *Carbohydr. Res.* 248, 701–704.
- Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 12: 111-127.
- Jurd, L. 1956. A spectrophotometric method for the detection of o-dihydroxyl groups in flavonoid compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 63: 376-381.
- Karabourniotis, G., Kotsabassidis, D., Manetas, Y. (1995). Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Canadian Journal of Botany*, 73,376-383.

- Karioti, A., Chatzopoulou, A., Bilia, A.R., Liakopoulos, G., Stavrianakou, S. and Skaltsa, H. (2006). Secoiridoid glucosides in *Olea europaea* under B deficiency. Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1898-1903.
- Kato, A., Azuma, J.-I and Koshijima, T., (1983). A new feruloylated trisaccharide from bagasse. *Chem Lett* 1, 137-140.
- Kato, Y., and Nevins, D.J.(1985) Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- α -L-arabinofuranosyl)-1-(3-O-P-xylopiranosyl)-(4-D)-D-xylopyranose as a component of *Zea* shoot cell walls. *Carbohydr. Res.* 154, 177-187.
- Kato, Y., and Nevins, D.J. (1986) Fine structure of (1-3), (1-4)-3-D-glucan from *Zea* shoot cell-walls. *Carbohydr. Res.* 147, 69-85.
- Kobayashi, M., Matoh, T. and Azuma, J. (1996). Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.*, 110, 1017-1020.
- Kobayashi, M., Ohno, K., and Matoh, 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*. Ed. by G. Kerstiens: an integrated functional approach. *BIOS scientific publishers, Oxford*, 83-108.
- Kroon, P.A. and Williamson, G.(1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 355-361.
- Lam, T. B. T., Kadoya, K., Iiyama, K.(2001). Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*. 57, 987-992.
- Lanoue, L., Trollinger, D.R., Strong, P.L., and Keen, C.L.(2000). Functional impairments in preimplantation mouse embryos following boron deficiency. *FASEB J* 14A, 539.
- Lemarchand, D., Gaillardet, J., Lewin, E., Allegre, C.J.(2000). The influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH. *Nature* 408, 951-954.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H. and Keegstra, K.(2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 621-630.
- Lewis, N. G. and Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 455-496.
- Liakopoulos, G. and 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., Nikolopoulos, D., Karvonis, E., Vekkos, K. A., Psaroudi, V., and 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.
- Liners, F., Letesson, J.J., Didembourg, C. and Van Cutsem, P.(1989). Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* 91, 1419-1424.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman, Fifth Edition.
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. (1992). Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3, 229-239.
- Lukaszewski, K.M. and Blevins, D.G. (1996). Root growth inhibition in boron-deficient or Aluminium-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiology*, 112: 1135-1140.
- Marschner, H.(1995). Mineral nutrition of higher plants. second edition. 889pp. London: *Academic Press*.

Βιβλιογραφία

- Mateo, P. Bonilla, I., Fernandez-Valiente, E. and Sanchez-Maeso, E. (1986). Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119. *Plant Physiol.* 81, 430-433.
- Matoh, T., Ishigaki, K.-I., Mizutani, M., Matsunaga, W., Takabe, K. (1992). Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for an intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant and Cell Physiology*, 33, 1135-1141.
- Mengel, K. and Kirkby, E.A. (2001). Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers.
- Metzler, D.E. (2001). Biochemistry. The chemical reactions of living cells, 2nd edition, Harcourt, San Diego.
- Mohnen, D. and Caffall, K.H. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 1879-1900.
- Muhling, K.H., Wimmer, M. and Goldbach, H.E. (1998). Apoplastic and membrane-associated Ca²⁺ in leaves and roots as affected by boron deficiency. *Physiol. Plant.*, 102, 179-184.
- Nielsen, F.H. (2000). The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition* 16, 512-514.
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P. and Darvill, A.G. (2001). Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*, 294, 846-849.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G. (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109-139.
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. 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.
- Parr, A. J. and Loughman, B. C. (1983). Boron and membrane function in plants. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants*, D. A. Robb and W. S. Pierpoint (eds.). London, UK: Academic Press, pp. 87-107.
- Pfeffer, H., Dannel, F., and Römheld, V. (1998). Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? *Physiol. Plant*, 104, 479-485.
- Pont-Lezica, R.F., McNally, J.G. and Pickard, B.G. (1993). Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: Some hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16, 111-123.
- Popper, Z.A. (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 286-292.
- Power, P.P., Woods, W.G. (1997). The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil* 193, 1-13.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabber, J.H., Steinhart, H. (2004). Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem Rev*, 3, 79-96.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H., Hatfield, R. D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydromers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1, 3485-3498.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57, 929-967.
- Römheld, V. and Marschner, H. (1991). Functions of micronutrients in plants. In *Micronutrients in Agriculture*, 2nd ed. Eds. J.J. Mordvedt, F.R. Cox, L.M. Shuman and R.M. Welch. SSSA Book Series, No. 4, Madison, WI, USA, pp 297-328.
- Rowell, R. et al. (2005). Cell Wall Chemistry. In: *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Ed. R. Rowell.
- Reid J.S.G. (1997). Carbohydrate Metabolism: Structural Carbohydrates. In: *Plant Biochemistry* (Ed. P.M. Dey and J.B. Harborne), 205-236, Academic Press.

- Rowe, R.I., Bouzan, C., Nabili, S., and Eckhert, C. D.(1998).The response of trout and zebrafish embryos to low and high boron concentrations is U-shaped. *Biological Trace Element Research* 66, 261-270.
- 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.
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A. C., Findlay, K., Reiter, W.D., McCann, M. C. (2003).Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.* 132, 1033-1040.
- Salisbury, F.B., and Ross, C.W.,(1992).Plant Physiology and Plant Cells. In *Plant Physiology*, Wadsworth, Inc.,Belmont, CA, pp. 3-26.
- Sánchez, M., Peña, M.J., Revilla, G. and Zarra, I.(1996).Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* Hypocotyl. *Plant Physiol.* 111,941-946.
- Saulnier, L., Crepeau, M.-J., Lahaye, M., Thibault, J.-F., Garcia-Conesa, M.T., Kroon, P.A., Williamson, G.(1999).Isolation and structural determination of two 5,50-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydr Res* 320, 82-92.
- Shelp, B.J., Marentes, E., Kitheka, A.M. and Vivekanandan, P.(1995). Boron mobility in plants. *Physiol. Plant.* 94, 356-361.
- Shelp, B.J.(1993). Physiology and biochemistry of boron in plants. In:Gupta UC, ed. Boron and its Role in Crop Production. CRC Press,Boca Raton. pp. 53-85.
- Shirley, B.W.(1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*, 1, 377-382.
- Shorrocks, V. (1997). The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil* 193, 121-148.
- Showalter, A.(1993). Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *The Plant Cell*, 5, 9-23.
- Smith, M.M. and Hartley, R.D.(1983).Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.* 118, 65-80.
- Smyth, D. A. and Dugger, W. M. (1981).Cellular changes during boron deficient culture of the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Physiol Plant.* 51, 111-117.
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G.(2006). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*, 56, 293-300.
- Strack, D.(1997). Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*, 387-416.
- Talmadge,K.W.,Keegstra,K., Bauer, W.D., Albersheim, P.,(1973). The structure of plant cell walls I.The macromolecular components of the walls of suspension-cultures sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* 51, 158-173.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T.(2002). Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420, 337-340.
- Tanaka, M., and Fujiwara, T.(2008). Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Eur. J. Physiol.* 456, 671-677.
- Taylor, N.G.(2008). Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist* 178 , 239-252.
- Teasdale, R.D. and Richards, D.K.(1990). Boron deficiency in cultured pine cells. Quantitative studies of the interaction with Ca and Mg. *Plant Physiol* 93, 1071-1077.
- Torssell, K.(1956).Chemistry of arylboric acids. VI. Effects of arylboric acids on wheat roots and the role of boron in plants. *Physiol. Plant* 9,652-664.
- Turner, L.B., Mueller-Harvey, I. and McAllen, A.B.,(1993). Lightinduced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. *Phytochemistry* 33, 791-796.

Βιβλιογραφία

- Van den Berg, R., Peters, J.A. and Van Bekkum, H.(1994).The structure and (local) stability constants of borate esters of mono- and di-saccharides as studied by ^{11}B and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 253, 1-12.
- Wallace, G. and Fry, S.C. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151, 229–267.
- Walton, T.J.,(1990).Waxes, cutin and suberin. *Methods Plant Biochem.*4, 105–158.
- Wang, Z.Y., Tang, Y.L., Zhang, F.S. and Wang, H. (1999). Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. *J. Plant Nutr.*, 22, 543-550
- Warrington, K. (1923). The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.* 37, 629–672.
- Welch, R.M. (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 49–82.
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Knox, J. P. (2001). In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 213, 37-44.
- Wimmer, M. A. and Goldbach, H. E.(1999)Influence of Ca^{2+} and pH on the stability of different boron fractions in intact roots of *Vicia faba* L. *Plant Biol.* 1, 632–637.
- Wimmer, M. A., Lochnit, G., Bassil, E., Mühlhng, K.H. and Goldbach, H.E.(2009) Membrane-Associated, Boron-Interacting Proteins Isolated by Boronate Affinity Chromatography. *Plant Cell Physiol.* 50(7), 1292–1304.
- Woods, W.G. (1996). A review of possible boron speciation relating to its essentiality. *J. Tr. Elem. Exp. Med.*, 9, 153-163.
- Yang, J. G. and Uchiyama, T. (2000). Hydroxycinnamic acids and their dimers involved in the cessation of cell elongation in *Mentha* suspension culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(8), 1572–1579.
- Yu, Q., Baluska, F., Jasper, F., Menzel, D., Goldbach, H. E. (2003)Short-term boron deprivation enhances levels of cytoskeletal proteins in maize, but not zucchini, root apices. *Physiol. Plant.* 117, 270–278.
- Yu, Q., Wingender, R., Schulz, M., Baluška, F. and Goldbach, H.E. (2001)Short – term boron deprivation induces increased levels of cytoskeletal proteins in *Arabidopsis* roots. *Plant Biology*, 3, 335–340.
- Zablackis, E., Huang, J.,Muller, B., Darvill, A.G. and Albersheim, P.(2005) Characterization of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Plant Physiology* 107, 1129-1138.
- Αλεξάνδρου, Ν.Ε., Βάρβογλης, Α.Γ.(1996) Οργανική Χημεία. Εκδόσεις ΖΗΤΗ , Θεσσαλονίκη.
- Δεληβόπουλος Σ.Γ. (1994) Μορφολογία και ανατομία φυτών, Θεσσαλονίκη.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. (1992). Η ανόργανη διατροφή των φυτών. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Δροσόπουλος,Ι.Β. (1998).Φυσιολογία Φυτών ΙΙ.Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Καραμπουρνιώτης, Γ.Α. (2003). Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Κίντζιος, Σ.Ε. (1994). Εισαγωγή στην κυτταρολογία. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Κλουβάτου, Α. 2006. Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου των φαινολικών συστατικών τα οποία συσσωρεύονται στην ελιά (*Olea europaea* L.) υπό συνθήκες ανεπάρκειας βορίου. Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Τσέκος Ιωάννης Β., Ηλίας Ηλίας Φ. (2007). Μορφολογία και ανατομία φυτών. Θεσσαλονίκη.

Περίληψη

Το βόριο υπό τη μορφή του βορικού οξέος εντοπίζεται σε όλα τα κυτταρικά υποδιαμερίσματα, ωστόσο οι μεγαλύτερες ποσότητες του στοιχείου συμμετέχουν σε διεστερικά σύμπλοκα στο πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος σχηματίζοντας διμερή αλυσίδων ραμνογαλακτουρονάνης ΙΙ μέσω των καταλοίπων απιόζης των πλάγιων αλυσίδων του παραπάνω πηκτινικού πολυμερούς. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η υπόθεση σύμφωνα με την οποία το βορικό οξύ μπορεί να συμμετάσχει σε σύμπλοκα στα οποία ο ένας υποκαταστάτης παραμένει η απιόζη της ραμνογαλακτουρονάνης ΙΙ ενώ ο άλλος είναι μόριο χαμηλού μοριακού βάρους με κατάλληλη μοριακή δομή. Με τον τρόπο αυτό, μόρια όπως φαινολικά συστατικά με δομή ορθο-δι-φαινόλης μπορούν να προσδεθούν στο κυτταρικό τοίχωμα. Πειράματα με ένα φαινολικό συστατικό της παραπάνω δομής, το καφεϊκό οξύ, έδειξαν ότι σχηματίζει αυθόρμητα σταθερά σύμπλοκα με το βορικό οξύ και ότι το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων μορίων μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της βαθυχρωμικής μετατόπισης του φάσματος απορρόφησης του μορίου στην υπεριώδη περιοχή. Μέσω της ίδιας τεχνικής δείχθηκε πως ένα μόριο οργανοβορανίου με ανάλογη του βορικού οξέος δομή αλλά μικρότερη τιμή pK_a , συγκεκριμένα το 3-νιτροφαινολο-βορονικό οξύ (3-NBA) μπορεί, σε πολύ μικρότερες γραμμομοριακές αναλογίες με το φαινολικό συστατικό (έως 1:1), να υποκαταστήσει εκλεκτικά το βορικό οξύ στα υφιστάμενα σύμπλοκα. Σημειώνεται πως επειδή το 3-NBA διαθέτει δύο ζεύγη υδροξυλομάδων (αντί τεσσάρων του βορικού οξέος), προκαλεί διάσπαση των γεφυρών βορικού οξέος των υφιστάμενων συμπλόκων και συνεπώς διαχωρισμό των ομο- ή ετεροδιμερών συμπλόκων. Βάσει των παραπάνω ιδιοτήτων του 3-NBA, η επώαση απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων με το παραπάνω μόριο θα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τυχόν υποκαταστατών όπως φαινολικά συστατικά ή άλλων χαμηλού μοριακού βάρους και ανάλογης δομής μορίων από το πηκτινικό κλάσμα τα οποία προσδένονται εξειδικευμένα μέσω βορικών εστέρων. Πράγματι, η επίδραση του 3-NBA σε κυτταρικά τοιχώματα απομονωμένα από διαφορετικούς ιστούς (φύλλα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων και ρίζες) ελιάς έδειξε την απελευθέρωση δύο διακριτών μορίων καθώς και βορικού οξέος στο διάλυμα επώασης σε ποσότητες οι οποίες σχετίζονται με το είδος του ιστού. Αξιοσημείωτα, οι ποσότητες των υπό μελέτη μορίων συσχετίστηκαν με αυτές του βορικού οξέος υποδηλώνοντας χημική στοιχειομετρία. Φασματοσκοπική ανάλυση των υπό μελέτη μορίων έδειξε πως πρόκειται για μόρια που φέρουν αρωματικό σύστημα και χρωμοφόρες ομάδες, τυπικά χαρακτηριστικά φαινολικών συστατικών. Περαιτέρω πειράματα απαιτούνται για την πλήρη διευκρίνιση της μοριακής δομής και της επιβεβαίωσης της ύπαρξης συστήματος ορθο-υδροξυλίων σε κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση ώστε να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με το βορικό οξύ.

Abstract

Boron in the form of boric acid, is present in all subcellular compartments, while the principal fractions participate in diester complexes in the pectic fraction of the cell wall forming rhamnogalacturonan-II dimers via the apiose residues of the side chains of the above polymer. In the present work the hypothesis that boric acid may be involved in complexes in which one ligand remains as the apiose of rhamnogalacturonan-II while the other could be a low-molecular weight ligand possessing an appropriate molecular structure, is examined. In this way, molecules such as phenolic compounds with ortho-di-phenol configuration could be attached to the cell wall. Experiments with caffeic acid, a phenolic compound possessing the above mentioned structure, showed that stable complexes with boric acid are readily formed and that the percentage of complexed molecules can be estimated through the bathochromic shift of the absorption spectrum of the phenolic compound in the ultraviolet region. Via the same technique, it was shown that organoboranes possessing a similar structure with boric acid but exhibiting lower pK_a , such as 3-nitrophenyl-boronic acid (3-NBA), may selectively substitute boric acid in such complexes at much lower molar ratios (down to 1:1) compared to boric acid. Notably, since the 3-NBA molecule offers two pairs of hydroxyl groups (instead of four of the boric acid molecule), results in the disruption of borate diester bridges in existing complexes thus causing the separation of homo- or hetero-dimer complexes. Based on the above attributes of 3-NBA, incubation of isolated cell walls with this molecule would result in the release of such ligands, either phenolic compounds or other low molecular weight and structurally related molecules, if they exist as borate esters, in the pectic fraction of the cell wall. Indeed, the effect of 3-NBA in isolated cell walls from various olive tissues (leaves of different developmental stages and roots), resulted in the release of two distinguishable molecules as well as boric acid in the incubation solution in quantities that were tissue-related. Interestingly, the quantities of the molecules under study were correlated with those of boric acid, implying chemical stoichiometry. Spectroscopic analysis of these molecules showed that they possess an aromatic system and one or more chromophores resembling the phenol structure. Further experiments are required for complete elucidation of the molecular structure and confirmation of the existence of an ortho-hydroxyl system possessing a stereochemical configuration which could allow the formation of stable complexes with boric acid.

