

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ  
ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΑ ΟΠΟΙΑ  
ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ (*Olea europaea* L.)  
ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΒΟΡΙΟΥ



ΑΣΠΑΣΙΑ Δ. ΚΛΟΥΒΑΤΟΥ

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

ΑΘΗΝΑ 2006



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

Διερεύνηση του Φυσιολογικού Ρόλου  
των Φαινολικών Συστατικών τα οποία  
Συσσωρεύονται στην Ελιά (*Olea europaea* L.)  
υπό Συνθήκες Ανεπάρκειας Βορίου

ΑΣΠΑΣΙΑ Δ. ΚΛΟΥΒΑΤΟΥ

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

ΑΘΗΝΑ 2006



Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εγκρίθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύγκλησης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 2/26-10-2005). Η πενταμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ 7/29-11-2005.

#### **ΠΕΝΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Γ. Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων)

Δ. Μπουράνης, Αναπληρωτής Καθηγητής (μέλος)

Σ. Κίντζιος, Αναπληρωτής Καθηγητής (μέλος)

Γ. Αϊβαλάκης, Επικουρος καθηγητής (μέλος)

Χ. Κιτσάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια (μέλος)

Η εκπόνηση της μεταπτυχιακής μελέτης υποστηρίχθηκε οικονομικά από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών



# Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	v
Πρόλογος.....	9
Εισαγωγή .....	11
I. Ανόργανη διατροφή φυτών .....	11
I.1. Βασικές αρχές.....	11
I.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος.....	12
I.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού .	12
I.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων .....	15
I.5. Τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων. ....	15
1.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων.....	16
1.5.2. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη και τον πρωτογενή μεταβολισμό των ανώτερων φυτών. ....	18
1.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στον δευτερογενή μεταβολισμό.....	18
II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών.....	20
II.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου και κυρίαρχα χημικά είδη .....	22
II.2. Μορφές εδαφικού βορίου, πρόσληψη από το ριζικό σύστημα των ανώτερων φυτών και πρωτογενής διανομή του βορίου.....	23
II.3. Κατανομή του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο .....	26
II.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού. ....	27
II.5. Ο ρόλος του βορίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών.....	28
II.5.1. Το βόριο συμμετέχει στην δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων.....	29
II.5.2. Το βόριο αποτελεί παράγοντα σταθερότητας και λειτουργικότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.....	32
II.5.3. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των φυτών.....	33
II.5.4. Ο ρόλος του βορίου στην φωτοσυνθετική λειτουργία και την διανομή σακχάρων. ....	34
II.5.5. Ο ρόλος του βορίου στον δευτερογενή μεταβολισμό.....	35
II.5.5.1. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων.....	36
II.5.5.2. Η αλληλεπίδραση βορίου και φαινολικών ενώσεων στα κύτταρα. ....	36
Σκοπός της εργασίας.....	39

## Περιεχόμενα

Υλικά και Μέθοδοι .....	41
I. Πειράματα με υδροπονική καλλιέργεια φυταρίων ελιάς .....	41
I.1. Φυτικό Υλικό και Περιγραφή των Συνθηκών Καλλιέργειας.....	41
I.1.1. Προετοιμασία του Φυτικού Υλικού και του Υποστρώματος Καλλιέργειας .....	41
I.1.2. Περιγραφή του Συστήματος Πειραματικής Υδροπονικής Καλλιέργειας. ....	42
I.1.3. Συνθήκες Υδροπονικής Καλλιέργειας.....	43
I.1.4. Κατηγορίες Δειγμάτων και Πειραματικοί Χειρισμοί .....	44
I.1.4.1. Προκαταρκτικά πειράματα .....	44
I.1.4.1.α. Προκαταρκτικό πείραμα επίδρασης ελλειματικής συγκέντρωσης βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας στα φαινολικά συστατικά των φύλλων .....	44
I.1.4.1.β. Προκαταρκτικό πείραμα μέτρησης συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών των φύλλων καθ' ύψος .....	44
I.1.4.1.γ. Προκαταρκτικό πείραμα της επίδρασης της μερικής αποφύλλωσης στα φαινολικά συστατικά των φύλλων.....	44
I.1.4.2. Κύριο πείραμα .....	45
I.2. Τρόπος Διενέργειας Μετρήσεων .....	45
I.2.1. Παράμετροι ανάπτυξης και παράμετροι χημικής σύστασης .....	45
I.2.2. Συγκέντρωση Βορίου .....	45
I.2.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων για Μέτρηση ολικού βορίου .....	45
I.2.2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων για Μέτρηση κλάσματος αδιάλυτου βορίου.....	46
I.2.2.3. Μέτρηση Συγκέντρωσης Βορίου Μέσω Χρωματικής Αντίδρασης Αζωμεθίνης. ....	46
I.2.3. Ανάλυση Φαινολικών .....	46
I.2.3.1. Μέτρηση διαλυτών φαινολικών .....	46
I.2.3.2. Μέτρηση φαινολικών υδρολύματος κυτταρικών τοιχωμάτων .	46
II. Πειράματα με απομονωμένα φαινολικά .....	47
II.1. Χρήση του βαθυχρωμικού φαινομένου στην υπεριώδη φασματοσκοπία για τη μελέτη του σχηματισμού συμπλόκων φαινολικών συστατικών-βορικού οξέος .....	47
II.2. Μελέτη σχηματισμού συμπλόκων βορικού οξέος με διαφορετικές δομές φαινολικών συστατικών .....	48
II.3. Επίδραση της αναλογίας των δύο μορίων στο σχηματισμό του συμπλόκου .....	48
II.4. Μελέτη του χρόνου σχηματισμού του συμπλόκου.....	48



Αποτελέσματα .....	51
I. Προκαταρκτικά πειράματα .....	51
I.1. Μέτρηση συγκέντρωσης φαινολικών καθ' ύψος.....	51
I.2. Μέτρηση επίδρασης της μερικής αποφύλλωσης στην συγκέντρωση φαινολικών καθ' ύψος .....	52
II. Κύρια πειράματα.....	54
II.1. Διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών κατά την διάρκεια καλλιέργειας φυτών ελιάς με ελλειματικές συγκεντρώσεις βορίου στο θρεπτικό διάλυμα .....	54
II.2. Παράμετροι ανάπτυξης των φυτών στο τέλος του πειράματος .....	55
II.3. Μέτρηση ολικού βορίου.....	57
II.4. Μέτρηση κλάσματος αδιάλυτου βορίου .....	57
II.5. Συγκέντρωση φαινολικών, διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος σε δείγματα φύλλων της τελικής δειγματοληψίας .....	59
III. In vitro Πειράματα.....	61
III.1. Σχηματισμός συμπλόκων Βορικού οξέος με επιλεγμένες δομές φαινολικών συστατικών .....	61
III.2. Επίδραση της αναλογίας των δυο μορίων στον σχηματισμό του συμπλόκου .....	64
Συζήτηση .....	67
Βιβλιογραφία .....	71
Περίληψη .....	83



## Πρόλογος

Οι μεταπτυχιακές σπουδές, μου έδωσαν την ευκαιρία να έρθω πιο κοντά στα μυστικά που κρύβει η φύση του φυτού της ελιάς, ένα φυτό που συναντά κανείς σε κάθε τόπο της χώρας μας.

Σημαντικότερο ρόλο στην αποκτηση αυτής μου της εμπειρίας έπαιξε ο Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, τον οποίο ευχαριστώ θερμά, πρώτα από όλα για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει όλα τα χρόνια των σπουδών μου και κυρίως για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω την ανθρώπινη πλευρά της επιστήμης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Μπουράνη Δημήτριο και κ. Κίντζιο Σπυρίδωνα και τους Επίκουρους καθηγητές κ. Κιτσάκη Χριστίνα και κ. Αϊβαλάκη Γεώργιο για την συμμετοχή τους στην Πενταμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για την ευχάριστη και φιλική διάθεση που τους διέκρινε κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Γεώργιο Λιακόπουλο που όχι μόνο σαν επιστήμονας αλλά και σαν φίλος μου συμπαραστάθηκε σε αυτή μου την προσπάθεια και σε κάθε μου δυσκολία με στήριζε άμεσα.

Επίσης ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Σωτηρία-Βασιλική Σταυριανάκου και την Διδάκτορα Βάλλυ Λιάκουρα καθώς επίσης τον Διδάκτορα και επιστημονικό μέλος του εργαστηρίου Δημοσθένη Νικολόπουλο για την καλή τους διάθεση και για τις επιστημονικές τους παρεμβάσεις.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γεωργία Τοουλάκου που αποτέλεσε για εμένα μια πολύ καλή συμφοιτήτρια και με την οποία μοιραζόμασταν με καλή διάθεση τις δυσκολίες που αντιμετώπιζε η κάθε μια κατά την διάρκεια των πειραμάτων μας. Ακόμη ευχαριστώ, την πτυχιούχο γεωπόνο Βαρβάρα Ψαρούδη και τον προπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Παπαχρήστου για την βοήθειά τους και το ευχάριστο κλίμα που καλλιέργησαν.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους καλούς μου φίλους Ευαγγελία Ρέστα, Βαγγέλη Καρβώνη και Κορνήλιο Βέκκο, οι οποίοι σε κάθε δύσκολη στιγμή μου ήξεραν τον τρόπο να με στηρίξουν και να μου δώσουν δύναμη να συνεχίσω.

Κλείνοντας ευχαριστώ περισσότερο από όλους τους πιο κοντινούς μου ανθρώπους, τους γονείς και τα αδέρφια μου που ανέκαθεν αποτελούσαν στηρίγματα σε κάθε μου προσπάθεια και η αγάπη τους αποτέλεσε κίνητρο για να συνεχίσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.



# Εισαγωγή

## **I. Ανόργανη διατροφή φυτών**

Τα φυτά αποτελούν φωτοσυνθετικά αυτότροφους οργανισμούς και συνεπώς είναι ικανά να συνθέτουν το σύνολο των δομικών και λειτουργικών τους μορίων, αποκλειστικά από ανόργανα συστατικά. Απαραίτητη προϋπόθεση για το παραπάνω είναι η πρόσληψη ανόργανων συστατικών κυρίως από το εδαφικό περιβάλλον. Η ανόργανη διατροφή των φυτών ασχολείται κατά κύριο λόγο με τους φυσιολογικούς μηχανισμούς του φυτικού οργανισμού μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η πρόσληψη, διακίνηση, κατανομή καθώς και αξιοποίηση των ανόργανων συστατικών από το περιβάλλον (Δροσόπουλος, 1992). Η πρόσληψη και η αξιοποίηση των ανόργανων συστατικών από τους φυτικούς οργανισμούς με την βοήθεια της ενέργειας του ήλιου είναι απαραίτητη τόσο για την ολοκλήρωση και την ομαλή διεξαγωγή του βιολογικού τους κύκλου όσο και για την προσφορά ανόργανων στοιχείων από το αβιοτικό περιβάλλον προς όλους τους ετερότροφους οργανισμούς - καταναλωτές (Taiz and Zeiger, 1998). Η ανόργανη διατροφή παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην φυσιολογία και ανάπτυξη των φυτών και συνεπώς αποτελεί σημαντικότερο τομέα της σύγχρονης Γεωπονικής επιστήμης.

### **I.1. Βασικές αρχές**

Στο φυτικό σώμα ανιχνεύεται ένας μεγάλος αριθμός ανόργανων στοιχείων. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να ανιχνευτούν έως και 60 διαφορετικά στοιχεία στην ξηρή ουσία των φυτών (Chrispeels and Sadava, 1994). Από αυτά, ένας περιορισμένος αριθμός ανήκει στην κατηγορία των ονομαζόμενων απαραίτητων στοιχείων (Tattini et al., 1996). Ο όρος αναφέρεται στα στοιχεία εκείνα τα οποία απαιτούνται για την ομαλή ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του φυτού (Δροσοπουλος, 1992).

Έως σήμερα, 17 ανόργανα στοιχεία έχουν χαρακτηριστεί ως απαραίτητα για τα φυτά. Πρόκειται για τα C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B, Ni. Τα απαραίτητα στοιχεία χωρίζονται σε μακροστοιχεία (C, H, O, N, P, K, Ca, P, Mg, S) επειδή απαιτούνται σε σχετικά μεγάλα ποσά και σε μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία (Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B, Ni) διότι απαιτούνται σε πολύ μικρότερες ποσότητες συγκριτικά με τα μακροστοιχεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο σίδηρος βρίσκεται στο όριο μεταξύ μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων. Υπάρχουν επίσης ορισμένα στοιχεία τα οποία θεωρούνται απαραίτητα σε ιδιαίτερες ομάδες κατώτερων ή ανώτερων φυτών αλλά όχι για το σύνολο των ανώτερων φυτικών

## Εισαγωγή

ειδών. Για το λόγο αυτό δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων. Αναφέρονται ως ωφέλιμα θρεπτικά στοιχεία και είναι τα Na, Co, Si, V, Se, Ga, Al, J, Ti, κ.λπ. (Taiz and Zeiger, 1998).

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

Τα στοιχεία C, H και O προέρχονται εμμέσως από το CO<sub>2</sub> και από το H<sub>2</sub>O. Τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία απαντώνται στην στερεή φάση του εδάφους και προσλαμβάνονται άμεσα μέσω του ριζικού συστήματος από το εδαφικό διάλυμα υπό τη μορφή ιόντων. Τόσο τα εδαφικά χαρακτηριστικά όσο και οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φυτού και εδάφους διαμορφώνουν την διαθεσιμότητα ενός δεδομένου θρεπτικού στοιχείου (Δροσοπουλος, 1992). Η διαθεσιμότητα ενός θρεπτικού στοιχείου καθορίζεται τόσο από την συγκέντρωσή του στο εδαφικό διάλυμα όσο και από την ικανότητα πρόσληψής του από την ρίζα (Charin, 1980). Η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων στο εδαφικό διάλυμα παρουσιάζεται μεταβαλλόμενη λόγω των αυξομειώσεων της συγκέντρωσης του νερού στο έδαφος. Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων στο διάλυμα εξαρτάται επίσης από την κατανομή τους μεταξύ των τριών φάσεων του εδάφους καθώς επίσης και από παράγοντες που καθορίζουν τον ρυθμό μετακίνησης των στοιχείων από την μια φάση στην άλλη (Pearson and Rengel, 1997).

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

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

Η πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων από τις ρίζες των φυτών γίνεται από μια περιοχή του εδάφους κοντά στο ριζικό σύστημα, η οποία αναφέρεται ως όγκος ή ζώνη απορρόφησης. Τα ιόντα του εδάφους μπορούν να φτάσουν στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος με τρεις τρόπους. Είτε να προσληφθούν μέσω άμεσης επαφής των ριζών με τα εδαφικά τεμαχίδια, είτε μέσω διάχυσης των ιόντων μέσω του εδαφικού διαλύματος, είτε τέλος με μετακίνηση των ιόντων μέσω μαζικής ροής κατά την κίνηση του εδαφικού διαλύματος κυρίως

λόγω του ρεύματος της διαπνοής (Δροσόπουλος, 1992). Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο, η πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων γίνεται απευθείας από την στερεή φάση του εδάφους, χωρίς την μεσολάβηση του εδαφικού διαλύματος και στηρίζεται στην δυνατότητα ανταλλαγής ιόντων, τα οποία είναι δεσμευμένα πάνω στα κολλοειδή του εδάφους, με κατάλληλα ιόντα αντικατάστασης τα οποία απεκκρίνονται από τις ρίζες. Το φαινόμενο της διάχυσης των ιόντων βασίζεται στην κίνηση τους από μια περιοχή υψηλής προς μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης. Καθώς το ριζικό σύστημα απορροφά ιόντα από το εδαφικό διάλυμα με ρυθμούς ταχύτερους από τους αντίστοιχους ρυθμούς ανανέωσης τους από τις ευρύτερες περιοχές του εδάφους, προκαλείται μια διαφορά συγκέντρωσης, η οποία προωθεί την κίνηση των ιόντων μέσω διάχυσης (Δροσόπουλος, 1992). Η μετακίνηση των ιόντων προς το ριζικό σύστημα μέσω μαζικής ροής, οφείλεται στην κίνηση του εδαφικού διαλύματος από ευρύτερες εδαφικές περιοχές προς τη ζώνη απορρόφησης, κίνηση που προκαλείται λόγω της λειτουργίας του διαπνευστικού ρεύματος των φυτών. Η μαζική ροή ευνοεί την μετακίνηση των ευκίνητων θρεπτικών στοιχείων, εφόσον αυτά απαντώνται σε επαρκείς συγκεντρώσεις στο έδαφος.

Το επόμενο στάδιο της εισόδου και της μεταφοράς των ιόντων και του νερού από την επιφάνεια απορρόφησης και διαμέσου των κυττάρων της ρίζας (κατά ακτίνα κίνηση), περιλαμβάνει δύο εναλλακτικούς τύπους κίνησης. Την αποπλαστική και την συμπλαστική κίνηση. Ο αποπλάστης περιλαμβάνει την υδατική φάση που εντοπίζεται στον χώρο μεταξύ των κυττάρων και εκείνη που είναι προσροφημένη στα κυτταρικά τοιχώματα, λόγω της παρουσίας των πόρων του πλέγματος των πολυμερών (Canny, 1995; Tattini et al., 1996). Συνεπώς στην αποπλαστική κίνηση δεν εμπλέκεται το ζωντανό περιεχόμενο του κυττάρου. Αντίθετα η συμπλαστική κίνηση περιλαμβάνει την πορεία του νερού και των ιόντων διαμέσου της κυτοπλασματικής μεμβράνης και εντός του κυτοπλάσματος από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλασμοδεσμών. Στην κίνηση αυτή παρεμβάλλονται ισχυρότερες αντιστάσεις συγκριτικά με την αποπλαστική κίνηση. Παρόλο που η κίνηση μπορεί εναλλάσσεται μεταξύ των δύο παραπάνω τύπων, από ένα σημείο και μετά η συμπλαστική κίνηση αποτελεί την μοναδική διαδρομή μέσω της οποίας τα ιόντα μπορούν να οδηγηθούν στα αγωγά στοιχεία και ακολούθως στο υπέργειο μέρος του φυτού. Η αποπλαστική οδός θεωρείται παθητική κίνηση, βασίζεται σε μηχανισμούς διάχυσης και μαζικής ροής (Marschner, 1995) και εξαρτάται από ανατομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων καθώς και από την αλληλεπίδραση μεταξύ εδάφους, φυτού και ατμόσφαιρας (Steudle, 2001). Όσον αφορά στην συμπλαστική οδό είναι φανερό ότι απαιτείται η διέλευση του νερού και των ιόντων δια μέσω της

## Εισαγωγή

κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η τελευταία αποτελεί ένα εμπόδιο στην κίνηση αυτή λόγω της διπλής στρώσης των φωσφορολιπιδίων. Η διέλευση διαμέσου της μεμβράνης πραγματοποιείται με την συμβολή μεμβρανικών πρωτεϊνών, εξειδικευμένων ως προς το είδος των μορίων που μεταφέρουν. Η κίνηση των ιόντων διαμέσου των μεμβρανικών πρωτεϊνών γίνεται είτε παθητικά, λόγω της ευνοϊκής διαβάθμισης του ηλεκτροχημικού δυναμικού (πρωτεΐνες διευκολυνόμενης μεταφοράς, συμμεταφορείς, αντιμεταφορείς και κανάλια ιόντων), είτε ενεργητικά, μέσω της δαπάνης μεταβολικής ενέργειας προς αποκατάσταση ευνοϊκής διαβάθμισης ηλεκτροχημικού δυναμικού (αντλίες πρωτονίων και ABC μεταφορείς) (Tanner and Caspari, 1996). Αξίζει να σημειωθεί ότι το νερό εισέρχεται εντός των κυττάρων δια μέσου της διπλής στοιβάδας των φωσφορολιπιδίων ή μέσω ειδικών καναλιών μεταφοράς που ονομάζονται υδροπορίνες. Η κίνηση του νερού μέσω των υδροπορινών αποτελεί μια χαμηλής αντίστασης δίοδο από και προς τα κύτταρα μέσω μαζικής μεταφοράς ενώ η κατεύθυνση κίνησης καθορίζεται από την κατεύθυνση της διαβάθμισης του δυναμικού νερού μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος (Maurel, 1997).

Την πρόσληψη του νερού και των ιόντων από τα κύτταρα της ρίζας διαδέχεται η κίνησή τους από τον φλοιό της ρίζας μέχρι την ενδοδερμίδα. Σε αυτό το σημείο παρατηρείται διαφοροποίηση της κίνησης του νερού από εκείνη των ιόντων. Το νερό μεταφέρεται αποπλαστικά μέχρι την ενδοδερμίδα, ακολουθώντας με αυτόν τον τρόπο την οδό της μικρότερης αντίστασης. Τα ιόντα από την άλλη πλευρά κινούνται τόσο αποπλαστικά όσο και συμπλαστικά μέσω διαχύσεως διασχίζοντας το φλοιώδες παρέγχυμα (Baldioli et al., 1996; Aerts and Charin, 2000). Πρέπει να σημειωθεί ότι ανεξάρτητα από την πορεία που ακολουθούν τα ιόντα και το νερό μέχρι τον κεντρικό κύλινδρο και τα αγγεία του ξύλου, η παρεμβολή της κασπαρικής λωρίδας, η οποία αποτελεί έναν αποπλαστικό φραγμό, εξαναγκάζει τόσο το νερό όσο και τα ιόντα να κινηθούν συμπλαστικά (Baldioli et al., 1996; Marschner, 1995). Στην συνέχεια ακολουθεί μεταφορά των ιόντων στα αγγεία του ξύλου, μέσω ενεργού απορρόφησης των κυττάρων μεταφοράς του ξυλώδους παρεγχύματος. Η μεγάλης κλίμακας κίνηση των θρεπτικών στοιχείων μέσα στο φυτικό σώμα πραγματοποιείται μέσω του αγωγού συστήματος του ξύλου και του ηθμού και οφείλεται σε μηχανισμούς μαζικής ροής. Όσον αφορά στα στοιχεία του ηθμού, αυτά εκτός από τα φωτοσυνθετικά προϊόντα, καθιστούν δυνατή και την μεταφορά ανόργανων στοιχείων στο φυτικό σώμα, μέσω του ρεύματος κίνησης του χυμού του ηθμού. Ο μηχανισμός αυτός αποσκοπεί στην αναδιανομή των θρεπτικών στοιχείων ακόμη και σε σημεία που η παροχή μέσω των αγγείων του ξύλου είναι



περιορισμένη. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διακίνηση μέσω του ηθμού καθορίζεται κυρίως από την ροή των φωτοσυνθετικών προϊόντων μεταξύ των σημείων παραγωγής και κατανάλωσης και όχι από την ροή του διαπνευστικού ρεύματος, όπως συμβαίνει στα αγγεία του ξύλου (Brown and Shelp, 1997).

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

Κάθε ανόργανο θρεπτικό στοιχείο συμμετέχει με διαφορετικό τρόπο σε ένα ή περισσότερα στάδια του φυτικού μεταβολισμού. Το σύνολο των θρεπτικών στοιχείων που απαντάται στο σώμα ενός μεσοφύτου καταλαμβάνει περίπου το 10% της νωπής βιομάζας ενώ το υπόλοιπο αντιστοιχεί στο νερό. Όπως έχει αναφερθεί, τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία ανάλογα με τις σχετικές ποσότητες που απαιτούνται στα φυτά, ταξινομούνται σε μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία. Τα πρώτα συμμετέχουν ως δομικά συστατικά του κυττάρου, διατηρούν την κυτταρική οργάνωση και λαμβάνουν μέρος στις ενεργειακές μετατροπές και στις ενζυμικές αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, ο άνθρακας, το υδρογόνο και το οξυγόνο αποτελούν το 94% της ξηρής ουσίας των φυτών και είναι τα κύρια δομικά στοιχεία των οργανικών συστατικών του κυττάρου. Εξασφαλίζουν την απαιτούμενη ενέργεια για την αύξηση κατά την φωτοσύνθεση και την οξειδωτική διάσπαση των αναπνευστικών υποστρωμάτων κατά την διάρκεια της αναπνοής. Ακόμη, ο άνθρακας, το υδρογόνο, το οξυγόνο, ο φώσφορος, το άζωτο και το θείο αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών του κυττάρου. Τα υπόλοιπα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία παίζουν τον ρόλο παραγόντων σταθεροποίησης της ειδικής δομής του πρωτοπλάσματος και των οργανιδίων του κυττάρου, σταθεροποίησης των ενζύμων καθώς και παραγόντων με καταλυτική σημασία (Δροσοπουλος, 1992).

Κάθε θρεπτικό στοιχείο χαρακτηρίζεται από μια κρίσιμη συγκέντρωση στο φυτικό σώμα, η οποία εξασφαλίζει την κανονική ανάπτυξη του φυτού. Συγκεντρώσεις πλέον της κρίσιμης προκαλούν συνήθως αύξηση της βιομάζας έως ορισμένου ορίου. Αντίθετα, συγκεντρώσεις χαμηλότερες της κρίσιμης ενδέχεται να προκαλούν τροφοπενία.

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

Η κρίσιμη συγκέντρωση κάθε θρεπτικού στοιχείου αποτελεί ένα μέτρο των αναγκών του φυτού για το στοιχείο αυτό. Όταν δεν ικανοποιούνται ή ικανοποιούνται μερικώς οι απαιτήσεις των φυτών για ένα ή περισσότερα θρεπτικά στοιχεία παρατηρούνται νοσηρές καταστάσεις στην ανάπτυξη τους με χαρακτηριστικά συμπτώματα, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο του φυτικού οργανισμού.

## Εισαγωγή

Ο όρος τροφοπενία αναφέρεται στην φυσιολογική κατάσταση που προκαλείται από την εκτεταμένη έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων. Παρόλο που η ομαλή ανάπτυξη και αύξηση των κυττάρων ενός φυτικού οργανισμού προϋποθέτει την επαρκή τροφοδοσία του με θρεπτικά στοιχεία, τα φυτά συχνά αντιμετωπίζουν περιστατικά έλλειψης θρεπτικών στοιχείων κατά την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου τόσο σε συνθήκες καλλιέργειας, όσο και σε συνθήκες περιβάλλοντος. Συνεπώς, ελλιπούς παροχή θρεπτικών προκαλεί διαταραχή σε μια ή περισσότερες λειτουργίες των φυτών με αποτέλεσμα η κατάσταση αυτή να αντιμετωπίζεται ως παράγοντας καταπόνησης. Η ανεπάρκεια ενός θρεπτικού στοιχείου μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη περιεκτικότητα του εδάφους σε αυτό, στην παρουσία του στοιχείου σε μη αφομοιώσιμη μορφή ή στις ακραίες εδαφοκλιματικές συνθήκες (υπερβολική ή ελλιπούς υγρασία, ανεπαρκής αερισμός, ακραίες τιμές του pH). Οι επιπτώσεις της τροφοπενίας ενός ή περισσότερων στοιχείων αντικατοπτρίζονται στον μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών, αλλά και σε δυσλειτουργίες του μεταβολισμού. Ακόμη, παρουσιάζεται μια αδυναμία στην σύνθεση συστατικών στα οποία συμμετέχει το στοιχείο που βρίσκεται σε έλλειψη και μπορεί να παρατηρηθεί δυσλειτουργία στα ενζυμικά συστήματα ή απώλεια της λειτουργικότητας των μεμβρανών, που έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της διαμερισματοποίησης του κυττάρου και την απώλεια της ομοιόστασης (Taiz and Zeiger, 1998). Οι επιζήμιες αυτές καταστάσεις αντιμετωπίζονται με κατάλληλες στρατηγικές προσαρμογής ή εγκλιματισμού των μεταβολικών λειτουργιών των φυτών (Larcher, 1995).

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

Η έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, αποτελεί παράγοντα καταπόνησης για τα φυτά και αντιμετωπίζεται ανάλογα. Η αντίδραση των φυτών σε ένα τέτοιο περιβάλλον περιλαμβάνει δύο στάδια έως την εμφάνιση της απάντησης που περιλαμβάνουν δέκτες αντίληψης, και παράγοντες μεταγωγής σήματος, ρυθμιστές μεταγραφής και γονίδια στόχους, με αποτέλεσμα να συνθέτονται πρωτεΐνες οι οποίες πραγματοποιούν την αντίδραση σε μεταβολικό-φυσιολογικό επίπεδο. Έτσι, κατ' αρχάς λαμβάνει χώρα αντίληψη του ερεθίσματος μέσω εξειδικευμένων δεκτών ή αισθητηρίων, οι οποίοι στην συνέχεια μεταβάλουν ορισμένες ιδιότητές τους, σηματοδοτώντας την έναρξη μιας ακολουθίας διαδικασιών εγκλιματισμού. Ακολουθεί το στάδιο της μεταγωγής, το οποίο αφορά σε όλα τα γεγονότα που μεσολαβούν από την αντίληψη του ερεθίσματος μέχρι την εμφάνιση της απάντησης. Στο στάδιο της

μεταγωγής παρατηρούνται μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που έχουν ως αποτέλεσμα την σύνθεση νέων οικογενειών πρωτεϊνών που προκαλούν την απάντηση (Καραμπουρνιώτης, 2002).

Σε συνθήκες, λοιπόν έλλειψης ενός θρεπτικού στοιχείου, τα φυτά αρχικά ενισχύουν μηχανισμούς που αποβλέπουν στην άντληση επαρκών ποσοτήτων του στοιχείου, παρά την περιορισμένη διαθεσιμότητα του στο εδαφικό διάλυμα. Η ενίσχυση των μηχανισμών αυτών αφορά σε αύξηση των ρυθμών άντλησης του στοιχείου από το ριζικό σύστημα, ενώ σε επίπεδο οργάνου επάγεται η ανάπτυξη πλάγιων ριζών και πολυάριθμων ριζικών τριχιδίων (Marschner, 1995). Τα κύτταρα της ρίζας παρουσιάζουν την ικανότητα να αυξάνουν την πυκνότητα των πρωτεϊνικών μεταφορέων που είναι υπεύθυνοι για την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων. Ο μηχανισμός αυτός παρουσιάζει εξειδίκευση για το στοιχείο που βρίσκεται σε έλλειψη και αναιρείται ταχέως όταν τα επίπεδα του στοιχείου επανέλθουν σε φυσιολογικές τιμές (Ridge, 2002). Επίσης, η έκκριση κατάλληλων ουσιών από τα κύτταρα της ρίζας αυξάνει την διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Ακόμη, η ικανότητα άντλησης θρεπτικών στοιχείων βελτιώνεται με την ανάπτυξη μυκορριζικών σχέσεων (Bryant et al., 1983; Hamilton et al., 2001; Herms and Matson, 1992). Στην περίπτωση που η ενίσχυση των μηχανισμών άντλησης του θρεπτικού στοιχείου δεν επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα, τα φυτά μεταβάλλουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες ώστε να συνεχίσουν να λειτουργούν αποδοτικά στο νέο θρεπτικό καθεστώς. Τέτοιες μεταβολές αφορούν στο πρότυπο κατανομής των θρεπτικών στοιχείων που απορροφούνται, αλλά και στην μεταβολή του προτύπου ανάπτυξης, με στόχο την μείωση του ρυθμού αύξησης. Αυτό επιτυγχάνεται με τον περιορισμό των κυτταρικών διαιρέσεων και της επιμήκυνσης των κυττάρων (Grossman and Takahashi, 2001). Οι αλλαγές αυτές συνήθως συνοδεύονται και με τροποποίηση στον λόγο υπέργειου προς υπόγειο μέρος, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος να αποκτά προτεραιότητα, έτσι ώστε να επιτευχθεί εγκλιματισμός στο νέο εδαφικό καθεστώς (Bryant et al., 1983; Hamilton et al., 2001; Herms and Matson, 1992). Ένας άλλος ρυθμιστικός μηχανισμός αφορά στην κινητοποίηση των αποθεμάτων από τα ώριμα προς τα νεαρά όργανα. Ως αποτέλεσμα, τα συμπτώματα της τροφopenίας για τα υψηλής κινητικότητας στοιχεία εμφανίζονται αρχικά στα ώριμα όργανα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει για τα χαμηλής κινητικότητας στοιχεία (Taiz and Zeiger, 1998). Τέλος, στο πλαίσιο των παραπάνω ρυθμίσεων μπορεί να λάβει χώρα εκτροπή του πρωτογενούς μεταβολισμού προς εναλλακτικές βιοσυνθετικές οδούς, ώστε να καταναλώνεται

η παραγόμενη ενέργεια αλλά και να περιορίζονται οι ανάγκες προς το στοιχείο που βρίσκεται σε έλλειψη (Chapin 1991, Hamilton et al. 2001).

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

Όπως είναι αναμενόμενο, η έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων επιδρά άμεσα ή έμμεσα στον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών. Δεδομένου του φυσιολογικού ρόλου κάθε θρεπτικού στοιχείου, ενδεχόμενη έλλειψή του έχει ως άμεσο αντίκτυπο πρώτα από όλα στις λειτουργίες οι οποίες εξαρτώνται άμεσα από αυτό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ορισμένων διαταραχών όπως η αδυναμία σύνθεσης των συστατικών στα οποία συμμετέχει το υπό έλλειψη στοιχείο, η δυσλειτουργία ενζυμικών συστημάτων, ή η απώλεια της λειτουργικότητας των μεμβρανών που προκαλεί διαταραχή στην διαμερισματοποίηση του κυττάρου και απώλεια της ομοιόστασης του (Taiz and Zeiger, 1998). Γενικότερα, τέτοιες ελλείψεις είτε επιδρούν σε κομβικά μεταβολικά σημεία, είτε προκαλούν έμμεσες μεταβολικές παρενέργειες (Lambers et al., 1998). Η φωτοσύνθεση π.χ. μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες του φυτικού οργανισμού, επηρεάζεται ποικιλοτρόπως από την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων. Ορισμένα θρεπτικά στοιχεία όπως το άζωτο, το μαγνήσιο και το μαγγάνιο εμπλέκονται άμεσα στην φωτοσυνθετική διαδικασία, ενώ άλλα την επηρεάζουν έμμεσα προκαλώντας καταστολή της ανάπτυξης ή διαταράσσοντας την διανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων (Logan et al., 1999; Cakmak et al., 1994). Εκτός αυτού, η τροφопενία ορισμένων θρεπτικών στοιχείων επηρεάζει την βιοσύνθεση των υδατανθράκων και των αμινοξέων. Η τροφопενία αζώτου π.χ. ευνοεί την βιοσύνθεση υδατανθράκων εις βάρος των αμινοξέων.

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

Ο δευτερογενής μεταβολισμός χαρακτηρίζεται από έντονη παραλακτικότητα τόσο ως προς τις συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών όσο και ως προς το είδος αυτών, ανάλογα με το φυτικό είδος και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Smirnoff, 1995; Robertson and Longhman, 1974; Gershenzon, 1984). Επιπλέον, επηρεάζεται καθοριστικά από παράγοντες καταπόνησης, είτε βιοτικούς είτε αβιοτικούς, όπως οι τροφопενίες των θρεπτικών στοιχείων. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμη διαμορφωθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα των μηχανισμών που αλληλεπιδράσης των περιβαλλοντικών συνθηκών-δευτερογενή μεταβολισμό. Έχουν διατυπωθεί

ωστόσο θεωρητικές προσεγγίσεις που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις αυτές. Σύμφωνα με την θεωρία της ισορροπίας άνθρακα / θρεπτικών στοιχείων, το είδος και η ποσότητα των μεταβολιτών που συνθέτει ένα φυτό εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των πόρων και συγκεκριμένα την ισορροπία μεταξύ παραγωγής οργανικού άνθρακα και διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών όπως του αζώτου. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόρια των δευτερογενών μεταβολιτών μπορούν να διακριθούν σε εκείνα που έχουν ως αποκλειστικό δομικό συστατικό τον άνθρακα (φαινολικά συστατικά και τερπένια) και σε εκείνα που περιλαμβάνουν άζωτο ( π.χ. αλκαλοειδή και κυανογόνα γλυκοσίδια). Συνεπώς, σύμφωνα με την παραπάνω διάκριση, αν το άζωτο βρίσκεται σε έλλειψη, περιορίζεται η σύνθεση των μεταβολιτών που περιέχουν άζωτο και ο οργανικός άνθρακας διοχετεύεται σε δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ως βάση τον άνθρακα (Bryant et al., 1983; Hamilton et al., 2001). Λαμβάνοντας υπόψη ότι, υπό έλλειψη αζώτου, καθίσταται αδύνατη η βιοσύνθεση βασικών βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες, το ποσοστό του οργανικού άνθρακα το οποίο διατίθεται πλέον για αναπτυξιακές δομές είναι καθορισμένο. Η θεωρία αυτή παρουσιάζει αδυναμίες, μια από τις οποίες είναι ότι οι λειτουργίες της άμυνας σε ένα φυτικό ιστό που αναπτύσσεται δεν αποτελούν εναλλακτική οδό απόθεσης των πόρων αλλά συνυπάρχουν με τις λειτουργίες της ανάπτυξης.

Η θεωρία ισορροπίας ανάπτυξης / διαφοροποίησης υποστηρίζει ότι οι πόροι που είναι διαθέσιμοι κάθε στιγμή στα φυτά κατανέμονται πρωταρχικά στην ανάπτυξη και εναλλακτικά στους αμυντικούς μηχανισμούς, όπου κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες (Herms and Mattson, 1992). Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, η εναπόθεση πόρων προς την κατεύθυνση της διαφοροποίησης και συνεπώς των αμυντικών δομών, πραγματοποιείται μόνο όταν καλυφθούν οι ανάγκες για ανάπτυξη. Υπό συνθήκες τροφопενίας, ευνοείται η ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών και έτσι, οι πόροι κατανέμονται προς την σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επομένως στις συνθήκες αυτές περιορίζεται η ανάπτυξη νέων ιστών και οργάνων, ενώ ενισχύονται οι αμυντικοί μηχανισμοί (Strack, 1997). Με βάση τα παραπάνω, ο δευτερογενής μεταβολισμός αντιμετωπίζεται από τους φυτικούς οργανισμούς ως μια εναλλακτική οδός στον καταμερισμό των πόρων, η οποία υπολείπεται της ανάπτυξης (Hamilton et al. 2001).

Η τρίτη θεωρία, της βέλτιστης άμυνας, βασίζεται στο ότι η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών σχετίζεται με την συνύπαρξη των φυτικών ειδών με τους βιοτικούς εχθρούς τους. Η θεωρία αυτή στηρίζεται στα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα που προσδίδουν οι αμυντικοί μηχανισμοί στους φυτικούς οργανισμούς και έτσι διαθέτει εξελικτική βάση (Hamilton et al., 2001).

## Εισαγωγή

Ανεξάρτητα πάντως από τις παραπάνω θεωρίες, είναι γεγονός ότι η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών κατά κανόνα ενισχύεται από την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων στους φυτικούς ιστούς (Gershenzon, 1984; Chou, 1999; Inderjit and del Moral, 1997; Chishaki and Horiguchi, 1997). Η επίδραση αυτή είναι περισσότερο αισθητή στην περίπτωση των φαινολικών συστατικών (Gershenzon, 1984; Haukioja et al., 1998; Dixon and Paiva, 1995). Οι τροφopenίες αζώτου, φωσφόρου, καλίου, θείου και σιδήρου (Bryant et al., 1987A; Bryant et al., 1987B; Dixon and Paiva, 1995; Wenzl et al., 2000; Chishaki and Horiguchi, 1997; Dedaldechamp and Macheix, 1995) αλλά και η τοξικότητα αζώτου (Sanchez et al., 2000), ενισχύουν την βιοσύνθεση φαινολικών ενώσεων, η οποία μπορεί να αποδοθεί είτε σε *de novo* σύνθεση μορίων, είτε σε συμπήκνωση της ήδη υπάρχουσας δεξαμενής των φαινολικών.

Η αυξημένη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, φαίνεται ότι συμβάλλει στον επιτυχή εγκλιματισμό. Η συσσώρευση π.χ. των φαινολικών προκαλεί καταστολή αυξητικών διαδικασιών, φαινόμενο που αποτελεί στρατηγική αντιμετώπισης της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Η παραγωγή φαινολικών συστατικών σε πλεονάζουσες ποσότητες μπορεί ακόμη να αποτελέσει μια εναλλακτική οδό διοχέτευσης της περίσσειας σκελετών άνθρακα που προκύπτει από την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, λόγω της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Εξάλλου, τα φαινολικά συστατικά μπορεί να προσδίδουν αλληλοπαθητική δράση στους φυτικούς οργανισμούς (Anaya, 1999; Inderjit and Keating, 1999), έτσι ώστε σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων να καθίστανται ανταγωνιστικοί απέναντι στα γειτονικά άτομα και να εκμεταλλεύονται πιο αποτελεσματικά τα περιορισμένα θρεπτικά αποθέματα. Τέλος, τα φαινολικά συστατικά αποτελούν παράγοντες άμυνας έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης όπως είναι τα παθογόνα και τα φυτοφάγα. Λόγω της συσσώρευσης δευτερογενών μεταβολιτών, τα φυτά ενισχύουν τις αμυντικές τους γραμμές έναντι ενδεχόμενης απώλειας φυτικών οργάνων, η οποία πλέον καθίσταται καταστροφική υπό συνθήκες έλλειψης ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων.

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

Οι απαιτήσεις των φυτών σε βόριο σε μοριακή βάση είναι υψηλότερες από κάθε άλλο μικροστοιχείο (Δροσόπουλος 1992). Έχουν περάσει περισσότερα από ογδόντα χρόνια από τότε που ο Warington (1923) κατέδειξε ότι το βόριο είναι απαραίτητο μικροστοιχείο για τα ανώτερα φυτά. Το βορικό οξύ δρά ως συνδετικό μόριο στα κυτταρικά τοιχώματα των ανώτερων φυτών, συμμετέχοντας στην δημιουργία διαδεσμών μεταξύ των πηκτικών

πολυσακχαριτών (Matoh et al., 1993; Kobayashi et al., 1997). Υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, το υψηλότερο ποσοστό του στοιχείου εντοπίζεται προσδεμένο στο κλάσμα των πηκτινικών πολυμερών, ενώ υπό συνθήκες επάρκειας ένα ποσοστό της τάξης του 60% του ολικού βορίου βρίσκεται υπό διαλυτή μορφή (Pfeffer et al., 1997; Hu and Brown, 1994). Παρόλο που η έλλειψη του βορίου προκαλεί έντονα συμπτώματα τροφοπενίας και η συχνότητα εμφάνισης περιπτώσεων τροφοπενίας βορίου είναι υψηλή στις καλλιέργειες σε παγκόσμια κλίμακα, ο βιολογικός του ρόλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως (Blevins and Lukaszewski, 1994; Blevins and Lukaszewski, 1998; Goldberg, 1993; Gupta, 1993.). Έχει παρατηρηθεί ωστόσο, ότι οι δυσμενέστερες επιπτώσεις της έλλειψης του βορίου εντοπίζονται στο στάδιο ανάπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων (Brown et al., 2002). Τα συμπτώματα της έλλειψης βορίου αναφέρονται κυρίως στην απώλεια της ομοιόστασης των κυττάρων και στην αποδιοργάνωση των αναπτυξιακών και αναπαραγωγικών διεργασιών. Παρόλα αυτά θεωρείται βέβαιο έως σήμερα ότι το βόριο δεν αποτελεί κύριο συστατικό κάποιου ζωτικού για των μεταβολισμό βιομορίου, δεν λαμβάνει μέρος σε ενεργειακές λειτουργίες των κυττάρων και δεν αποτελεί συνενζυμικό παράγοντα για κανένα γνωστό ενζυμικό σύστημα (Marschner, 1995). Παρόλο ότι η ακριβής λειτουργία του βορίου στον μεταβολισμό των φυτών δεν είναι γνωστή, υπάρχουν στοιχεία για τον ρόλο του στην σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων, στη φυσιολογία των φυτικών ορμονών, και στις μεμβρανικές λειτουργίες (Parr and Loughman, 1983). Τα τροφοπενιακά σε βόριο φυτά μπορούν να εμφανίσουν μια ποικιλία συμπτωμάτων που εξαρτώνται από το είδος και την ηλικία του φυτού. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα αποτελεί η μαύρη νέκρωση των νεαρών φύλλων και οφθαλμών. Η νέκρωση των νεαρών φύλλων εμφανίζεται αρχικά στην βάση του ελάσματος. Η απόκτηση καστανής απόχρωσης σε νεαρούς κυρίως ιστούς και όργανα την οποία διαδέχεται η νέκρωση, ενδεχομένως σχετίζεται με οξειδωτικές βλάβες, οι οποίες προκαλούνται στα κύτταρα μέσω της αυξημένης βιοσύνθεσης φαινολικών συστατικών και της περαιτέρω οξειδωσης τους λόγω απώλειας της κυτταρικής διαμερισματοποίησης. Τα συμπτώματα αυτά ενισχύονται υπό συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού. Η υπόθεση της οξειδωτικής καταπόνησης ενισχύεται επίσης από το γεγονός ότι υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου παρατηρείται μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικών μορίων, όπως της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος, καθώς και μείωση της δραστηριότητας των αντίστοιχων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται ορμονικές ανωμαλίες, όπως απώλεια της κυριαρχίας της κορυφής και έκπτυξη πλάγιων οφθαλμών, οι οποίοι όμως σύντομα νεκρώνονται λόγω της παρεμπόδισης των κυτταρικών

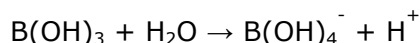
## Εισαγωγή

διαιρέσεων. Όργανα όπως οι καρποί και οι βολβοί μπορεί να εμφανίζουν νέκρωση ή δομικές ανωμαλίες, λόγω καταστροφής των εσωτερικών ιστών (Taiz and Zeiger, 1998).

Ορισμένες φυσιολογικές βλάβες αποδίδονται στην έλλειψη βορίου στα κύτταρα, όπως διαταραχές στον μεταβολισμό και τη μεταφορά υδατανθράκων, στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, στη λιγνινοποίηση, στον μεταβολισμό του RNA, στην αναπνοή, στον μεταβολισμό του IAA, στον μεταβολισμό των φαινολικών και στην ακεραιότητα των μεμβρανών (Parr και Loughman, 1983). Συμπερασματικά, οι κύριοι ρόλοι του βορίου αφορούν στη συμμετοχή του στην ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της δημιουργίας διαδεσμών με τα πηκτινικά πολυμερή και στην λειτουργική ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης (Brown et al., 2002). Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που προκαλούνται από την έλλειψη βορίου πιθανώς σχετίζονται με την αδυναμία σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ του βορικού οξέος με μόρια τα οποία διαθέτουν γειτονικά υδροξύλια στον ανθρακικό σκελετό σε διάταξη cis (cis-διόλες), όπως είναι τα ουρονικά οξέα των πηκτινικών πολυμερών στο κυτταρικό τοίχωμα, γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια στις μεμβράνες καθώς και φαινολικά (ορθο-δι-φαινόλες) (Dugger, 1983; Marschner, 1995; Römheld and Marschner, 1991; Shelp, 1993).

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

Το βόριο ανήκει στην κατηγορία των μεταλλοειδών και καταλαμβάνει την πέμπτη θέση στον περιοδικό πίνακα. Είναι το μοναδικό αμέταλλο μικροστοιχείο με σθένος +3 και έχει πολύ μικρή ιοντική ακτίνα (Δροσόπουλος, 1992). Λόγω του υψηλού δυναμικού ιονισμού, το βόριο δεν απαντάται ως  $B^{+3}$  αλλά σχηματίζει σύμπλοκα με την δημιουργία τριών ομοιοπολικών δεσμών (Power and Woods, 1997). Στην φύση το βόριο απαντάται σε ενώσεις με οξυγόνο ως βορικό οξύ και σπανίως ως βορικό ιόν, ενώ σπανιότερα βρίσκεται ενωμένο με το φθόριο ( $BF_4^-$ ) (Hu and Brown, 1997). 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



Σε υψηλές τιμές pH ευνοείται η πρόσληψη ενός ιόντος υδροξυλίου και ο σχηματισμός του τετραεδρικού ανιόντος  $B(OH)_4^-$ . Σε υδατικά διαλύματα και σε συγκεντρώσεις βορικού οξέος χαμηλότερες των 0,02 M, το βόριο απαντά ως  $B(OH)_3$  και σημαντικά λιγότερο ως  $B(OH)_4^-$ . Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και σε υψηλές τιμές pH απαντάται σε πολυπλοκότερες μορφές όπως  $B_2O(OH)_6^{2-}$ ,  $B_3O_3(OH)_4^-$  και  $B_4O_5(OH)_4^{2-}$  (Power and Woods, 1997). Στις συνθήκες του



συνήθους κυτοπλασματικού pH (~7,3) ευνοείται η μορφή του αδιάστατου βορικού οξέος, ενώ ένα μικρό ποσοστό απαντάται με την μορφή του βορικού ανιόντος (Brown et al., 2002). Όπως προαναφέρθηκε, τόσο το βορικό οξύ όσο και το βορικό ανιόν σχηματίζουν σύμπλοκα με αλκοόλες μέσω διεστερικών δεσμών ή με άλλες ενώσεις που φέρουν δύο υδροξυλομάδες σε θέση cis. Πρόκειται για μια αυθόρμητη αντίδραση με ταχεία κινητική, της οποίας η χημική ισορροπία εξαρτάται από την τιμή του pH (Brown et al., 2002). Την δομή αυτή διαθέτουν πολλά κυτταρικά συστατικά και ως εκ τούτου μπορούν να σχηματίσουν διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ (Loomis and Durst, 1992; Blevins and Lukaszewski, 1998; Brown et al., 2002; Dembitsky et al., 2002). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ολιγοσακχαρίτες που εντοπίζονται τόσο στο κυτόπλασμα όσο και στον ηθμό, τα φαινολικά συστατικά, τα οποία συμμετέχουν στην δόμη του κυτταρικού τοιχώματος, στη λιγνινοποίηση καθώς και στην άμυνα του φυτικού οργανισμού και επίσης τα γλυκολιπίδια και οι γλυκοπρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δομή των κυτταρικών μεμβρανών και στην κυτταρική επικοινωνία αντίστοιχα.

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

Η περιεκτικότητα των περισσότερων εδαφών σε βόριο ανέρχεται σε 10 mg kg<sup>-1</sup> περίπου. Εδάφη με χαμηλότερη συγκέντρωση (<10 mg kg<sup>-1</sup>) χαρακτηρίζονται ως φτωχά σε βόριο (περισσότερο διαδεδομένα) ενώ εκείνα που περιέχουν 10-100 mg kg<sup>-1</sup> περιλαμβάνουν τα πλούσια σε βόριο εδάφη (Power, 1997). 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 οξείδια δ) διαλυτό στο εδαφικό διάλυμα ε) αφομοιωμένο στην βιομάζα. Το διαλυτό βόριο αποτελεί συνήθως το 10% του ολικού εδαφικού βορίου (Power and Woods, 1997). Στο έδαφος το διαλυτό βόριο απαντάται με τη μορφή βορικού οξέος B(OH)<sub>3</sub>, ενώ σε τιμές pH άνω του 7 εμφανίζεται ως τετραεδρικό ανιόν B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup>. Η διαθεσιμότητα του βορίου στο έδαφος επηρεάζεται από την υφή του εδάφους, την ατμοσφαιρική υγρασία, την θερμοκρασία και το pH του εδαφικού διαλύματος, σε υψηλές τιμές του οποίου η διαθεσιμότητα βορίου μειώνεται πιθανώς λόγω του σχηματισμού του ανιόντος B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> (Goldberg, 1997). Το βόριο του εδάφους απομακρύνεται ευχερώς με έκπλυση, φαινόμενο που εξαρτάται από την ποσότητα του ύδατος και από την υφή του εδάφους. Κατά συνέπεια, εδάφη με λεπτή υφή συγκρατούν το βόριο για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα συγκριτικά με χονδρόκοκκα εδάφη (Δροσόπουλος, 1992). Εκτός αυτού, η οργανική ουσία του

## Εισαγωγή

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 υδατική καταπόνηση, αλλά και η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία επηρεάζουν εμμέσως την πρόσληψη βορίου από τα φυτά διότι επιδρούν αρνητικά στην διαπνοή. Αρνητικά επιδρούν επίσης και παράγοντες που αυξάνουν τον ρυθμό παραγωγής βιομάζας, όπως είναι τα υψηλά επίπεδα αζώτου στο έδαφος και οι υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας (Goldberg, 1993). Η μεταφορά του βορίου από το εδαφικό διάλυμα στα κύτταρα της ρίζας επιτελείται μέσω μαζικής ροής και διάχυσης, με την πρώτη να κρίνεται πιο σημαντική. Τα κύτταρα των ριζών απορροφούν το αδιάστατο βορικό οξύ από το έδαφος κυρίως μέσω παθητικής μεταφοράς. Ωστόσο υπάρχουν και ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες σημαντικό ποσοστό απορρόφησης του βορικού οξέος οφείλεται/ αποδίδεται σε μηχανισμούς ενεργού μεταφοράς (Danniel et al., 2002; Stavrianaou et al., 2006a). Στην συνέχεια λαμβάνει χώρα μεταφορά του βορίου από τα κύτταρα του ριζικού συστήματος στα υπέργεια μέρη του φυτού, με φόρτωσή του στα αγγεία του ξύλου. Σε συνθήκες επάρκειας βορίου στο έδαφος, η συγκέντρωση του στοιχείου στον ανιόντα χυμό είναι χαμηλότερη εκείνης των κυττάρων της ρίζας χωρίς να παρουσιάζει διακυμάνσεις, γεγονός που υποδηλώνει την μεταφορά του μέσω μηχανισμών μαζικής ροής και διάχυσης στην κατ' ακτίνα κίνηση. Ωστόσο, σε ορισμένα φυτικά είδη και σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας βορίου στο εξωτερικό μέσο, η συγκέντρωση του βορίου τόσο στα κύτταρα της ρίζας όσο και στο εξωτερικό μέσο εμφανίζεται χαμηλότερη εκείνης των αγγείων του ξύλου (Dannel et al., 1997; Shelp et al., 1998; Dannel et al., 1999; Dannel et al., 2000), γεγονός που υποδηλώνει ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες λειτουργεί ένας μηχανισμός ο οποίος ευθύνεται για την ανάπτυξη υψηλών συγκεντρώσεων βορικού οξέος στα σημεία φόρτωσης των αγγείων του ξύλου (Dannel et al., 2002; Takano et al., 2002). Η ύπαρξη ομαλού διαπνευστικού ρεύματος, αλλά και η δυνατότητα επανekίνησης του βορίου μέσω του ηθμού καθορίζουν την διακίνηση του βορίου από το υπόγειο προς το υπέργειο μέρος (Brown and Shelp, 1997).

Επειδή το βορικό οξύ, υπό φυσιολογικές τιμές pH, απαντά στο εδαφικό διάλυμα και απορροφάται από τα κύτταρα της ρίζας ως αδιάστατο μόριο, η περατότητα του διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αναμένεται να είναι υψηλή (Hu et al., 1996; Reid, 2001). Συνεπώς, η υψηλή τιμή του

συντελεστή περατότητας υποδηλώνει ότι αυτή καθ' αυτή η παθητική μεταφορά είναι ικανή να καλύψει τις ανάγκες πρόσληψης των φυτών εάν η συγκέντρωση του βορικού οξέος στο εξωτερικό μέσο είναι υψηλή. Παρόλα αυτά, πλήθος πειραματικών δεδομένων υποδηλώνει ότι πέρα της παθητικής μεταφοράς υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί πρόσληψης βορικού οξέος από τα φυτά. Τόσο σε εργαστηριακές συνθήκες, όσο και σε συνθήκες αγρού, ο ρυθμός πρόσληψης βορίου ποικίλει ανάλογα με το φυτικό είδος (Hu and Brown, 1997; Rerkasem and Jamjod, 1997). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι οι συγκεντρώσεις του βορίου στο εδαφικό διάλυμα ή στα κύτταρα της ρίζας και ακόμη η ένταση διαπνοής δεν επηρεάζουν την συγκέντρωση του βορίου εντός του φυτού. (Raven, 1980). Εάν η απορρόφηση βορίου γινόταν αποκλειστικά μέσω παθητικής μεταφοράς δεν θα μπορούσαν να δικαιολογηθούν τα παραπάνω αποτελέσματα. Η πρώτη υπόθεση, η οποία όμως δεν υποστηρίζεται επαρκώς αναφέρεται σε πιθανή ρύθμιση της πρόσληψης του βορίου από τον μεταβολισμό ή από ένα ενεργό μηχανισμό αποκλεισμού του στοιχείου. Η δεύτερη υπόθεση σχετίζεται με την έκκριση παραγόντων συμπλοκοποίησης του βορίου στην ριζόσφαιρα και την συνακόλουθη απορρόφηση του συμπλόκου (ή τον αποκλεισμό του). Μια άλλη υπόθεση αναφέρεται στην συμπλοκοποίηση του βορίου στο κυτταρικό περιβάλλον. Με τον σχηματισμό τέτοιων συμπλόκων στον κυτταρικό χυμό, η συγκέντρωση του ελεύθερου βορικού οξέος, διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα να ενισχύεται η παθητική μεταφορά του στοιχείου από το εξωτερικό μέσο, καθώς συντηρείται η διαφορά συγκεντρώσεων μεταξύ των δυο πλευρών της κυτταρικής μεμβράνης. Η επόμενη υπόθεση σχετίζεται με την ιδιαίτερη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεμβράνων των κυττάρων της ρίζας. Είναι γνωστό ότι το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού βορίου στα δίκτυλα φυτά εντοπίζεται στα κυτταρικά τοιχώματα όπου σχηματίζει σύμπλοκα με τα πηκτινικά πολυμερή (Hu and Brown, 1994). Εάν επομένως η σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων περιλαμβάνει μικρή ποσότητα πηκτινικών πολυμερών, η ποσότητα του συμπλοκοποιημένου βορίου στα κυτταρικά τοιχώματα περιορίζεται, ενώ αντίθετα αυξάνεται η ποσότητα του ελεύθερου βορίου στο κυτόπλασμα (Hu et al., 1996; Matoh et al., 1996). Η περατότητα των μεμβρανών σε αφόρτιστα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, όπως είναι το βορικό οξύ, επηρεάζεται από τον τύπο και το μήκος των αλειφατικών αλυσίδων των φωσφορολιπιδίων (Dordas and Brown, 2000; Brown et al., 2002; Dannel et al., 2002), αλλά και από την ύπαρξη μεμβρανικών πρωτεϊνών-πόρων. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη καναλιών μεταφοράς που προωθούν τον μηχανισμό διευκολυνόμενης πρόσληψης βορίου (Dordas et al., 2000; Brown et

## Εισαγωγή

al., 2002; Dannel et al., 2002). Παρόμοιοι μεμβρανικοί πόροι μπορεί να συμβάλλουν στην μεταφορά νερού και άλλων χαμηλού μοριακού βάρους μη φορτισμένων μορίων όπως είναι τα μόρια της ουρίας. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να ανήκουν στην ομάδα των υδροπορινών ή σε εκείνη των καναλιών μεταφοράς. Με βάση τους Dordas et al. (2000), η έκφραση μιας υδροπορίνης που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε ζωικά ωκύτταρα αύξησε την περατότητα του βορικού οξέος διαμέσου της μεμβράνης κατά 30%. Η αύξηση εξαλείφθηκε με την εφαρμογή HgCl<sub>2</sub> (Dordas et al., 2000), αποτέλεσμα που κατέδειξε ότι αυτή οφειλόταν στην λειτουργία καναλιών μεταφοράς. Παρόμοια αποτελέσματα παρεμπόδισης παρουσία HgCl<sub>2</sub> παρατηρήθηκαν σε κύτταρα ριζών των ειδών *Cucurbita pepo* και *Arabidopsis thaliana* γεγονός που υποδεικνύει ότι τα κανάλια αυτά συμβάλλουν στην πρόσληψη του βορίου και σε φυτικούς ιστούς (Dordas and Brown, 2000; Dordas et al., 2000).

Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να επηρεάσουν την πρόσληψη βορίου από τις ρίζες διαφορετικών ειδών, όμως η λειτουργία τους προϋποθέτει την ύπαρξη ευνοϊκής συγκέντρωσης βορικού οξέος μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Στην αντίθετη περίπτωση, η ικανότητα πρόσληψης του στοιχείου από τα φυτά μπορεί να ερμηνευτεί μόνο από μηχανισμούς ενεργού μεταφοράς (Brown et al., 2002; Takano et al., 2001).

### **II.3. Κατανομή του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο**

Σε υποκυτταρικό επίπεδο το βόριο απαντάται σε δυο μορφές, την αδιάλυτη και την διαλυτή (Pfeffer et al., 1997; Dannel et al., 1998). Οι δυο αυτές μορφές εμφανίζουν διακριτούς ενδοκυτταρικούς ρόλους. Το κλάσμα του αδιάλυτου βορίου φαίνεται πως αντιπροσωπεύει το στενά συνδεδεμένο με τα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων βόριο. Οι Dannel et al. (1998) αναφέρουν ότι το αδιάλυτο κλάσμα αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του βορίου των κυττάρων, δεν μπορεί να παραληφθεί με απλή εκχύλιση και είναι μη ανταλλάξιμο, φαινόμενο που υποδηλώνει ότι το βορικό οξύ σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με τα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος. Το διαλυτό βόριο αναφέρεται σε εκείνο του κυτταρικού χυμού που αντιπροσωπεύει κυρίως τον συμπλάστη και δευτερευόντως την υγρή φάση του αποπλαστικού χώρου (Dannel et al., 1998). Το κλάσμα αυτό μπορεί να συμμετέχει σε φυσιολογικές διεργασίες τόσο σε επίπεδο κυττάρου, όσο και σε επίπεδο ολόκληρου φυτού. Συνεπώς ο διαχωρισμός των δυο κλασμάτων του βορίου δεν σχετίζεται μόνο με την μέθοδο απομόνωσης, αλλά εμφανίζει και λειτουργικό χαρακτήρα. Με βάση διάφορες αναλυτικές τεχνικές καθίσταται δυνατή η μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής

του βορίου (Dannel et al., 2002). Το βόριο φαίνεται ότι δεν απαντάται αποκλειστικά σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα, αφού δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποκλείουν την παρουσία του βορίου σε ορισμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Λαμβάνοντας, λοιπόν υπόψη και τα χημικά χαρακτηριστικά του βορικού οξέος, δηλαδή την σχετικά υψηλή περατότητα των μεμβρανών σε αυτό, τις αντιδράσεις του με πολυόλες και την απουσία αλάτων αυτού, μπορεί να θεωρηθεί βέβαιο ότι το βόριο είναι παρόν σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Οι Thellier et al. (1979) συμπέραναν ότι το διαλυτό Β είναι παρόν και στα δύο κύρια κυτταρικά διαμερίσματα, καθώς και στον ελεύθερο αποπλαστικό χώρο. Ωστόσο, οι γνώσεις μας όσον αφορά στις ενώσεις του βορίου με άλλα συστατικά στο κυτταρικό περιβάλλον και τις σχετικές συγκεντρώσεις του στα διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα είναι πολύ περιορισμένες. Η διαμερισματοποίηση του βορίου επηρεάζεται από παράγοντες όπως το είδος του ιστού και το φυτικό είδος π.χ. τα υδρόφυτα συγκριτικά με τα μεσόφυτα και τα μονοκότυλα σε σχέση με τα δικότυλα εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό συνολικού βορίου εντοπισμένου στα κυτταρικά τοιχώματα (Dannel et al., 2002). Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει και η παροχή βορίου στο φυτό και συνεπώς η θρεπτική του κατάσταση (Dannel et al., 2002). Παρόλο που ένα σημαντικό ποσοστό του βορίου προσδένεται στο πηκτινικό κλάσμα του κυτταρικού τοιχώματος, ιδιαίτερα σε συνθήκες ανεπαρκούς εφοδιασμού, σε συνθήκες επάρκειας πάνω από το 60% του βορίου απαντάται σε διαλυτή μορφή (Pfeffer et al., 1997; Hu and Brown, 1994). Σε συνθήκες ανεπαρκούς τροφοδοσίας βορίου, το ποσοστό του δεσμευμένου στο κυτταρικό τοίχωμα βορίου κυμαίνεται από 60-90% (Loomis and Durst, 1992; Matoh et al., 1993; Hu and Brown, 1994; Dannel et al., 2002), και αντίστοιχα το ελεύθερο βόριο του αποπλαστικού χώρου μειώνεται δραματικά (Pfeffer et al., 2001). Υπάρχουν αναφορές (Matoh et al., 1992; Martini and Thellier, 1993; Pariot et al., 1994; Kobayashi et al., 1997; Matoh, 1997; Stangoulis et al., 2001) που υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες επαρκούς τροφοδοσίας του στοιχείου, ένα σημαντικό ποσοστό του συνολικού βορίου, της τάξης του 26-68% εντοπίζεται στον πρωτοπλάστη υπό μορφή συμπλόκου (Thellier et al., 1979; Hu and Brown, 1994; Pfeffer et al., 2001), με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους (Cakmak and Römheld, 1997).

#### **II.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού.**

Το βόριο παρουσιάζει αποκλίσεις όσον αφορά στην δυνατότητα επαναδιανομής του μέσα στο φυτικό σώμα, γεγονός που επηρεάζει την κατανομή του στοιχείου σε επίπεδο φυτού. Στα περισσότερα φυτά, τα οποία

## Εισαγωγή

στερούνται της δυνατότητας επαναδιανομής του στοιχείου, η συγκέντρωση του βορίου στο υπέργειο μέρος αυξάνεται με την ηλικία με αποτέλεσμα τα παλαιότερα όργανα του φυτού να εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις βορίου συγκριτικά με τα νεότερα. Στα φυτικά είδη στα οποία το στοιχείο είναι ευκίνητο και μπορεί να επαναδιανεμηθεί, το παραπάνω πρότυπο κατανομής αντιστρέφεται (Brown and Shelp, 1997). Σε συνθήκες επάρκειας του στοιχείου οι συγκεντρώσεις του στην ρίζα είναι χαμηλότερες από εκείνες του υπεργείου μέρους, καθεστώς που αλλάζει δραματικά σε συνθήκες μειωμένης εξωτερικής τροφοδοσίας του στοιχείου (Stavrianakou et al., 2006b). Αυτό το φαινόμενο ενδεχομένως παρατηρείται διότι λόγω θέσης οι ιστοί της ρίζας έχουν προτεραιότητα στην κάλυψη των αναγκών τους σε βόριο, συγκριτικά με το υπέργειο μέρος. Υψηλές συγκεντρώσεις βορίου εμφανίζονται ιδιαίτερα σε ιστούς αναπαραγωγικών οργάνων. Έτσι, ακόμη και σε φυτικά είδη με περιορισμένες απαιτήσεις σε βόριο, οι ανάγκες αυξάνονται δραματικά κατά την περίοδο έκπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων (Loomis and Durst, 1992; Brown et al., 2002).

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

Μια από τις χαρακτηριστικότερες αντιδράσεις των φυτών στην έλλειψη βορίου αποτελεί η παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των αναπτυσσόμενων κυττάρων (Hu and Brown, 1994; Dell and Huang, 1997), φαινόμενο που παρατηρείται εντονότερα στα κύτταρα του ριζικού συστήματος (Dugger, 1983; Marschner, 1995; Shelp, 1993) μερικές ώρες μετά την απομάκρυνση του στοιχείου από το θρεπτικό διάλυμα (Hirsch and Torrey, 1980; Dell and Huang, 1997; Dugger, 1983). Η παρεμπόδιση αυτή μπορεί κάλλιστα να ερμηνεύσει την μείωση της αύξησης των μεριστωματικών ιστών, ένα από τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα που προκαλεί η έλλειψη βορίου (Dugger, 1983; Marschner, 1995). Η ανάπτυξη των κορυφαίων μεριστωματικών ιστών του υπεργείου τμήματος εξαρτάται από την ομαλή τροφοδοσία σε βόριο. Σε συνθήκες πλήρους έλλειψης του στοιχείου μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και ολική νέκρωση του κορυφαίου μεριστώματος. Τα φύλλα παρουσιάζουν ανώμαλη ανάπτυξη και αδυνατούν να εκπυχθούν πλήρως (Pilbeam and Kirky, 1983; Hu and Brown, 1994; Huang et al., 1996). Αποκτούν αρχικά έντονο πράσινο χρώμα, ακολούθως αναπτύσσουν καστανούς χρωματισμούς, ενώ σε ακραίες συνθήκες έλλειψης εμφανίζουν χλωρώσεις και απορρίπτονται (Dell and Huang, 1997; Marschner, 1995). Είναι γνωστό επίσης από παρατηρήσεις σε ακρορίζα ηλιάνθου, ότι η τροφοπενία βορίου εκτός από την παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των αναπτυσσόμενων

κυττάρων επιδρά και στην κυτταρική διαίρεση (Moore and Hirsch, 1983). Σε ορισμένες περιπτώσεις η τροφοπενία βορίου προκαλεί ανωμαλίες στην ανάπτυξη των αγγείων του ξύλου και των στοιχείων του ηθμού (Dell and Huang, 1997), ενώ σε άλλες δεν έχουν παρατηρηθεί ανάλογα συμπτώματα (Liakopoulos et al., 2005). Οι αναπτυξιακές δυσλειτουργίες στα ακραία μεριστώματα οφείλονται στο γεγονός ότι το βόριο παίζει δομικό ρόλο στην συναρμολόγηση των κυτταρικών τοιχωμάτων και των κυτταροπλασματικών μεμβρανών (Dell and Huang, 1997). Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα κύρια συμπτώματα της έλλειψης βορίου περιορίζονται στα αναπτυξιακά στάδια, ενώ τα λοιπά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι δευτερογενούς αιτιολογίας (Brown and Hu, 1997). Πειράματα σε φυτά όπου η έλλειψη βορίου είχε παρεμποδίσει πλήρως την ανάπτυξη, έδειξαν ότι οι ανεπτυγμένοι ιστοί παρέμειναν πράσινοι και δεν παρουσίασαν κανένα επιπλέον ορατό σύμπτωμα για τουλάχιστον μια εβδομάδα σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο βορίου. Ωστόσο, στις συνθήκες αυτές το κυτταροπλασματικό βόριο βρισκόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Σύμφωνα με τους Brown and Hu (1997), η έλλειψη του βορίου στα ώριμα όργανα που προκαλείται από την επανεκκίνηση προς τους αναπτυσσόμενους ιστούς στο είδος *Prunus salicina*, δεν συνοδεύεται από ανάπτυξη συμπτωμάτων ή διαταραχή φυσιολογικών λειτουργιών, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν το βόριο απουσιάζει από τα αναπτυσσόμενα όργανα (Brown and Hu, 1997). Σύμφωνα με τα παραπάνω, το βόριο στα είδη αυτά απαιτείται κυρίως για την κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων ενώ οι ανάγκες τους σε κυτοπλασματικό βόριο μπορούν να ικανοποιηθούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του στοιχείου.

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

Έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία του βορίου είναι απαραίτητη για την ομαλή συγκρότηση και λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος. Το ποσοστό του βορίου που απαντάται στο κυτταρικό τοίχωμα είναι σημαντικό (Hu and Brown, 1994) και ιδιαίτερα σε συνθήκες ανεπάρκειας του στοιχείου μπορεί να φτάσει έως και το 95-98% του συνολικού κυτταρικού βορίου (Loomis and Durst, 1992; Matoh et al., 1993; Hu and Brown, 1994; O' Neill et al., 2001), ανάλογα με το φυτικό είδος και τις συνολικές του απαιτήσεις σε βόριο (Hu et al., 1996; Matoh et al., 1996). Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα της τροφοπενίας του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο σχετίζεται με αλλοιώσεις της λεπτής δομής και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του κυτταρικού τοιχώματος και του μεσοτοιχείου (Hu and Brown, 1994; Loomis and Durst, 1992). Κάτω από τις συνθήκες αυτές τα κυτταρικά τοιχώματα εμφανίζονται διογκωμένα (Matoh et al., 1992; Hu and

## Εισαγωγή

Brown, 1994; Matoh et al., 2000), ακανόνιστα και με περισσότερο αδρή υφή (Hu and Brown, 1994; Matoh et al., 1992). Οι αλλοιώσεις στην λεπτή υφή συνοδεύονται από μακροπρόθεσμες (Hu and Brown, 1994) αλλά και βραχυπρόθεσμες (Findelee et al., 1997) αλλαγές στα μηχανικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων, όπως στην ελαστικότητα (Findelee et al., 1997) και στην διάμετρο των πόρων (Fleischer et al., 1999), αλλά και στην υδραυλική αγωγιμότητα των κυττάρων (Findelee et al., 1997). Τα συμπτώματα αυτά κάνουν την εμφανισή τους μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα από την διακοπή της τροφοδοσίας με βόριο (Hirsch and Torrey, 1980). Οι αντιδράσεις των φυτικών κυττάρων υποδηλώνουν ότι η έλλειψη βορίου έχει άμεσες επιδράσεις στην δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων και δεν σχετίζονται με συγκεκριμένο μεταβολικό μηχανισμό (Hu and Brown, 1994). Επικρατεί η άποψη ότι ο λειτουργικός ρόλος του βορίου στην επιμήκυνση των κυττάρων σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά ελαστικότητας του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος και με τον έλεγχο που ασκεί στην εναπόθεση του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Matoh et al., 2000; Dell and Huang, 1997). Ο λειτουργικός ρόλος του βορίου σχετίζεται επίσης με την διαμόρφωση του τελικού μεγέθους και σχήματος των κυττάρων (Dell and Huang, 1997). Μελέτες σε 14 είδη, με διαφορετικές απαιτήσεις σε βόριο, έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης βορίου στα φύλλα ή στα κυτταρικά τοιχώματα και των ποσοτήτων ουρονικού οξέος, ραμνόζης και γαλακτόζης, αλλά και της συγκέντρωσης της πηκτίνης στα κυτταρικά τοιχώματα (Hu et al., 1996). Παρόλα αυτά η έλλειψη βορίου δεν επηρέασε την ποσότητα του ουρονικού οξέος στα κυτταρικά τοιχώματα, φαινόμενο που υποδηλώνει ότι η έλλειψη βορίου δεν έχει καμία επίδραση στον μεταβολισμό της πηκτίνης (Hu et al., 1996). Σε συνθήκες έλλειψης βορίου παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του διαλυτού βορίου και αύξηση εκείνης του αδιάλυτου, φαινόμενο που σημαίνει ότι είτε είδη των οποίων τα κυτταρικά τοιχώματα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πηκτίνη απαιτούν υψηλότερα ποσά βορίου για την κατασκευή των κυτταρικών τους τοιχωμάτων, είτε ότι η πηκτίνη δημιουργεί ένα αδιάλυτο σύμπλοκο με το βόριο στα κυτταρικά τοιχώματα με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθεσιμότητα για άλλες πιθανές μεταβολικές διαδικασίες που απαιτούν βόριο (Hu et al., 1996).

Με βάση πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχει διαπιστωθεί ότι το βόριο συμβάλλει στην δημιουργία πλάγιων διακλαδώσεων/διαδεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των δομικών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος, υπό την προϋπόθεση ότι τα τελευταία διαθέτουν δομή cis-διόλης (Loomis and Durst, 1992; Cakmak and Römhald, 1997). Η δημιουργία των διαδεσμών



πραγματοποιείται μέσω διεστέρων που σχηματίζονται μεταξύ του βορικού οξέος και των ομάδων υδροξυλίου των δομικών μονάδων των πολυσακχαριτών που εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτινικά πολυμερή). Τα ισχυρότερα σύμπλοκα της μορφής αυτής σχηματίζονται με φουρανόζες που διαθέτουν διαμόρφωση cis-διόλης όπως είναι η ριβόζη και η απιόζη. Η τελευταία αποτελεί το κύριο συστατικό για την δημιουργία διαδικών δεσμών στα κυτταρικά τοιχώματα και απαντάται ως δομικό μόριο των συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων σε πλήθος μονοκοτύλων και δικοτύλων φυτών (Loomis and Durst, 1992). Οι διαδεσμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της μηχανικής αντοχής και της ελαστικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την διάρκεια της κυτταρικής επιμήκυνσης με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται η προοδευτική αύξηση των διαστάσεων των κυττάρων χωρίς να χρειάζεται η διάσπαση και η αναδημιουργία των ομοιοπολικών δεσμών (Teasdale and Richards, 1990). Τα φύλλα μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis thaliana*, τα οποία έχουν τροποποιηθεί στα πηκτινικά τους πολυμερή έτσι ώστε να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός των διαδεσμών με το βορικό οξύ, εμφανίζονται εύθραυστα, φαινόμενο το οποίο συντάται σε φυτά κάτω από συνθήκες έλλειψης βορίου (O'Neill et al., 2001). Η δημιουργία συμπλόκων του βορίου με πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος έχει επίσης σχέση με την δέσμευση ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου στο κυτταρικό τοίχωμα. Έχει διαπιστωθεί ότι σε συνθήκες τροφопενίας του στοιχείου το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει χαμηλότερες ποσότητες ασβεστίου (Yamanouchi, 1971; Yamauchi et al., 1986; Matoh et al., 2000). Εκτός αυτού εάν οι ρίζες του φυτού *Vicia faba* μεταφερθούν σε μέσο ελεύθερο βορίου, η διαρροή ιόντων ασβεστίου στον αποπλαστικό χώρο αυξάνεται (Findelee et al., 2000). Τα παραπάνω αποτελέσματα ερμηνεύονται με την υπόθεση που είχε ήδη διατυπωθεί από τους Teasdale and Richards, 1990 ότι η δημιουργία συμπλόκων μεταξύ του βορίου και των πολυμερών της πηκτινής ή των πλάγιων μονάδων των γλυκοπρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος δημιουργεί θέσεις χηλιοποίησης για ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου τα οποία ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τις θέσεις δέσμευσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι έναν χημικό παράγοντα, ο οποίος παρεμποδίζει τον σχηματισμό συμπλόκων του βορικού οξέος με ενώσεις του κυτταρικού τοιχώματος τύπου cis-διόλης, αποτελούν τα βορονικά οξέα. Η ικανότητα συνεπώς των βορονικών οξέων να επάγουν συμπτώματα όμοια με αυτά της τροφопενίας βορίου αποδίδεται στην αποδιοργάνωση των διαδεσμών του βορίου και όχι σε άλλες γενικές επιδράσεις των βορονικών οξέων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν έναν δομικό ρόλο του βορίου λόγω της

δημιουργίας διαδεσμών, σε κρίσιμα σημεία κατά μήκος της σύνδεσης της κυττοπλασματικής μεμβράνης με το κυτταρικό τοίχωμα, που είναι απαραίτητη για την ακεραιότητα του κυττάρου (Bassil et al., 2004).

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

Είναι προφανές ότι το βόριο παίζει θεμελιώδη ρόλο στην δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων, ωστόσο σε συνθήκες τροφοπενίας του στοιχείου παρουσιάζεται ένας αριθμός συμπτωμάτων που υποδηλώνουν ότι ενδεχομένως το βόριο να λαμβάνει μέρος και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, οι οποίες ακόμη παραμένουν αδιευκρίνιστες. Εκτός αυτού ορισμένα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το βόριο αποτελεί ζωτικό στοιχείο και σε ζωικούς οργανισμούς, των οποίων τα κύτταρα στερούνται κυτταρικού τοιχώματος. Το βόριο φαίνεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην κατασκευή της πλασματικής μεμβράνης μέσω της ικανότητας του να προσδένεται σε μεμβρανικά συστατικά που περιέχουν ομάδες *cis*-διόλης όπως είναι οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Η πρόσδεση του βορίου σε πολυ-ύδροξυ-ομάδες συστατικών των μεμβρανών και η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των πλασματικών μεμβρανών ερμηνεύει ορισμένα φαινόμενα, όπως η διέγερση που προκαλεί το βόριο στην δραστηριότητα των προσδεδωμένων στις μεμβράνες ATP-σων, την διατήρηση της μεμβρανικής ακεραιότητας και τον έλεγχο της διαπερατότητας των πλασματικών μεμβρανών (Cakmak et al., 1995; Ferrol et al., 1993; Goldbach et al., 1990; Pollard et al., 1977; Roldan et al., 1992; Tang and Dela Fuente, 1986). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το βόριο προστατεύει τις μεμβράνες από την καταστροφή τους από ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS). Ο προστατευτικός ρόλος του βορίου στην ακεραιότητα της μεμβράνης έναντι της επίθεσης ελεύθερων ριζών μπορεί εν μέρη να είναι σημαντικός κάτω από συνθήκες υψηλού φωτισμού και συγκεκριμένα σε φυτά που συσσωρεύουν υψηλά ποσά φαινολικών ως απόκριση στην έλλειψη βορίου, όπως ο ηλίανθος. Σε φυτά με έλλειψη βορίου παρατηρείται αύξηση της περατότητας της μεμβράνης και απώλεια της διαμερισματοποίησης, που συνοδεύεται από διαρροή ιόντων καλίου, σακχάρων, αμινοξέων και φαινολικών συστατικών. Το παραπάνω φαινόμενο ωστόσο δεν είναι καθολικής διάδοσης και προϋποθέτει την επικράτηση ευνοϊκών συνθηκών περιβάλλοντος, έτσι ώστε η έλλειψη βορίου να συνδυαστεί με υψηλούς ρυθμούς αύξησης (Pfeffer et al., 1998).

Η εκροή ιόντων  $K^+$  σε συνθήκες ανεπάρκειας βορίου επηρεάζει και τον μηχανισμό ανοίγματος των στοματίων της επιδερμίδας του φυτού *Commelina communis* (Roth-Bejerano and Itai, 1981). Το βόριο παίζει επίσης ρόλο στην

ομαλή ροή ηλεκτρονίων κατά τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην κυττοπλασματική μεμβράνη (Ferrol and Donaire, 1992; Cseh and Fodor, 1997). Κάτω από συνθήκες έλλειψης βορίου παρατηρείται πτώση της δραστηριότητας της οξειδάσης του NADH που εδράζεται στην κυτοπλασματική μεμβράνη, ενώ επανατροφοδοσία με βόριο προκαλεί ταχεία ενεργοποίηση του ενζύμου (Barr and Crane, 1991; Findelee et al., 1997). Η έλλειψη βορίου προκαλεί επίσης διαταραχή στην ικανότητα πρόσληψης και μεταφοράς ιόντων, η οποία αποκαθίσταται ταχέως όταν προστεθεί βόριο, φαινόμενο το οποίο πιθανώς να οφείλεται σε διαταραχές της λειτουργίας των μεμβρανικών αντλιών και σε αδυναμία ανάπτυξης διαφοράς ηλεκτροχημικού δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης (Robertson and Loughman, 1974; Pollard et al., 1977; Goldbach, 1984; Cakmak and Römheld, 1997). Το γεγονός ότι μετά από την χορήγηση βορίου αποκαθίσταται ραγδαία η δράση των μεμβρανικών αντλιών πρωτονίων, μπορεί να υποδηλώνει άμεση συμμετοχή του βορίου ως συνενζυμικού παράγοντα (Cakmak and Römheld, 1997). Έχει προταθεί ότι το βόριο σταθεροποιεί την δομή των κυτταρικών μεμβρανών δημιουργώντας σύμπλοκα με μεμβρανικά συστατικά, μέσω δεσμών υδρογόνου ή εστερικών δεσμών, οι οποίοι συμβάλουν στην απόκτηση της απαιτούμενης διαμόρφωσης, γεωμετρικής τοποθέτησης και αγκίστρωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Cakmak et al., 1995). Κάτω από συνθήκες τροφопενίας βορίου, ορισμένα ένζυμα που βρίσκονται δεσμευμένα στην κυτταρική μεμβράνη ή στο κυτταρικό τοίχωμα και θεωρούνται απενεργοποιημένα εκεί, απελευθερώνονται στον αποπλάστη, ασκώντας ενζυμική δράση (Blevins and Lukaszewski, 1998). Ένζυμα του είδους αυτού είναι η ριβονουκλεάση, η αφυδρογονάση της 6 φωσφορογλυκόζης, η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης, η β-γλυκοζιδάση και οι πολυφαινολοξειδάσες. Η ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών επηρεάζει, όπως είναι φυσικό, τον μεταβολισμό του κυττάρου καθώς επίσης και την δεξαμενή των φαινολικών συστατικών. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στα δικότυλα και όχι στα μονοκότυλα φυτά, γεγονός που οδηγεί στο ερώτημα αν τελικά οι αποπλαστικές πρωτεΐνες των μονοκοτύλων διέπονται από διαφορετικό πρότυπο γλυκοζυλίωσης ή αν η δέσμευσή τους στις μεμβράνες και στα κυτταρικά τοιχώματα είναι περιορισμένη (Shkol'nik, 1984; Cakmak and Römheld, 1997).

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

Με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα παρότι ο ρόλος του βορίου στον πρωτογενή μεταβολισμό δεν θεωρείται άμεσος, η έλλειψη του βορίου έχει επιπτώσεις στον κυτταρικό μεταβολισμό, οι οποίες σχετίζονται με ζωτικές λειτουργίες ή προκύπτουν από την απώλεια της κυτταρικής ομοιόστασης.

## Εισαγωγή

Ορισμένα ένζυμα όπως η ουρεάση (Thellier et al., 1979) και η φωσφορογλυκομουτάση (Shepherd, 1951) ενδεχομένως να σχετίζονται με το βόριο, ενώ έχει προταθεί ότι το βόριο αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα για ορισμένα μεταλλοένζυμα (Blevins and Lukaszewski, 1998; Dembitsky et al., 2002). Η ικανότητα ωστόσο του βορίου να αλληλεπιδρά με ορισμένα ένζυμα *in vitro* δεν σημαίνει κατ'ανάγκη και ανάλογη δράση *in vivo* (Blevins and Lukaszewski, 1998; Dembitsky et al., 2002). Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των φυτών παραμένει ακόμη θέμα υποθέσεων εργασίας.

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

Η επίδραση της έλλειψης του βορίου στην φωτοσυνθετική λειτουργία έχει διαπιστωθεί ότι είναι έμμεση και όχι άμεση. Κατ' αρχάς, υπό συνθήκες έλλειψης βορίου μειώνονται οι ρυθμοί αύξησης των φύλλων και έτσι προκαλείται μείωση της ενεργού φωτοσυνθετικής επιφάνειας. Στις συνθήκες αυτές, η πυκνότητα των στομάτων παρουσιάζεται μειωμένη, με μειωμένες διαστάσεις στοματικού πόρου και χαμηλότερες συγκεντρώσεις χλωροφυλλών, συγκριτικά με φύλλα φυτών που αναπτύσσονται σε συνθήκες επάρκειας του στοιχείου (Marschner, 1995; Dell and Huang, 1997). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της αγωγιμότητας των στομάτων και ως εκ τούτου και την μείωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας (Dell and Huang, 1997). Ένα ακόμα χαρακτηριστικό σύμπτωμα της τροφοπενίας βορίου είναι και οι δομικές και λειτουργικές διαταραχές των μεμβρανών (Cakmak et al., 1995; Blevins and Lucaszewski, 1998), που μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργίες στην φωτοσυνθετική ροή των ηλεκτρονίων στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών (El-Shintinawy, 1999). Πράγματι, στον ηλίανθο σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου έχουν διαπιστωθεί αλλοιώσεις στα δομικά λιπίδια των μεμβρανών των χλωροπλαστών, οι οποίες θεωρείται ότι προκαλούν διαρροή συστατικών από τις μεμβράνες και μειώνουν την φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II (El-Shintinawy, 1999; Kastori et al., 1995; Brown et al., 2002). Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η έλλειψη βορίου προκαλεί μείωση στα επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του μεγέθους των πρωτεϊνικών συμπλόκων των φωτοσυλλεκτικών μηχανισμών, μειωμένη απόδοση της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων (El-Shintinawy, 1999; Goldbach et al., 1991) καθώς και αυξημένη ευαισθησία έναντι της φωτοπαραεμπόδισης (Dell and Huang, 1997). Οι διαταραχές αυτές ευνοούν τον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στις μεμβράνες και στις χρωστικές των

χλωροπλαστών, εφόσον οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί παρουσιάζουν αδυναμία να ανταποκριθούν. Σε προχωρημένο στάδιο τροφopenίας, μια τέτοια κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε χλώρωση (Cakmak and Römheld, 1997). Τα φαινόμενα αυτά ενισχύονται υπό συνθήκες υψηλών εντάσεων φωτός (Cakmak et al., 1995; Marschner, 1995; Robertson and Longman, 1974) διότι στις συνθήκες αυτές αφενώς ευνοείται η φωτοπαρεμπόδιση και επομένως η παραγωγή ROS, και αφετέρου αυξάνεται η παραγωγή πολυσακχαριτών στα κυτταρικά τοιχώματα, ολιγοσακχαριτών και φαινολικών συστατικών, τα οποία δεσμεύουν βόριο με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι απαιτήσεις για το στοιχείο (Cakmak and Römheld, 1997). Ωστόσο, δεν έχουν παρατηρηθεί ανάλογες επιδράσεις της έλλειψης βορίου στην φωτοσυνθετική ικανότητα των φύλλων των φυτών *Olea europaea* και *Dittrichia viscosa* (Liakopoulos et al., 2005; Stavrianakou et al., 2006b). Αντίθετα, σε φύλλα ηλιάνθου (Kastori et al., 1995), η έλλειψη B είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της φωτοσυνθετικής αφομοίωσης του CO<sub>2</sub>. Σε φύλλα σπανακιού η έλλειψη βορίου μείωσε όχι μόνο την φωτοσυνθετική έκλυση O<sub>2</sub> αλλά και την μεταφορά ηλεκτρονίων από το PSII στο PSI (Goldbach et al., 1991).

Η ικανότητα του βορίου να σχηματίζει σύμπλοκα με σάκχαρα επιδρά στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και την διανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων μεταξύ των φυτικών οργάνων (Brown et al., 2002). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η τροφopenία του βορίου μπορεί να επηρεάσει την διανομή του οργανικού άνθρακα (Dugger, 1983), ωστόσο οι επιδράσεις αυτές είναι έμμεσες και όχι άμεσες, δεδομένου ότι η δημιουργία συμπλόκων του βορίου με τις πολυόλες σχετίζεται κυρίως με την διανομή του βορίου και όχι με την διανομή των φωτοσυνθετικών προϊόντων.

#### **II.5.5. Ο ρόλος του βορίου στον δευτερογενή μεταβολισμό.**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ανόργανη διατροφή των ανώτερων φυτών επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον δευτερογενή μεταβολισμό. Παρόλο που οι επιδράσεις του επιπέδου της θρέψης στον πρωτογενή μεταβολισμό έχουν εκτεταμένα μελετηθεί, οι μηχανισμοί με τους οποίους ο δευτερογενής μεταβολισμός ανταποκρίνεται στο επίπεδο θρέψης δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως (Aerts and Charin, 2000). Οι μελέτες για τις επιδράσεις της ανόργανης θρέψης στον δευτερογενή μεταβολισμό έχουν γενικά περιοριστεί σε επίπεδο τάξης ενώσεων. Λίγες μελέτες έχουν εστιαστεί στις επιδράσεις της ανόργανης θρέψης σε συγκεκριμένες δομές, παρόλο που ορισμένοι ερευνητές έχουν προτείνει ότι ανεξάρτητα από γενικές μεταβολικές αντιδράσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα, τα φυτά ανταποκρίνονται στις καταπονήσεις αναπτύσσοντας και

## Εισαγωγή

συντηρώντας υψηλές συγκεντρώσεις διακριτών δευτερογενών μεταβολιτών με πιθανώς συγκεκριμένες ιδιότητες (Dixon and Paiva, 1995).

### *II.5.5.1. Ο ρόλος του βορίου στον μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων*

Η τροφοπενία βορίου συνήθως αυξάνει τις συγκεντρώσεις των φαινολικών στους ιστούς των φυτών (Tan, 1980; Gershenzon, 1984; Brown et al., 1984; Chishaki and Horiguchi, 1997). Η έλλειψη βορίου φαίνεται ότι επάγει το μεταβολικό μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών (Cakmak and Römheld, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998). Η έλλειψη βορίου αυξάνει την δραστηριότητα της αμμωνιολυάσης της φαινυλαλανίνης, κυρίως στα δίκτυλα φυτά (Cakmak and Römheld, 1997; Ruiz et al., 1998) και οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή φαινολικών συστατικών (Cakmak and Römheld, 1997; Ruiz et al., 1999; Ruiz et al., 1998; Garcia et al., 2001). Το ένζυμο αυτό αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ του πρωτογενούς (βιοσυνθετική οδός του σικιμικού) και του δευτερογενούς μεταβολισμού (βιοσυνθετική οδός φαινυλοπροπανοειδών) (Seigler, 1998). Άλλος πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η έλλειψη βορίου αυξάνει την συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, όπως τα οξέα καφεϊκό ή 5-υδροξυφερουλικό, είναι η παρεμπόδιση σχηματισμού συμπλόκων των μορίων αυτών με το βορικό οξύ, γεγονός το οποίο οδηγεί στην αυξημένη διάθεση των φαινολικών οξέων στο κυτόπλασμα σε ελεύθερη μορφή.

Τα φύλλα της *Olea europaea* L. περιέχουν μεγάλη ποικιλία φαινολικών ενώσεων όπως φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, φλαβονοειδή (πολλα ως γλυκοσυλιωμένα παράγωγα φλαβονοειδών) και σεκοριδοειδή (Gariboldi et al., 1986; Le Tutour and Guedon, 1992; Pieroni et al., 1996; Le Floch et al., 1998). Επιπρόσθετα, μια υποδεξαμενή φαινολικών ενώσεων απαντάται στο πυκνό στρώμα των μη αδενωδών τριχών (Liakouroulos, 2005).

### *II.5.5.2. Η αλληλεπίδραση βορίου και φαινολικών ενώσεων στα κύτταρα.*

Ο σχηματισμός cis-diol συμπλόκων μεταξύ του βορίου και ορισμένων φαινολικών υπό συνθήκες επάρκειας του στοιχείου παίζει καθοριστικό ρόλο στην συσσώρευση των φαινολικών στους ιστούς υπο έλλειψη βορίου. Ο σχηματισμός των συμπλόκων του βορίου με ορισμένα φαινολικά, όπως το καφεϊκό οξύ, μπορεί ακόμη να επηρεάσει την δεξαμενή των φαινολικών των ιστών. Η δημιουργία των συμπλόκων αυτών, δεδομένης της διαμερισματοποίησης του κυττάρου, αποτρέπει την οξειδωση των φαινολικών του κυτοπλάσματος και του χυμοτοπίου από τις φαινολοξειδάσες ενώ επιτρέπει την διάθεσή τους ως υποστρώματα για την βιοσύνθεση φαινολικών αλκοολών, οι οποίες αποτελούν πρόδρομα της λιγνίνης. Όπως αναφέρεται από τους Lewis

(1980) και Pilbeam και Kirkby (1983), η πρόσδεση του βορίου στο καφεϊκό οξύ εμποδίζει τον σχηματισμό των κινονών. Οι φαινολοξειδάσες, οι οποίες καταλύουν την οξειδωση των φαινολικών ενώσεων προς κινόνες και εντοπίζονται στα πλαστίδια (Vaughn et al., 1988) και στα κυτταρικά τοιχώματα (Zawistowski et al., 1991), εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου και ιδιαίτερα σε φυτά που έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε βόριο (Cakmak and Römheld, 1997; Shkol'nik, 1984; Ruiz et al., 1998; Shkol'nik et al., 1981). Δεδομένου ότι η τροφοπενία βορίου προκαλεί απώλεια της διαμερισματοποίησης του κυττάρου εξαιτίας της διαταραχής της λειτουργίας των κυτταρικών μεμβρανών, στις συνθήκες αυτές λαμβάνει χώρα διαρροή ουσίων και προωθείται η οξειδωση των φαινολικών από τις φαινολοξειδάσες με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται οξειδωμένες μορφές φαινολικών συστατικών, κινονών καθώς και των προιόντων συμπύκνωσής τους, των μελανινών (Cakmak and Römheld, 1997). Στις μελανίνες οφείλεται ο καστανός μεταχρωματισμός των ιστών που έχουν τραυματιστεί. Έχει βρεθεί ότι οι κινόνες αποτελούν τις τοξικότερες μορφές των φαινολικών που παράγονται (Mason and Wasserman, 1987; Pillinger et al., 1994). Η συσσώρευση κινονών σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φυτά ευαίσθητα στη έλλειψη βορίου αποτελεί ενδεχόμενα μια από τις αιτίες καταστροφής του κυττάρου και της παρεμπόδισης της ανάπτυξης (Lee and Aronoff, 1967; Shkol'nik et al., 1981). Οι αυξημένοι ρυθμοί οξειδωσης των φαινολικών έχουν ως αποτέλεσμα παραγωγή κινονών οι οποίες παράγουν ROS, οπότε αυξάνονται οι πιθανότητες καταστροφής λόγω οξειδωτικών βλαβών κυτταρικών συστατικών όπως τα λιπίδια της μεμβράνης και οι πρωτεΐνες. Τα αυξημένα επίπεδα των ROS στα φυτά με τροφοπενία βορίου μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργιών της φωτοσύνθεσης και των αντιοξειδωτικών συστημάτων.





## Σκοπός της εργασίας

Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι υπό καθεστώς τροφοπενίας βορίου προκαλείται συσσώρευση φαινολικών συστατικών στα φύλλα ελιάς. Η παρούσα εργασία απέβλεπε στην παρατήρηση της συσσώρευσης φαινολικών συστατικών υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, σε φύλλα ελιάς, χρονικά και σε επίπεδο αναπτυξιακού σταδίου των φύλλων σε τέσσερα διαφορετικά καθεστώτα παροχής βορίου από το θρεπτικό διάλυμα. Ακόμη, αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε και ο σχηματισμός συμπλόκου του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά που διέθεταν δομή τύπου *cis*-διόλης. Επιπλέον, με βάση το δεδομένο ότι ο ακτεοσίδης αποτελεί φαινολικό συστατικό που συσσωρεύεται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις απουσία βορίου διερευνήθηκε και η συμπλοκοποίηση του ακτεοσίδη με το βορικό οξύ *in vitro*. Η πειραματική προσέγγιση της πρώτης υπόθεσης περιελάμβανε ελεγχόμενη ανάπτυξη νεαρών φυταρίων ελιάς με την μέθοδο της υδροπονικής καλλιέργειας. Έτσι, καθίσταται δυνατός ο πλήρης έλεγχος των συνθηκών θρέψης. Η δεύτερη ενότητα προσεγγίστηκε πειραματικά με *in vitro* πειράματα.



# Υλικά και Μέθοδοι

## *I. Πειράματα με υδροπονική καλλιέργεια φυταρίων ελιάς*

### **I.1. Φυτικό Υλικό και Περιγραφή των Συνθηκών Καλλιέργειας**

#### **I.1.1. Προετοιμασία του Φυτικού Υλικού και του Υποστρώματος Καλλιέργειας**

Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν φυτά ελιάς ποικιλίας 'Μανάκι', η οποία θεωρείται ευαίσθητη στην τροφοπενία βορίου. Συνολικά παρελήφθησαν 100 υγιή ριζοβολημένα μοσχεύματα ηλικίας ενός έτους (φυτώριο Ελιάς Γ. Κωστελένος, Πόρος Τροιζινίας). Για τα προκαταρκτικά πειράματα επιλέχθηκαν 10, 5 και 10 φυτά. Για το κύριο πείραμα επιλέχθηκαν 52 φυτά και χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των 13 φυτών. Η επιλογή τους έγινε με βάση την ομοιομορφία και τον αριθμό των φύλλων της υπέργεια βλάστησης. Στη συνέχεια κάθε ομάδα καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα με διαφορετική συγκέντρωση βορικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για μεν το προκαταρκτικό 23,0  $\mu\text{M}$  (φυτά μάρτυρες, B23) και 0,0  $\mu\text{M}$  βορικού οξέος (φυτά B0), για δε το κύριο πείραμα 23,0  $\mu\text{M}$  (φυτά μάρτυρες, B23), 2,0  $\mu\text{M}$  (φυτά B2), 0,5  $\mu\text{M}$  (φυτά B05) και 0,0  $\mu\text{M}$  βορικού οξέος (φυτά B0). Οι τρεις τελευταίες μεταχειρίσεις αντιπροσωπεύουν ανεπαρκή τροφοδοσία βορίου στο μέσο καλλιέργειας. Τα φυτά είχαν κατά μέσο όρο 17 εκπτυγμένα φύλλα, 9 εκπτυσσόμενα και μέσο όρο ύψους εμβολίου 30,5 cm.

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

Η άμμος προετοιμάστηκε με εξαντλητικό πλύσιμο χρησιμοποιώντας αρχικά νερό βρύσης και στην συνέχεια απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1 (v/v). Ακολούθως, η άμμος καθαρίστηκε με διάλυμα 5% HCL (w/v) / 1% οξαλικό οξύ (w/v) σε αναλογία επίσης 1:1 (v/v). Τελικά, η άμμος ξεπλύθηκε από τα υπολείμματα των οξέων με απεσταγμένο νερό έως ότου τα εκπλύματα να αποκτήσουν pH τουλάχιστον 3,5. Η διαδικασία προετοιμασίας της άμμου θεωρείται ότι απομακρύνει τα ανόργανα άλατα και τα ένυδρα οξειδία σιδήρου και αργίλου και έχει χρησιμοποιηθεί για την πειραματική μελέτη τροφοπενιών με ανόργανα στοιχεία συμπεριλαμβανομένου του βορίου (Hewitt 1952).

### **I.1.2. Περιγραφή του Συστήματος Πειραματικής Υδροπονικής Καλλιέργειας.**

Για το σύστημα πειραματικής υδροπονίας χρησιμοποιήθηκε κλειστός θάλαμος ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών. Η επιφάνεια ανάπτυξης είχε διαστάσεις 2,0 x 2,3 m. Στον θάλαμο ανάπτυξης λειτουργούσε σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας του αέρα, φωτοπεριόδου και έντασης φωτισμού. Οι κλιματικές συνθήκες διαμορφώνονταν με ομοιόμορφη κυκλοφορία αέρα από το εξωτερικό περιβάλλον. Ο θάλαμος διέθετε πίνακα ελέγχου με δυνατότητα προγραμματισμού 24 βημάτων ανά εικοσιτετράωρο. Ο φωτισμός παρέχόταν από 12 λαμπτήρες αλογόνου τύπου Powerstar HQI-BT-400W/D (OSRAM, GmbH, Munich, Germany).

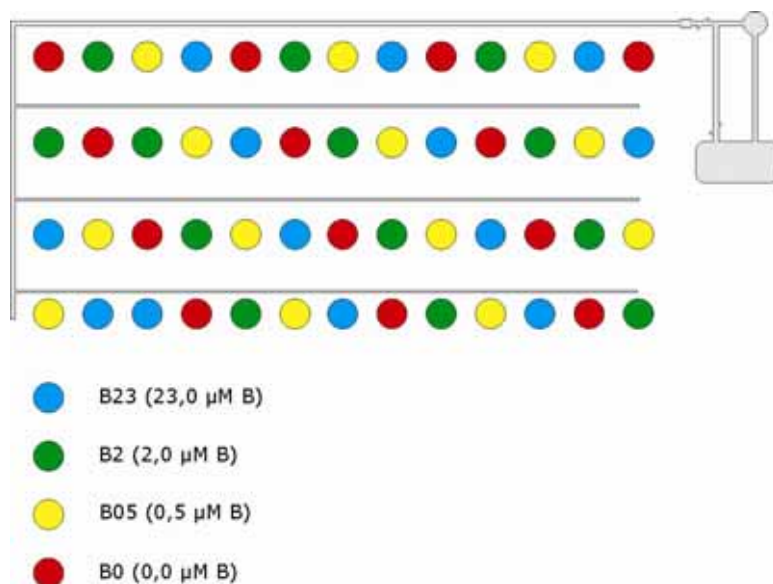
Το σύστημα της πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας διέθετε από τέσσερα ανεξάρτητα κυκλώματα διανομής θρεπτικού διαλύματος κλειστού τύπου χωρίς ανακύκλωση. Τα θρεπτικά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία όγκου 100 l. Για την τροφοδοσία κάθε κυκλώματος χρησιμοποιήθηκε αντλία τύπου DAB JET 81 M-P (DABPumps S.P.A., Mestrino, Italy) με δοχείο πίεσης όγκου 24 l. Η αντλία είχε μανομετρικό ύψος 102 m και παροχή 0,06-37,00 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Λόγω των μικρών απαιτήσεων παροχής και με σκοπό την αποφυγή επαναλαμβανόμενων εκκινήσεων κατά την διάρκεια της άρδευσης καθώς και για την τακτική ανακίνηση των θρεπτικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δευτερεύον κύκλωμα επαναφοράς στο δοχείο φύλαξης. Η πίεση στο κύκλωμα ρυθμιζόταν με βάνα στον σωλήνα του κυρίως κυκλώματος. Η πυκνότητα και ο χρόνος των αρδεύσεων ρυθμιζόταν αυτόματα από προγραμματιστή άρδευσης τύπου junior 6M (Irritrol Systems, Riverside, CA, USA).

Το κύκλωμα διανομής διέθετε από ένα κεντρικό κορμό με βάνα από φίλτρο σίτας και κεντρικές σωληνώσεις  $\varnothing$  25 που έφεραν σε καθορισμένα σημεία αυτορυθμιζόμενους σταλάκτες τύπου TORO (The Toro company, Bloomington, MN, USA) παροχής 4 l h<sup>-1</sup> και πίεσης λειτουργίας 1,5-4,0 atm. Οι σταλάκτες στην έξοδό τους έφεραν διακλάδωση τεσσάρων σημείων με σωληνάκια κατανομής θρεπτικού διαλύματος. Η διάταξη περιελάμβανε ένα σταλάκτη με τέσσερα σωληνάκια ανά δοχείο ανάπτυξης. Η απορροή των δοχείων γινόταν μέσω ενός σωλήνα ορθογώνιας διατομής με κατάλληλα ανοίγματα. Το εκκρέον θρεπτικό διάλυμα έρεε στην αποχέτευση. Όλα τα στοιχεία του συστήματος άρδευσης, συμπεριλαμβανομένων των δοχείων φύλαξης του θρεπτικού διαλύματος και των δοχείων ανάπτυξης των φυτών

ήταν κατασκευασμένα από πλαστικό υλικό (για την αποφυγή επιρύπανσης του θρεπτικού διαλύματος με βόριο) και σκούρου χρώματος (για την αποφυγή ανάπτυξης φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών). Προκειμένου να αξιολογηθεί η ομοιομορφία μεταξύ των σταλακτών του συστήματος έγιναν δοκιμές άρδευσης με δοκιμαστικά δοχεία και μετρήθηκε ο όγκος του θρεπτικού διαλύματος που συγκεντρωνόταν σε κάθε δοχείο. Η τυπική απόκλιση του όγκου του θρεπτικού διαλύματος ήταν μικρότερη από 10% του μέσου όρου. Για να εξασφαλιστεί ισορροπία το υπόστρωμα τοποθετήθηκε στα δοχεία ανάπτυξης και αρδεύονταν κανονικά με το θρεπτικό διάλυμα δύο μέρες πριν την τοποθέτηση των φυτών. Η τιμή του pH του εκκρέοντος θρεπτικού διαλύματος ήταν περίπου 4,5-5,0.

### 1.1.3. Συνθήκες Υδροπονικής Καλλιέργειας

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



Εικόνα 1. Η διάταξη των πειραματοφύτων ελιάς στο θάλαμο ανάπτυξης ανάλογα με την προοριζόμενη μεταχείριση.

Τα φυτά αρδεύονταν με θρεπτικό διάλυμα Hoagland No 2 ημίσειας συγκέντρωσης. Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος ήταν (σε  $\mu\text{M}$ ),  $\text{KNO}_3$  3000,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2000,  $\text{MgSO}_4$  1000,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  500,  $\text{FeNaEDTA}$  50,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  23,0/

2/ 0,5/ 0,0 , ανάλογα με την μεταχείριση και  $MnCl_2$  4,60,  $ZnSO_4$  0,43,  $CuSO_4$  0,16,  $Na_2MoO_4$  0,06. Η παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος γινόταν κάθε 3 ή 4 μέρες με αραιώση μητρικών διαλυμάτων σε απιονισμένο νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν στην τιμή 6,5 με KOH. Κατά την διάρκεια της παρασκευής των θρεπτικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά πλαστικά σκεύη για την αποφυγή επιρύπανσης με βόριο. Η συχνότητα των αρδεύσεων ήταν 12 αρδεύσεις ανά εικοσιτετράωρο, με συχνότητα 1 ώρα στη φωτοπερίοδο και 2 ώρες στη σκοτοπερίοδο και η διάρκεια κάθε άρδευσης 1 λεπτό. Με βάση τα παραπάνω, και δεδομένης της παροχής των σταλακτών, κάθε φυτό ελάμβανε 70 ml ανά άρδευση ή 800 ml ανα εικοσιτετράωρο.

#### **I.1.4. Κατηγορίες Δειγμάτων και Πειραματικοί Χειρισμοί**

##### *I.1.4.1. Προκαταρκτικά πειράματα*

##### *I.1.4.1.α. Προκαταρκτικό πείραμα επίδρασης ελλειμματικής συγκέντρωσης βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας στα φαινολικά συστατικά των φύλλων*

Χρησιμοποιήθηκαν δύο χειρισμοί, ο μάρτυρας B23 και ο χειρισμός που αντιπροσώπευε την τροφοπενία βορίου, B0 και κάθε χειρισμός περιελάμβανε 5 φυτά. Το πείραμα διήρκεσε 54 ημέρες και συγκεκριμένα από 16/4/2005 έως 8/6/2005. Δειγματοληψία ελάμβανε χώρα κάθε τρεις ή τέσσερις ημέρες σε μεσημβρινές ώρες και περιελάμβανε ένα φύλλο από κάθε χειρισμό, το πρώτο πλήρως εκπτυγμένο της νεαρής βλάστησης από την βάση.

##### *I.1.4.1.β. Προκαταρκτικό πείραμα μέτρησης συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών των φύλλων καθ' ύψος*

Το πείραμα αυτό διεξήχθη προκειμένου να μελετηθεί η μεταβολή της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών των φύλλων καθ' ύψος. Το πείραμα διήρκεσε από 12/06/2005 έως 17/06/2005 και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 φυτά. Μετά το πέρας των 5 ημερών έλαβε χώρα δειγματοληψία ενός δίσκου για ένα φύλλο ανά κόμβο, ξεκινώντας από τον τέταρτο κόμβο και καταλήγοντας στον εικοστό δεύτερο.

##### *I.1.4.1.γ. Προκαταρκτικό πείραμα της επίδρασης της μερικής αποφύλλωσης στα φαινολικά συστατικά των φύλλων*

Για να μελετηθεί η επίδραση της αποφύλλωσης στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, έλαβε χώρα απομάκρυνση ενός φύλλου από κάθε κόμβο, από τον τέταρτο κόμβο μέχρι τον εικοστό δεύτερο. Το πείραμα διήρκεσε από 12/06/2005 έως 17/06/2005 και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3

φυτά άθικτα (μάρτυρες) και τρία φυτά μεταχείρισης. Μετά το πέρας των 5 ημερών έλαβε χώρα δειγματοληψία ενός δίσκου για ένα φύλλο ανά κόμβο.

#### *I.1.4.2. Κύριο πείραμα*

Για την διεξαγωγή του κύριου πειράματος, καθορίστηκαν κατ' αρχήν τρεις κατηγορίες-δέσμες φύλλων. Η ανώτερη δέσμη (Δ1) άρχιζε από την κορυφή της νεαρής βλάστησης και κατέληγε στο τελευταίο νεαρό φύλλο. Η δεύτερη δέσμη (Δ2) περιελάμβανε φύλλα των επόμενων έξι κόμβων της βλάστησης, τα οποία βρίσκονταν σε διαφορετικά στάδια έκπτυξης κατά την έναρξη των πειραματικών χειρισμών, ενώ η τελευταία δέσμη (Δ3) περιελάμβανε φύλλα ώριμα που είχαν συμπληρώσει την έκπτυξή τους πριν την έναρξη των πειραματικών χειρισμών. Το πείραμα διήρκησε από 20/06/2005 έως 13/07/05. Σε κάθε δειγματοληψία που απέβλεπε στην μέτρηση της απορρόφησης φαινολικών συστατικών τα δείγματα προέρχονταν από φύλλα όλων των δεσμών και όλων των χειρισμών βορίου (B23, B2, B05, B00). Σε κάθε κατηγορία δέσμης και χειρισμού αντιστοιχούσαν τρεις επαναλήψεις άρα λαμβάνονταν τρία φύλλα.

## **I.2. Τρόπος Διενέργειας Μετρήσεων**

### **I.2.1. Παράμετροι ανάπτυξης και παράμετροι χημικής σύστασης**

Μετά την λήξη του πειράματος ελήφθησαν μετρήσεις που αφορούσαν σε μορφολογικές και φυσιολογικές παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα έλαβαν χώρα μετρήσεις των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών (μήκος βλάστησης, αριθμός φύλλων Δ1, Δ2, Δ3, νωπό βάρος των φύλλων και της ρίζας, ξηρό βάρος φύλλων). Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις συγκέντρωσης βορίου και φαινολικών συστατικών στα φύλλα.

### **I.2.2. Συγκέντρωση Βορίου**

#### *I.2.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων για Μέτρηση ολικού βορίου*

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού βορίου έλαβε χώρα στις τρεις δέσμες των χειρισμών B23 και B00 σε τέσσερις επαναλήψεις. Το έλασμα των φύλλων κάθε κατηγορίας χωρίστηκε σε δύο μέρη. Το ένα τοποθετήθηκε στους 50<sup>0</sup> C για τρία εικοσιτετράωρα ώστε να μετρηθεί το ολικό βόριο. Ακολούθησε λειοτρίβηση αυτού και τοποθέτηση 0,1g ξηρής ουσίας περίπου, σε πορσελάνινες κάψες (εξευγενισμένες με πλύσεις διαλύματος HCl 0,6N και απιονισμένου νερού) και στη συνέχεια ξηρή καύση σε θερμοκρασία 500<sup>0</sup> C (ανύψωση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4,2<sup>0</sup> C min<sup>-1</sup> και παραμονή στην παραπάνω θερμοκρασία για 6 h). Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η τέφρα

εκχυλίστηκε με 0,5 ml διαλύματος HCl 6 N και το εκχύλισμα αραιώθηκε σε τελικό όγκο 5 ml με νερό.

#### *1.2.2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων για Μέτρηση κλάσματος αδιάλυτου βορίου*

Για την μέτρηση του κλάσματος αδιάλυτου βορίου αρχικά συλλέχθηκαν τα κυτταρικά τοιχώματα με την ακόλουθη διαδικασία. Το υπόλοιπο ήμισι του φύλλου λειοτριβήθηκε έως λεπτής σκόνης σε γουδί με υγρό άζωτο. Η σκόνη εκχυλίστηκε τέσσερις φορές με 10 ml νερό MilliQ ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του διαλυτού βορικού οξέος και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (2600 g, 5 min). Το στερεό υπόλειμμα συλλέχθηκε και ξηράνθηκε στους 50<sup>o</sup> C για τρία εικοσιτετράωρα. Ακολούθως το δείγμα υποβλήθηκε σε ξηρή καύση όπως παραπάνω.

#### *1.2.2.3. Μέτρηση Συγκέντρωσης Βορίου Μέσω Χρωματικής Αντίδρασης Αζωμεθίνης.*

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης βορίου ακολουθήθηκε η μέθοδος της χρωματικής αντίδρασης με αζωμεθίνη (Banuelos et al. 1992). Όγκος 2 ml από το εκχύλισμα της τέφρας ρυθμίστηκε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος AcNH<sub>4</sub> / AcOH / Na<sub>2</sub>EDTA, pH 5,7 και αντέδρασε με 1 ml διαλύματος αζωμεθίνης (0,45 g / 100ml ασκορβικού οξέος 1% ). Μετά από 20 min μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 420 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης τύπου Shimadzu UV-Vis 160A (Shimadzu Co., Tokyo, Japan).

Η συγκέντρωση βορίου υπολογίστηκε βάση καμπύλης αναφοράς (0,01 0,5 ppm B; 10 σημεία; R<sup>2</sup> 0,9977). Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε διάλυμα 0,6 N HCl. Σε όλα τα στάδια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκεύη για την αποφυγή επιρύπανσης με βόριο.

### **1.2.3. Ανάλυση Φαινολικών**

#### *1.2.3.1. Μέτρηση διαλυτών φαινολικών*

Τα φύλλα αμέσως μετά από την κοπή τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο. Στην συνέχεια κάθε φύλλο αποτριχώθηκε στην κάτω και πάνω επιφάνεια και παρελήφθει από το έλασμα ένας δίσκος διαμέτρου 4,5 mm. Ακολούθησε εκχύλιση του δίσκου σε 10 ml μεθανόλης 80% και φυγοκέντριση. Στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των υπερκειμένων στα 280nm και 330nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης τύπου Shimadzu UV-Vis 160A (Shimadzu Co., Tokyo, Japan).

#### *1.2.3.2. Μέτρηση φαινολικών υδρολύματος κυτταρικών τοιχωμάτων*



Για την μέτρηση των ολικών φαινολικών νωπά φύλλα λειοτριβήθηκαν σε γουδι με υγρό άζωτο έως λεπτής σκόνης. Ακολούθησαν τρεις εκχυλίσεις με 10 ml διαλύματος μεθανόλης 80%, ενώ μετά από κάθε εκχύλιση έλαβε χώρα φυγοκέντρηση (2600×g, 5 min). Τα υπερκείμενα κάθε εκχύλισης συννεύθηκαν και φωτομετρήθηκαν στα 280 nm και 330 nm. Το ίζημα εκχυλίστηκε με 10ml απιονισμένου νερού ακολούθησε φυγοκέντρηση (2600×g, 5 min), απομάκρυνση του υπερκείμενου και νέα εκχύλιση του ιζήματος με 10 ml ακετόνης και νέα φυγοκέντρηση. Το στερεό υπόλειμμα πλύθηκε με ακετόνη σε υάλινο φίλτρο 10–16 μm (Winzer Laborglastechnik, Wertheim, Germany) υπό κενό ώστε να απομακρυνθούν τα τελευταία υπολείματα των χλωροφυλλών και της υγρασίας.

Το προκύπτον ίζημα παρέμεινε στους 50 °C έως την παραλαβή 0,1 g ιστού. Στο δείγμα προστέθηκαν 3ml απιονισμένου νερού και 3 ml διαλύματος NaOH 8 N και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για την δημιουργία κενού, για 6 ώρες υπό χαμηλό φωτισμό. Μετά το πέρας των 6 ωρών ακολούθησε οξίνιση του ενεωρήματος που προέκυψε σε pH 1 με διάλυμα HCl 6N. Στην συνέχεια έλαβε χώρα εκχύλιση δυο φορές σε διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα, έτσι ώστε να παραληφθούν τα φαινολικά συστατικά από την υδατική φάση. Ακολούθησε απομάκρυνση των υπολειμάτων του οξέος με πλύσιμο της φάσης του οξικού αιθυλεστέρα τρεις φορές σε ίσο όγκο νερού σε εκχυλιστική χοάνη και τέλος το δείγμα συμπυκνώθηκε έως ξηρού υπό κενό. Μετά την συμπύκνωση ακολούθησε αραιώση των συστατικών σε 10ml μεθανόλης 80%. Τέλος, έλαβε χώρα φωτομέτρηση στα 280nm και 330 nm όπως παραπάνω.

## **II. Πειράματα με απομονωμένα φαινολικά**

### **II.1. Χρήση του βαθυχρωμικού φαινομένου στην υπεριώδη φασματοσκοπία για τη μελέτη του σχηματισμού συμπλόκων φαινολικών συστατικών-βορικού οξέος**

Η μελέτη της βαθυχρωμικής μετατόπισης των μεγίστων του φάσματος UV ορισμένων φαινολικών συστατικών ως αποτέλεσμα της προσθήκης βορικού οξέος χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη διερεύνηση του είδους και της θέσης των υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο (Harborne, 1998). Μέσω της βαθυχρωμικής μετατόπισης διερευνάται η ύπαρξη γειτονικών υδροξυλομάδων σε διαμόρφωση *cis*. Η βαθυχρωμική μετατόπιση οφείλεται στο σχηματισμό διεστερικού συμπλόκου μεταξύ των γειτονικών υδροξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου και του βορικού οξέος. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, το φαινόμενο της βαθυχρωμικής μετατόπισης χρησιμοποιήθηκε ώστε να

διαπιστωθεί και να μελετηθεί η ικανότητα ορισμένων φαινολικών συστατικών να σχηματίζουν σύμπλοκο με το βορικό οξύ.

## **II.2. Μελέτη σχηματισμού συμπλόκων βορικού οξέος με διαφορετικές δομές φαινολικών συστατικών**

Για να μελετηθεί ο σχηματισμός συμπλόκου φαινολικών συστατικών με βορικό οξύ, επιλέχθηκαν πέντε φαινολικά συστατικά που έφεραν *cis*-υδροξύλια στο μόριό τους (χλωρογενικό, καφεϊκό, πρωτοκατεχικό, γαλλικό, κατεχόλη) και πέντε φαινολικά οξέα χωρίς την παραπάνω δομή (φερουλικό, *p*-κουμαρικό, σαλικυλικό, βενζοϊκό, κινναμικό). Αρχικά παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα των παραπάνω φαινολικών σε νερό. Στην συνέχεια ακολούθησε αραιώση των διαλυμάτων φαινολικών σε buffer φωσφορικών ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) pH 7,4 τέτοια ώστε η συγκέντρωση των φαινολικών να είναι 40μM και ο όγκος του διαλύματος 5 ml. Ακολούθως, προστέθηκε 1 ml απιονισμένο νερό ή 1 ml διαλύματος βορικού οξέος έτσι ώστε στο προκύπτον μίγμα η αναλογία των δύο μορίων να είναι 1:1 (33,3 μM). Στα προκύπτοντα μίγματα λαμβανόταν φάσμα απορρόφησης ανά 30 min από 200 έως 500 nm.

## **II.3. Επίδραση της αναλογίας των δύο μορίων στο σχηματισμό του συμπλόκου**

Με βάση το παραπάνω πείραμα, επιλέχθηκαν δυο φαινολικά οξέα με δομή *cis*-υδροξυλίων, το καφεϊκό και το χλωρογενικό, τα οποία μετά την αντίδρασή τους με το βορικό οξύ παρουσίασαν την μεγαλύτερη βαθυχρωμική μετατόπιση, καθώς και δυο φαινολικά οξέα χωρίς δομή *cis*-υδροξυλίων, τα *p*-κουμαρικό και φερουλικό τα οποία δεν παρουσίασαν βαθυχρωμική μετατόπιση. Προκειμένου να μελετήσουμε σε ποια αναλογία φαινολικού συστατικού:βορικού οξέος παρατηρείται η μεγαλύτερη βαθυχρωμική μετατόπιση στο φάσμα απορρόφησης (η οποία αντιστοιχεί στο σχηματισμό συμπλόκου για το 100% των μορίων του φαινολικού συστατικού) μετρήθηκε η βαθυχρωμική μετατόπιση σε μίγματα με διαφορετικές δεκαδικές αραιώσεις διαλύματος βορικού οξέος. Έτσι, παρασκευάστηκαν μίγματα φαινολικών:βορικού οξέος 1:0, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2500. Μετά από 1h λήφθηκε φάσμα απορρόφησης ανά 30 min από 200 έως 500 nm.

## **II.4. Μελέτη του χρόνου σχηματισμού του συμπλόκου.**

Στα πειράματα αυτά λήφθηκε φάσμα απορρόφησης πριν και αμέσως μετά (3 sec) της προσθήκης βορικού οξέος σε διαλύματα φαινολικών συστατικών (χλωρογενικού και καφεϊκού οξέος) σε τελική αναλογία 1:1000. Από τα

πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι η βαθυχρωμική μετατόπιση ήταν μέγιστη 3 sec μετά από την προσθήκη του βορικού οξέος.

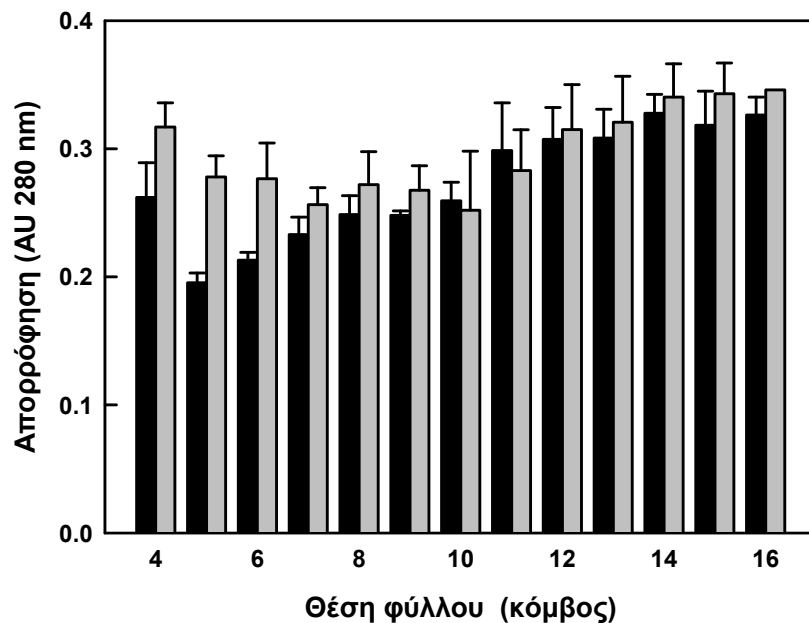


# Αποτελέσματα

## I. Προκαταρκτικά πειράματα

### I.1. Μέτρηση συγκέντρωσης φαινολικών καθ' ύψος

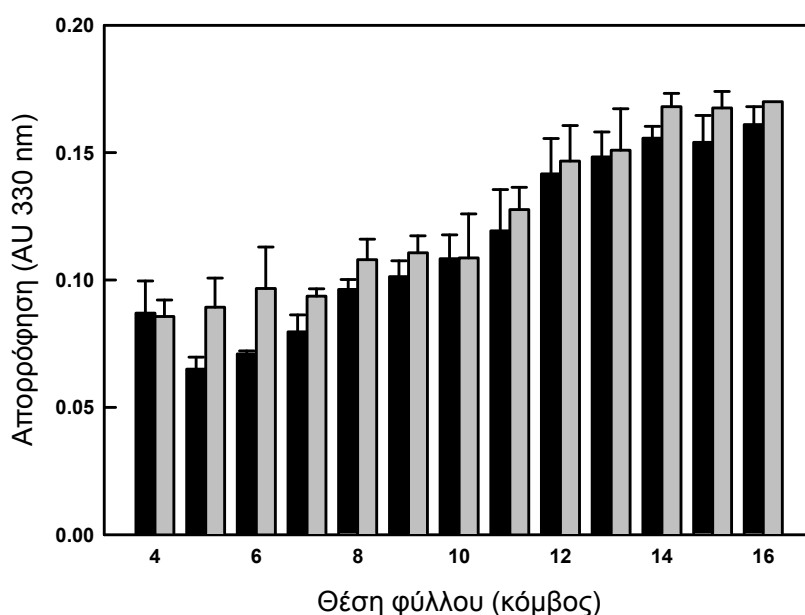
Στην εργασία αυτή διερευνήθηκαν επιλεγμένες φυσιολογικές μεταβλητές οι οποίες σχετίζονται με την επίδραση της έλλειψης βορίου στο δευτερογενή μεταβολισμό. Για τα πειράματα που ακολουθούν θεωρήθηκε σκόπιμο να διακριθούν τρεις ηλικιακές κατηγορίες φύλλων κατανεμημένες σε τρεις δειγματοληπτικές κατηγορίες, Δ1 ως αναπτυσσόμενα, Δ2 ως πλήρως εκπτυγμένα και Δ3 ως ώριμα. Διενεργήθηκε επίσης ένα προκαταρκτικό πείραμα ώστε να καταγραφούν τυχόν διαφορές στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών καθ' ύψος. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν τέσσερα φυτά ελιάς στα φύλλα των οποίων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις συγκέντρωσης φαινολικών. Τα φύλλα διακρίθηκαν σε κόμβους από το ανώτερο (4<sup>ος</sup> κόμβος) προς το κατώτερο τμήμα της βλάστησης (16<sup>ος</sup> κόμβος,). Στην εικόνα 1 απεικονίζεται η



Εικόνα 1. Απορρόφηση στα 280 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων (από την κορυφή προς τη βάση της βλάστησης) τα οποία είχαν παραμείνει για 5 ημέρες στο θάλαμο ανάπτυξης. Από κάθε φύλλο εκχυλίστηκαν 2 δίσκοι διαμέτρου 7 mm και το τελικό εκχύλισμα είχε όγκο 25 ml. Με μαύρες ράβδους παριστάνονται τα άθικτα φυτά ενώ με γκρι τα φυτά τα οποία υποβλήθηκαν σε μερική αποφύλλωση κατά την έναρξη του πειράματος. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

## Αποτελέσματα

απορρόφηση στα 280 και 330 nm η οποία αντιστοιχεί στα φαινολικά συστατικά μεθανολικών εκχυλισμάτων. Τα φυτά είχαν εγκατασταθεί στον θάλαμο ανάπτυξης για πέντε ημέρες. Τα φύλλα των αρχικών αναπτυξιακών σταδίων παρουσιάζουν πρόσκαιρα υψηλές τιμές απορρόφησης στα 280 nm οι οποίες στην συνέχεια μειώνονται στα φύλλα του πέμπου κόμβου μετά τον οποίο βαίνουν αυξανόμενες μέχρι τον δεκατο τέταρτο κόμβο όπου σταθεροποιούνται σε υψηλές τιμές. Όσον αφορά στα 330 nm, οι τιμές απορρόφησης παρουσιάζουν ανάλογη εικόνα με αυτή των 280 nm αυξανόμενου του αναπτυξιακού σταδίου (Εικόνα 2).

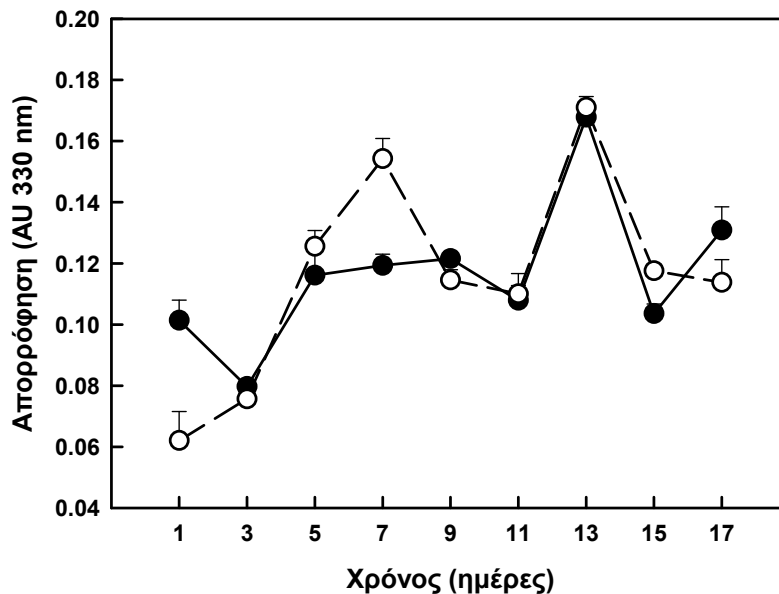


Εικόνα 2. Απορρόφηση στα 330 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων (από την κορυφή προς τη βάση της βλάστησης) τα οποία είχαν παραμείνει για 5 ημέρες στο θάλαμο ανάπτυξης. Από κάθε φύλλο εκχυλίστηκαν 2 δίσκοι διαμέτρου 7 mm και το τελικό εκχύλισμα είχε όγκο 25 ml. Με μαύρες ράβδους παριστάνονται τα άθικτα φυτά ενώ με γκρι τα φυτά τα οποία υποβλήθηκαν σε μερική αποφύλλωση κατά την έναρξη του πειράματος. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

### 1.2. Μέτρηση επίδρασης της μερικής αποφύλλωσης στην συγκέντρωση φαινολικών καθ' ύψος

Δεδομένου ότι στο κυρίως πείραμα είχε σχεδιαστεί η λήψη δειγμάτων φύλλων εκ περιτροπής από όλα τα φυτά, θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί εάν η αφαίρεση μικρού αριθμού φύλλων αποτελεί παράγοντα αλλαγής των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών στα εναπομείναντα φύλλα. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν τέσσερα φυτά ελιάς τα οποία παρέμειναν κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τα αντίστοιχα του πειράματος της μελέτης της συγκέντρωσης

φαινολικών συστατικών κατά ύψος (βλ. I.a.). Στα φυτά αυτά έγινε μερική αποφύλλωση κατά την εισαγωγή τους στο θάλαμο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, αφαιρέθηκε το ένα από τα δύο φύλλα κάθε κόμβου, χειρισμός ο οποίος αντιστοιχούσε σε ποσοστό αποφύλλωσης 50%. Μετά την πάροδο πέντε ημερών μετρήθηκε η απορρόφηση όπως παραπάνω (βλ. I.a.). Στις εικόνες 1 και 2 παρουσιάζεται συγκριτικά η απορρόφηση στα 280 και 330 nm των φύλλων μεταξύ των δύο χειρισμών. Η κατά ύψος κλιμάκωση της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στα φυτά όπου είχε προηγηθεί αποφύλλωση έδειξε την ίδια εξάρτηση από το ηλικιακό στάδιο του φύλλου με αυτή των άρτιων φυτών. Συγκριτικά, οι δυο χειρισμοί δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές στην απορρόφηση των δειγμάτων από ανεπτυγμένα φύλλα γεγονός που υποδηλώνει ότι η αποφύλλωση δεν επηρεάζει αισθητά τη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, στα αναπτυσσόμενα φύλλα, η αποφύλλωση προκάλεσε αισθητή αύξηση των φαινολικών συστατικών, ειδικά μετρούμενη στα 280 nm (Εικόνες 1 και 2).

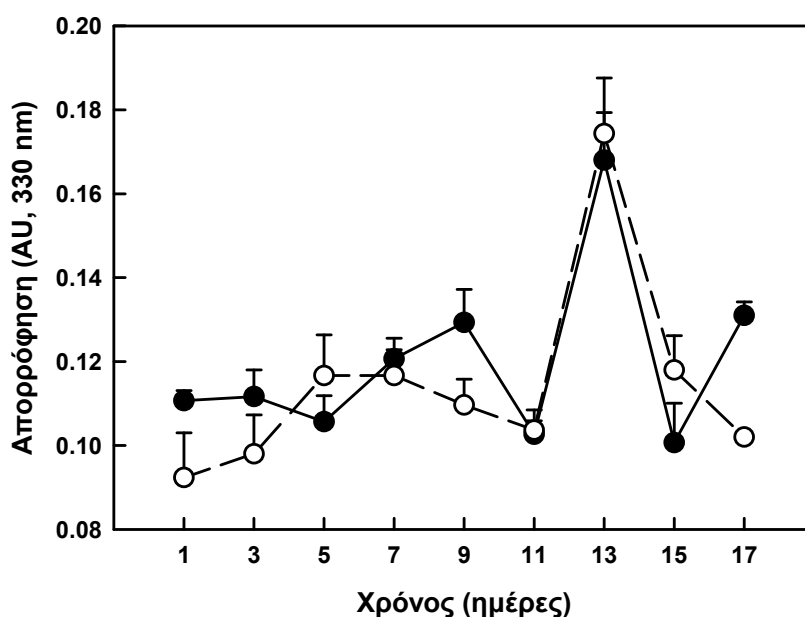


Εικόνα 3. Απορρόφηση στα 330 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων αναπτυσσόμενων φύλλων ελιάς κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23  $\mu\text{M}$ , μάρτυρας, μαύρα σύμβολα, συνεχής γραμμή) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (λευκά σύμβολα, διακεκομμένη γραμμή). Από κάθε φύλλο εκχυλίστηκαν 2 δίσκοι διαμέτρου 4,5 mm και το τελικό εκχύλισμα είχε όγκο 25 ml. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

## II. Κύρια πειράματα

### II.1. Διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών κατά την διάρκεια καλλιέργειας φυτών ελιάς με ελλειματικές συγκεντρώσεις βορίου στο θρεπτικό διάλυμα

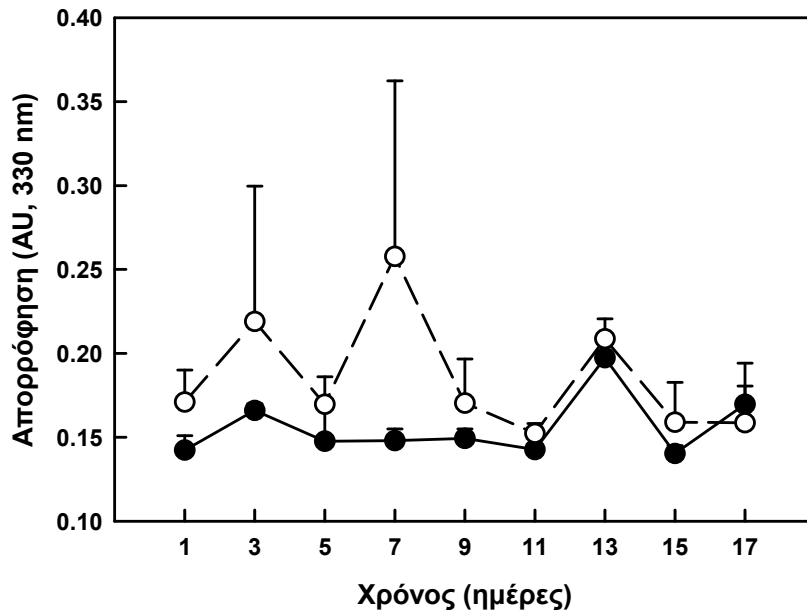
Στο κυρίως πείραμα, φυτά ελιάς καλλιεργήθηκαν σε υδροπονία για 17 ημέρες κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις βορικού οξέος στο θρεπτικό διάλυμα. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και ανά διαστήματα 2-3 ημερών, λαμβάνονταν δείγματα φύλλων ώστε να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης βορίου στα φαινολικά συστατικά. Στις εικόνες 3, 4 και 5 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της απορρόφησης των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων των φύλλων κάθε δέσμης για τους δύο ακραίους χειρισμούς, συναρτήσε του χρόνου καλλιέργειας. Παρατηρούμε ότι οι εντονότερες διακυμάνσεις σημειώθηκαν στα αναπτυσσόμενα φύλλα (Εικόνα 3). Η καλλιέργεια σε ελλειματικό ως προς βορικό οξύ θρεπτικό διάλυμα προκάλεσε σημαντική αύξηση των φαινολικών συστατικών στα φύλλα η οποία σημειώθηκε την



Εικόνα 4. Απορρόφηση στα 330 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων νεαρών πλήρως εκπτυγμένων φύλλων ελιάς κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23  $\mu\text{M}$ , μάρτυρας, μαύρα σύμβολα, συνεχής γραμμή) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (λευκά σύμβολα, διακεκομμένη γραμμή). Από κάθε φύλλο εκχυλίστηκαν 2 δίσκοι διαμέτρου 4,5 mm και το τελικό εκχύλισμα είχε όγκο 25 ml. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.



έβδομη ημέρα από την έναρξη των χειρισμών. Αντίθετα δεν σημειώθηκε κάποια σαφής επίδραση των χειρισμών στα ανεπτυγμένα φύλλα κατά την πορεία της καλλιέργειας (Εικόνα 4). Οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ της έλλειψης βορίου στο υπόστρωμα και του μάρτυρα παρατηρήθηκαν στα ώριμα φύλλα και σημειώθηκαν κατά την τρίτη και έβδομη ημέρα της καλλιέργειας (Εικόνα 5).

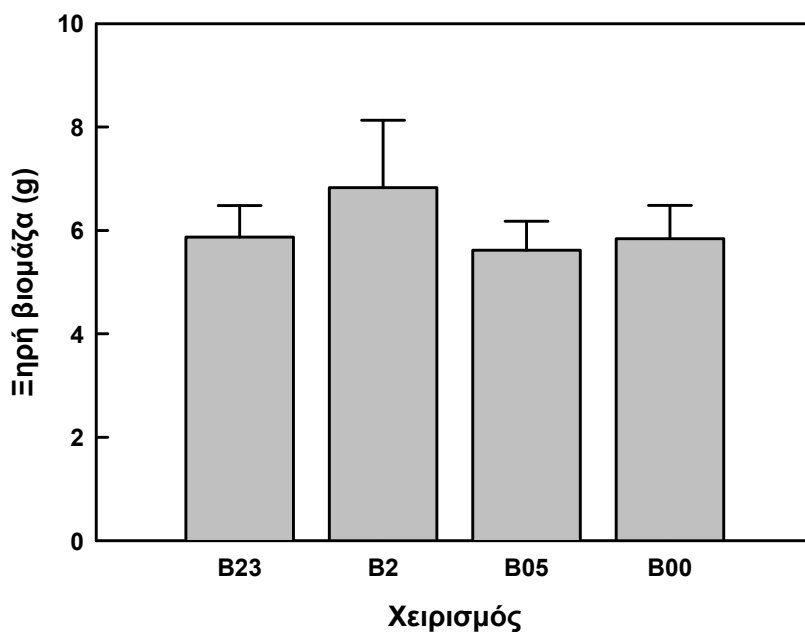


Εικόνα 5. Απορρόφηση στα 330 nm των μεθανολικών εκχυλισμάτων ώριμων φύλλων ελιάς κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23  $\mu\text{M}$ , μάρτυρας, μαύρα σύμβολα, συνεχής γραμμή) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (λευκά σύμβολα, διακεκομμένη γραμμή). Από κάθε φύλλο εκχυλίστηκαν 2 δίσκοι διαμέτρου 4,5 mm και το τελικό εκχύλισμα είχε όγκο 25 ml. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 3 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

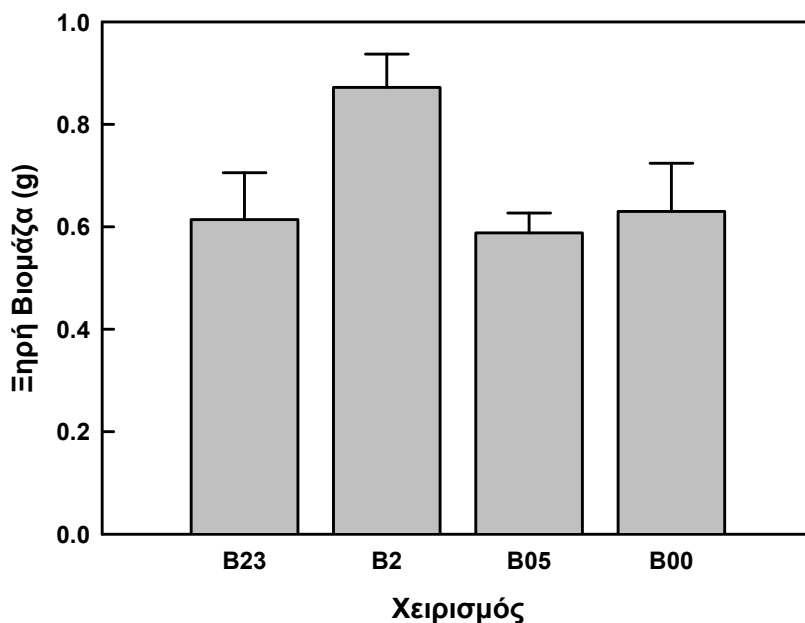
## II.2. Παράμετροι ανάπτυξης των φυτών στο τέλος του πειράματος

Στην εικόνα 6 απεικονίζεται η ξηρή βιομάζα των φυτών για κάθε χειρισμό. Σε συμφωνία με τις οπτικές παρατηρήσεις, η καλλιέργεια των φυτών σε διάφορες συγκεντρώσεις βορικού οξέος στο θρεπτικό διάλυμα δεν είχε σημαντική επίδραση στις αναπτυξιακές παραμέτρους των φυτών μέσα στο χρονικό διάστημα των 17 ημερών. Δεδομένου ότι η έλλειψη βορίου επηρεάζει κατά κύριο λόγο την ανάπτυξη της νέας βλάστησης, από τη βιομάζα των φυτών απομονώθηκαν τα αναπτυσσόμενα φύλλα (Εικόνα 7) καθώς και το ριζικό σύστημα (Εικόνα 8). Όπως παραπάνω, οι πειραματικοί χειρισμοί δεν είχαν σημαντική επίδραση στα τμήματα αυτά του φυτικού σώματος, γεγονός το οποίο

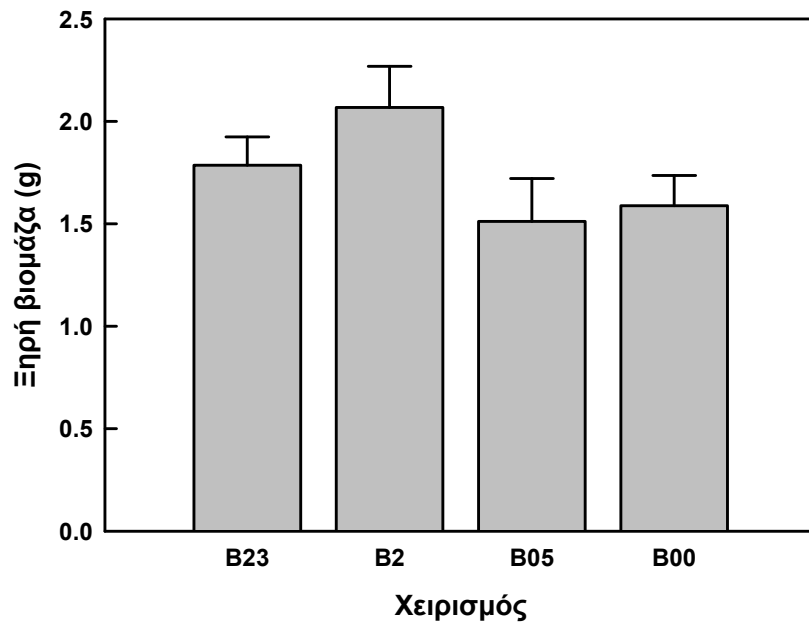
## Αποτελέσματα



Εικόνα 6. Η συνολική ξηρή βιομάζα των φυτών για κάθε πειραματικό χειρισμό (B23 μάρτυρας 23,0  $\mu\text{M}$ , B2 2,0  $\mu\text{M}$ , B05 0,5  $\mu\text{M}$  και B00 0,0  $\mu\text{M}$  βορικού οξέος) μετά το πέρας της υδροπονικής καλλιέργειας. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 7. Η συνολική ξηρή βιομάζα των αναπτυσσόμενων φύλλων για κάθε πειραματικό χειρισμό (B23 μάρτυρας 23,0  $\mu\text{M}$ , B2 2,0  $\mu\text{M}$ , B05 0,5  $\mu\text{M}$  και B00 0,0  $\mu\text{M}$  βορικού οξέος) μετά το πέρας της υδροπονικής καλλιέργειας. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 8. Η συνολική ξηρή βιομάζα των ριζών ανά φυτό για κάθε πειραματικό χειρισμό (B23 μάρτυρας 23,0  $\mu\text{M}$ , B2 2,0  $\mu\text{M}$ , B05 0,5  $\mu\text{M}$  και B00 0,0  $\mu\text{M}$  βορικού οξέος) μετά το πέρας της υδροπονικής καλλιέργειας. Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

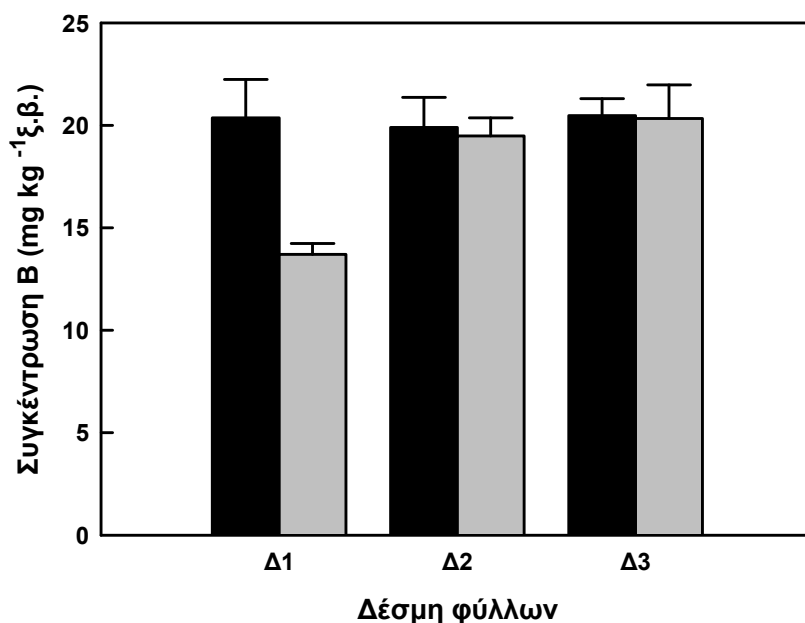
υποδηλώνει την απουσία επιβολής τροφοπενιακής κατάστασης στα φυτά κατά το διάστημα της καλλιέργειας.

### II.3. Μέτρηση ολικού βορίου

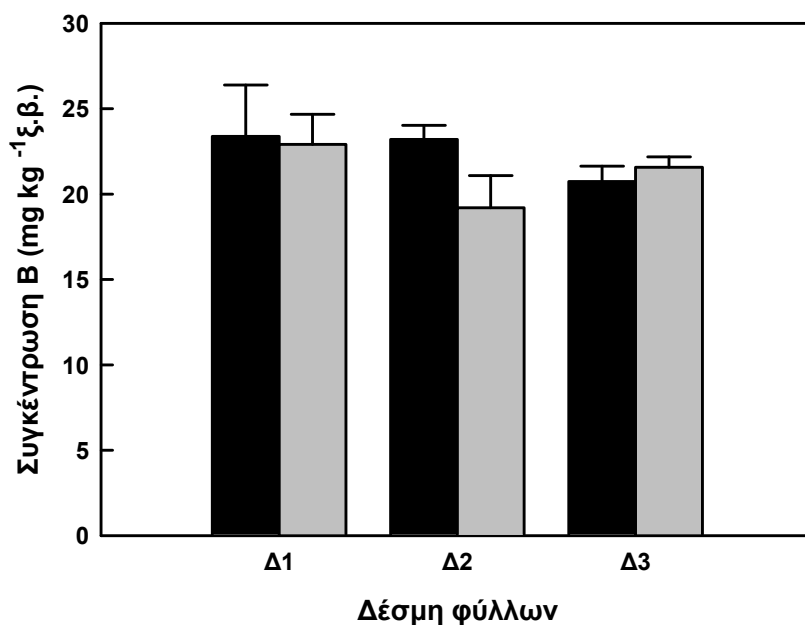
Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του ολικού βορίου στις τρεις διαφορετικές δέσμες φύλλων για τους δύο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς. Η συγκέντρωση βορίου δεν εμφάνισε διαφορές μεταξύ διαφορετικών ηλικιακών σταδίων των φύλλων. Μεταξύ των πειραματικών χειρισμών, η έλλειψη βορίου στο θρεπτικό διάλυμα προκάλεσε αισθητή πτώση του ολικού βορίου στα αναπτυσσόμενα μόνο φύλλα (Εικόνα 9).

### II.4. Μέτρηση κλάσματος αδιάλυτου βορίου

Οι τιμές της συγκέντρωσης του αδιάλυτου βορίου στα φύλλα διαφορετικών ηλικιακών σταδίων των φυτών του μάρτυρα δεν παρουσίασαν αισθητές διαφορές. Από την άλλη πλευρά, η έλλειψη βορίου στο μέσο καλλιέργειας προκάλεσε μικρή μείωση στη συγκέντρωση του αδιάλυτου βορίου των ανεπτυγμένων φύλλων (Εικόνα 10).



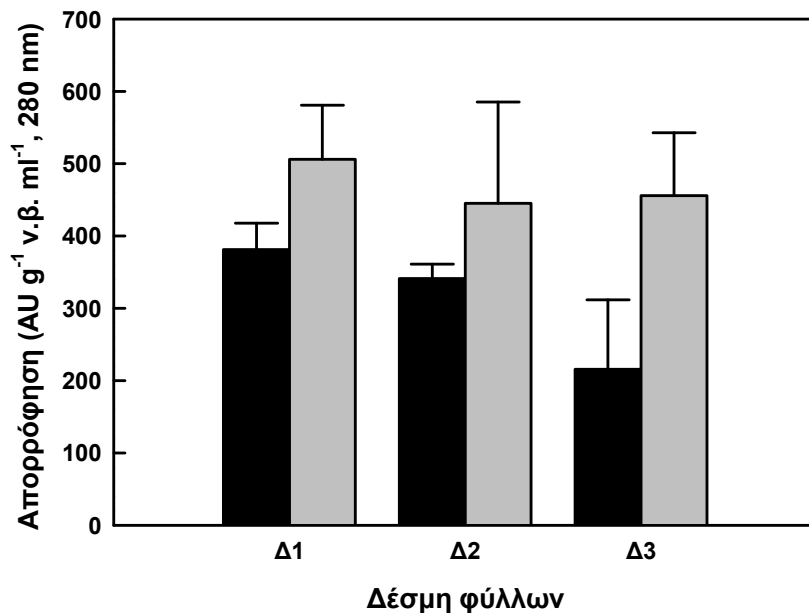
Εικόνα 9. Συγκέντρωση ολικού βορίου στις τρεις δέσμες φύλλων για τους δυο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς μετά το πέρας της υδροπονικής καλλιέργειας, σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23 μM, μάρτυρας, μαύρες ράβδοι) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (γκρι ράβδοι). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 10. Συγκέντρωση αδιάλυτου βορίου στις τρεις δέσμες φύλλων για τους δυο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς μετά το πέρας της υδροπονικής καλλιέργειας, σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23 μM, μάρτυρας, μαύρες ράβδοι) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (γκρι ράβδοι). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

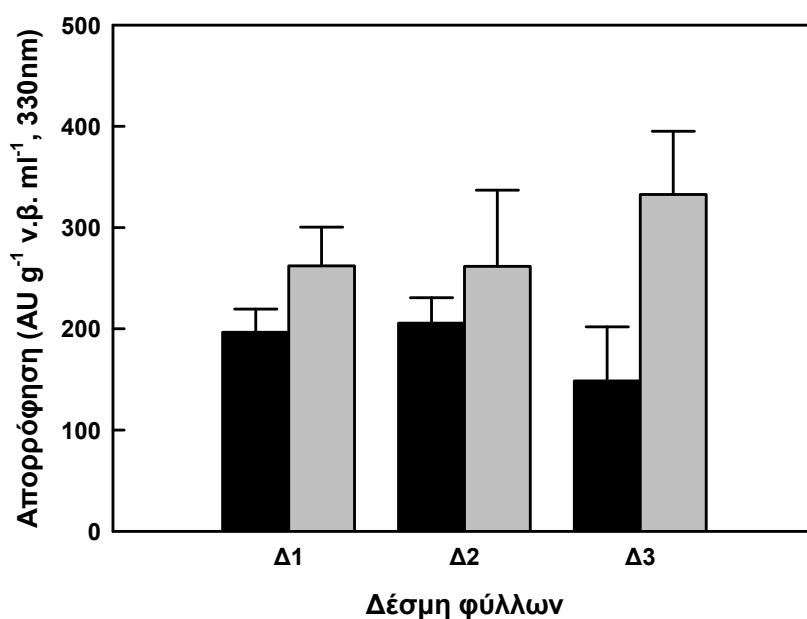
### II.5. Συγκέντρωση φαινολικών, διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος σε δείγματα φύλλων της τελικής δειγματοληψίας

Κατά την τελική δειγματοληψία, η οποία πραγματοποιήθηκε την 21<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη των χειρισμών, μετρήθηκε η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των φύλλων των τριών αναπτυξιακών σταδίων για τους δύο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς. Τα φαινολικά συστατικά διακρίθηκαν σε αυτά του διαλυτού κλάσματος (το οποίο παραλαμβάνεται με εκχύλιση σε κατάλληλο διαλύτη μετά από μηχανική ομογενοποίηση του ιστού) και σε αυτά του αδιάλυτου κλάσματος (το οποίο παραλήφθηκε μετά από απομόνωση και αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων). Σύμφωνα με τις αναλύσεις, η συγκέντρωση των διαλυτών φαινολικών συστατικών αυξήθηκε ως αποτέλεσμα της έλλειψης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα. Η αύξηση σημειώθηκε στα φύλλα και των τριών ηλικιακών σταδίων (Εικόνες 11 και 12). Ωστόσο, μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στα διαλυτά φαινολικά συστατικά των ώριμων φύλλων. Όσον αφορά στα φαινολικά συστατικά του αδιάλυτου κλάσματος (Εικόνες 13 και 14), η έλλειψη βορίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας προκάλεσε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης η οποία ήταν αισθητή στα φύλλα και των τριών ηλικιακών σταδίων. Μεταξύ των τριών ηλικιακών σταδίων, υψηλότερη αύξηση παρατηρήθηκε στα ανεπτυγμένα και ώριμα φύλλα.

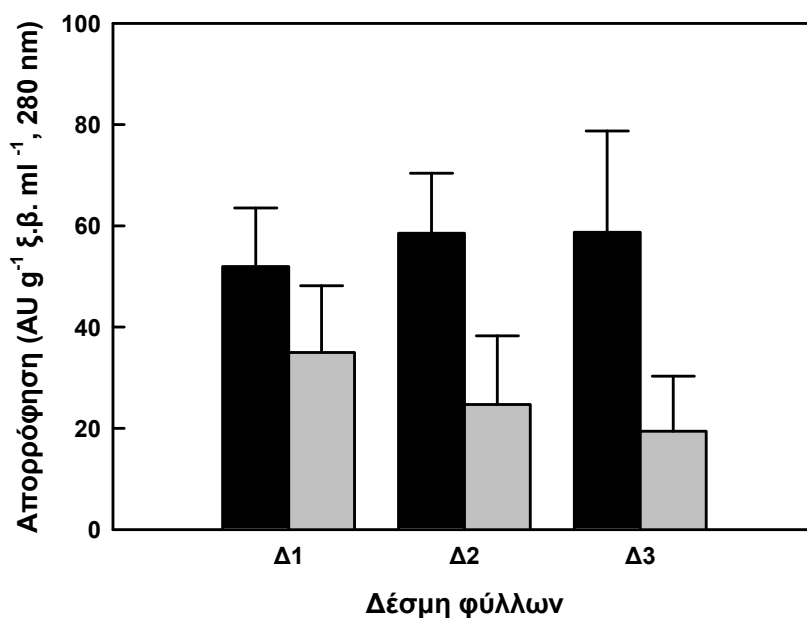


Εικόνα 11. Απορρόφηση στα 280 nm του διαλυτού κλάσματος φαινολικών συστατικών φύλλων ελιάς των τριών δεσμών για τους δυο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς, σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23 μM, μάρτυρας, μαύρες ράβδοι) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (γκρι ράβδοι). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

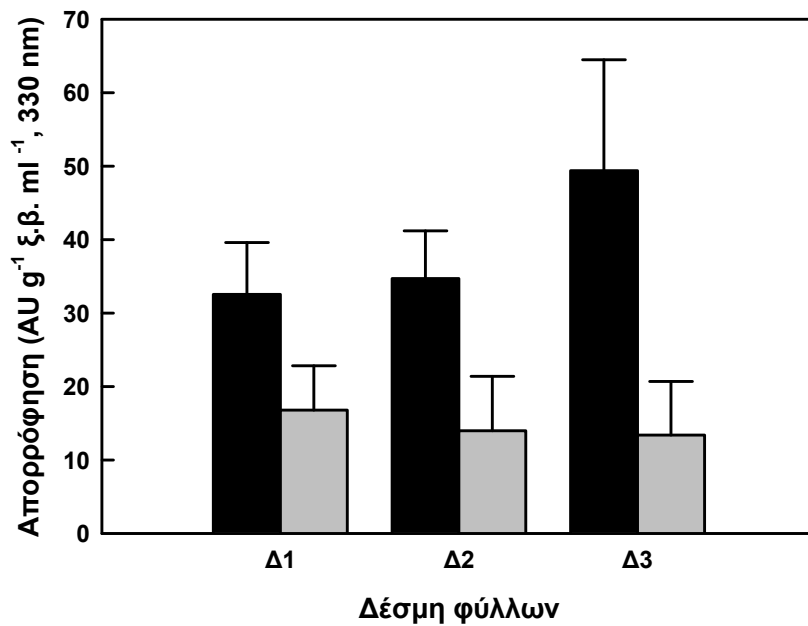
## Αποτελέσματα



Εικόνα 12. Απορρόφηση στα 330 nm του διαλυτού κλάσματος φαινολικών συστατικών φύλλων ελιάς των τριών δεσμών για τους δυο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς, σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23 μM, μάρτυρας, μαύρες ράβδοι) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (γκρι ράβδοι). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 13. Απορρόφηση στα 280 nm του αδιάλυτου κλάσματος φαινολικών συστατικών φύλλων ελιάς των τριών δεσμών για τους δυο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς, σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23 μM, μάρτυρας, μαύρες ράβδοι) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (γκρι ράβδοι). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 14. Απορρόφηση στα 330 nm του αδιάλυτου κλάσματος φαινολικών συστατικών φύλλων ελιάς των τριών δεσμών για τους δυο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς, σε θρεπτικό μέσο πλήρους σύστασης (συγκέντρωση βορικού οξέος 23  $\mu\text{M}$ , μάρτυρας, μαύρες ράβδοι) ή σε θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσίαζε το βορικό οξύ (γκρι ράβδοι). Κάθε τιμή είναι μέσος όρος 4 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου.

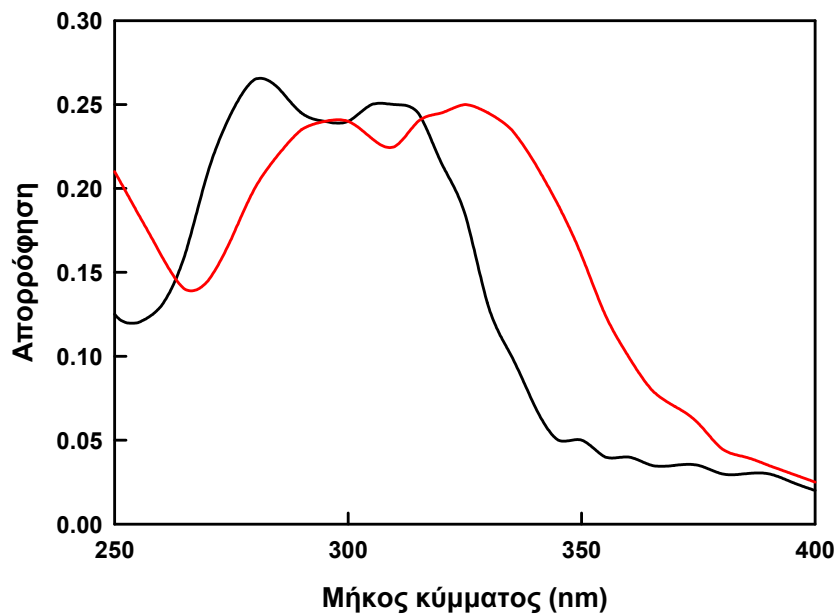
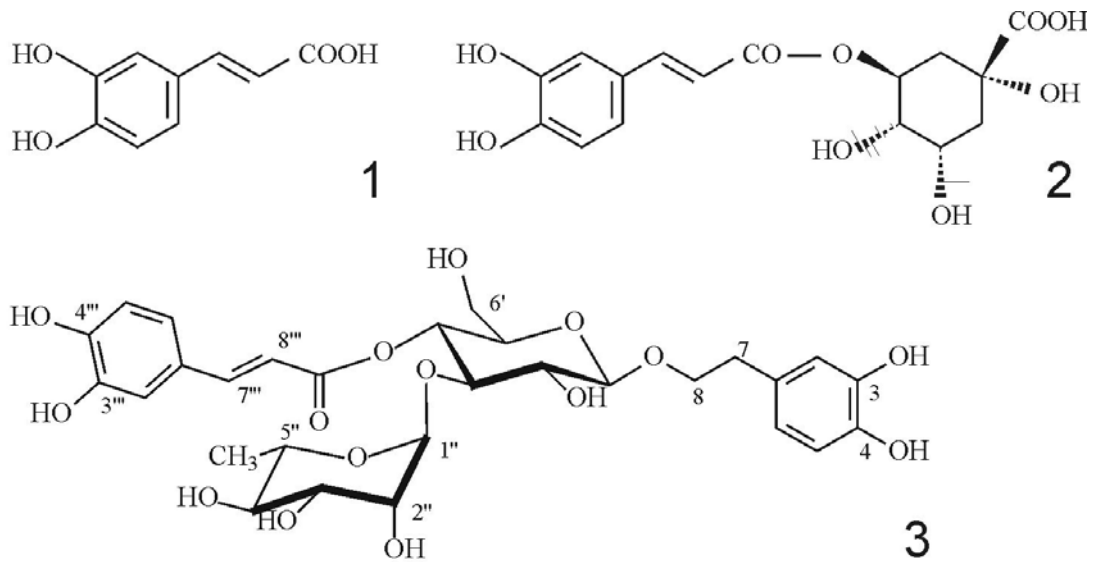
### III. *In vitro* Πειράματα

#### III.1. Σχηματισμός συμπλόκων Βορικού οξέος με επιλεγμένες δομές φαινολικών συστατικών

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να μελετηθεί η αυθόρμητη δημιουργία συμπλόκων βορικού οξέος – φαινολικών συστατικών *in vitro*. Για το σκοπό αυτό, επιλεγμένα φαινολικά συστατικά διαλύθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη και αραιώθηκαν με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έως τελικής συγκέντρωσης 33  $\mu\text{M}$ . Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος επιλέχθηκε να προσομοιάζει αυτό του κυτταροπλάσματος ενός τυπικού κυττάρου. Ακολούθως προστέθηκε ορισμένος όγκος διαλύματος βορικού οξέος ώστε τελικά να διαμορφωθούν στο μίγμα διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες φαινολικών συστατικών – βορικού οξέος, με τιμές από 0 έως 2500 φορές αυτών του φαινολικού συστατικού. Σκοπός των κλιμακούμενων συγκεντρώσεων βορικού οξέος ήταν να διαπιστωθεί η τιμή εκείνη της συγκέντρωσης βορικού οξέος η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συμπλοκοποίηση του συνόλου των μορίων του φαινολικού συστατικού το οποίο κάθε φορά χρησιμοποιήθηκε. Μετρήσεις ελέγχου του pH έδειξαν ότι το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο επιλέχθηκε διατήρησε την επιλεγμένη τιμή pH ανεξάρτητα της τελικής γραμμομοριακής αναλογίας φαινολικών συστατικών –

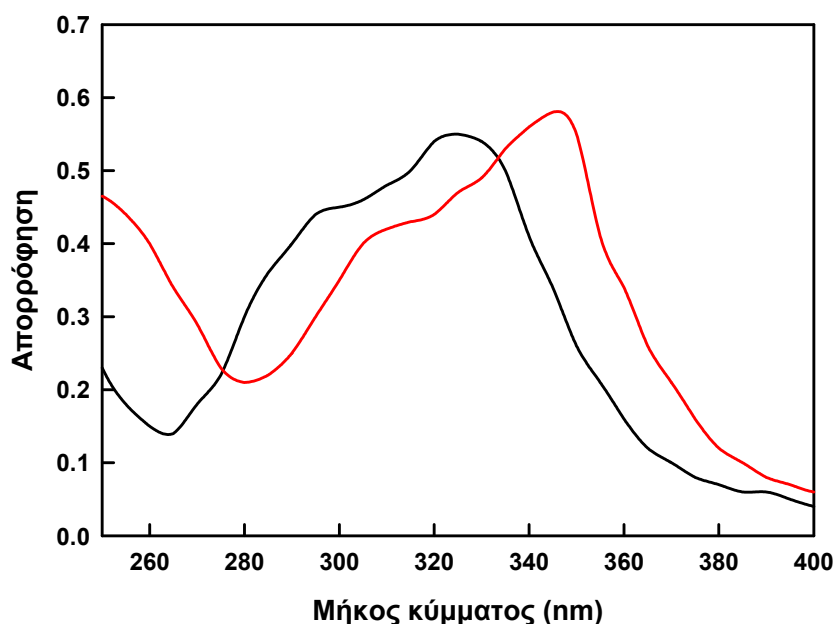
βορικού οξέος. Οι διάφορες δομές των φαινολικών συστατικών επιλέχθηκαν με βάση τη θέση και τον αριθμό των ζευγών υδροξυλομάδων στον ανθρακικό σκελετό οι οποίες τελούσαν υπό στερεοδιαμόρφωση *cis*. Δύο είναι τα χαρακτηριστικά της μοριακής δομής τα οποία εξασφαλίζουν την παραπάνω διαμόρφωση. Το πρώτο αφορά στη θέση των υποκαταστατών σε θέση όρθο-στον φαινολικό δακτύλιο ενώ το δεύτερο στο γεγονός ότι, λόγω στερεοχημείας του αρωματικού συστήματος, οι υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, αυτό του αρωματικού δακτυλίου. Τα επιλεγμένα φαινολικά τα οποία διαθέτουν την παραπάνω διαμόρφωση ήταν τα φαινολικά οξέα καφεϊκό (1), προτοκατεχουϊκό (3,4-διϋδρόξυ-βενζοϊκό οξύ), γαλλικό και χλωρογενικό (2), η ορθοδιφαινόλη κατεχόλη, καθώς και ο φαινυλαιθανοειδής γλυκοσίτης ακτεοσίδης (3) (βερμπασκοσίδης). Το τελευταίο αυτό συστατικό επιλέχθηκε βάσει της ιδιαίτερης φυσιολογικής του συμπεριφοράς, σύμφωνα με προηγούμενες παρατηρήσεις (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Liakopoulos et al., αδημοσιεύτα αποτελέσματα). Παράλληλα με τις παραπάνω δομές, επιλέχθηκαν και φαινολικά συστατικά τα οποία δεν διαθέτουν την κατάλληλη διαμόρφωση. Αυτά ήταν τα φαινολικά οξέα φερουλικό, σαλικυλικό, *p*-κουμαρικό, βενζοϊκό και σινναμικό. Μετά τη δημιουργία των τελικών μιγμάτων μεταξύ των παραπάνω φαινολικών συστατικών και του βορικού οξέος σε διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες, λήφθηκαν φάσματα απορρόφησης τους στην περιοχή 200-500 nm. Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων και σε συμφωνία με το θεωρητικό υπόβαθρο, τα φαινολικά συστατικά τα οποία δεν διαθέτουν υδροξυλομάδες σε διαμόρφωση *cis* έδωσαν ταυτόσημα φάσματα UV ανεξάρτητα της παρουσίας βορικού οξέος σε οποιαδήποτε αναλογία (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Αντίθετα, για όλα τα φαινολικά συστατικά τα οποία διαθέτουν υδροξυλομάδες σε διαμόρφωση *cis*, η προσθήκη βορικού οξέος είχε ως αποτέλεσμα τη βαθυχρωμική μετατόπιση τμήματος του φάσματος UV στο οποίο απορροφά ο φαινολικός δακτύλιος. Η βαθυχρωμική μετατόπιση οφείλεται στο σχηματισμό διεστερικού συμπλόκου μεταξύ των γειτονικών υδροξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου και του βορικού οξέος. Στις εικόνες 15, 16 και 17 απεικονίζεται η βαθυχρωμική μετατόπιση των φασμάτων απορρόφησης των φαινολικών ενώσεων, καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ και ακτεοσίδη ως αποτέλεσμα της παρουσίας βορικού οξέος.





Εικόνα 15. Φάσμα απορρόφησης του καφεϊκού οξέος συγκέντρωσης 33  $\mu\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4 (μαύρη γραμμή). Με την κόκκινη γραμμή παριστάνεται η βαθυχρωμική μετατόπιση του φάσματος του φαινολικού συστατικού λόγω της προσθήκης βορικού οξέος σε συγκέντρωση 2500 φορές υψηλότερη αυτής του φαινολικού συστατικού.

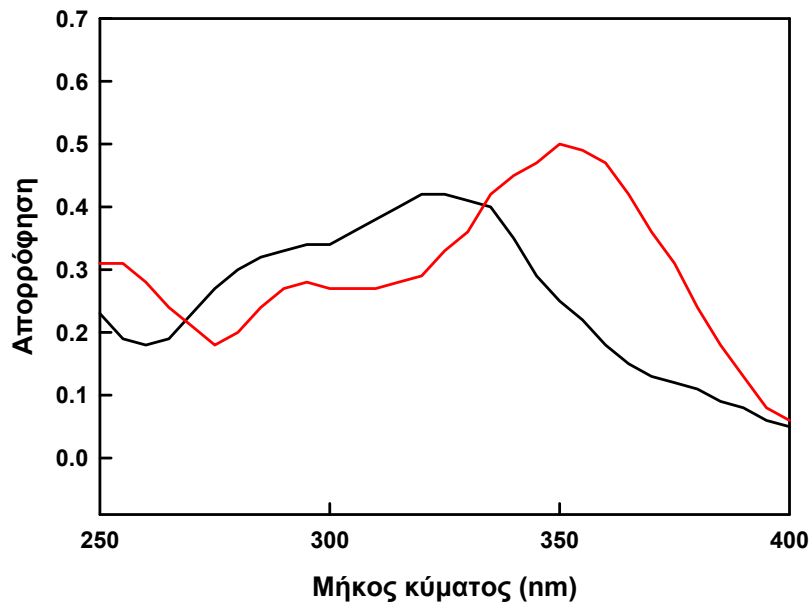
## Αποτελέσματα



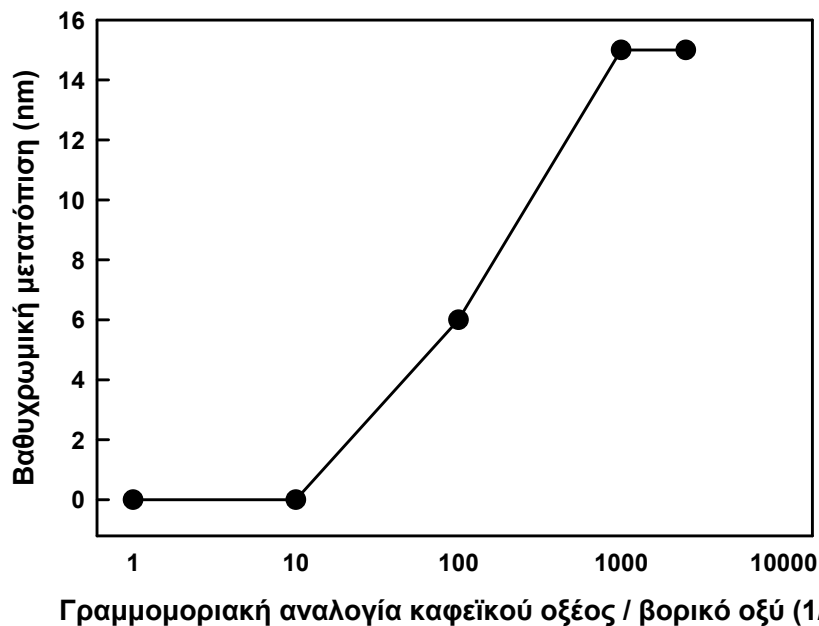
Εικόνα 16. Φάσμα απορρόφησης του χλωρογενικού οξέος συγκέντρωσης 33  $\mu\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4 (μαύρη γραμμή). Με την κόκκινη γραμμή παριστάνεται η βαθυχρωμική μετατόπιση του φάσματος του φαινολικού συστατικού λόγω της προσθήκης βορικού οξέος σε συγκέντρωση 2500 φορές υψηλότερη αυτής του φαινολικού συστατικού.

### III.2. Επίδραση της αναλογίας των δυο μορίων στον σχηματισμό του συμπλόκου

Με την παραδοχή ότι η μέγιστη βαθυχρωμική μετατόπιση αντιστοιχεί στην κατάσταση όπου το σύνολο του πληθυσμού των μορίων του φαινολικού συστατικού έχει συμπλοκοποιηθεί με βορικό οξύ, παρασκευάστηκαν μίγματα φαινολικού συστατικού - βορικού οξέος αυξανόμενης συγκέντρωσης του τελευταίου, από 0 έως 2500 φορές αυτής του φαινολικού συστατικού. Στις εικόνες 18-20 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της βαθυχρωμικής μετατόπισης συναρτήσει της γραμμομοριακής αναλογίας των δύο μορίων στο δείγμα για τα φαινολικά συστατικά καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ και ακτεοσίδη. Διαπιστώθηκε ότι έως το δεκαπλάσιο της συγκέντρωσης του βορικού οξέος η βαθυχρωμική μετατόπιση ήταν αμελητέα. Περαιτέρω αύξηση του βορικού οξέος προκάλεσε γραμμική αύξηση της τιμής της βαθυχρωμικής μετατόπισης έως μια μέγιστη τιμή που αντιστοιχεί σε μια γραμμομοριακή αναλογία 1:1000. Περαιτέρω αύξηση του βορικού οξέος δεν προκάλεσε αισθητή βαθυχρωμική μετατόπιση στο φάσμα του φαινολικού συστατικού υποδηλώνοντας ότι το σύστημα βρισκόταν σε κατάσταση κορεσμού. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως αντιστοιχεί στη συμπλοκοποίηση του συνόλου των μορίων του φαινολικού συστατικού από το βορικό οξύ.

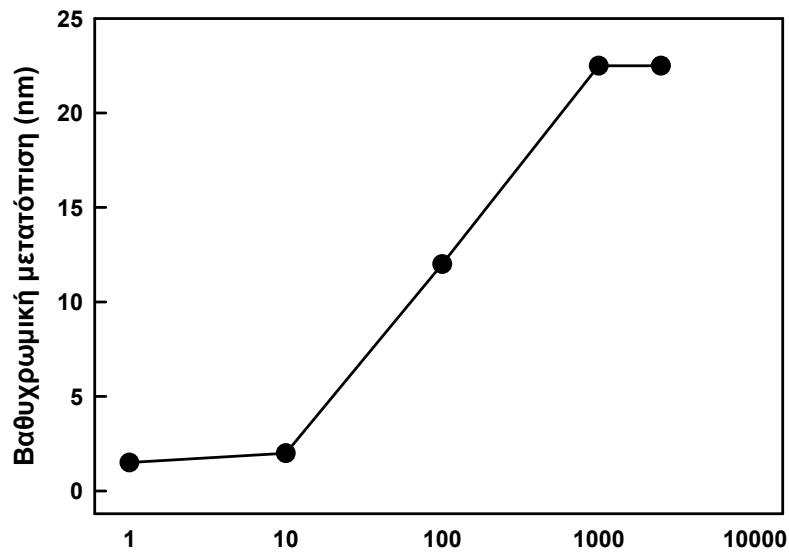


Εικόνα 17. Φάσμα απορρόφησης του ακτεοσίδη συγκέντρωσης 33  $\mu\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,4 (μαύρη γραμμή). Με την κόκκινη γραμμή παριστάνεται η βαθυχρωμική μετατόπιση του φάσματος του φαινολικού συστατικού λόγω της προσθήκης βορικού οξέος σε συγκέντρωση 2500 φορές υψηλότερη αυτής του φαινολικού συστατικού.



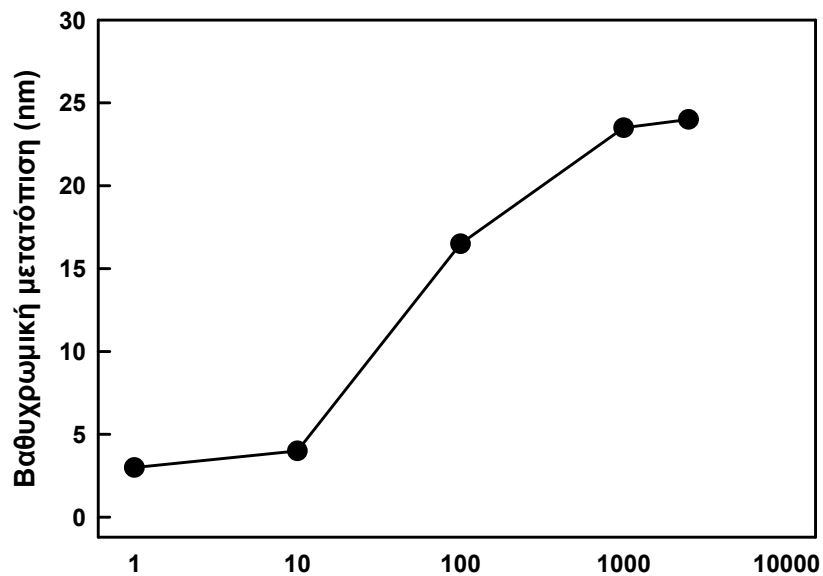
Εικόνα 18. Εξάρτηση της βαθυχρωμικής μετατόπισης του μεγίστου φάσματος απορρόφησης UV του καφεϊκού οξέος από την γραμμομοριακή αναλογία βορικού οξέος στο διάλυμα.

## Αποτελέσματα



**Γραμμομοριακή αναλογία χλωρογενικού οξέος / βορικό οξύ (1/x)**

Εικόνα 19. Εξάρτηση της βαθυχρωμικής μετατόπισης του μεγίστου φάσματος απορρόφησης UV του χλωρογενικού οξέος από την γραμμομοριακή αναλογία βορικού οξέος στο διάλυμα.



**Γραμμομοριακή αναλογία ακτεοσίδη / βορικό οξύ (1/x)**

Εικόνα 20. Εξάρτηση της βαθυχρωμικής μετατόπισης του μεγίστου φάσματος απορρόφησης UV του ακτεοσίδη από την γραμμομοριακή αναλογία βορικού οξέος στο διάλυμα.

## Συζήτηση

Ο πειραματικός σχεδιασμός προέβλεπε την βαθμιαία εμφάνιση έλλειψης Β και συμπτωμάτων στους διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς. Ωστόσο, τα φυτάρια ελιάς δεν ανταποκρίθηκαν πλήρως στις ελλειματικές ή μηδενικές συγκεντρώσεις Β στο εδαφικό διάλυμα. Ενδεχομένως το πειραματικό υλικό διέθετε εξ αρχής ικανοποιητικά αποθέματα βορίου (κυρίως στο βλαστό), τα οποία επαρκούσαν για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Αλλωστε το δένδρο της ελιάς διαθέτει την ικανότητα επαναδιανομής των αποθεμάτων του στοιχείου (Perica et al., 2001; Liakopoulos et al., 2005). Επιπρόσθετα, δεν στάθηκε δυνατό να παραταθεί η πειραματική περίοδος διότι αφενός μεν τα πειραματόφυτα προσβλήθηκαν από ακάρεα, αφετέρου η βιομάζα που είχε απομείνει δεν επαρκούσε για περαιτέρω δειγματοληψίες.

Παρά το γεγονός ότι οι πειραματικοί χειρισμοί, όσον αφορά στη διαμόρφωση έκδηλων διαφορών στη συγκέντρωση βορίου των φύλλων μεταξύ των πειραματοφύτων δεν απέδωσαν τα αναμενόμενα, ορισμένα αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω συζήτησης. Συγκεκριμένα, κατά την τελική δειγματοληψία, η συγκέντρωση ολικού βορίου στα νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα του χειρισμού Β0 ήταν εμφανώς μειωμένη σε σχέση με αυτήν των φύλλων ίδιας ηλικίας των φυτών-μαρτύρων. Από την άλλη πλευρά δεν βρέθηκαν διαφορές στη συγκέντρωση ολικού βορίου μεταξύ των φύλλων των δύο άλλων ηλικιακών κατηγοριών του χειρισμού Β0 και των φυτών μαρτύρων. Εκτός αυτού, η συγκέντρωση αδιάλυτου βορίου εμφάνισε ελαφρά μείωση στα νεαρά πλήρως εκπτυγμένα φύλλα του χειρισμού Β0 έναντι αυτής των φύλλων της ίδιας ηλικιακής κατηγορίας των φυτών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι κατά την τελική δειγματοληψία τα πειραματόφυτα του χειρισμού Β0 βρίσκονταν στα αρχικά στάδια διαμόρφωσης έλλειψης Β στα φύλλα. Όπως είναι φυσικό, η έλλειψη εμφανίστηκε αρχικά μόνο στα νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα, τα οποία λόγω θέσης αλλά και αναπτυξιακού σταδίου εμφανίζουν τις μεγαλύτερες ανάγκες στο στοιχείο. Η μείωση της συγκέντρωσης αδιάλυτου βορίου στα νεαρά πλήρως εκπτυγμένα φύλλα του χειρισμού Β0 αποτελεί πιθανή ένδειξη κινητοποίησης των αποθεμάτων του στοιχείου από τα φύλλα αυτά προς τα υπερκείμενα αναπτυσσόμενα φύλλα. Παρά το γεγονός ότι οι μεταβολές στη συγκέντρωση του διαλυτού βορίου μεταξύ των δύο ακραίων πειραματικών χειρισμών δεν ήταν εντυπωσιακές, το αντίθετο συνέβη με τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των φύλλων. Η συγκέντρωση του διαλυτού κλάσματος των φαινολικών συστατικών στα φύλλα και των τριών ηλικιακών κατηγοριών του χειρισμού Β0 εμφάνισε σημαντική αύξηση

συγκριτικά με αυτήν των αντίστοιχων φύλλων των φυτών μαρτύρων. Η αύξηση αυτή ήταν περισσότερο εμφανής στα ώριμα φύλλα. Αντίθετα, η συγκέντρωση του αδιάλυτου κλάσματος των φαινολικών συστατικών στα φύλλα και των τριών ηλικιακών κατηγοριών του χειρισμού Β0 παρουσίασε αξιοσημείωτη μείωση σε σχέση με αυτήν των αντίστοιχων φύλλων των φυτών μαρτύρων. Η μείωση αυτή ήταν εντονότερη στα ώριμα φύλλα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα επίπεδα των φαινολικών συστατικών στα φύλλα της ελιάς βρίσκονται σε άμεση και ταχεία αλληλεπίδραση με τα επίπεδα βορίου. Είναι γνωστό ότι η θρεπτική κατάσταση των φυτών όσον αφορά στο βόριο επηρεάζει τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα φύλλα (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν ενδεχομένως την πρώτη αναφορά για την επίδραση της έλλειψης βορίου στο κλάσμα των φαινολικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επιπρόσθετα είναι σημαντική η υπόθεση που διατυπώνεται σύμφωνα με την οποία η άνοδος στη συγκέντρωση του διαλυτού κλάσματος των φαινολικών συστατικών των φύλλων ενδεχομένως δεν οφείλεται σε *de novo* σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, αλλά σε απελευθέρωση φαινολικών συστατικών τα οποία βρίσκονται δεσμευμένα στα κυτταρικά τοιχώματα. Η υπόθεση αυτή, η οποία απαιτεί πειραματική επιβεβαίωση, στηρίζεται στο γεγονός ότι η άνοδος στη συγκέντρωση του διαλυτού κλάσματος των φαινολικών συστατικών συνοδεύεται από πτώση στη συγκέντρωση του αδιάλυτου κλάσματος. Από προηγούμενες εργασίες είναι γνωστό ότι η τροφοπενία βορίου στα φύλλα της ελιάς προκαλεί την εντυπωσιακή συσσώρευση (από 40 έως 184 φορές, ανάλογα με την ηλικία των φύλλων) ενός φαινολικού συστατικού του οποίου το φάσμα απορρόφησης προσομοιάζει αυτό του καφεϊκού οξέος (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005). Περαιτέρω πειράματα οδήγησαν στην ταυτοποίηση του συστατικού αυτού ως ακτεοσίδη [βερμπασκοσίδη, 2-(3,4-διυδροξυφαινυλ)αιθυλο-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο(1→3')-(4'-O-*E*-καφεοϋλο)-β-O-γλυκοπυρανοσίδη)], ένα φαινυλαιθανοειδή γλυκοζίτη ο οποίος είναι γνωστός μεταβολίτης στον καρπό της ελιάς (Jimenez and Riguera, 1994). Το συστατικό αυτό απομονώθηκε αρχικά από το φυτό *Verbascum sinuatum* (Scarpati and Monache, 1963). Ο ακτεοσίδης διαθέτει αντιμικροβιακές, κυτταροτοξικές, αντιοξειδωτικές και άλλες ιδιότητες (Jimenez and Riguera, 1994). Διαθέτει επίσης την κατάλληλη δομή ώστε να μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με το βορικό οξύ και συγκεκριμένα με στοιχειομετρία 1:1 καθώς ένα μόριο ακτεοσίδη διαθέτει δύο ζεύγη *cis*-υδροξυλίων. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι πράγματι ο ακτεοσίδης σχηματίζει τα σύμπλοκα αυτά. Σύμφωνα λοιπόν με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, η εντυπωσιακή

επίδραση της έλλειψης βορίου στα επίπεδα των φαινολικών συστατικών των φύλλων της ελιάς, είναι πιθανό να μην αφορά αποκλειστικά σε μεταβολικές ρυθμίσεις σε επίπεδο *de novo* σύνθεσης, αλλά κατά ένα σημαντικό ποσοστό σε επαναδιευθέτηση της ήδη υπάρχουσας δεξαμενής φαινολικών συστατικών. Μπορεί επομένως να διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο ακτεοσίδης (και ενδεχομένως και άλλα φαινολικά συστατικά με δομή *cis*-διόλης) σε συνθήκες επάρκειας βορίου εντοπίζεται δεσμευμένος στα κυτταρικά τοιχώματα με τη μορφή συμπλόκου με βόριο, ενώ σε συνθήκες ανεπάρκειας του στοιχείου απελευθερώνεται από τα κυτταρικά τοιχώματα και απαντάται πλέον σε διαλυτή μορφή. Ας σημειωθεί ότι σε προηγούμενα πειράματα δείχθηκε ότι η άνοδος των επιπέδων του ακτεοσίδη ευθύνεται για ένα σημαντικό ποσοστό της παρατηρούμενης αύξησης των επιπέδων της ολικής δεξαμενής (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005).





## Βιβλιογραφία

- Aerts, R. and Chapin, III F.S. 2000. The mineral nutrition of wild plants revisited: A Reevaluation of processes and patterns. *In: Advances in Ecological Research*, Vol 30, San Diego: Academic Press.
- Anaya, A.L. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Science*, 18: 697-739
- Baldioli, M. Servili, M. Perretti, G. and Montedoro, G.F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 73: 1589-1593.
- Banuelos, G.S., Cardon, G. Pflaum, T. and Akohoue, S. 1992. Comparison of dry ashing and wet acid digestion on the determination of boron in plant tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23: 2383-2397
- Barr, R. and Crane, F.L. 1991. Boron stimulates NADH oxidase activity of cultured carrot cells. *In: Current topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol. 10, DD Randall, DG Blenvis and CD Miles (eds), Columbia: Univ. Mo. Press.
- Bassil, E., Hu, H.N. and Brown, P.H. 2004. Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiology*, 136: 3383-3395.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M. 1994. Proposed physiological functions in plants pertinent to animal and human metabolism. *Environmental Health Perspectives*, 102(s7): 31-33.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 481-500.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, MA., Bassil, ES., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*, 4: 205-223
- Brown, P.H. and Hu, H. 1997. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? *Plant and Soil*, 196: 211-215
- Brown, P.H. and Shelp, B.J. 1997. Boron mobility in plants. *Plant and Soil*, 193: 85-101
- Bryant, J.P., Chapin, III F.S. and Klein, R.D. 1983. Carbon / nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *OIKOS*, 40: 357-368

## Βιβλιογραφία

- Bryant, J.P., Chapin, III F.S., Reichardt, P. and Clausen, T. 1987A. Responses of winter chemical defense in Alaska paper birch and green alder to manipulation of plant carbon:nutrient balance. *Oecologia*, 72: 510-514
- Bryant, J.P., Clausen, T.P., Reichardt, P.B., McCarthy, M.C. and Werner, R.A. 1987B. Effects of nitrogen fertilization upon the secondary chemistry and nutritional value of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) leaves for the large aspen tortrix (*Choristoneura conflictana* (Walker)). *Oecologia*, 73: 513-517
- Cakmak, I. and Römheld, V. 1997. Boron deficiency –induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil*, 193: 71–83
- Cakmak, I., Hengeler, C. and Marschner, H. 1994. Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1251–1257
- Cakmak, I., Kurz, H. and Marschner, H. 1995. Short – term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiologia Plantarum*, 95: 11–18
- Canny, M.J. 1995. Apoplastic water and solute movement: New rules for an old space. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 215-236
- Chapin, III FS. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, II: 233-260
- Chapin, III FS. 1991. Effects of multiple environmental stresses on nutrient availability and use. *In: Responses of Plants to Multiple Stresses*, HA Mooney, WE Winner and EJ Pell (eds). San Diego: Academic Press
- Chishaki, N. and Horiguchi, T. 1997. Responses of secondary metabolism to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 987-991
- Chou, C.-H. 1999. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Science*, 18: 609-636
- Chrispeels, M.J. and Sadava, D.E. 1994. Plants, genes and agriculture. Boston: Jones and Bartlett Publishers
- CoSeteng, M.Y. and Lee, C.Y. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52: 985-989
- Cseh, E. and Fodor, F. 1997. Role of boron in other plasmalemma turbo reductase activity. *In: Boron in Soils and Plants*, RW Bell and B Rerkasem (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 1997. Effect of pH and boron concentration in the nutrient solution on translocation of boron in the xylem

- of sunflower *In: Boron in Soils and Plants*, RW Bell and B Rerkasem (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 1998. Compartmentation of boron in roots and leaves of sunflower as affected by boron supply. *Journal of Plant Physiology*, 153: 615–622
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 1999. Distribution within the plant or compartmentation does not contribute substantially to the detoxification of excess boron in sunflower. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 95-99
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 2000. Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotopes  $^{10}\text{B}$  and  $^{11}\text{B}$ . *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 397-405
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 2002. Update on boron in higher plants – Uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biology*, 4: 193-204
- Dedaldechamp, F., Uhel, C. and Macheix, J.-J. 1995. Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. *Phytochemistry*, 40: 1357-1360
- Dell, B. and Huang, L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil*, 193: 103–120
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I. and Srebniak, 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. *The Plant Cell*, 7: 1085–1097
- Dordas, C. and Brown, P.H. 2000. Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *Journal of Membrane Biology*, 175: 95-105
- Dordas, C., Chrispeels, M.J. and Brown, P.H. 2000. Permeability and channel – mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology*, 124: 1349-1361
- Dugger, W.M. 1983. Boron in plant metabolism. *In: Encyclopedia of Plant Physiology*, A Läuchli and RL Bielecki (eds), New Series, Volume 15A. Inorganic Plant Nutrition. Berlin: Springer – Verlag
- El-Shintinawy, F. 1999. Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves. *Photosynthetica*, 36: 565– 573

## Βιβλιογραφία

- Ferrol, N., Belver, A., Roldan, M., Rodriguez-Rosales, M.P. and Donaire, J.P. 1993. Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes. *Plant Physiology*, 103: 763–769
- Ferrol, N. and Donaire, J.P. 1992. Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Science*, 86: 41–47
- Findekle, P., Wimmer, M. and Goldbach, H.E. 1997. Early effects of boron deficiency on physical cell wall parameters, hydraulic conductivity and plasmalemma – bound reductase activities in young *C. pepo* and *V. faba* roots. In: Boron in Soils and Plants, RW Bell and B Rerkasem, (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Fleischer, A., O'Neill, M.A. and Ehwald, R. 1999. The pore size of non – graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross – linking of the pectic polysaccharide rhamno–galacturonan II. *Plant Physiology*, 121: 829–838
- Garcia, P.C., Rivero, R.M., López-Lefebvre, L.R., Sánchez E, Ruiz, J.M. and Romero, L. 2001. Response of oxidative metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 801–806
- Gariboldi, P., Jommi, G. and Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25: 865–869
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: Phytochemical Adaptations to stress, BN Timmermann, C Steelink and FA Loewus (eds), New York: Plenum
- Glass, A.D.M. 1973. Influence of phenolic acids on ion uptake. *Plant Physiology* 51: 1037-1041
- Goldbach, H.E. 1984. Influence of boron nutrition on boron nutrition on net uptake and efflux of <sup>32</sup>P and 14 C–glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 118: 431–438
- Goldbach, H.E., Blaser-Grill, J., Lindemann, N., Porzelt, M., Hormann, C., Lupp, B. and Gessner, B. 1991. Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic process. In: Current topics in Plant Biochemistry and Physiology, Vol. 10, DD
- Goldbach, H.E., Hartmann, D. and Rötzer, T. 1990. Boron is required for the stimulation of the ferricyanide – induced proton release by auxins in suspension – cultured cells of *Daucus carota* and *Lycopersicon esculentum*. *Physiologia Plantarum*, 80: 114–118

- Goldberg, S. 1993. Chemistry and mineralogy of boron in soils. *In: Boron and its role in crop production*, UC Gupta (ed), Boca Raton: CRC Press
- Goldberg, S. 1997. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*, 193: 35-48
- Grossman, A., and Takahashi, H. 2001. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interaction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 163-210
- Gupta, U.C. 1993. Deficiency and toxicity symptoms of boron in plants. *In: Boron and its role in crop production*, UC Gupta (ed), Boca Raton: CRC Press
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H. and Berenbaum, M.R. 2001. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*, 4: 86-95
- Harborne, J.B., 1998. Phytochemical methods. *In: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall, London, 60–66.
- Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Honkanen, T., Larsson, S. and Lempa, K. 1998. Biosynthetic origin of carbon- based secondary compounds- cause of variable responses of woody plants to fertilization? *Chemoecology*, 8: 133-139
- Heipieper, H.J., Keweloh, H. and Rehm, H.J. 1991. Influence of phenolics on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1213-1217
- Herms, D.A. and Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or to defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3): 283-335
- Hewitt, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent
- Hirsch, A.M. and Torrey, J.G. 1980. Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Canadian Journal of Botany*, 58: 856–866
- Hu, H. and Brown, P.H. 1994. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. Evidence for a structural role of boron in the cell wall. *Plant Physiology*, 105: 681-689
- Hu, H. and Brown, P.H. 1997. Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil*, 193: 49-58
- Hu, H., Brown, P.H. and Labavitch, J.M. 1996. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany*, 47: 227-232

## Βιβλιογραφία

- Huang, L., Ye, Z. and Bell, R.W. 1996. The importance of sampling immature leaves for the diagnosis of boron deficiency in oilseed rape ( *Brassica napus* cv. Eureka). *Plant and Soil*, 183: 187–198
- Inderjit, and del Moral, R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? *The Botanical Review*, 63: 221–230
- Inderjiit, and Keating, K.I. 1999. Allelopathy: Principles, procedures, processes, and promises for biological control. *Advances in Agronomy*, 67: 141-231
- Kastori, R., Plesnicar, M., Pankovic, D. and Sakac, Z. 1995. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1751–1763
- Kobayashi, M., 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
- Lambers, H., Chapin III, F.S. and Pons, T.L. 1998. Plant physiological ecology. New York: Springer-Verlag
- Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology. New York: Springer-Verlag
- Lawrence, K., Bhalla, P. and Misra, P.C. 1995. Changes in (NADP)H – dependent redox activities in plasmalemma – enriched vesicles isolated from boron – and zinc – deficient chick pea roots. *Journal of Plant Physiology*, 146: 652-657
- Le Bot, J., Pilbeam, D.J. and Kirkby, E.A. 1994. Plant mineral nutrition in crop production. *In: Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity: Modern Approaches*, AS Basra (ed), New York: Marcel Dekker
- Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A. and Valcárcel, M. 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 46: 1123-1130
- Le Tutour, B. and Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31: 1173-1178
- Lee, S. and Aronoff, S. 1967. Boron in plants: a biochemical role. *Science* 158: 798-799
- Lewis, D.H. 1980. Boron, lignification and the origin of vascular plants- a unified hypothesis. *New Phytologist*, 84: 209-229
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Filippou, M., Fasseas, C., Tsadilas, C., Drossopoulos, I. and Karabourniotis, G. 2005. Boron remobilization at low boron supply in olive (*Olea europaea*) in relation to leaf and phloem mannitol concentrations. *Tree Physiology*, 25:157-165.

- Liakopoulos, G. and Karabourniotis, G. 2005. Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea*: a combined growth chamber and field study. *Tree Physiology*, 25: 307-315.
- Logan, B.A., Demming-Adams, B., Rosenstiel, T.N. and Adams III, W.W. 1999. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relation to other metabolic characteristics. *Planta*, 209: 213-220
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3: 229-239
- Lovatt, C.J. and Dugger, W.M. 1984. Boron in the biochemistry of the essential ultra trace elements (Frieden, E., ed), New York: Plenum, pp. 389-421
- Macheix, J.J., Sapis, J.C. and Fleuriet, A. 1991. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 441-486
- Mason, T.L. and Wasserman, B.P. 1987. Inactivation of red beet  $\beta$ -glucan synthetase by native and oxidised phenolic compounds. *Phytochem.* 26: 2197-2202
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, London: Academic Press
- Martini, F. and Thellier, M. 1993. Boron distribution in parenchyma cells of clover leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31: 777-786
- Matoh, T. 1997. Boron in plant cell walls. *Plant and Soil*, 193: 59-70
- Matoh, T., Ishigaki, K., Ohno, K. and Azuma, J. 1993. Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. *Plant Cell Physiology*, 34: 639-642
- Matoh, T., Ishigaki, K.-I., Mizutani, M., Matsunaga, W. and Takabe, K. 1992. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. I. Requirement for an intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant Cell Physiology*, 33: 1135-1141
- Matoh, T., Kawaguchi, S. and Kobayashi, M. 1996. Ubiquity of a borate - rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiology*, 37: 636-640
- Matoh, T., Takasaki, M., Kobayashi, M. and Takabe, K. 2000. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. III. Characterization of the boron - rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron. *Plant Cell Physiology*, 41: 363-366
- Maurel, C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 399-429

## Βιβλιογραφία

- Moore, H.M. and Hirsch, A.M. 1983. Effects of boron on mitosis and incorporation of tritiated thymidine into nuclei of sunflower root tips. *American Journal of Botany*, 70: 165–172
- 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
- Pariot, C., Martini, F., Thellier, M. and Ripoll, C. 1994. Quantitative imaging of the distribution of boron in the hypocotyl sections of flax seedlings, using neutron capture radiography. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 12: 61–85
- Parr, A.J., Loughman, B.C. 1983. Boron and membrane function in plants. In: Robb DA, Pierpoint WS, (eds), *Metals and micronutrients. Uptake and utilization by plants*. New York: Academic Press, 87-107
- Pearson, J.N. and Rengel, Z. 1997. Mechanisms of plant resistance to nutrient deficiency stress. In: Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants, AS Basra and RK Basra (eds), Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 1997. Compartmentation of boron in roots and its translocation to the shoot of sunflower as affected by short term changes in boron supply. In: Boron in Soils and Plants, RW Bell and B Rerkasem (eds), The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 1998. Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron – deficient sunflower plants? *Physiologia Plantarum*, 104: 479–485
- Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 2001. Boron compartmentation in roots of sunflower plants of different boron status: A study using the stable isotopes  $^{10}\text{B}$  and  $^{11}\text{B}$  adopting two independent approaches. *Physiologia Plantarum*, 113: 346–351
- Pieroni, A., Heimler, D., Pieters, L., van Poel, B. and Vlietinck, A.J. 1996. In vitro anti – complementary activity of flavonoids from olive ( *Olea europaea* L.) leaves. *Pharmazie*, 51: 765–767
- Pilbeam, D.J. and Kirkby, E.A. 1983. The physiological role of boron in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 563–582
- Pillinger, J.M., Cooper, J.A., Ridge, I. 1994. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of burley straw. *J. Chem. Ecol.* 20: 1557-1569
- Pollard, A.S., Parr, A.J. and Loughman, B.C. 1977. Boron in relation to membrane function in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 28: 831–841



- Power, P.P. and Woods, W.G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. *In: Plant Soil* 193: 1-13
- Randall, D.G., Blevins and Miles, C.D. (eds), Columbia: Univ. Mo. Press
- Raven, J.A. 1980. Short – and long- distance transport of boric acid in plants. *New Phytologist*, 84: 231-249
- Reid, R.J. 2001. Mechanisms of micronutrient uptake in plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 659-666
- Rerkasem, B. and Jamjod, S. 1997. Genotypic variation in plant response to low boron and implications for plant breeding. *Plant and Soil*, 193:169-180
- Ridge, I. 2002. Plants. New York: Oxford University Press.
- Robertson, G.A. and Longman, B.C. 1974. Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba L.* *New Phytologist* , 73: 291–298
- Römheld, V. and Marschner, H. 1991. Functions of micronutrients in plants. *In: Micronutrients in Agriculture*, 2<sup>nd</sup> ed. (eds), Mordvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., and Welch, R.M. pp 297-328. SSSA Book Series, No. 4, Madison, WI, USA
- Roldan, M., Belver, A., Rodriguez-Rosales, P., Ferrol, N. and Donaire, J.D. 1992. *In vivo* and *In vitro* effects of boron on the plasma membrane proton pump of sunflower roots. *Physiol. Plant.* 84: 49-54
- Roth-Bejerano, N. and Itai, C. 1981. Effect of boron on stomatal opening in epidermis strips of *Commelina communis*. *Physiol. Plant.* 52: 302-304
- 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
- Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Rivero, R.M. and Romero, L. 1999. Response of phenolic metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Physiologia Plantarum*, 106: 151–157
- Sanchez, E., Soto, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Rivero, R.M., Ruiz, J.M. and Romero, L. 2000. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 973-978
- Seigler, D.S. 1998. Plant secondary metabolism, Kluwer Academic Publishers: Norwell
- Shelp, B.J. 1993. Physiology and biochemistry of boron in plants. *In: Boron and its role in crop production*, UC Gupta (ed), Boca Raton: CRC Press
- Shelp, B.J., Kitheka, A.M., Vanderpool, R.A., Van Cauwenberghe, O.R. and Spiers, G.A. 1998. Xylem - to - phloem transfer of boron in broccoli and

## Βιβλιογραφία

- lupin during early reproductive growth. *Physiologia Plantarum*, 104: 533-540
- Shepherd, C.J. 1951. The enzymes of carbohydrate metabolism in Neurospora. *Biochemical Journal*, 48: 483-486
- Shkol'nik, M.Y. 1984. Trace elements in plants, New York: Elsevier
- Shkol'nik, M.Y., Kupnikova, T.A., Timofeeva, S.S. and Stom, D.I. 1981. Intensification of quinone formation from exogenous polyphenols by homogenates of the leaves of sunflower plants reared under conditions of boron deficiency. *Fiziologiya Rastenii*, 28: 541-546
- Smirnoff, N. 1995. Metabolic flexibility in relation to the environment. *In: Environment and Plant Metabolism*, N. Smirnoff (ed), Oxford: Bios Scientific Publishers
- Stangoulis, J.C.R., Brown, P.H., Bellaloui, N., Reid, R.J. and Graham, R.D. 2001. The efficiency of boron utilization in canola. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 1109-1114
- Stavrianiakou, S., Liakopoulos, G., Karvonis, E., Resta, E. and Karabourniotis G. 2006a. Low-boron acclimation induces uptake of boric acid against a concentration gradient in root cells of *Olea europaea*. *Functional Plant Biology*, 33: 189-193.
- Stavrianiakou, S., Liakopoulos, G. and Karabourniotis, G. 2006b. Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*, in press.
- Steudle, E., 2001. The cohesion - tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 847-875
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. *In: P.M. Dey and J.B. Harborne (eds) Plant Biochemistry*. Academic Press: London
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates
- Takano, J., Yamagami, M., Noguchi, K., Hayashi, H. and Fujiwara, T. 2001. Preferential translocation of boron to young leaves in *Arabidopsis thaliana* regulated by the BOR1 gene. *Soil Science and Plant Nutrition*, 47: 345-357
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420: 337-340
- Tan, S.C. 1980. Phenylalanine ammonia - lyase and the phenylalanine ammonia - lyase inactivating system: Effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7: 159-167

- Tang, P.M. and Dela Fuente, R.K. 1986. The transport of indole-3-acetic acid in boron –and calcium- deficient sunflower hypocotyls segments. *Plant Physiology*, 81: 646-650
- Tanner, W. and Caspari, T. 1996. Membrane transport carriers. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 595-626
- Tattini, M., Gucci, R., Romani, A., Baldi, A. and Everard, J.D. 1996. Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 98: 117-124
- Teasdale, R.D. and Richards, D.K. 1990. Boron deficiency in cultured pine cells. *Plant Physiology*, 93: 1071–1077
- Thellier, M., Duval, Y. and Demarty, M. 1979. Borate exchange of Lemna minor as studied with the help of the enriched stable isotopes of an nuclear reaction. *Plant Physiology*, 63: 283–288
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. and Duke, S.O. 1988. Polyphenol oxidase – The chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum*, 72: 659–665
- Warrington, K. 1923. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Annals of Botany*, 37: 629-672
- Wenzl, P., Chaves, A.L., Mayer, J.E., Rao, I.M. and Nair, M.G. 2000. Roots of nutrient – deprived *Brachiaria* species accumulate 1,3-di-O-trans-feruloylquinic acid. *Phytochemistry*, 55: 389-395
- Yamanouchi, M. 1971. The role of boron In higher plants. I. The relations between boron and calcium on the pectic substances in plants. *Journal of the Science of Soil Manure*, 42: 207–213
- Yamauchi, T., Hara, T. and Sonoda, Y. 1986. Distribution of calcium and boron in the pectic fraction of tomato leaf cell wall. *Plant Cell Physiology*, 27: 729–732
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. Oxidative enzymes in foods. Eds. DS Robinson and AM Eskin. Elsevier Science Publishers, England, : 217–273
- Δροσόπουλος, Ι. 1992. Στοιχεία ανόργανης διατροφής των φυτών. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Καραμπουρνιώτης, Γ. 2002. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο
- Σταυριανάκου, Σ . 2000. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών στα φύλλα του φυτού *Dictyochia viscosa*. Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών



## Περίληψη

Η συσσώρευση φαινολικών συστατικών είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές αντιδράσεις των φυτών στην τροφοπενία βορίου (B). Στην ελιά, πέραν της αύξησης των επιπέδων των φαινολικών ως σύνολο, παρατηρείται υψηλή συσσώρευση δομών όπως αυτή του ακτεοσίδη, ενός φαινυλαιθανοειδούς γλυκοζίτη. Σύμφωνα με τη μοριακή του δομή, ο ακτεοσίδης μπορεί θεωρητικά να σχηματίσει σύμπλοκο με δύο μόρια βορικού οξέος. Συνεπώς, πέραν της γενικής αντίδρασης του μεταβολισμού στην τροφοπενία B, ενδέχεται η συσσώρευση ορισμένων δομών στα φύλλα της ελιάς να σχετίζεται με την αντιμετώπιση της καταπόνησης από την έλλειψη του στοιχείου. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της μειωμένης διαθεσιμότητας B του θρεπτικού διαλύματος, στην συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των φύλλων της ελιάς. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με απομονωμένα φαινολικά συστατικά κατάλληλης δομής προκειμένου να διαπιστωθεί ο σχηματισμός συμπλόκων με το βορικό οξύ. Για το πρώτο πείραμα μοσχεύματα ελιάς αναπτύχθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια σε τέσσερις μεταχειρήσεις στις οποίες τα επίπεδα του B στο θρεπτικό διάλυμα κυμαίνονταν από επαρκή έως μηδενικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα φυτάρια ελιάς δεν ανταποκρίθηκαν πλήρως στις ελλειματικές ή μηδενικές συγκεντρώσεις B στο θρεπτικό διάλυμα. Παρόλα αυτά, στην τελική δειγματοληψία και στα νεαρά αναπτυξιακά στάδια του χειρισμού B0 (συγκέντρωση B 0  $\mu\text{M}$ ), η συγκέντρωση του ολικού B στα φύλλα παρουσιάστηκε μειωμένη συγκριτικά με τα αντίστοιχα του μάρτυρα. Ακόμη, στον χειρισμό B0 και στα τρία αναπτυξιακά στάδια παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση των διαλυτών φαινολικών συστατικών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα φύλλα του μάρτυρα. Αντίθετα, η συγκέντρωση του αδιάλυτου κλάσματος των φαινολικών συστατικών μειώθηκε στα φύλλα του χειρισμού B0 σε σχέση με τον μάρτυρα. Στα πειράματα που διεξήχθησαν με τα φαινολικά συστατικά χλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ και ακτεοσίδη, διαπιστώθηκε ο αυθόρμητος και ταχύς σχηματισμός συμπλόκου με το βορικό οξύ, φαινόμενο το οποίο μελετήθηκε μέσω της βαθυχρωμικής μετατόπισης των μεγίστων του φάσματος απορρόφησης UV. Με βάση τα αποτελέσματα μπορεί να διατυπωθεί η υπόθεση κατά την οποία φαινολικά συστατικά τα οποία υπό επάρκεια B είναι εντοπισμένα στο κυτταρικό τοίχωμα απελευθερώνονται σε διαλυτή μορφή υπό συνθήκες τροφοπενίας B. Η φυσιολογική σημασία ενός τέτοιου φαινομένου πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.





