

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ
ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΑ
ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *DITTRICHIA VISCOSA***



ΣΩΤΗΡΙΑ-ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΤΑΥΡΙΑΝΑΚΟΥ

Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης

ΑΘΗΝΑ 2000

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ
ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΑ
ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *DITTRICHIA VISCOSA***

ΣΩΤΗΡΙΑ-ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΤΑΥΡΙΑΝΑΚΟΥ

Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης

ΑΘΗΝΑ 2000

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (συνεδρίας 11-7-2000), κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή της μελέτης

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- | | | | |
|----|--------------------|-----------------------|------------------------------|
| 1) | Γ. Καραμπουρνιώτης | Επίκουρος Καθηγητής | Άμεσος επιβλέπων (Εισηγητής) |
| 2) | Ι. Δροσόπουλος | Καθηγητής | |
| 3) | Π. Χατζόπουλος | Αναπληρωτής Καθηγητής | |

Αντί προλόγου

Η εκπόνηση της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Γ. Καραμπουρνιώτη στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος της Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, κλάδος Βιοτεχνολογία Φυτών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους συντελεστές εκπόνησης αυτής της εργασίας:

Στον Επικ. Καθηγητή κ. Γ. Καραμπουρνιώτη για το ενδιαφέρον, την ουσιαστική καθοδήγηση και συμβολή του καθ' όλα τα στάδια της εργασίας αυτής, τις πολύτιμες εισηγήσεις του στην οργάνωση και διάρθρωση της συγγραφής, τις άρτιες και εύστοχες επιστημονικές παρεμβάσεις και παρατηρήσεις του, αλλά κυρίως για την αμεσότητα της συμμετοχής του στην επίβλεψη της εργασίας.

Στον Καθηγητή κ. Ι. Δροσόπουλο και στον Αν. Καθηγητή κ. Π. Χατζόπουλο για τις πολύτιμες διορθώσεις και υποδείξεις που εισηγήθηκαν διαβάζοντας αυτήν την εργασία συμβάλλοντας ουσιαστικά στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την χορήγηση της υποτροφίας καθιστώντας την πραγματοποίηση του έργου ευχερέστερη.

Σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γ.Π.Α. για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και ιδιαίτερα τη φιλική διάθεση που επέδειξαν.

Στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γ. Λιακόπουλο για την πολύτιμη συμβολή του τόσο κατά το πειραματικό όσο και κατά το συγγραφικό τμήμα της εργασίας.

Στην υποψήφια διδάκτορα κ. Β. Λιάκουρα για τη βοήθειά της στην επεξεργασία του κειμένου.

Στον κ. Χ. Παπαδά για την αμέριστη συμπαράστασή του καθώς και για την ουσιαστική βοήθειά του σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Στην οικογένειά μου για την κατανόηση και την υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της φιλόδοξης πλην επίπονης αυτής προσπάθειας.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A.1. ΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	2
A.1.1. Οι φαινολικές ενώσεις των φυτών και ο ρόλος τους	4
A.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΟΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	7
A.2.1. Γενικά	7
A.2.2. Ανόργανη διατροφή και δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι περιέχουν άζωτο στο μόριό τους	8
α. Αλκαλοειδή	8
β. Κυανογόνα γλυκοζίδια	9
γ. Θειογλυκοζίτες	9
A.2.3. Ανόργανη διατροφή και φαινολικές ενώσεις	10
A.2.4. Ανόργανη διατροφή και τερπένια	12
A.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	14
A.3.1. Γενικά	14
A.3.2. Η εμπλοκή του βορίου στην κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων	15
A.3.3. Ο ρόλος του βορίου στη λειτουργία των μεμβρανών	16
A.3.4. Το βόριο και η φωτοσυνθετική λειτουργία	16
A.3.5. Ο ρόλος του βορίου στην αναπαραγωγική διαδικασία	17
A.3.6. Η εμπλοκή του στον μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος	17
A.3.7. Η εμπλοκή του στον μεταβολισμό της αυξίνης	18
A.3.8. Ο ρόλος του στο μεταβολισμό των φαινολικών	18
A.3.9. Ο ρόλος του βορίου σε άλλες λειτουργίες	20
A.4. ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΠΕΝΙΑΣ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	22
A.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	23
A.5.1. Η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός του σαλικυλικού οξέος (SA) στα φυτικά κύτταρα	23
A.5.2. Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών των φυτικών ιστών	23
A.5.3. Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην επαγωγή της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR)	24
A.5.4. Η εμπλοκή του σαλικυλικού οξέος στη θερμογόνο αναπνοή	25
A.5.5. Η επίδραση του SA σε άλλες λειτουργίες	25
A.5.6. Η επίδραση του SA στη ρύθμιση γονιδίων	26

A.6. ΤΟ ΦΥΤΟ <i>DITTRICHIA VISCOSA</i>	27
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
Γ.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	33
Γ.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	33
Γ.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ	36
Γ.4. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	36
Γ.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ	37
Γ.6. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	38
Γ.7. ΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	38
Γ.8. ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ <i>IN VIVO</i>	39
Γ.9. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ	40
Γ.10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΟΡΕΣΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ CO ₂	41
Γ.11. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΚΑΙ ΡΙΖΩΝ	41
Γ.12. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΕΦΥΜΕΝΙΔΙΚΟΥ ΕΚΚΡΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ	42
Γ.13. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	42
Γ.14. ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	44
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
Δ.1. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ, ΣΤΟΥΣ ΒΛΑΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ	46
Δ.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>D. VISCOSA</i> ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	48
Δ.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΑΝΑΤΟΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>D. VISCOSA</i> ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	54
Δ.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>D. VISCOSA</i> ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	60
Δ.4.1. Φωτοσυνθετική λειτουργία	60

Δ.4.2. Σχετική συγκέντρωση των συστατικών των εκχυλισμάτων ριζών και φύλλων οι οποίες απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος	61
Δ.4.3. Χρωματογραφική ανάλυση εσωτερικών φαινολικών ριζών και φύλλων και επεφυμενιδικών φαινολικών συστατικών των φύλλων	68
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της έλλειψης βορίου καθώς και της χορήγησης μέσω του θρεπτικού διαλύματος σαλικυλικού οξέος, σε ορισμένες αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους του φυτού *Dittrichia viscosa* υπό ελεγχόμενες συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας. Η έλλειψη βορίου προκάλεσε δραματικές αλλαγές στην ανάπτυξη του φυτού. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε υστέρηση στην ανάπτυξη φύλλων και βλαστών, μείωση του ξηρού βάρους των φύλλων, των βλαστών και των ριζών, μείωση του αριθμού των πλάγιων κλάδων, του μήκους και της επιφάνειας κάτοψης των ριζών, του ύψους των φυτών και της ειδικής επιφάνειας των φύλλων ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του ειδικού μήκους της ρίζας. Η έλλειψη βορίου προκάλεσε επίσης αύξηση του πάχους των φύλλων, ενώ δεν επηρέασε την πυκνότητα των στοματίων και των αδενωδών τριχών των φύλλων. Κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες παρατηρήθηκε συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας τα οποία βρίσκονται κοντά στην ενδοδερμίδα. Στο φυσιολογικό επίπεδο, η έλλειψη βορίου δεν επηρέασε την παράμετρο F_v/F_m και τη συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φύλλων των φυτών τα οποία παρουσίασαν τα συμπτώματα της τροφοπενίας. Στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου παρατηρήθηκε αύξηση στη σχετική συγκέντρωση των συστατικών τα οποία απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος στις ρίζες και στα φύλλα (από τα οποία είχε αφαιρεθεί το επιεφυμενιδικό έκκριμα), ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη παραγωγή του επιεφυμενιδικού εκκρίματος των αδενωδών τριχών των φύλλων. Χρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων με HPLC, έδειξε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών αυτών στα φύλλα και στις ρίζες, σε ορισμένες περιπτώσεις συνοδεύτηκε και από μεταβολές της αναλογίας των συστατικών των εκχυλισμάτων.

Η χορήγηση σαλικυλικού οξέος μέσω του θρεπτικού διαλύματος δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τις αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους οι οποίες εξετάστηκαν, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε ανεπαρκή χορήγηση της ουσίας (όσον αφορά στη συγκέντρωση ή/και το χρόνο εφαρμογής) ή σε αδυναμία εισόδου της στο εσωτερικό της ρίζας.

Τα αποτελέσματα συμβάλλουν στην κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της ανάπτυξης και του μεταβολισμού του *D. viscosa* υπό συνθήκες θρεπτικής καταπόνησης και παράλληλα δημιουργούν το κατάλληλο υπόβαθρο για χρήση των μεθόδων υδροπονίας σε ανάλογες μελλοντικές εφαρμογές.

A. Εισαγωγή

A.1. ΟΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

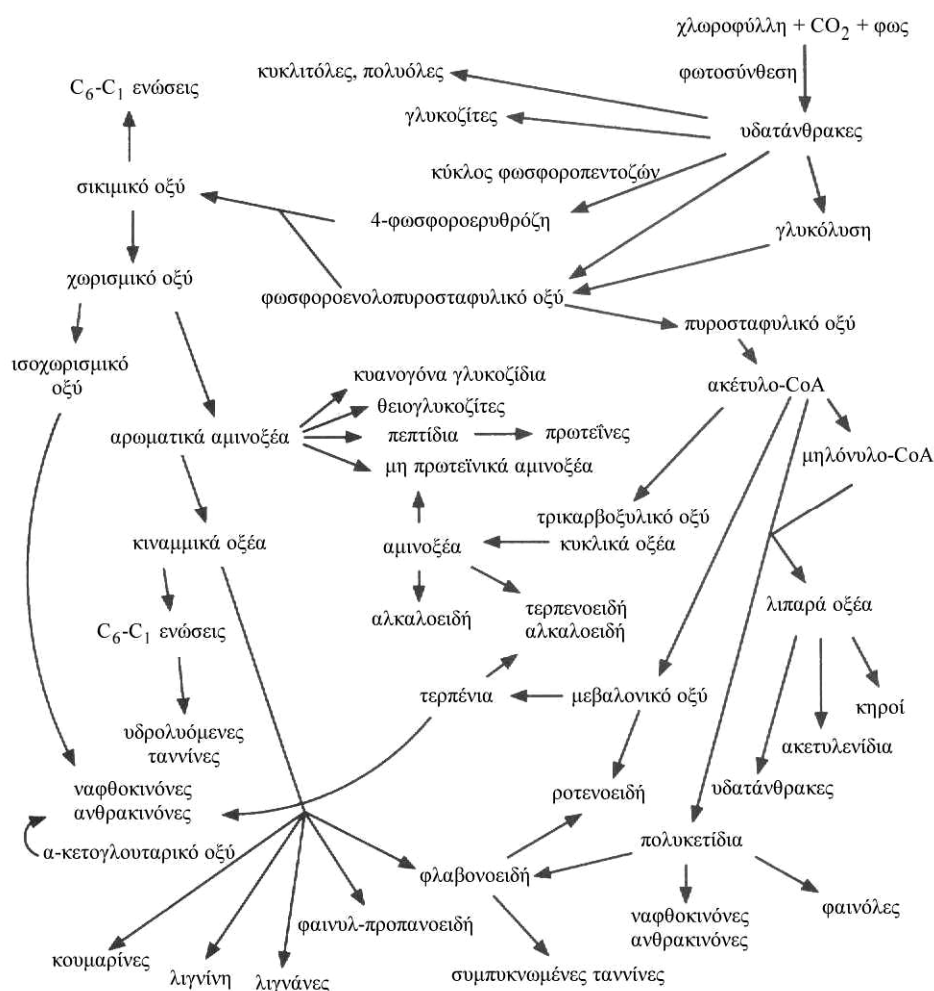
Πρόκειται για ουσίες οι οποίες προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών, οι οποίες στο σύνολό τους συνιστούν το δευτερογενή μεταβολισμό (Εικόνα Α.1). Ενώ ο αριθμός των επί μέρους προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού είναι εξαιρετικά υψηλός, οι ενδιάμεσες ουσίες του πρωτογενούς μεταβολισμού, από τις οποίες προέρχονται τα προϊόντα αυτά, καθώς και οι κύριες βιοσυνθετικοί οδοί είναι ολιγάριθμες. Με βάση τη βιοσυνθετική οδό μέσω της οποίας παράγονται καθώς και τα χαρακτηριστικά του μορίου τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται συνήθως σε τρεις μεγάλες ομάδες: φαινολικές ενώσεις, τερπένια, αζωτούχες ενώσεις (Seigler, 1998).

Η ομάδα των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει μεταβολίτες οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας τουλάχιστον φαινολικής ομάδας (αρωματικός δακτύλιος υποκατεστημένος με ένα υδροξύλιο) στο μόριό τους (Waterman and Mole, 1994). Οι φαινολικές ενώσεις συντίθενται κυρίως μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού ή/και του μηλονικού οξέος. Μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, προσθήκης ή πολυμερισμού του βασικού αρωματικού δακτυλίου, προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων (Harborne, 1989; Strack, 1997; Taiz and Zeiger, 1998).

Τα τερπένια αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών. Όλες οι ενώσεις της ομάδας αυτής προέρχονται από τη βασική μονάδα του ισοπεντανίου. Πρόκειται ουσιαστικά για μια κατηγορία λιπιδίων των οποίων ο βασικός σκελετός είναι ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα. Τα τερπένια συντίθενται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού οξέος και πρόδρομο μόριο το ακέτυλο-συνένζυμο Α. Με τη συνένωση βασικών μονάδων (2,4,6,8...n) δημιουργούνται μεγαλύτερα μόρια, διαφορετικά μεταξύ τους. Ορισμένες ενώσεις της κατηγορίας αυτής αποτελούν αναπόσπαστα συστατικά θεμελιωδών λειτουργιών, όπως π.χ. τα καροτενοειδή, οι χλωροφύλλες, και ορισμένες φυτορμόνες, όπως οι γιββερελλίνες και το αμπισικό οξύ (Heldt, 1997; Seigler, 1998; Taiz and Zeiger, 1998).

Η ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών απαρτίζεται από ενώσεις, οι οποίες προέρχονται κυρίως από αμινοξέα. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, η οποία περιλαμβάνει: *α. Τα αλκαλοειδή*. Οι ενώσεις αυτές συνήθως περιλαμβάνουν άζωτο σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο ποικίλων

μορφών. **β.** *Τις μπεταλαΐνες.* Χρωστικές, οι οποίες δίδουν χαρακτηριστικούς χρωματισμούς σε όργανα και ιστούς σε ορισμένα είδη φυτών, με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο την μπετανίνη των κονδύλων των τεύτλων. **γ.** *Τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα.* **δ.** *Τις αμίνες,* οι οποίες περιλαμβάνουν μία τουλάχιστον αμινομάδα στο μόριό τους, με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους την ισταμίνη, την πουτρεσκίνη, κ.ά. **ε.** *Τα κυανογόνα γλυκοζίδια.* Αζωτούχες ενώσεις ενωμένες με ένα σάκχαρο. Υπό την επίδραση κατάλληλων ενζύμων απελευθερώνουν την τοξική ρίζα $-CN$. **στ.** *Τους θειογλυκοζίτες.* Αζωτούχες ενώσεις που περιέχουν θείο στο μόριό τους, το οποίο κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να απελευθερωθεί ως ισοθειοκυανικό ή θειοκυανικό ιόν. **ζ.** *Τις αμυντικές πρωτεΐνες,* δηλ. πολυπεπτίδια-εξειδικευμένους παρεμποδιστές με σαφή αμυντικό προορισμό (Καραμπουρνιώτης, 1999).



Εικόνα Α.1. Σύνοψη του δευτερογενούς μεταβολισμού των ανώτερων φυτών (από Seigler, 1998).

A.1.1. Οι φαινολικές ενώσεις των φυτών και ο ρόλος τους

Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια χημικώς ετερογενή ομάδα. Ορισμένες είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές (καρβοξυλιωμένα παράγωγα και γλυκοζίδια), ενώ άλλες είναι αδιάλυτα πολυμερή. Οι κύριες βιοσυνθετικές οδοί των φαινολικών είναι η οδός του σικιμικού οξέος και η οδός του μηλονικού οξέος. Η πρώτη αποτελεί τη βιοσυνθετική οδό των περισσότερων φαινολικών φυτικής προέλευσης, ενώ η δεύτερη, παρ' όλο που είναι σημαντική οδός βιοσύνθεσης σε μύκητες και βακτήρια, φαίνεται ότι είναι περιορισμένης σημασίας για τα ανώτερα φυτά. Η βιοσυνθετική οδός του σικιμικού οξέος απαντάται σε φυτά, βακτήρια και μύκητες αλλά όχι σε ζώα, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη (Heldt, 1997; Taiz and Zeiger, 1998).

Οι περισσότερες ομάδες φαινολικών δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη. Η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL) αποτελεί το ένζυμο κλειδί για τη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε κινναμικό οξύ (Taiz and Zeiger, 1998). Σε ορισμένα φυτά απαντάται μια ενζυμική μορφή της PAL, ενώ σε άλλα απαντώνται πολλά ισοένζυμα. Σε διάφορα φυτά, ορισμένα ισοένζυμα δεν απαντούν υπό φυσιολογικές συνθήκες αλλά συντίθενται μετά από διέγερση. Στο φυτό *Medicago sativa* έχουν βρεθεί πάνω από 6 γονίδια (ή πιθανοί αλληλόμορφοι), τα οποία κωδικοποιούν ισοένζυμα της PAL (Strack, 1997). Η δραστηριότητα της PAL στα φυτά ρυθμίζεται μέσω αλλοστερικών επιδράσεων και διαμόρφωσης των επιπέδων συγκέντρωσης από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες όπως ορμόνες, επίπεδα θρεπτικών στοιχείων, φως, προσβολή από μύκητες και πληγές (Ebel and Hahlbrock, 1982; Taiz and Zeiger, 1998). Η προσβολή από μύκητες πυροδοτεί τη μεταγραφή του m-RNA που κωδικοποιεί την PAL (Lamb *et al.*, 1989). Έχει επίσης παρατηρηθεί φωτοεπαγόμενη αύξηση των επιπέδων m-RNA της PAL λόγω επιμήκυνσης του χρόνου μεταγραφής. Οι ακτινοβολίες UV-A/Blue, UV-B και Red αναφέρονται ως δραστικές για τη φωτοεπαγωγή της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών σε διάφορους συνδυασμούς μηκών κύματος που ποικίλουν ανάλογα με το φυτό (Beggs and Wellmann, 1994).

Οι σημαντικότεροι ρόλοι που έχουν αποδοθεί στις φαινολικές ενώσεις είναι οι εξής:

α. Παίρνουν μέρος σε σημαντικούς αμυντικούς μηχανισμούς των φυτικών ιστών. Ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών ενώσεων παίζει ενεργό ρόλο στη

διαμόρφωση της θεμελιώδους προϋπάρχουσας άμυνας των φυτικών ιστών έναντι παθογόνων και φυτοφάγων οργανισμών (Harborne, 1989; Nicholson and Hammerschmidt, 1992; Reyes-Chilpa *et al.*, 1995). Χαρακτηριστική δράση παρουσιάζουν οι ταννίνες, οι οποίες μειώνουν την τροφική αξία του γεύματος και σε πολλές περιπτώσεις αποτελούν ισχυρά απωθητικά μόρια για τα φυτοφάγα (Swain, 1977; Harborne, 1993; Shain, 1995) και οι φουρανοκουμαρίνες (Taiz and Zeiger, 1998). Ορισμένα ισοφλαβονοειδή αποτελούν την αιχμή του δόρατος της επαγόμενης άμυνας ορισμένων φυτών. Συμπεριφέρονται ως φυτοαλεξίνες, δηλαδή τοξικά μόρια, των οποίων η σύνθεση επάγεται από την παρουσία φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Harborne, 1993; Dixon *et al.*, 1995).

β. Ορισμένα χαμηλού μοριακού βάρους, πολικά φαινολικά συστατικά των φυλλικών επιφανειών, καθώς και φαινολικά τα οποία εκκρίνονται από τις ρίζες παρουσιάζουν αλληλοπαθητική δράση, μπορεί δηλαδή να διοχετεύονται στο έδαφος μετά από έκπλυση και να επηρεάζουν τη βλάστηση των σπερμάτων και την ανάπτυξη γειτονικών φυτών (Harborne, 1993).

γ. Ορισμένες φαινολικές ενώσεις (κυρίως φλαβονοειδή) εμπλέκονται σε αμοιβαία επωφελείς σχέσεις φυτών-μικροοργανισμών, αφού μεσολαβούν ως εξειδικευμένα σήματα για την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων **1.** στα φυμάτια των ψυχανθών και **2.** των μυκορριζών (Fisher and Long, 1992; Koes *et al.*, 1994; Dakora, 1995; Phillips and Kapulnik, 1995; Shirley, 1996; Strack, 1997).

δ. Η λιγνίνη, ως πολυμερές ετερογενών φαινολικών δομικών μονάδων (Whetten and Sederoff, 1995), αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα ισχυροποίησης των κυτταρικών τοιχωμάτων παρέχοντας μηχανική υποστήριξη και προστασία (Nicholson and Hammerschmidt, 1992; Wallace and Fry, 1994; Taiz and Zeiger, 1998). Ορισμένα φαινολικά συστατικά συμμετέχουν επίσης στη σύνθεση της σουβερίνης και της κουτίνης, λιπόφιλα ετερογενή πολυμερή τα οποία προστατεύουν την επιφάνεια των φυτικών οργάνων από τις απώλειες νερού και τις προσβολές από παθογόνα και εχθρούς (Smith, 1989; Allen *et al.*, 1991; Bernards and Lewis, 1992; Shirley, 1996; Harborne, 1997; Strack, 1997).

ε. Ορισμένες χρωστικές (φλαβονοειδή, κυρίως ανθοκυάνες) παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αναπαραγωγής προσδίδοντας στα άνθη τους χαρακτηριστικούς χρωματισμούς, μέσω των οποίων προσελκύονται οι επικονιαστές (Koes *et al.*, 1994; Dakora, 1995). Ορισμένα επίσης φλαβονοειδή συμπεριφέρονται ως εξειδικευμένα σήματα, τα οποία προσανατολίζουν την προβολή του γυρεόκοκκου προς την

σπερματική βλάστη (Taiz and Zeiger, 1998). Έχει βρεθεί ότι τα φλαβονοειδή παίζουν ρόλο στην αναπαραγωγική ικανότητα ορισμένων φυτών (πετούνια, καλαμπόκι), μέσω της επίδρασής τους στη ζωτικότητα των γυρεοκόκκων (Shirley, 1996).

στ. Φαινολικές ενώσεις (κυρίως φλαβονοειδή) είναι υπεύθυνες για την προστασία των φυτικών ιστών από τη ζημιογόνο επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας (Caldwell *et al.*, 1983; Tevini, 1994; Bornman, 1999; Rozema, 1999;). Εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε επιφανειακούς προστατευτικούς ιστούς, όπως η επιδερμίδα και τα εξαρτήματά της (Caldwell *et al.*, 1983; Karabourniotis *et al.*, 1992; Karabourniotis *et al.*, 1993; Tevini, 1993; Skaltsa *et al.*, 1994; Tevini, 1994; Liakoura *et al.*, 1997; Karabourniotis *et al.*, 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις συσσωρεύονται υπό την επίδραση όχι μόνον βιοτικών, αλλά και ορισμένων αβιοτικών καταπονήσεων και ερεθισμάτων (Dixon and Paiva, 1995). Η συσσώρευση των ουσιών αυτών (κυρίως φλαβονοειδών) επάγεται από αυξημένα επίπεδα υπερϊώδους ακτινοβολίας (Hahlbrock, 1981; Beggs *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1993; Lois, 1994; Shirley, 1996), καθώς και από έλλειψη ή τοξικά επίπεδα ορισμένων θρεπτικών στοιχείων. Οι τροφοπενίες αζώτου, μαγνησίου, φωσφόρου και βορίου αποτελούν παράγοντες συσσώρευσης φαινολικών ουσιών στους φυτικούς ιστούς (Dixon and Paiva, 1995).

Α.2. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΟΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Α.2.1. Γενικά

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι συντίθενται και συσσωρεύονται στους φυτικούς ιστούς απουσία αβιοτικών ή βιοτικών καταπονήσεων, συνιστούν τμήμα της θεμελιώδους προϋπάρχουσας άμυνας των φυτών. Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν αναλάβει τη μόνιμη προστασία των φυτικών ιστών και οργάνων έναντι δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος (Καραμπουρνιώτης, 1998). Ο δευτερογενής μεταβολισμός δεν αποτελεί ένα άκαμπτο σύνολο μηχανισμών βιοσύνθεσης αμυντικών μεταβολιτών. Αντιθέτως, προσαρμόζεται στις επικρατούσες συνθήκες του περιβάλλοντος, οι οποίες εκτός από την ύπαρξη εχθρών περιλαμβάνουν τις συνθήκες φωτισμού, την επάρκεια θρεπτικών συστατικών κ.ά. (Chaves and Escudero, 1999). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι οι μεταβολές στα επίπεδα ενός δευτερογενούς μεταβολίτη, οι οποίες προκαλούνται λόγω της ύπαρξης ενός παράγοντα καταπόνησης (π.χ. ανεπάρκεια νερού), μπορεί να επηρεάσουν την άμυνα των ιστών έναντι άλλων παραγόντων καταπόνησης (π.χ. προσβολές από έντομα ή παθογόνα) (Gershenzon, 1984; Chaves and Escudero, 1999). Η ανόργανη διατροφή επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτικών ιστών. Ωστόσο, από την αναδρομή στη διεθνή βιβλιογραφία, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα δεδομένα τα οποία σχετίζονται με το θέμα αυτό είναι περιορισμένα και σποραδικά και αφορούν κυρίως σε πειραματικούς χειρισμούς με μακροστοιχεία (Aerts and Chapin, 2000).

Κατά κανόνα τα επίπεδα των δευτερογενών μεταβολιτών αυξάνονται παρουσία ενός ή περισσότερων παραγόντων καταπόνησης (Chaves and Escudero, 1999). Όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, η φυσιολογική και προσαρμοστική σημασία του μηχανισμού αυτού θα πρέπει να είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των φυτικών οργανισμών σε ακραίες και δυσμενείς, από πλευράς ανάπτυξης, συνθήκες. Σύμφωνα με τη θεωρία της ισορροπίας άνθρακα/θρεπτικών συστατικών (Bryant *et al.*, 1983), η προτεραιότητα, η οποία δίδεται στο είδος των αμυντικών μεταβολιτών που συντίθενται, εξαρτάται εκτός των άλλων και από την επάρκεια ορισμένων θρεπτικών συστατικών όπως π.χ. του αζώτου. Έλλειψη αζώτου οδηγεί συνήθως στη σύνθεση μεταβολιτών που περιέχουν αποκλειστικά άνθρακα στο μόριό τους (π.χ. φαινολικές ουσίες) εις βάρος μεταβολιτών που περιέχουν άζωτο (όπως π.χ. αλκαλοειδή). Σε περίπτωση επάρκειας αζώτου ή ανεπάρκειας διαθέσιμου άνθρακα (π.χ. σε συνθήκες

σκιάς) η περίσσεια αζώτου οδηγεί προς την κατεύθυνση σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι περιέχουν άζωτο στο μόριό τους. Κατ'επέκταση σε ολιγοτροφικά περιβάλλοντα (όπως το Μεσογειακό) αφθονούν φυτά, των οποίων οι αμυντικοί μηχανισμοί στηρίζονται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών με βάση τον άνθρακα, π.χ. φαινολικές ενώσεις και τερπένια. Σύμφωνα εξάλλου με τη θεωρία ισορροπίας αύξησης/διαφοροποίησης (Herms and Mattson, 1992) τόσο οι ενδογενείς, όσο και οι περιβαλλοντικοί περιορισμοί παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη των προτύπων ανάπτυξης αλλά και άμυνας σε κάθε φυτικό είδος. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, τα φυτά θα πρέπει να επιλέξουν μεταξύ της ταχείας ανάπτυξης, ώστε να ανταγωνιστούν επιτυχώς τα γειτονικά φυτά και της επένδυσης σε αμυντικούς μηχανισμούς, ώστε να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους κάτω από αντίξοες συνθήκες. Τα φυτά επομένως έχουν να αντιμετωπίσουν το δίλημμα της επιλογής μέσω δύο, εκ των πραγμάτων, αντικρουόμενων μηχανισμών, αφού η επένδυση σε αμυντικούς μηχανισμούς προϋποθέτει ενεργειακή και τροφική δαπάνη.

A.2.2. Ανόργανη διατροφή και δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι περιέχουν άζωτο στο μόριό τους

α. Αλκαλοειδή

Όσον αφορά στα αλκαλοειδή, φαίνεται ότι σε συνθήκες αγρού υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των χορηγούμενων δόσεων αζώτου και της συγκέντρωσης των αλκαλοειδών στους φυτικούς ιστούς. Βεβαίως οι παρατηρούμενες αντιδράσεις των φυτικών ιστών παρουσιάζουν αποκλείσεις, οι οποίες εξαρτώνται από μια σειρά παραγόντων, όπως το είδος του φυτού, την ένταση ακτινοβολίας, τη θερμοκρασία, την εποχή, τις συνθήκες καλλιέργειας και τους πειραματικούς χειρισμούς χορήγησης αζώτου (Williams, 1972). Συνήθως σημαντικές αυξήσεις στη συγκέντρωση των αλκαλοειδών παρατηρούνται σε φυτικά είδη τα οποία συνθέτουν αλκαλοειδή των οποίων το μόριο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο (χαμηλός λόγος C/N στο μόριο) (Gershenzon, 1984). Οι αυξημένες επίσης συγκεντρώσεις αζώτου επάγουν τη δραστηριότητα των ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αλκαλοειδών (Gershenzon, 1984). Η συσσώρευση αλκαλοειδών σε συνθήκες επάρκειας αζώτου πιθανόν να σχετίζεται όχι μόνο με την άμυνα των φυτών αλλά και με τη δημιουργία αποθεμάτων αζώτου το οποίο αποθηκεύεται με τη μορφή τέτοιου είδους μορίων. Πέραν αυτού, υπάρχουν ενδείξεις ότι σε ορισμένες περιπτώσεις το άζωτο

δευτερογενών μεταβολιτών μπορεί να τροφοδοτεί συνθετικές διαδικασίες του πρωτογενούς μεταβολισμού (Poulton, 1990; Καραμπουρνιώτης, 1999).

Η λίπανση με κάλιο συνήθως προκαλεί μείωση των επιπέδων των αλκαλοειδών στους φυτικούς ιστούς (Kennedy and Bush, 1983; Lamarre, 1983), ενώ αντίθετα η ανεπαρκής τροφοδοσία του στοιχείου προκαλεί αύξηση του περιεχομένου σε αλκαλοειδή (Waller and Nowacki, 1978; Ahmed and Müller, 1979). Παρόμοιες αυξήσεις παρατηρούνται και σε συνθήκες ανεπάρκειας φωσφόρου (Stewart and Lahrer, 1980; Sasse *et al.*, 1982; Gershenzon, 1984).

β. Κυανογόνα γλυκοζίδια

Ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα έχουν προκύψει και με διαφορετικούς δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι περιέχουν άζωτο στο μόριό τους. Η επαρκής αζωτούχος λίπανση προκαλεί αύξηση των συγκεντρώσεων και των κυανογόνων γλυκοζιδίων (McBee and Miller, 1980; Lancaster and Brooks, 1983). Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χορηγούμενου αζώτου στον αγρό και της παραγωγής κυανογόνων γλυκοζιδίων. Η ανεπάρκεια σε φωσφόρο μπορεί να προκαλέσει ανάλογα αποτελέσματα (Gershenzon, 1984).

γ. Θειογλυκοζίτες

Οι θειογλυκοζίτες αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, αφού περιέχουν άζωτο αλλά και θείο στο μόριό τους. Αναμένεται επομένως ότι η ανεπαρκής χορήγηση σε αυτά τα θρεπτικά στοιχεία θα οδηγήσει σε ελάττωση της παραγωγής θειογλυκοζιτών (Gershenzon, 1984). Πράγματι, συνθήκες ανεπάρκειας θείου οδηγούν στη μείωση της συσσώρευσης θειογλυκοζιτών. Η χαμηλή παροχή θείου οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης των θειογλυκοζιτών, καθώς και άλλων δευτερογενών ουσιών που περιέχουν θείο στο μόριό τους (όπως τα αλκυλοσουλφίδια και οι μερκαπτάνες) σε αρκετά φυτά μεγάλης καλλιέργειας συμπεριλαμβανομένου του ραπανιού (*Raphanus sativus*), λευκού σιναπιού (*Sinapis alba*), σκόρδου (*Allium sativum*), κρεμμυδιού (*A. cepa*) και αγριοκρέμμυδου (*A. vineale*) (Freeman and Mossadeghi, 1970, Freeman and Mossadeghi, 1971, Freeman and Mossadeghi, 1972).

Σε αντίθεση με την ανεπάρκεια θείου, η ανεπάρκεια αζώτου άλλοτε αυξάνει τη συγκέντρωση των θειογλυκοζιτών και άλλοτε δεν παρουσιάζει καμία επίδραση. Σε συνθήκες περιορισμένης επάρκειας αζώτου, η συγκέντρωση θειογλυκοζιτών σε διαφορετικά φυτικά όργανα των ειδών του γένους *Brassica* (*B. napus*, *B. nigra*, *B. oleracea*) αυξήθηκε μέχρι και 120 % (McDonald *et al.*, 1981; Wolfson, 1982), ενώ σε άλλα πειράματα δεν έδειξε αξιοσημείωτη μεταβολή (McDonald *et al.*, 1981).

A.2.3. Ανόργανη διατροφή και φαινολικές ενώσεις

Η ανεπάρκεια σε άζωτο, φωσφόρο, κάλιο και θείο συνήθως προκαλεί αύξηση των επιπέδων των φαινολικών ουσιών στους φυτικούς ιστούς (Gershenzon, 1984). Σε ορισμένα καλλιεργούμενα φυτά (καπνός, ηλίανθος, τομάτα) οι αυξήσεις που παρατηρούνται είναι εξαιρετικά υψηλές (Hall *et al.*, 1982). Οι επιδράσεις αυτές είναι περισσότερο έντονες σε συνθήκες ανεπάρκειας αζώτου και φωσφόρου (Doak and Miller, 1968; Lehman and Rice, 1972; Koeppe *et al.*, 1976). Συσσώρευση φαινολικών παραγώγων στα κύτταρα της ριζοδερμίδας έχει παρατηρηθεί και σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, επειδή μειώνεται η δραστηριότητα των υπεροξειδασών και κατ'επέκταση παρεμποδίζεται ο σχηματισμός κυτταρικού τοιχώματος και η εναπόθεση λιγνίνης. Οι ουσίες αυτές, οι οποίες αποβάλλονται προς το εδαφικό διάλυμα, θεωρείται ότι δημιουργούν αποτελεσματικά χηλικά σύμπλοκα με το σίδηρο (Marshner, 1995). Συσσώρευση φαινολικών ουσιών μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις τροφοπενίας χαλκού λόγω πτώσης της δραστηριότητας των φαινολοξειδασών. Από την άλλη πλευρά, η επαρκής τροφοδοσία με τα στοιχεία αυτά οδηγεί συνήθως στην επαγωγή μηχανισμών ανάπτυξης εις βάρος του μηχανισμού σύνθεσης φαινολικών ουσιών (Δροσόπουλος, 1992).

Η δραματική αύξηση των επιπέδων των φαινολικών των φυτικών ιστών υπό συνθήκες θρεπτικής καταπόνησης υποδηλώνει ότι, σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις, η αύξηση αυτή οφείλεται σε *de novo* σύνθεση και όχι απλά σε μια υστέρηση του πρωτογενούς έναντι του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η συσσώρευση των φαινολικών ενώσεων σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην επαγωγή της δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων-κλειδιών τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φαινολικών, όπως η PAL (Hanson and Havir, 1981), είτε στην αυξημένη προσφορά πρόδρομων ενώσεων, είτε σε συνδυασμό των δύο περιπτώσεων (Gershenzon, 1984). Πράγματι, σε ορισμένες περιπτώσεις τροφοπενίας θρεπτικών στοιχείων έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας της PAL (Gershenzon, 1984). Κάτω επίσης από ορισμένες συνθήκες η θρεπτική καταπόνηση θα μπορούσε να αυξήσει την παροχή των πρόδρομων ενώσεων των φαινολικών, όπως της φαινυλαλανίνης, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Η ανεπάρκεια αζώτου αυξάνει τη μεταβολική ζήτηση αμινομάδων και ως εκ τούτου η απαμίνωση της φαινυλαλανίνης θα μπορούσε να καλύψει ένα μέρος των αναγκών (Gershenzon, 1984). Επομένως το παραγόμενο trans-κιναμμικό οξύ είναι διαθέσιμο για τη σύνθεση πολυπλοκότερων φαινολικών ενώσεων. Σε συνθήκες επίσης έντονης έλλειψης αζώτου η

πρωτεϊνοσύνθεση επιβραδύνεται, ενώ οι πλεονάζοντες υδατάνθρακες διοχετεύονται προς την οδό παραγωγής φαινολικών ενώσεων (Jones and Hartley, 1999).

Η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων φαινολικών υπό συνθήκες θρεπτικής καταπόνησης δεν θα πρέπει να αντιμετωπίζεται μόνο ως ένα αναγκαίο κακό, το οποίο προκύπτει ως αποτέλεσμα μιας συνολικής δυσλειτουργίας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να διαδραματίζει και κάποιο ρόλο στην προσαρμογή των φυτών στις συνθήκες αυτές. Οι προτεινόμενοι πιθανοί ρόλοι είναι οι εξής (Gershenzon, 1984):

α. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης. Ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να αποτελέσει σημαντικό μηχανισμό επιβίωσης υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων (Chapin, 1980). Ορισμένες φαινολικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν ως ενδογενείς παρεμποδιστές της ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να επιβραδύνονται ορισμένες μεταβολικές διεργασίες (Grime, 1977; Seigler, 1977).

β. Ενίσχυση της αλληλοπαθητικής δράσης. Ορισμένες φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από ισχυρή αλληλοπαθητική δράση, δηλ. παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπερμάτων και την ανάπτυξη των αρχέφυτρων άλλων φυτών. Επομένως η παραγωγή αυξημένων επιπέδων φαινολικών έμμεσα συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης γειτονικών φυτών και μπορεί να αποτελεί προσαρμοστικό πλεονέκτημα σε φτωχά εδάφη, ώστε να μειωθεί ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά στοιχεία των οποίων η διαθεσιμότητα είναι περιορισμένη (Gershenzon, 1984).

γ. Ενίσχυση του αμυντικού δυναμικού έναντι εχθρών και παθογόνων. Οι φαινολικές ενώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εμπλέκονται στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών (Καραμπουρνιώτης, 1999). Η αυξημένη σύνθεση φαινολικών σε δυσμενείς γενικά συνθήκες, μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό ελαχιστοποίησης των απωλειών λόγω φυτοφάγων ή μυκήτων σε μια περίοδο όπου το κόστος αντικατάστασης των ιστών ή οργάνων είναι σημαντικά υψηλότερο από ότι θα ήταν κάτω από συνθήκες επάρκειας των θρεπτικών συστατικών (Estiarte *et al.*, 1994). Με βάση τις υποθέσεις αυτές, φυτά τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες καταλαμβάνουν άγονες περιοχές, αναμένεται να έχουν συνεχώς υψηλά επίπεδα φαινολικών. Πράγματι, τα δέντρα των τροπικών δασών τα οποία αναπτύσσονται σε φτωχά, αμμώδη εδάφη εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονται σε εδάφη με υψηλότερα αποθέματα θρεπτικών στοιχείων και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι αμύνονται αποτελεσματικότερα έναντι των φυτοφάγων (Gartlan *et al.* 1980).

δ. *Διασφάλιση των αποθεμάτων άνθρακα.* Η ανεπάρκεια ορισμένων τουλάχιστον θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε ανάσχεση της ανάπτυξης σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι της φωτοσυνθετικής λειτουργίας (Clarkson and Hanson, 1980), με αποτέλεσμα να πλεονάζουν μόρια υδατανθράκων τα οποία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν (Mattson, 1980). Η αυξημένη παραγωγή φαινολικών υπό τις συνθήκες αυτές μπορεί να θεωρηθεί ως ένας τρόπος να αποθηκευτεί ο επιπρόσθετος αφομοιωμένος άνθρακας σε μορφή η οποία παρέχει υψηλότερη ασφάλεια αλλά και προστασία έναντι των φυτοφάγων. Το μειονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι τα φαινολικά ως περισσότερο οξειδωμένες ενώσεις είναι φτωχότερα ενεργειακά έναντι των υδατανθράκων οι οποίοι κατά κανόνα παίζουν τον ρόλο αυτό. Ο αποθηκευμένος άνθρακας μπορεί θεωρητικά να κινητοποιηθεί όταν οι δυσμενείς συνθήκες αρθούν (Barz and Hoesel, 1979).

A.2.4. Ανόργανη διατροφή και τερπένια

Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα συσχέτισης της συγκέντρωσης των τερπενίων στους φυτικούς ιστούς και της χορήγησης θρεπτικών στοιχείων, παρόλο που η ομάδα αυτή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί το βασικό συστατικό των αιθερίων ελαίων των αρωματικών φυτών αλλά και της ρητίνης των κωνοφόρων. Έχουν γίνει προσπάθειες να αυξηθεί η απόδοση σε αιθέρια έλαια στη μέντα με εφαρμογή λίπανσης. Τα αποτελέσματα ωστόσο υπήρξαν ασαφή. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες η χορήγηση αζώτου, φωσφόρου ή καλίου αύξησε την συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου, ενώ σύμφωνα με άλλες δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση (Clark and Menary, 1980).

Πολύ λίγα είναι γνωστά για την επίδραση της θρεπτικής καταπόνησης στην παραγωγή στεροειδών, τριτερπενίων και συναφών ενώσεων. Η επίδραση της λίπανσης στην περιεκτικότητα σαπωνίνης στο είδος *Saponaria* δεν έδειξε σαφή τάση. Τα αποτελέσματα της ανεπαρκούς θρέψης στο φυτό *Parthenium argentatum*, το οποίο παράγει κόμμεα, είναι επίσης ασαφή. Χαμηλά επίπεδα αζώτου ή φωσφόρου μειώνουν συνήθως την περιεκτικότητα σε κόμμεα, αλλά όταν η παροχή θρεπτικών στοιχείων σε φυτά που βρίσκονται σε φάση ραγδαίας ανάπτυξης διακοπεί απότομα, παρατηρείται μια ταχεία άνοδος στη συγκέντρωσή τους. Μεταβολές στα επίπεδα καλίου και θείου δεν έχουν σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα του φυτού σε κόμμεα. Οι επιδράσεις της καταπόνησης έχουν επίσης μελετηθεί και σε άλλα φυτά που παράγουν κόμμεα. Στο αγριοραδίκι της Ρωσίας (*Taraxacum kok saghyz*), η καταπόνηση αζώτου μπορεί να προκαλέσει αύξηση στην παραγωγή κόμμεος, ενώ εφαρμογή υψηλών

ποσοτήτων αζώτου μειώνει την περιεκτικότητα σε αυτά. Η κύρια πηγή φυσικού καουτσούκ παραμένει μέχρι σήμερα το φυτό του Αμαζονίου *Hevea brasiliensis*. Χαμηλά επίπεδα αζώτου και φωσφόρου σε αυτό το φυτό καθώς και υδατικό έλλειμμα, αυξάνουν την απόδοση σε γαλακτικό χυμό (latex) (Gershenzon, 1984).

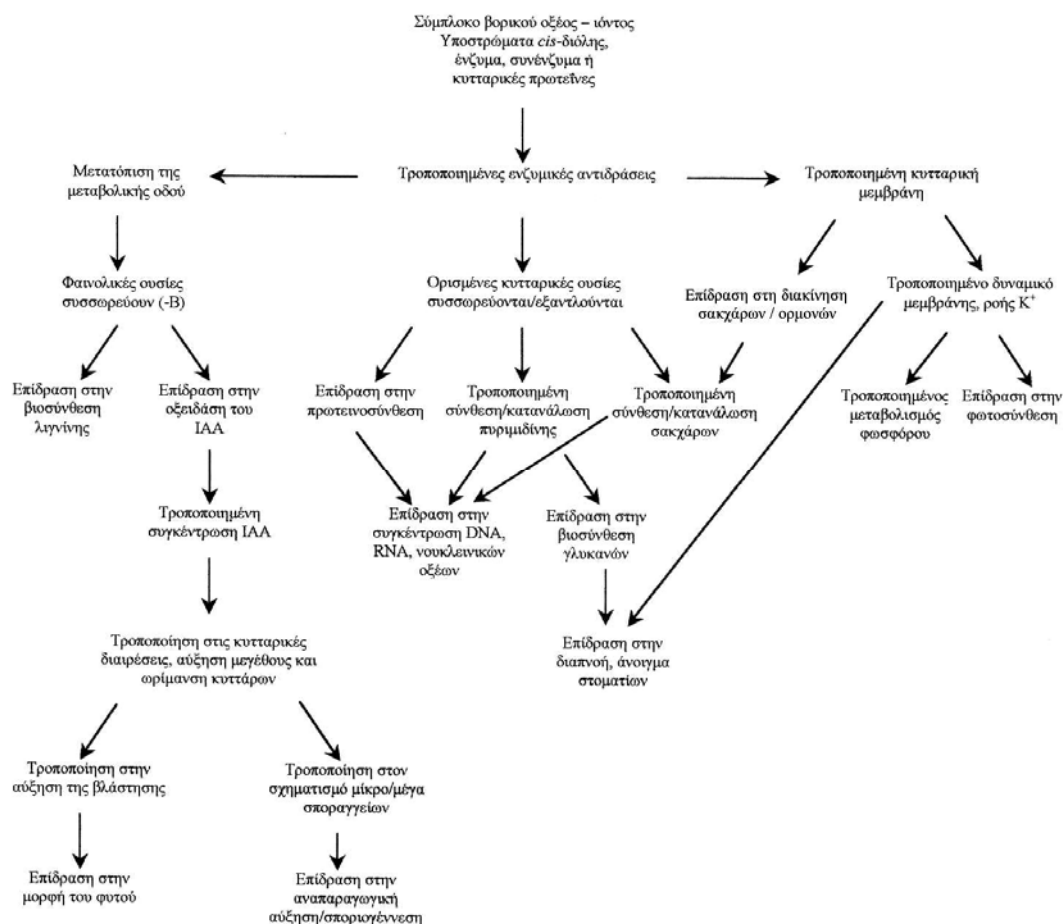
Πίνακας Α.1. Σύνοψη των επιδράσεων της ανεπαρκούς χορήγησης τεσσάρων μακροστοιχείων στη συσσώρευση ορισμένων ομάδων δευτερογενών μεταβολιτών (από Gershenzon, 1984).

Είδος δευτερογενών μεταβολιτών	-N	-P	-K	-S
Αλκαλοειδή	-	?	+	
Κυανογόνα γλυκοζίδια	-			
Θειογλυκοζίτες	+			-
Φαινολικές ενώσεις	+	+	+	+
Τερπένια	?	+	?	

Α.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Α.3.1. Γενικά

Το βόριο απορροφάται ως αδιάστατο βορικό οξύ από το έδαφος και μετακινείται παθητικά εντός του φυτού μέσω των αγγείων του ξύλου μέχρι τις απολήξεις του διαπνευστικού ρεύματος, όπου και συσσωρεύεται (Marshner, 1995; Brown and Shelp, 1997). Η κινητικότητα του βορίου εντός του φυτού διαφέρει ανάλογα με το είδος των σακχάρων που διακινούνται στον ηθμό. Γενικά η επανεκκίνηση του βορίου, μέσω του ηθμού, στα φυτά είναι περιορισμένη. Ωστόσο, στα φυτά όπου το κύριο διακινούμενο σάκχαρο είναι κάποια σακχαροαλκοόλη, το βόριο εμφανίζει αυξημένη κινητικότητα λόγω της διακίνησης των συμπλόκων βορικού οξέος-σακχαροαλκοολών (Brown and Hu, 1996). Ο φυσιολογικός ρόλος του βορίου οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με διάφορες κατηγορίες ενώσεων, κυρίως μέσω της δημιουργίας συμπλόκων τους με το βορικό οξύ (Dugger, 1983) (Εικόνα Α.2).



Εικόνα Α.2. Σύνοψη των πιθανών ρόλων του βορίου στη φυσιολογία των φυτών (από Dugger, 1983).

A.3.2. Η εμπλοκή του βορίου στην κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων

Το βόριο συμμετέχει στην κατασκευή του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος ως παράγοντας συνένωσης και σταθεροποίησης των δομικών συστατικών (όπως οι ημικυτταρίνες και οι πηκτίνες) των κυτταρικών τοιχωμάτων. Σχηματίζονται εστέρες του βορίου με υδροξυλομάδες πολυσακχαριτών και/ή γλυκοπρωτεϊνών. Η περιεκτικότητα των φυτών σε βόριο σχετίζεται με την πηκτίνη. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι εστέρες του βορικού οξέος που σχηματίζονται με τις υδροξυλομάδες σακχάρων (όπως η απιόζη ή η φουκόζη) στα πολυμερή της πηκτίνης ή των γλυκοπρωτεϊνών παρέχουν θέσεις για τη χηλιοποίηση ασβεστίου ή μαγνησίου στα κυτταρικά τοιχώματα. Το πρώτο σύμπλοκο βορίου-πολυσακχαριτών που απομονώθηκε από φυτά ήταν το σύμπλοκο βορίου-ραμνογαλακτουρονάνης-II (RG-II-B) (Matoh *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1996; Takasaki *et al.*, 1997; Fleischer *et al.*, 1998). Το σύμπλοκο αποτελείται από βορικό οξύ και δύο μονομερή RG-II, όπου το βορικό διαπλέκει δυο αλυσίδες πηκτινικών πολυσακχαριτών στην περιοχή της RG-II. Άλλα πιθανά υποψήφια μόρια για σύνδεση με το βορικό είναι γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυπρολίνη, καθώς και πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη, π.χ. εξτενσίνη.

Το βορικό οξύ σχηματίζει μόνο- και δι-εστέρες με ενώσεις οι οποίες είναι ενσωματωμένες στα κυτταρικά τοιχώματα και έχουν διαμόρφωση *cis*-διόλης. Πιθανότατα χρησιμεύει -μαζί με τα ιόντα ασβεστίου- και ως υλικό πλήρωσης των κενών. Ένα σημαντικό ποσοστό (έως 90 %) του βορίου απαντάται δεσμευμένο στα κυτταρικά τοιχώματα με τη μορφή συμπλόκων με τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος (Loomis and Durst, 1992). Μάλιστα σε συνθήκες τροφопενίας, το 95-98 % του βορίου βρίσκεται δεσμευμένο στα κυτταρικά τοιχώματα και μόνο ένα μικρό ποσοστό είναι διαθέσιμο για μετακινήσεις (Powers and Woods, 1997). Η ζωτική σημασία του βορίου στην περίπτωση αυτή διαφαίνεται από το γεγονός ότι ένα από τα πρώτα συμπτώματα έλλειψής του αποτελούν οι ανωμαλίες στην κατασκευή των κυτταρικών τοιχωμάτων και του μεσοτοιχίου (Blevins and Lukaszewski, 1998), ενώ οι ιστοί καθίστανται εύθρυπτοι. Οι υψηλότερες απαιτήσεις σε βόριο των δικότυλων έναντι των μονοκότυλων σχετίζονται με την υψηλότερη αναλογία ενώσεων με διαμόρφωση *cis*-διόλης (κυρίως συστατικά της πηκτίνης και πολυγαλακτορουρανής) στα κυτταρικά τοιχώματα της πρώτης κατηγορίας (Δροσόπουλος, 1992; Marschner, 1995).

A.3.3. Ο ρόλος του βορίου στη λειτουργία των μεμβρανών

Το βόριο θεωρείται ότι σταθεροποιεί τη δομή και τη λειτουργικότητα των μεμβρανών μέσω συμπλόκων, τα οποία σχηματίζει με τα υδροξύλια ορισμένων συστατικών (με τη μορφή *cis*-διόλης) των μεμβρανών (Δροσόπουλος, 1992; Cakmak *et al.*, 1995). Η έλλειψη του βορίου διαταράσσει την ικανότητα πρόσληψης και μεταφοράς ιόντων (Robertson and Longman, 1974; Pollard *et al.*, 1977; Goldbach, 1984; Cakmak and Römheld, 1997). Πέραν των άμεσων επιδράσεων, η είσοδος και έξοδος ιόντων μέσω των μεμβρανών διαταράσσεται και λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών, οι οποίες συσσωρεύονται υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου. Εφαρμογή χαμηλών συγκεντρώσεων φαινολικών στο ριζικό σύστημα προκαλεί παρεμπόδιση της πρόσληψης ιόντων, η οποία μπορεί να αρθεί μετά από απομάκρυνση των φαινολικών. Οι αλλαγές αυτές στη ροή των ιόντων συνοδεύονται και από αντίστοιχες διαταραχές του δυναμικού των μεμβρανών (Cakmak and Römheld, 1997).

A.3.4. Το βόριο και η φωτοσυνθετική λειτουργία

Δεν υπάρχουν δεδομένα ότι το βόριο επηρεάζει άμεσα τη φωτοσυνθετική λειτουργία (Dell and Huang, 1997). Ωστόσο η δράση του μπορεί να είναι έμμεση, αφού η ανεπάρκεια σε βόριο μειώνει σημαντικά τη φυλλική επιφάνεια και τα επίπεδα πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση. Η φωτοσυνθετική ταχύτητα μπορεί επίσης να εμφανίζεται μειωμένη λόγω της μειωμένης πυκνότητας, καθώς και της αγωγιμότητας των στοματίων (Dell and Huang, 1997). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στο κυανοβακτήριο *Anabaena* και στα φύλλα του ηλίανθου, η τροφοπενία του B οδήγησε σε μειωμένη φωτοσυνθετική έκλυση O_2 και αφομοίωση CO_2 (Kastori *et al.*, 1995). Στο σπανάκι εκτός από τη μειωμένη φωτοσυνθετική έκλυση O_2 παρατηρήθηκε και μειωμένη ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PSII στο PSI (Goldbach *et al.*, 1991). Πέρα από τις διαταραχές στη φωτοσυνθετική διαδικασία, παρατηρήθηκε συσώρευση αμύλου και σακχάρων, γεγονός που υποδηλώνει μειωμένη ικανότητα μεταφοράς των φωτοσυνθετικών προϊόντων (Camacho-Cristóbal and González-Fontes, 1999). Η μειωμένη ικανότητα μεταφοράς σακχαρόζης από τα φύλλα προς τις μεταβολικές καταβόθρες σε συνθήκες έλλειψης βορίου μπορεί να αποδοθεί στις δυσλειτουργίες, οι οποίες εμφανίζονται στις περιοχές των ακροριζίων και των κορυφών των βλαστών. Στα γενικότερα συμπτώματα τροφοπενίας βορίου, τα οποία μπορεί εμμέσως να επηρεάζουν τη φωτοσυνθετική λειτουργία, περιλαμβάνονται και η μείωση των επιπέδων των χλωροφυλλών ενώ η αύξηση των επιπέδων των διαλυτών σακχάρων

μπορεί να προκαλέσει οπισθόδρομη παρεμπόδιση στην πορεία αφομοίωσης του CO₂. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η τροφопενία βορίου όχι μόνον επέδρασε αρνητικά στα φωτοσυνθετικά χαρακτηριστικά ορισμένων φωτοσυνθετικών οργανισμών (και συγκεκριμένα σε διάτομα) αλλά παρατηρήθηκε και αύξηση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας (Smyth and Dugger, 1980).

A.3.5. Ο ρόλος του βορίου στην αναπαραγωγική διαδικασία

Το βόριο παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή. Στα περισσότερα φυτικά είδη οι απαιτήσεις σε βόριο είναι πολύ υψηλότερες κατά την αναπαραγωγική φάση από ότι κατά τη βλαστητική ανάπτυξη (Noppakoonwong *et al.*, 1997). Οι απαιτήσεις αυτές είναι περισσότερο εμφανείς σε αγρωστώδη, τα οποία κατά τη βλαστητική ανάπτυξη εμφανίζουν τις χαμηλότερες απαιτήσεις σε βόριο (και το κυτταρικό τους τοίχωμα τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πηκτίνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί). Τα φυτά αυτά εμφανίζουν τις ίδιες απαιτήσεις σε βόριο με τα δικότυλα φυτά κατά το αναπαραγωγικό στάδιο (Loomis and Durst, 1992). Η ανεπάρκεια βορίου οδηγεί σε διαταραχή της ανάπτυξης των αναπαραγωγικών οργάνων, σε στειρότητα των ανθέων και μειωμένη ανάπτυξη των σπερμάτων (Dell and Huang, 1997). Το βόριο θεωρείται επίσης απαραίτητο για την βλάστηση των γυρεοκόκκων και την ομαλή επιμήκυνση της προβολής τους (Blevins and Lukaszewski, 1998). Πιθανόν επίσης το βόριο να παίζει ρόλο στον χημειοτακτικό προσανατολισμό της προβολής του γυρεόκοκκου, αφού η συγκέντρωσή του εμφανίζει μία ανερχόμενη κλιμάκωση κατά μήκος του σωλήνα του ύπερου (Robbertse *et al.*, 1990).

A.3.6. Η εμπλοκή του στον μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος

Το βόριο εμπλέκεται στο μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος. Η επάρκεια βορίου σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα του ασκορβικού στους φυτικούς ιστούς (Blevins and Lucaszewski, 1998), γεγονός το οποίο πιθανόν να οφείλεται στη δράση του στοιχείου επί των αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και συγκεκριμένα επί της οξειδάσης του NADH (Barr and Crane, 1991). Παρ' όλα αυτά η μείωση της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος σε συνθήκες έλλειψης βορίου φαίνεται ότι δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά και μόνο στην εμπλοκή του βορίου στις αντιδράσεις που προαναφέρθηκαν, αλλά ενδεχομένως αντιπροσωπεύει μια εκτεταμένη μείωση της συνολικής δεξαμενής ασκορβικού. Είναι χαρακτηριστικό ότι η προσθήκη ασκορβικού σε συνθήκες τροφопενίας βορίου, μπορεί ως κάποιο βαθμό να

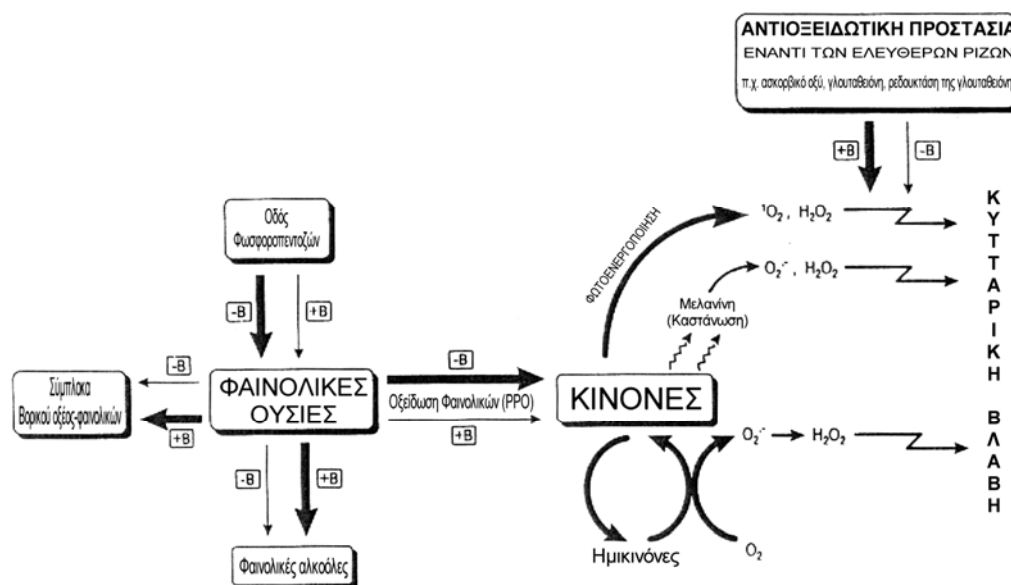
αμβλύνει τις επιπτώσεις έλλειψης του στοιχείου σε ορισμένες αναπτυξιακές διαδικασίες (Lucaszewski and Blevins, 1996).

A.3.7. Η εμπλοκή του στον μεταβολισμό της αυξίνης

Το βόριο εμπλέκεται και στο μεταβολισμό του IAA, αφού η ανεπάρκεια βορίου σχετίζεται με διαταραχές της συγκέντρωσης αυξίνης στους ιστούς. Το βόριο επηρεάζει τη δραστηριότητα της οξειδάσης του IAA, μέσω της αλληλεπίδρασής του με το μαγγάνιο και το p-κουμαρικό οξύ, παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η δραστηριότητα του ενζύμου επηρεάζεται από το λόγο βορίου/μαγγανίου καθώς επίσης και από τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος, η οποία όπως αναφέρθηκε επηρεάζεται από το βόριο (Blevins and Lucaszewski, 1998).

A.3.8. Ο ρόλος του στο μεταβολισμό των φαινολικών

Το βορικό οξύ σχηματίζει σύμπλοκα με ενώσεις με δομή *cis*-διόλης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και ορισμένα ο-διφαινολικά παράγωγα (π.χ. καφεϊκό οξύ, υδροξυφερουλικό οξύ) (Cakmak and Römheld, 1997). Κατά κανόνα η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται στους φυτικούς ιστούς σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου (B) και κυρίως στα φυτικά είδη με τις μεγαλύτερες απαιτήσεις στο στοιχείο αυτό (π.χ. ηλίανθος). Αποφασιστικό ρόλο στη συσσώρευση των φαινολικών σε συνθήκες έλλειψης βορίου παίζει η ιδιότητα του στοιχείου να σχηματίζει σύμπλοκα με σάκχαρα ή φαινολικές ουσίες με δομή *cis*-διόλης. Το βόριο παρεμποδίζει τη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης του 6- φωσφογλυκονικού οξέος επειδή σχηματίζει σύμπλοκα με το υπόστρωμα του ενζύμου. Κατά συνέπεια σε συνθήκες τροφοπενίας B η διαθεσιμότητα ελεύθερου 6- φωσφογλυκονικού οξέος αυξάνει και ως εκ τούτου ευνοείται η πορεία των φωσφοροπεντοζών (PPP) εις βάρος της γλυκόλυσης (Dugger, 1983, Δροσόπουλος, 1992) (Εικόνα Α.3). Επίσης σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου η δραστηριότητα της δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορογλυκόζης (το ένζυμο το οποίο καταλύει την πρώτη αντίδραση στην οδό των φωσφοροπεντοζών) αυξάνεται περισσότερο από ότι της αφυδρογονάσης του 6- φωσφογλυκονικού οξέος (Gomez-Rodriguez *et al.*, 1987). Η οδός των φωσφοροπεντοζών οδηγεί, ως γνωστόν, σε αυξημένη σύνθεση φαινολικών. Ωστόσο οι δραματικές επιδράσεις του βορίου στο μεταβολισμό των φαινολικών δε φαίνεται να οφείλονται μόνο στην προαναφερθείσα δράση του (Cakmak and Römheld, 1997).



Εικόνα Α.3. Διαγραμματική παρουσίαση των επιδράσεων του βορίου στο μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων (από Cakmak and Römheld, 1997).

Ο σχηματισμός συμπλόκων ανάμεσα στο βορικό ανιόν και ορισμένες φαινολικές ενώσεις (π.χ. καφεϊκό οξύ) μπορεί να επηρεάσει την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των ιστών σε φαινολικά. Η εκτεταμένη συμπλοκοποίηση του βορίου με το καφεϊκό οξύ, σε συνθήκες επάρκειας B, παρεμποδίζει την πορεία προς σχηματισμό κινονών και έτσι διευκολύνει τη σύνθεση των φαινολικών αλκοολών που αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις της βιοσύνθεσης της λιγνίνης. Η αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, ως αποτέλεσμα του συνδυασμού της διέγερσης της οδού των φωσφοροπεντοζών και του περιορισμού της βιοσύνθεσης των φαινολικών αλκοολών, είναι λιγότερο εμφανής στα αγρωστώδη σε σχέση με τα δικότυλα φυτά. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με τις διαφορετικές απαιτήσεις για το στοιχείο αυτό μεταξύ δικότυλων και μονοκότυλων φυτών. Η τελευταία κατηγορία παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερες απαιτήσεις για το βόριο (Cakmak and Römheld, 1997).

Η συσσώρευση φαινολικών στους ιστούς -υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου- αποτελεί κρίσιμο βήμα για την έναρξη διαταραχών σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Τα περισσότερα φαινολικά παρουσιάζουν τοξική επίδραση έναντι των φυτικών ιστών, ακόμη και σε συγκεντρώσεις του επιπέδου 1 μM (Vaughan and Ord, 1990). Σε φυτά που αναπτύσσονται υπό συνθήκες έλλειψης βορίου συσσωρεύονται κυρίως καφεϊκό, χλωρογενικό, φερουλικό και βανιλικό οξύ, καθώς και ορισμένες

κουμαρίνες, των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται περαιτέρω παρουσία αυξημένων εντάσεων φωτεινής ακτινοβολίας. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην επαγωγή της δραστηριότητας της PAL από το φως, η δραστηριότητα της οποίας αυξάνεται σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου, κυρίως στα ευαίσθητα στην τροφοπενία βορίου δικοτύλα φυτά (Shkol'nik, 1984).

Η συσσώρευση φαινολικών ενώσεων σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου μπορεί να έχει έμμεσες επιπτώσεις σε διαφορετικά σημεία του φυτικού μεταβολισμού. Π.χ. το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ αποτελούν παρεμποδιστές της οξειδάσης του IAA. Ως εκ τούτου η συσσώρευσή τους μπορεί να επιφέρει αύξηση των επιπέδων του IAA λόγω ελάττωσης της δραστηριότητας του ενζύμου. Φαίνεται ωστόσο ότι η αύξηση της στάθμης του IAA δεν αποτελεί πάντα ένα συνοδό σύμπτωμα της τροφοπενίας βορίου (Δροσόπουλος, 1992; Cakmak and Römhelt, 1997).

Η συσσώρευση φαινολικών υπό συνθήκες τροφοπενίας B μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση ορισμένων ένζυμων, τα οποία χρησιμοποιούν φαινολικές ουσίες ως υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί αύξηση της δραστηριότητας της PPO σε εκχυλίσματα τα οποία προέρχονται από φυτά ανεπτυγμένα σε συνθήκες έλλειψης βορίου (Marshner, 1995). Μάλιστα, η δραστηριότητα του ενζύμου σχετίζεται θετικά με την ένταση των συμπτωμάτων της τροφοπενίας, καθώς και το βαθμό ευαισθησίας κάθε φυτικού είδους έναντι της έλλειψης βορίου. Η υψηλή δραστηριότητα της PPO υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση κινονών, ουσιών εξαιρετικά τοξικών για τα φυτικά κύτταρα, ενώ παράλληλα μέσω της διαδικασίας αυτής να παραχθούν ενεργές ρίζες οξυγόνου (Εικόνα Α.3). Η διαδικασία αυτή φαίνεται ότι ευθύνεται για την εμφάνιση των συμπτωμάτων, τα οποία σχετίζονται με καταστροφές σε κυτταρικό επίπεδο και ανάσχεση της ανάπτυξης. Η περαιτέρω συμπύκνωση των κινονών προς μελανίνες φαίνεται ότι ευθύνεται για το σύμπτωμα της εμφάνισης καφέ κηλίδων σε ιστούς υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου. Η άρση -τμήματος τουλάχιστον- των συμπτωμάτων τροφοπενίας βορίου με χορήγηση ασκορβικού οξέος, όπως ήδη έχει αναφερθεί, φαίνεται ότι σχετίζεται με την ικανότητά του να ανάγει τις κινόνες προς τις πρόδρομες φαινολικές ενώσεις (Cakmak and Römhelt, 1997).

Α.3.9. Ο ρόλος του βορίου σε άλλες λειτουργίες

Το βόριο συμβάλλει στην ομαλή λειτουργία των φυματίων κατά τη συμβιωτική δέσμευση του αζώτου (García-González *et al.*, 1991; Cakmak and Römhelt, 1997).

Εμπλέκεται επίσης στο μεταβολισμό του αζώτου (Shelp, 1988; Shelp, 1990) και την τροφοδοσία των φυτικών ιστών με νιτρικά (Camacho-Cristóbal and González-Fontes, 1999). Σημαντικός είναι ο ρόλος του βορίου και στην κινητικότητα των φωτοσυνθετικών προϊόντων στον ηθμό, ειδικά σε φυτά τα οποία διακινούν σακχαροαλκοόλες. Η επάρκεια βορίου συμβάλλει στην ταχύτερη και ευρύτερη διασπορά των φωτοσυνθετικών προϊόντων (Koge, 1978). Το βόριο συμβάλλει, μέσω της επίδρασής του στην πρωτεϊνσύνθεση και στη βιοσύνθεση σακχάρων και πυριμιδίνης, στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και ειδικά του RNA, όπου η επίδραση είναι άμεση. Σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου η στάθμη του RNA εμφανίζεται χαμηλή λόγω αυξημένης δραστηριότητας των ενζύμων αποδόμησής του (Δροσόπουλος, 1992). Το βόριο επιδρά στην κυτταροδιαίρεση και την επιμήκυνση των κυττάρων μέσω της ρύθμισης της οξειδάσης του IAA (Dugger, 1983).

A.4. ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΠΕΝΙΑΣ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Τα συμπτώματα υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου παρατηρούνται τόσο σε επίπεδο οργανισμού, όσο και σε επίπεδο ιστών ή οργάνων (Dell and Huang, 1997). Ο ρυθμός ανάπτυξης στις συνθήκες αυτές επιβραδύνεται ή σταματά πλήρως. Η τροφοπενία βορίου παρεμποδίζει την επιμήκυνση της ρίζας περιορίζοντας τις κυτταρικές διαιρέσεις αλλά και τη διάταση των μεριστωματικών κυττάρων του ακρορίζιου. Στην περίπτωση ισχυρής τροφοπενίας βορίου, η καλύπτρα, η μεριστωματική ζώνη και το πρωτόδερμα των ακρορίζιων αλλοιώνονται ή καταστρέφονται, η ανάπτυξη της ρίζας σταματά και τα ακρορίζια νεκρώνονται. Η ρίζα αποκτά κοντόχοντρη και θαμνώδη εμφάνιση. Δυσμορφίες παρουσιάζονται και στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος της ρίζας. Το σύμπτωμα της παρεμπόδισης της ανάπτυξης της ρίζας εμφανίζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη διακοπή της τροφοδοσίας σε βόριο σε σύγκριση με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του βλαστού και ως εκ τούτου ο λόγος βλαστός/ρίζα αυξάνεται. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αυξάνει την ευαισθησία των φυτών στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως οι οριακές ελλείψεις άλλων στοιχείων και το υδατικό έλλειμμα του εδάφους (Lovatt *et al.*, 1981; Marshner, 1995).

Η περιορισμένη διαθεσιμότητα βορίου (B) προκαλεί διαταραχές στην ανάπτυξη των φύλλων και περιορισμό της επιφάνειάς τους, περιορίζοντας έμμεσα και τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα. Κατά το αναπαραγωγικό στάδιο τα φυτά εμφανίζονται περισσότερο ευαίσθητα στην έλλειψη B σε σύγκριση με το βλαστητικό και γι' αυτό το λόγο είναι δυνατό σε συνθήκες αγρού να παρατηρηθούν μειωμένες αποδόσεις, χωρίς προηγούμενη εμφάνιση συμπτωμάτων στην ανάπτυξη της βλάστησης (Dell and Huang, 1997).

A.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

A.5.1. Η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός του σαλικυλικού οξέος (SA) στα φυτικά κύτταρα

Τα φυτά συνθέτουν SA (*ο*-υδροξυβενζοϊκό οξύ) μέσω του *trans*-κινναμμικού οξέος (*t*-CA), το οποίο προκύπτει με απαμίνωση της φαινυλαλανίνης παρουσία του ενζύμου αμμωνιο-λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL) (Raskin, 1992). Το κινναμμικό οξύ μετατρέπεται αρχικά σε βενζοϊκό οξύ (BA) ή *ο*-κουμαρικό οξύ και στη συνέχεια σε SA (Raskin, 1992; Yalpani *et al.*, 1993; Ryals *et al.*, 1996). Τόσο το BA όσο και το SA μπορούν να μετατραπούν σε γλυκοζίτες, ενώ οι αντιδράσεις μετατροπής αποτελούν το σημαντικότερο μηχανισμό, μέσω του οποίου ασκείται έλεγχος των επιπέδων του SA. Κατά κανόνα η συσσώρευση του SA επιφέρει την άμεση μετατροπή του προς β-0-D-γλυκοσυλ-σαλικυλικό οξύ (SAG), δηλ. τη μη ενεργό μορφή, η οποία δεν εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών (Leon *et al.*, 1993). Αδρανοποίηση του SA μπορεί επίσης να προκύψει μέσω υδροξυλιώσεων του αρωματικού δακτυλίου του SA (Raskin, 1992). Η μετατροπή των αδρανών μορφών στην ενεργό, ελεύθερη μορφή του SA, πιθανότατα αποτελεί ένα μηχανισμό ταχείας αύξησης των επιπέδων SA στα φυτικά κύτταρα (Ryals *et al.*, 1996).

A.5.2. Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών των φυτικών ιστών

Το σαλικυλικό οξύ αποτελεί ένα ενδογενές σήμα μεταγωγής, το οποίο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση πολυάριθμων φυτικών αμυντικών μηχανισμών έναντι παθογόνων. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την επαγωγή τόσο της τοπικής, όσο και της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας, τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου στον ξενιστή, καθώς επίσης και τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου (Raskin, 1992; Ryals *et al.*, 1996; Dempsey *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 1999). Ο τρόπος με τον οποίο το SA εμπλέκεται στους μηχανισμούς αυτούς ποικίλλει και περιλαμβάνει αλλαγές στην καταλυτική έκφραση ενζύμων, τόσο σε μεταγραφικό (επαγωγή αμυντικών γονιδίων, *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών), όσο και σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο (ρύθμιση της δραστηριότητας), ρύθμιση των αμυντικών μηχανισμών και/ή δημιουργία ελευθέρων ριζών O₂ και παραγωγή H₂O₂ (Chen *et al.*, 1993; Durner *et al.*, 1997; Van Camp *et al.*, 1998; Dempsey *et al.*, 1999). Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μηχανισμοί ανθεκτικότητας, οι οποίοι δεν επάγονται από το SA, ωστόσο

αλληλεπιδρούν με τους επαγόμενους από το SA (Pieterse and van Loon, 1999). Στους μη επαγόμενους από το SA μηχανισμούς εμπλέκονται ως σήματα μεταγωγής το γιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο, με συνεργιστική δράση έναντι αυτής του σαλικυλικού οξέος (Lawton *et al.*, 1994). Αντίθετα, το σαλικυλικό οξύ φαίνεται ότι παρουσιάζει αρνητική επίδραση στις αμυντικές αντιδράσεις, οι οποίες επάγονται από το γιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο (Dong, 1998; Maleck and Dietrich, 1999).

Μία από τις ταχείες αντιδράσεις των φυτών έναντι προσβολών είναι η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου με υψηλό οξειδωτικό δυναμικό. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως οξειδωτική έκρηξη. Μία αρχική οξειδωτική έκρηξη παρατηρείται αμέσως μετά την προσβολή, ενώ μία δεύτερη έκρηξη, η οποία παρατηρείται λίγες ώρες αργότερα, χαρακτηρίζει τις περιπτώσεις επαγωγής ανθεκτικότητας. Εκτός από την άμεση δράση των ελευθέρων ριζών έναντι των παθογόνων το οξειδωτικό περιβάλλον το οποίο δημιουργούν ευνοεί τη διαδικασία λιγνινοποίησης και κατ' επέκταση την ισχυροποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Sticher *et al.*, 1997; Wojtaszek, 1997; Alvarez *et al.*, 1998). Μεταξύ των αρχικών αμυντικών αντιδράσεων ορισμένων φυτών είναι και η ενεργοποίηση ενζύμων (κυρίως της PAL) της βιοσυνθετικής οδού των φαινυλπροπανοειδών, η οποία οδηγεί στη σύνθεση φυτοαλεξινών, αλλά και των προδρόμων του SA. Οι αντιδράσεις των φυτών έναντι των προσβολών, οι οποίες δρομολογούνται στο διάστημα των επόμενων ωρών και ημερών περιλαμβάνουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και την τοπική (LAR) και διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (SAR). Οι τελευταίες αυτές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από την επαγωγή της έκφρασης των PR γονιδίων (Delaney, 1997; Mauch-Mani and Metraux, 1998; Dempsey *et al.*, 1999).

A.5.3. Ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στην επαγωγή της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR)

Το γεγονός ότι πειραματικοί χειρισμοί με SA ή ακετυλοσαλικυλικό οξύ (τη γνωστή ασπιρίνη) αμβλύνουν τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί ο TMV στον καπνό, ενώ ταυτόχρονα επάγουν την έκφραση PRs, αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι το SA εμπλέκεται στη SAR (White, 1979; Antoniow and White, 1980). Μετέπειτα πειράματα έδειξαν ότι η εφαρμογή SA επάγει τη SAR και την έκφραση SAR γονιδίων σε διάφορα φυτά (Ward *et al.*, 1991; Delaney, 1997) καθώς και ότι τόσο τα αυξημένα επίπεδα του ενδογενούς SA (ικανά για την επαγωγή των PRs) όσο και η χρονική στιγμή της αύξησης συσχετίζονται με την επαγωγή της SAR. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων

αυτών πιστοποιήσαν το ρόλο του SA ως ενδογενούς σήματος, το οποίο οδηγεί στη διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Ryals *et al.*, 1996). Το γεγονός ότι το SA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη SAR επιβεβαιώθηκε και από πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά φυτά (Gaffney *et al.*, 1993; Uknes *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997), ενώ ο τρόπος δράσης του αποτελεί αντικείμενο έρευνας της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια (Baker *et al.*, 1997; Maleck and Lawton, 1998; Carrington *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

Παρ'όλον ότι θεωρείται πλέον βέβαιο ότι το SA αποτελεί το σήμα για την ενεργοποίηση της SAR, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν αποτελεί και το σήμα, το οποίο μεταφέρεται διασυστηματικά από το σημείο της προσβολής σε όλο το φυτό και ενεργοποιεί τους αμυντικούς φυτικούς μηχανισμούς (Godiard *et al.*, 1994; Vernooij *et al.*, 1994; Shulaev *et al.*, 1997; Dempsey *et al.*, 1999). Εκτός από το SA και ένα δεύτερο -άγνωστο μέχρι στιγμής- σήμα είναι πιθανόν να εμπλέκεται στην επαγωγή της SAR (Smith-Becker *et al.*, 1998).

A.5.4. Η εμπλοκή του σαλικυλικού οξέος στη θερμογόνο αναπνοή

Το ενδογενές SA αποτελεί διεγέρτη της θερμογένεσης σε ορισμένα φυτικά είδη (Raskin *et al.*, 1987; Taiz and Zeiger, 1998). Η θερμογένεση (π.χ. στο γένος *Arum*), αποτελεί μία ιδιόμορφη περίπτωση προσέλκυσης επικονιαστών. Κατά την ωρίμανση του άνθους και για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα παρατηρείται μία δραματική αύξηση στη θερμογόνο αναπνοή του σπάδικα, στην αναπνευστική δηλαδή δραστηριότητα μέσω της οποίας η παραγόμενη ενέργεια, με τη μορφή ATP, μειώνεται δραματικά ενώ αντίστοιχα αυξάνονται οι θερμικές απώλειες. Το σαλικυλικό οξύ παίζει στην περίπτωση αυτή το ρόλο του εξειδικευμένου σήματος, το οποίο προκαλεί την έναρξη της διαδικασίας αυτής. Το SA συντίθεται στα αρσενικά άνθη και κινείται προς το ανώτερο μέρος του σπάδικα (Raskin *et al.*, 1987; Raskin *et al.*, 1989), ενώ το διάστημα κατά το οποίο παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του SA συμπίπτει χρονικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η θερμογένεση προκαλεί σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας του σπάδικα -έως και 14 °C. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας καθιστά πτητικές ορισμένες ουσίες (κυρίως αμίνες), οι οποίες προσδίδουν χαρακτηριστική οσμή στον σπάδικα και ως εκ τούτου προσελκύουν έντομα-επικονιαστές (Raskin, 1992).

A.5.5. Η επίδραση του SA σε άλλες λειτουργίες

Η εφαρμογή SA, εκτός από την επαγωγή της SAR, επηρεάζει και άλλες φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών (Raskin, 1992). Σ' αυτές συγκαταλέγονται η επαγωγή της

άνθησης, η παρεμπόδιση της απορρόφησης καλίου και φωσφόρου (Glass, 1973; Glass, 1974) καθώς και η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου (Leslie and Romani, 1986). Το σαλικυλικό οξύ πιθανόν εμπλέκεται στο μηχανισμό των στοματικών κινήσεων (Rai *et al.*, 1986). Πρόσφατα βρέθηκε ότι χειρισμοί με SA σε φυτά *Sinapis alba* βελτίωσαν την θερμοανθεκτικότητα τους (Dat *et al.*, 1998) ενώ εφαρμογή SA μέσω υδροπονίας αύξησε την ανθεκτικότητα στο ψύχος (Janda *et al.*, 1998). Εφαρμογή SA μέσω υδροπονίας πραγματοποιήθηκε πρόσφατα και για την επαγωγή της SAR (Spletzer and Enyedi, 1999).

Μολονότι έως πρόσφατα το ενδιαφέρον εστιαζόταν κυρίως στο ρόλο του SA υπό συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι το SA συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της έκθεσης των φυτών στο όζον ή στην υπεριώδη ακτινοβολία (Yalpani *et al.*, 1994; Dixon and Paiva, 1995; Sharma *et al.*, 1996).

A.5.6. Η επίδραση του SA στη ρύθμιση γονιδίων

Το SA ρυθμίζει την έκφραση και άλλων γονιδίων πλην αυτών που σχετίζονται με ορισμένους αμυντικούς μηχανισμούς. Η εμπλοκή του SA στη θερμογένεση σχετίζεται με τη δράση του επί του γονιδίου *aox1*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της εναλλακτικής οξειδάσης. Μάλιστα βρέθηκε ότι υπάρχει ομολογία στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου αυτού και του προαγωγέα των PR γονιδίων (Rhoads and McIntosh, 1993). Επίσης έχει βρεθεί ότι το SA εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης της SOD (Fodor *et al.*, 1997), καθώς και ενός αριθμού γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα-κλειδιά του φυτικού μεταβολισμού, όπως της συνθετάσης της νοπαλίνης (Kim *et al.*, 1993) της θειοτρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Boots *et al.*, 1993), ορισμένων κινασών (Zhang *et al.*, 1997) και γλυκοσυλτρανσφερασών (Horvath and Chua, 1996; Fraissinet-Tachet *et al.*, 1998).

A.6. ΤΟ ΦΥΤΟ *DITTRICHIA VISCOSA*

Το φυτό *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter (syn. *Inula viscosa* (L.) Aiton) ανήκει στην οικογένεια Asteraceae. Ίνουλα ή ιξώδης. Αναφέρεται με τα κοινά ονόματα νεροκόνυζος, κονυζός, νεροκολλησιά. Πιθανόν η κόνυζα ή άρρην του Θεόφραστου, καθώς και η κόνυζα η μεγάλη του Διοσκορίδη. Είναι αειθαλής πολυετής θάμνος, ιξώδης-κολλώδης και εύοσμος, όρθιος, πολύφυλλος και αποξυλωμένος στη βάση του. Φέρει φύλλα λογχοειδή ακέραια ή οδοντωτά, οξέα. Απαντάται σε χέρσους, πετρώδεις τόπους σε όλη την Ελλάδα. Εξαπλώνεται στη Μεσογειακή Ευρώπη, Ασία και Αφρική (Καββάδας, 1956). Πρόκειται για θάμνο ιδιαίτερα επιθετικό στην κατάληψη διαταραγμένων, λόγω ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, περιοχών με αποτέλεσμα η γεωγραφική εξάπλωση του φυτού να επεκτείνεται ταχύτατα, διότι οι υποβαθμισμένες αυτές περιοχές διευρύνονται.

Η επιφάνεια του βλαστού και των φύλλων του *D. viscosa* είναι κολλώδης και ιξώδης, επειδή το φυτό εκκρίνει στην επιφάνειά του ένα πολύπλοκο μίγμα οργανικών ουσιών, κυρίως τερπενοειδών (Ceccherelli *et al.*, 1985), άγλυκων φλαβονοειδών και απλών φαινολικών (Wollenweber *et al.*, 1991, βλ. Πίνακα Α.2). Τα φύλλα και οι νεαροί βλαστοί του φυτού φέρουν άμισχες και έμμισχες αδενώδεις τρίχες, οι οποίες παραμένουν λειτουργικές καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του φύλλου, από τα πρώτα στάδια του σχηματισμού του μέχρι την πλήρη ωρίμανσή του. Δεν είναι γνωστό εάν αυτοί οι δύο τύποι εκκρίνουν τις ίδιες ή διαφορετικές ουσίες. Στην τελευταία περίπτωση οι ουσίες μπορεί να έχουν και διαφορετική λειτουργία (Werker, 2000). Και τα δύο είδη τριχών διαθέτουν μια αδενώδη κεφαλή, η οποία απαρτίζεται από τρεις τύπους κυττάρων: ένα ζεύγος κυττάρων της κορυφής, ένα ζεύγος κυττάρων κάτω από αυτό και τρία ζεύγη φωτοσυνθετικών κυττάρων. Όλα τα κύτταρα της κεφαλής εκκρίνουν λιπίδια, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Όσον αφορά στα εκκριτικά κύτταρα των αδενωδών τριχών του φυτού, τα λιπίδια εκκρίνονται μέσω πόρων που υπάρχουν στην εφυμενίδα, ενώ οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κάτω από την εφυμενίδα, η οποία αργότερα διαρρηγνύεται. Κατά συνέπεια το επιπλέον υλικό το οποίο παράγεται στη συνέχεια από τα εκκριτικά κύτταρα εκκρίνεται απευθείας στο εξωτερικό περιβάλλον (Werker and Fahn, 1981).

Σε υποκυτταρικό επίπεδο, φαίνεται ότι στην εκκριτική λειτουργία συμμετέχουν το λείο και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, τα πλαστίδια, τα μιτοχόνδρια και η συσκευή Golgi. Τα διάφορα ζεύγη κυττάρων της κεφαλής των αδενωδών τριχών

διαφέρουν μεταξύ τους στα ανατομικά τους χαρακτηριστικά, στον τύπο των πλαστιδίων που εμπλέκονται στις εκκριτικές διεργασίες και στον τρόπο με τον οποίο εκκρίνονται οι ουσίες αυτές στο περιβάλλον (Werker and Fahn, 1981). Η εμπλοκή όλων των τύπων των κυτοπλασματικών οργανιδίων στην παραγωγή των υλικών έκκρισης, τα οποία μπορεί να διαφέρουν όσον αφορά στους μεταβολικούς μηχανισμούς τους οποίους διαθέτουν, υποδεικνύει ότι η ποικιλότητα των υλικών τα οποία παράγονται από τις αδενώδεις τρίχες του *D. viscosa* είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι ανιχνεύθηκε αρχικά μέσω ιστοχημικών μεθόδων (Werker and Fahn, 1981; Fahn, 2000).

Το έκκριμα αναφέρεται και ως μίγμα επιεφυμενιδικών συστατικών επειδή είναι ενσωματωμένο, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, στο κηρώδες εφυμενιδικό υπόστρωμα. Το επιεφυμενιδικό έκκριμα του φυτού *D. viscosa* είναι κατά μεγάλο ποσοστό (περίπου 70%) υδατοδιαλυτό (Stephanou and Manetas, 1997a). Το υλικό αυτό περιορίζει τις απώλειες του νερού από την εφυμενίδα και είναι ισχυρά αλληλοπαθητικό (αναστέλλει τη βλάστηση σπερμάτων μαρουλιού και *Phlomis fruticosa* χωρίς να επηρεάζει τα σπέρματα του μητρικού φυτού) (Stephanou and Manetas, 1995). Η παραγωγή των επιεφυμενιδικών συστατικών από το φυτό και η διασπορά τους στο περιβάλλον παρουσιάζει χαρακτηριστική εποχική κατανομή. Η συγκέντρωσή τους στην επιφάνεια των φύλλων παρουσιάζεται υψηλότερη κατά το θέρος, ενώ η διασπορά του εκκρίματος γίνεται κατά την υγρή περίοδο του έτους όταν η βροχή παρασύρει στο έδαφος τις δραστικές ουσίες (Stephanou and Manetas, 1997c). Παρόλο που το επιεφυμενιδικό έκκριμα απορροφά σημαντικά στη UV-B περιοχή του φάσματος, η απομάκρυνσή του, παρουσία της ακτινοβολίας αυτής, δεν επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογία και στην ανάπτυξη του φυτού (Stephanou and Manetas, 1997b). Το έκκριμα παρουσιάζει επίσης σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ισχυρή τοξικότητα έναντι ορισμένων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών *in vitro* (Μιλτιάδου κ.α., 1998).

Λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τα συστατικά του επιεφυμενιδικού εκκρίματος του φυτού, έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης και ταυτοποίησης των ουσιών αυτών από πολλές ερευνητικές ομάδες. Εκτός από τα φλαβονοειδή (τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα Α.2, Wollenweber *et al.*, 1991) έχουν ανιχνευθεί και τερπένια- κυρίως σεσκιτερπενικές λακτόνες (Bohlman and Gupta, 1982; Maoz *et al.*, 1999) και σεσκιτερπενικά οξέα (Ceccherelli *et al.*, 1985; Ulubelen *et al.*, 1987; Ceccherelli *et al.*, 1988; Sanz *et al.*, 1991; Abu Zarga *et al.*, 1998). Οι Grande

et al. (1992) απομόνωσαν 10 τριτερπένια με τη μορφή ελεύθερων αλκοολών, οξικού οξέος ή λιπαρών οξέων.

Πίνακας Α.2. Τα φλαβονοειδή του επιεφυμενιδικού εκκρίματος των φύλλων του φυτού *D. viscosa* (Wollenweber *et al.*, 1991).

Φλαβόνες	
scutellarein 6-methyl ether (hispidulin)	Apigenin
6-methoxyluteolin (nepetin)	Luteolin
Φλαβονόλες	
kaempferol 3-methyl ether (isokaempferide)	quercetin 7-methyl ether (rhamnetin)
kaempferol 7-methyl ether (rhamnocitrin)	quercetin 3'-methyl ether (isorhamnetin)
6-methoxykaempferol	quercetin 3,3'-dimethyl ether
quercetin	quercetagenin 3,6-dimethyl ether (axillarin)
quercetin 3-methyl ether	quercetagenin 6,3'-dimethyl ether (spinacetin)
Φλαβανόνες	
naringenin 7-methyl ether (sakuranetin)	eriodictyol 7-methyl ether
eriodictyol	
Διυδροφλαβονόλες	
aromadendrin 3-acetate	taxifolin 7-methyl ether
aromadendrin 7-methyl ether	taxifolin 7-methyl ether-3-acetate
taxifolin 3-acetate	

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι στην επιφάνεια των φύλλων και των νεαρών βλαστών του φυτού εντοπίζονται, εκτός από τις αδενώδεις, και μη αδενώδεις τρίχες. Οι τελευταίες απαντώνται σε μεγαλύτερο αριθμό στη βάση και κατά μήκος του κεντρικού νεύρου του φύλλου και χαρακτηρίζονται από το πολύ μεγάλο μήκος τους και από το γεγονός ότι είναι πολυκύτταρες. Ωριμάζουν πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια έκπτυξης των φύλλων και φτάνουν σχεδόν στο τελικό τους μήκος όταν το φύλλο είναι περίπου 2 mm. Στο στάδιο αυτό γέρνουν προς την άκρη του φύλλου και καλύπτουν το νεαρό φύλλο (Werker, 2000).

B. Σκοπός της Εργασίας

Λαμβάνοντας υπ'όψη ότι **α.** το φυτό *Dittrichia viscosa* παράγει επιφανειακό έκκριμα (μίγμα φαινολικών και τερπενίων) στα φύλλα του, το οποίο παρουσιάζει ισχυρή αλληλοπαθητική δράση (παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπερμάτων άλλων φυτών) και ισχυρή τοξική δράση έναντι της ανάπτυξης ορισμένων φυτοπαθογόνων βακτηρίων και μυκήτων, **β.** η βιολογική δράση του εκκρίματος παρουσιάζεται στις περισσότερες περιπτώσεις ισχυρότατη και η αξιοποίησή του στη βιολογική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών ή/και εντόμων φαίνεται εφικτή, **γ.** το πειραματόφυτο είναι άφθονο στη φύση, ενώ η καλλιέργειά του δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες και **δ.** το επιφανειακό έκκριμα είναι φυσικό προϊόν και παραλαμβάνεται εύκολα και ταχέως από το φυτό, η παρούσα ερευνητική εργασία έθεσε ως στόχους:

I. Την υδροπονική καλλιέργεια φυτών *D. viscosa* υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Το πειραματικό αυτό τμήμα της εργασίας περιλαμβάνει το σχεδιασμό και εγκατάσταση ενός πλήρως αυτοματοποιημένου συστήματος υδροπονικής καλλιέργειας εντός θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών.

II. Την εφαρμογή ορισμένων πειραματικών χειρισμών στις συνθήκες αυτές ώστε το φυτό να παράγει αυξημένες ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών. Οι πειραματικοί αυτοί χειρισμοί αφορούσαν σε **α.** χορήγηση σαλικυλικού οξέος στο περιβάλλον της ρίζας μέσω του θρεπτικού διαλύματος και **β.** την πρόκληση τροφопενίας βορίου.

Παράλληλα, εκτός των ποιοτικών και ποσοτικών μετρήσεων των δευτερογενών μεταβολιτών κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν μια σειρά από αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτροι, έτσι ώστε να δοθεί μια πλήρης εικόνα των λειτουργιών του φυτού κάτω από τους διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς.

Σε επίπεδο εφαρμογής ο πειραματικός σχεδιασμός αποσκοπούσε στην τεχνητή αύξηση της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών σε επιλεγμένο πειραματόφυτο κάτω από πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες. Στόχος επομένως ήταν να δημιουργηθούν προοπτικές για την εφαρμογή ανάλογων πειραματικών χειρισμών σε φυτά, τα οποία καλλιεργούνται για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε παραγωγική κλίμακα, ώστε με απλούς χειρισμούς να αυξηθεί η παραγωγή του προϊόντος.

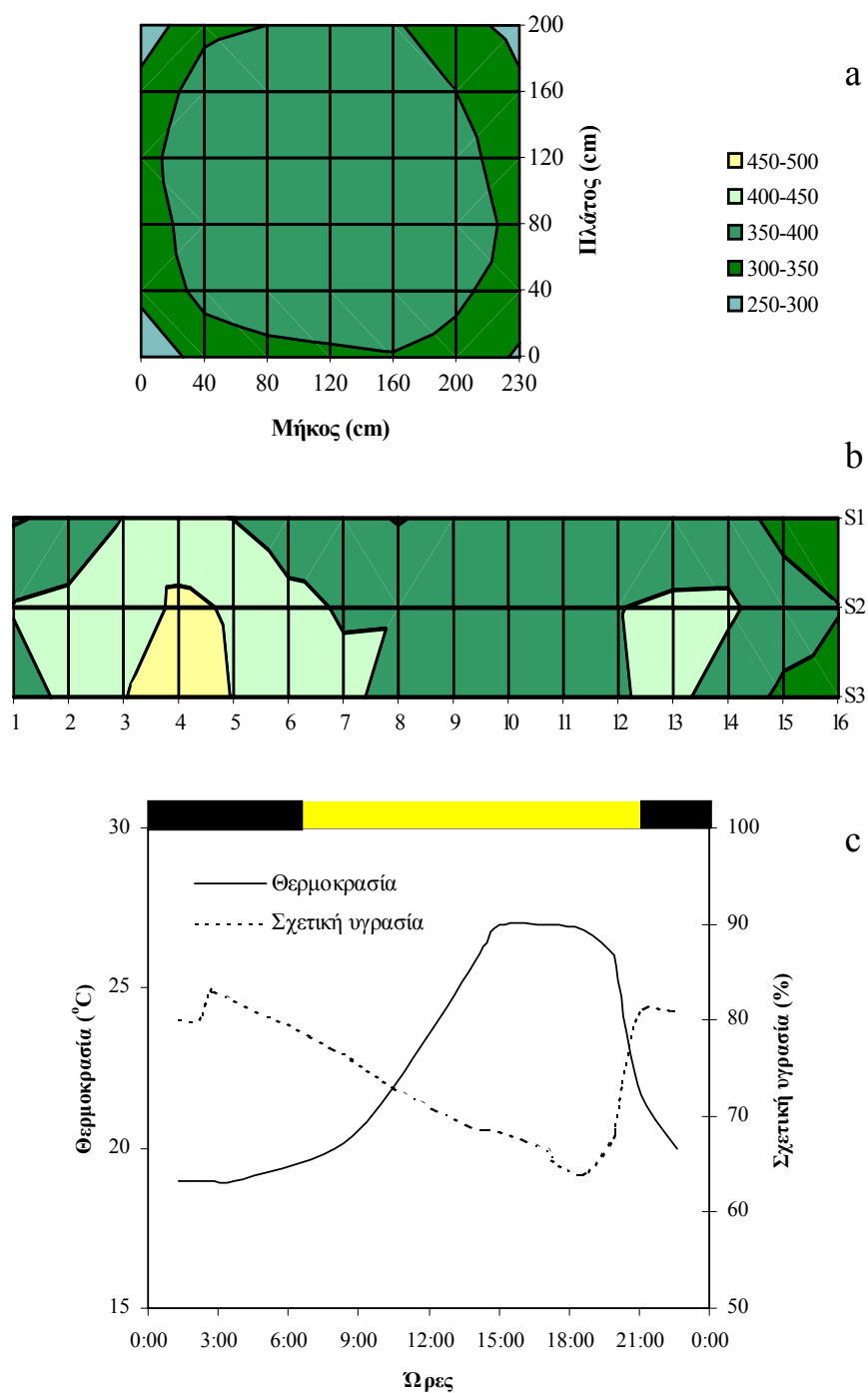
Γ. Υλικά και Μέθοδοι

Γ.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

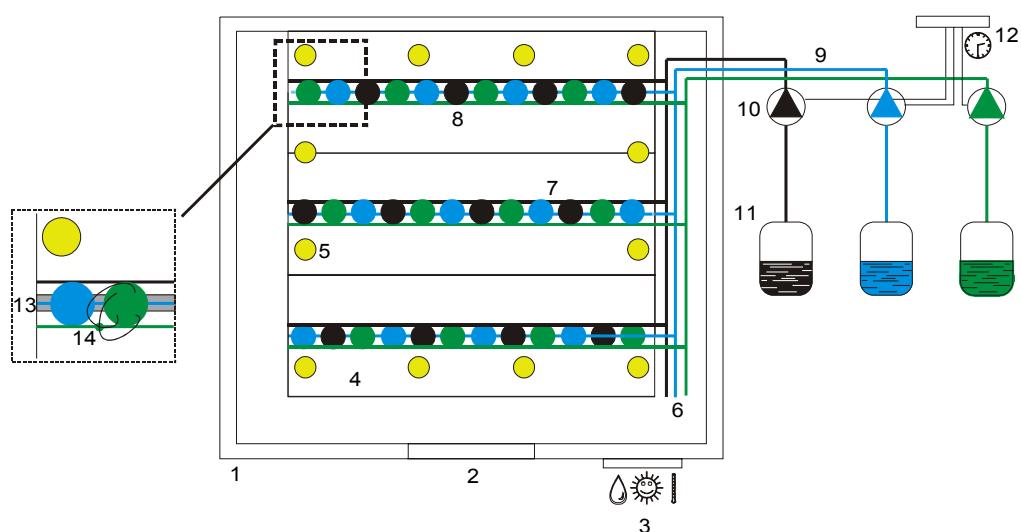
Σπέρματα του φυτού *D. viscosa* συλλέχθηκαν από την περιοχή Άγιος Γεώργιος Πάρνηθας, σε υψόμετρο 500 m περίπου, από υγιή φυτά τα οποία βρίσκονταν στα πρανή δασικού δρόμου. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία προήλθαν από προβλαστημένα σπέρματα. Τα σπέρματα είχαν υποστεί στρωμάτωση για μία εβδομάδα στους 4 °C και είχαν παραμείνει για μία εβδομάδα στο θάλαμο σε φωτοπερίοδο 14/10h και κλιματολογικές συνθήκες όμοιες με αυτές του πειράματος ώστε να καταστούν κατάλληλα για μεταφύτευση. Τη στιγμή της μεταφύτευσης τα φυτάρια είχαν ανεπτυγμένες κοτυληδόνες και ύψος υπέργειου τμήματος 2 cm. Η εγκατάσταση των φυτών έγινε στις 25/1/2000.

Γ.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (το πεδίο ακτινοβολίας και οι κλιματολογικές συνθήκες στο θάλαμο φαίνονται στην Εικόνα Γ.1). Ο φωτισμός προερχόταν από 12 λαμπτήρες υψηλής πίεσης ατμών νατρίου (OSRAM Vialox NAV-T 400 W). Η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας στο θάλαμο μετρήθηκε με ραδιόμετρο Li-COR LI-188B. Η σχηματική αναπαράσταση του θαλάμου και η πειραματική διάταξη φαίνεται στην Εικόνα Γ.2. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε πλαστικά δοχεία όγκου 2 λίτρων. Τα δοχεία ήταν καλυμμένα με μαύρο πλαστικό για την αποφυγή ανάπτυξης φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε άμμος κρυσταλλικού χαλαζία, η οποία είχε ξεπλυθεί εκτεταμένα με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό, είχε κατεργαστεί με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 5% και οξαλικού οξέος 1% σε όγκο ίσο με την υδατοϊκανότητα της άμμου και τέλος είχε ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό διπλάσιου όγκου από τον όγκο της άμμου. Η διαδικασία κατεργασίας με το παραπάνω διάλυμα οξέων μπορεί να απομακρύνει επιτυχώς διαλυτά ανόργανα συστατικά και αδιάλυτα άλατα του σιδήρου (Hewitt, 1952). Το θρεπτικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το Hoagland No 2 (Benton, 1997) ημίσειας συγκέντρωσης (Πίνακας Γ.1). Η τιμή του pH ρυθμιζόταν στο 6,5 με διάλυμα υδροξειδίου του καλίου. Κάθε φυτό ελάμβανε 670 ml θρεπτικού διαλύματος ανά 24ωρο σε 12 αρδεύσεις με διάρκεια 1 λεπτό η καθεμιά (67 ml/άρδευση). Ο όγκος θρεπτικού διαλύματος που ελάμβαναν τα φυτά μέσα σε ένα



Εικόνα Γ.1. Το πεδίο της έντασης ακτινοβολίας στο ύψος της επιφάνειας ανάπτυξης του θαλάμου σταθερών συνθηκών ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) (a), και ομοίως στο μέγιστο ύψος των φυτών κάθε πειραματικής σειράς (1-16 και S1-S3) στις 10/2/2000 (b). Η ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας στον θάλαμο σταθερών συνθηκών πριν την εγκατάσταση των φυτών (c).



Εικόνα Γ.2. Σχηματική αναπαράσταση του θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών και της πειραματικής διάταξης. Φαίνεται η κατανομή των πειραματικών χειρισμών (● φυτά-μάρτυρες, ● φυτά ανεπτυγμένα απουσία βορίου, ● φυτά στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ). (1) τοίχωμα θαλάμου, (2) είσοδος, (3) πίνακας ελέγχου κλιματικών συνθηκών, (4) επιφάνεια εργασίας, (5) λαμπτήρες, (6) κύριοι σωλήνες διανομής θρεπτικού διαλύματος, (7) δευτερεύοντες σωλήνες διανομής, (8) δοχεία καλλιέργειας, (9) εξωτερικοί σωλήνες διανομής, (10) αντλίες διανομής, (11) δοχεία θρεπτικού διαλύματος, (12) πίνακας ελέγχου άρδευσης, (13) ανοικτός κεντρικός σωλήνας απορροής/αποχέτευσης, (14) σταλάκτης με 4 σωλήνες διασποράς.

Πίνακας Γ.1. Η σύνθεση του διαλύματος Hoagland No 2 ημίσειας συγκέντρωσης (Benton, 1997).

Άλας	Συγκέντρωση πυκνού δ/τος	Αραίωση στο τελικό δ/μα (ml/l)
<i>Διαλύματα μακροστοιχείων</i>		
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 M	0,5
KNO_3	1 M	3,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 M	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 M	1,0
<i>Διάλυμα μικροστοιχείων</i>		
H_3BO_3	2,86 g/l	0,5
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,48 g/l	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g/l	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,027 g/l	
<i>Διάλυμα σιδήρου</i>		
EDTA Fe Na	0,1 M	0,5

24ωρο αντιστοιχούσε στον όγκο υδατοϊκανότητας των δοχείων. Σύμφωνα με τον παραπάνω χειρισμό έγινε η παραδοχή ότι το σύνολο του θρεπτικού διαλύματος ανανεωνόταν ανά 24ωρο. Το θρεπτικό διάλυμα παρεχόταν στα φυτά από σταλάκτες με παροχή 4 λίτρα/ώρα με τη βοήθεια τεσσάρων σωλήνων ανά δοχείο για καλύτερη διαβροχή του υποστρώματος. Η διαδοχή των αρδεύσεων ρυθμιζόταν αυτόματα μέσω προγραμματιστών άρδευσης. Το θρεπτικό διάλυμα παρασκευαζόταν κάθε 3-4 ημέρες σε δοχεία χωρητικότητας 100 λίτρων τα οποία ήταν καλυμμένα με μαύρο πλαστικό για την αποφυγή ανάπτυξης φυκών. Το θρεπτικό διάλυμα που απόρρεε από τα δοχεία οδηγείτο στην αποχέτευση.

Γ.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ

Σχεδιάστηκαν τρεις πειραματικοί χειρισμοί (μάρτυρας, έλλειψη βορίου (B-) και χορήγηση σαλικυλικού οξέος (SA+)) με 12 επαναλήψεις κατανεμημένες σε τρεις σειρές (4 επαναλήψεις ανά σειρά). Τα φυτά-μάρτυρες τροφοδοτούνταν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα από την στιγμή της εγκατάστασής τους ενώ τα φυτά (B-) με θρεπτικό διάλυμα από το οποίο απουσίαζε το βόριο. Τα φυτά (SA+) τροφοδοτούνταν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα ενώ στις 17/2/2000 προστέθηκε στο θρεπτικό διάλυμα σαλικυλικό οξύ σε συγκέντρωση 0,5 mM και τα φυτά (SA+) αρδεύτηκαν κανονικά για 24 ώρες (12 αρδεύσεις). Στη συνέχεια το θρεπτικό διάλυμα αντικαταστάθηκε με πλήρες διάλυμα χωρίς σαλικυλικό οξύ και τα φυτά αρδεύτηκαν σύμφωνα με το πρόγραμμα.

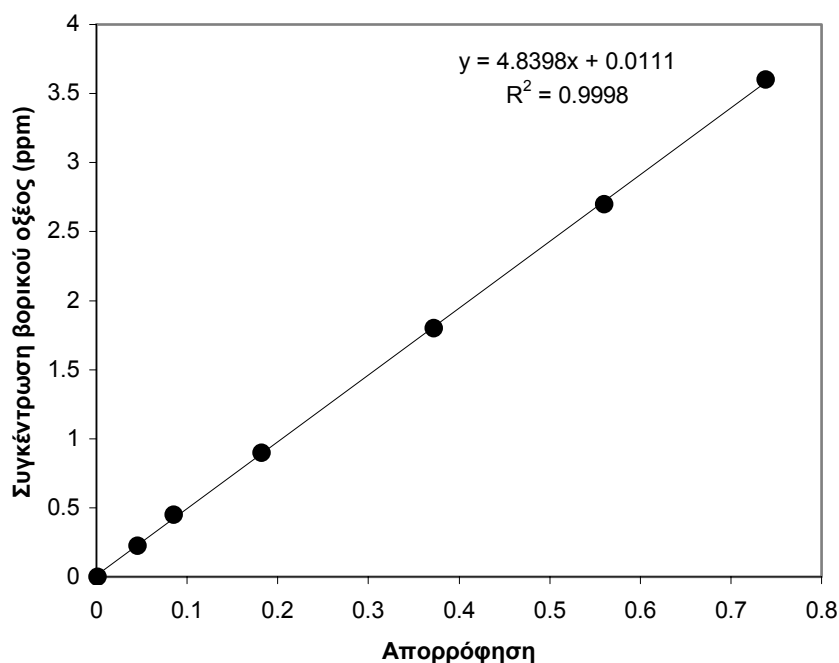
Γ.4. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η πρώτη ημερομηνία μέτρησης (12/2/2000) αφορούσε στην καταγραφή των παραμέτρων ανάπτυξης των φυτών ενώ στις 17/2/2000 πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις που αφορούσαν στην κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (φθορισμός χλωροφύλλης και συγκέντρωση χλωροφυλλών).

Η δεύτερη ημερομηνία μέτρησης (25/2/2000) αφορούσε στην καταγραφή των ίδιων παραμέτρων ενώ επιπλέον έγινε και η τελική δειγματοληψία των φυτών. Παρασκευάστηκαν τα εκχυλίσματα του επιεφυμενιδικού εκκρίματος των φύλλων, των εσωτερικών φαινολικών φύλλων και ριζών, μετρήθηκε η φωτοσυνθετική ικανότητα και έγιναν οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις.

Γ.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΟΥΣ ΦΥΤΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βορίου χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπική μέθοδος της αζωμεθίνης (Banuelos *et al.*, 1992). Η μέθοδος προσαρμόστηκε ώστε να αυξηθεί η ακρίβειά της στο επίπεδο των 0,2 ppm βορίου με σκοπό την ανάλυση δειγμάτων μικρού βάρους. Συνοπτικά, η ξηρή ουσία του ιστού (30-50 mg) εισάγεται σε πορσελάνινη κάψα όγκου 10 ml. Ακολουθεί ξηρή καύση σε θερμοκρασία 500°C για 6 ώρες με ρυθμό ανόδου 4,2 °C min⁻¹. Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η τέφρα εκχυλίζεται με 0.5 ml HCl 6N και το εκχύλισμα φέρεται σε τελικό όγκο 5 ml με απιονισμένο νερό. Όγκος 2 ml από το εκχύλισμα ρυθμίζεται με 1 ml buffer AcNH₄/AcOH/Na₂EDTA pH 5,7 και αντιδρά με 1 ml διαλύματος αζωμεθίνης παρασκευασμένο ως 0,45 g αζωμεθίνης σε 100 ml ασκορβικού οξέος 1%. Μετά την παρέλευση 30 λεπτών μετράται η απορρόφηση στα 420 nm. Η συγκέντρωση υπολογίζεται με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων βορικού οξέος με περιεκτικότητα HCl 0,6 N ώστε να αντιστοιχούν στην συγκέντρωση HCl των δειγμάτων (Εικόνα Γ.3).



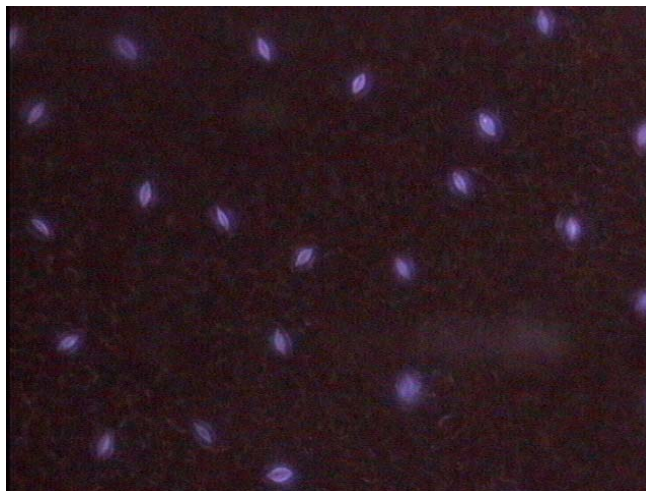
Εικόνα Γ.3. Διάγραμμα καμπύλης αναφοράς φασματοσκοπικής μεθόδου αζωμεθίνης χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα βορικού οξέος. Η απορρόφηση μετρίεται στα 420 nm.

Γ.6. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η συνολική φυλλική επιφάνεια μετρήθηκε *in planta* με τη βοήθεια διαφανούς κλίμακας με υποδιαίρέσεις 0,25 και 0,5 cm. Ο δείκτης ειδικής φυλλικής επιφάνειας (SLA) υπολογίστηκε σε φύλλα μετά από ξήρανση στους 60 °C ως $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$. Οι ρίζες αποτυπώθηκαν σε ψηφιακή μορφή με τη βοήθεια σαρωτή και μετρήθηκε η επιφάνεια κάτοψης και το μέγιστο μήκος τους με τη βοήθεια ανάλυσης εικόνας (Image Pro Plus 2.0, Media Cybernetics). Το ειδικό μήκος ρίζας (SRL) μετρήθηκε μετά από ξήρανση των ριζών στους 60 °C ως cm g^{-1} .

Γ.7. ΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Για τη μέτρηση του αριθμού των στοματίων και των αδενωδών τριχών των φύλλων του φυτού *D. viscosa* χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiolab εφοδιασμένο με βιντεοκάμερα (CCD colour camera SSC-DC 38P/45, SONY Corporation, Japan) συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα φύλλα εμβαπτίστηκαν για 1 min σε διάλυμα 20% KOH και στη συνέχεια, αφού ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό, η επιφάνειά τους παρατηρήθηκε απ'ευθείας στο μικροσκόπιο. Προκαταρκτικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι για την παρατήρηση και καταμέτρηση των στοματίων η εικόνα είναι καλύτερη με τη χρήση των φίλτρων G-365 (exciter filter) και FT-395 (chromatic beam splitter) (Εικόνα Γ.4), ενώ για την καταμέτρηση των αδενωδών τριχών με τη χρήση των φίλτρων 450-490 και FT 510. Η παρατήρηση των εγκάρσιων τομών φύλλων και ριζών έγινε στο ίδιο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας ως επαγωγείς φθορισμού είτε πυκνό διάλυμα KOH 20%, είτε διφαινυλοβορικό οξύ-αιθανολαμίνη (Naturstoffreagent, NR). Το NR έχει χρησιμοποιηθεί ως εξειδικευμένος επαγωγέας φθορισμού των φλαβονοειδών για την ανίχνευση των ουσιών αυτών σε χρωματογραφίες χαρτιού και λεπτής στοιβάδας (Markham, 1982; Harborne, 1989). Η ίδια ουσία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον εντοπισμό πολυφαινολικών ουσιών σε ιστούς ή κύτταρα *in situ* (Karabourniotis *et al.*, 1998). Το αντιδραστήριο NR διαλύθηκε αρχικά σε έναν μικρό όγκο μεθανόλης και στη συνέχεια ο όγκος συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα το οποίο προέκυψε διηθήθηκε πριν από τη χρήση του σε χαρτί Whatman No 3.



Εικόνα Γ.4. Η αποαξονική επιφάνεια φύλλου φυτού-μάρτυρα *D. viscosa*. Φίλτρο εκπομπής G 365. Ως επαγωγέας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα KOH 20%. Φαίνεται καθαρά ο μπλέ φθορισμός ο οποίος εκπέμπεται από τα καταφρακτικά κύτταρα, ένδειξη ύπαρξης απλών φαινολικών ενώσεων.

Το πάχος των φύλλων μετρήθηκε με τη βοήθεια κλίμακας του μικροσκοπίου σε εγκάρσιες τομές του ελάσματος.

Γ.8. ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ *IN VIVO*

Ο φθορισμός της χλωροφύλλης *in vivo* καταγράφηκε κατά τις δύο ημερομηνίες μέτρησης με το φθορισμόμετρο FIM 1500 (ADC Analytical Development Company LTD). Ο φθορισμός της χλωροφύλλης αποτελεί ένα τρόπο αποδιέγερσης του μορίου της μετά από την απορρόφηση φωτονίων. Κάτω από φυσιολογικές θερμοκρασίες, πρακτικά όλος ο εκπεμπόμενος φθορισμός προέρχεται από τα μόρια της χλωροφύλλης α του φωτοσυστήματος II (PSII). Με τη χρήση του φθορισμόμετρου του συγκεκριμένου τύπου, οι μελέτες του φθορισμού πραγματοποιούνται με αιφνίδια ακτινοβολία του φύλλου, το οποίο έχει προηγουμένως παραμένει για ορισμένο χρονικό διάστημα (περίπου είκοσι λεπτά) στο σκοτάδι. Η διάρκεια ακτινοβολίας ήταν 5 s και η ένταση ακτινοβολίας ίση με το 60% της μέγιστης. Με την παραμονή στο σκοτάδι όλοι οι πρωταρχικοί δέκτες του PSII (Q_A , Q_B) οξειδώνονται πλήρως. Έτσι με τον απότομο φωτισμό, ο φθορισμός (P) ανέρχεται σε ένα αρχικό επίπεδο P_0 , που αντιστοιχεί στο βασικό φθορισμό της φωτοσυνθετικής συσκευής πριν το PSII διεγερθεί. Στη συνέχεια και εφ' όσον η ένταση του διεγείροντας φωτός αντιστοιχεί σε επίπεδα κορεσμού, ο αρχικός φθορισμός ανέρχεται σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_{max} , F_m) που συμπίπτει με την πλήρη αναγωγή όλων των αποθεμάτων του πρωταρχικού δέκτη Q_A , άρα στο σημείο αυτό η φωτοχημική ικανότητα θεωρείται μηδέν. Η διαφορά μεταξύ

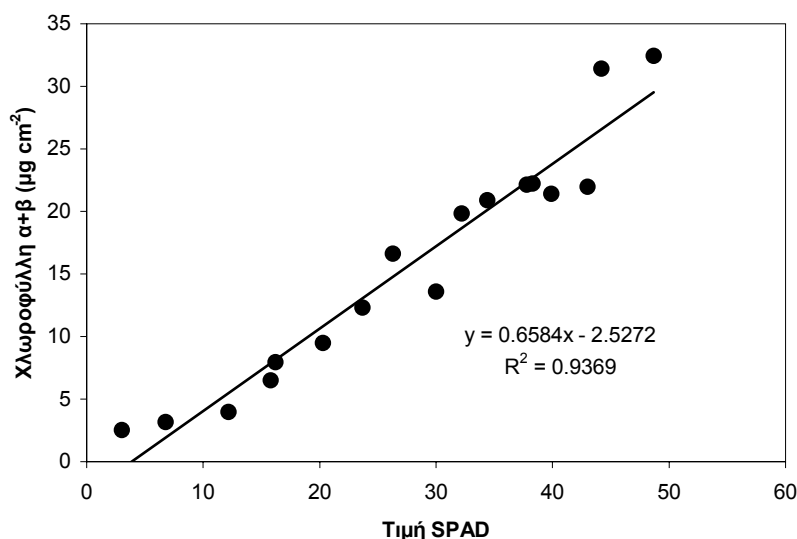
μέγιστου και αρχικού φθορισμού ονομάζεται μεταβλητός φθορισμός ($F_v = F_m - F_o$). Ο λόγος του μεταβλητού προς το μέγιστο φθορισμό (F_v/F_m) αποτελεί έναν πολύ χρήσιμο δείκτη της φωτοχημικής ικανότητας των φυτών. Όπως έχει αποδειχθεί (Demmig and Björkman 1987), ο λόγος F_v/F_m είναι ευθέως ανάλογος με την ανά φωτόνιο απόδοση της φωτοσύνθεσης αποτελώντας έτσι μία καλή ένδειξη φωτοανασταλτικών βλαβών, που μπορούν να προέρχονται από διάφορες μορφές περιβαλλοντικής καταπόνησης (χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες, τροφοπενίες, ασθένειες κλπ.). Το φθορισμόμετρο που χρησιμοποιήθηκε, παρέχει στο φύλλο φως στα 650 nm, πλήρους έντασης 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ και δίνει αυτομάτως το λόγο F_v/F_m .

Γ.9. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ

Η συγκέντρωση των χλωροφυλλών προσδιορίστηκε εμμέσως, μη καταστροφικά, με φορητό χλωροφυλλόμετρο (SPAD-502, Minolta Co Ltd., Japan). Η μέτρηση με το συγκεκριμένο όργανο βασίζεται στη σύγκριση της διαπερατότητας του φύλλου σε δύο μήκη κύματος, στα 650 nm όπου απορροφά η χλωροφύλλη και στα 940 nm, όπου δεν απορροφά κανένα συστατικό του φύλλου. Οι προκύπτουσες τιμές είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στα φύλλα. Καθώς το χλωροφυλλόμετρο δίνει σχετικές τιμές, είναι αναγκαία η βαθμονόμηση του με τις πραγματικές συγκεντρώσεις χλωροφυλλών που προκύπτουν από την κλασσική φασματοφωτομετρική μέθοδο (Lichtenthaler and Wellburn, 1983). Η προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη (τιμές SPAD έναντι πραγματικών συγκεντρώσεων χλωροφυλλών) είναι μοναδική για κάθε φυτικό είδος και το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην πολυπλοκότητα του μονοπατιού διέλευσης του φωτός μέσα στο φύλλο (Manetas *et al.*, 1998). Στην περίπτωση της *D. viscosa* η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα Γ.5) κατασκευάστηκε ως εξής: φύλλα με συγκέντρωση χλωροφύλλης που καλύπτει το εύρος των πειραματικών μετρήσεων, από φυτά που συλλέχθηκαν στο πεδίο και φυτά που αναπτύσσονταν στο εργαστήριο, εκχυλίστηκαν σε γουδί με άμμο εκχύλισης και μικρή ποσότητα CaCO_3 , χρησιμοποιώντας ακετόνη 80%. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 4000 rpm, ογκομετρήθηκε και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 720, 663 και 646 nm. Η απορρόφηση (A) στα 720 nm οφείλεται σε πιθανό σκεδασμό και η τιμή αυτή αφαιρείται από τις αντίστοιχες στα 663 και 646 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών σε μg ανά ml εκχυλίσματος χρησιμοποιούνται οι παρακάτω εξισώσεις (Lichtenthaler and Wellburn, 1983):

χλωροφύλλη α, $\mu\text{g ml}^{-1}$, $C_a=12,21A_{663}-2,81A_{646}$

χλωροφύλλη β, $\mu\text{g ml}^{-1}$, $C_b=20,13 A_{646}-5,03A_{663}$



Εικόνα Γ.5. Διάγραμμα πρότυπης καμπύλης (τιμές SPAD έναντι πραγματικών συγκεντρώσεων χλωροφυλλών) για το φυτό *D. viscosa*.

Γ.10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΟΡΕΣΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ CO₂

Για την μέτρηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε οξυγονόμετρο εξοπλισμένο με ηλεκτρόδιο οξυγόνου αερίου φάσεως τύπου Hansatech. Η ένταση φωτεινής ακτινοβολίας στο επίπεδο του φύλλου έφθανε τα $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και η συγκέντρωση CO₂ τα 5000 ppm. Στις συνθήκες αυτές η αντίσταση των στοματίων δεν αποτελούσε περιοριστικό παράγοντα (Walker, 1993).

Γ.11. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΚΑΙ ΡΙΖΩΝ

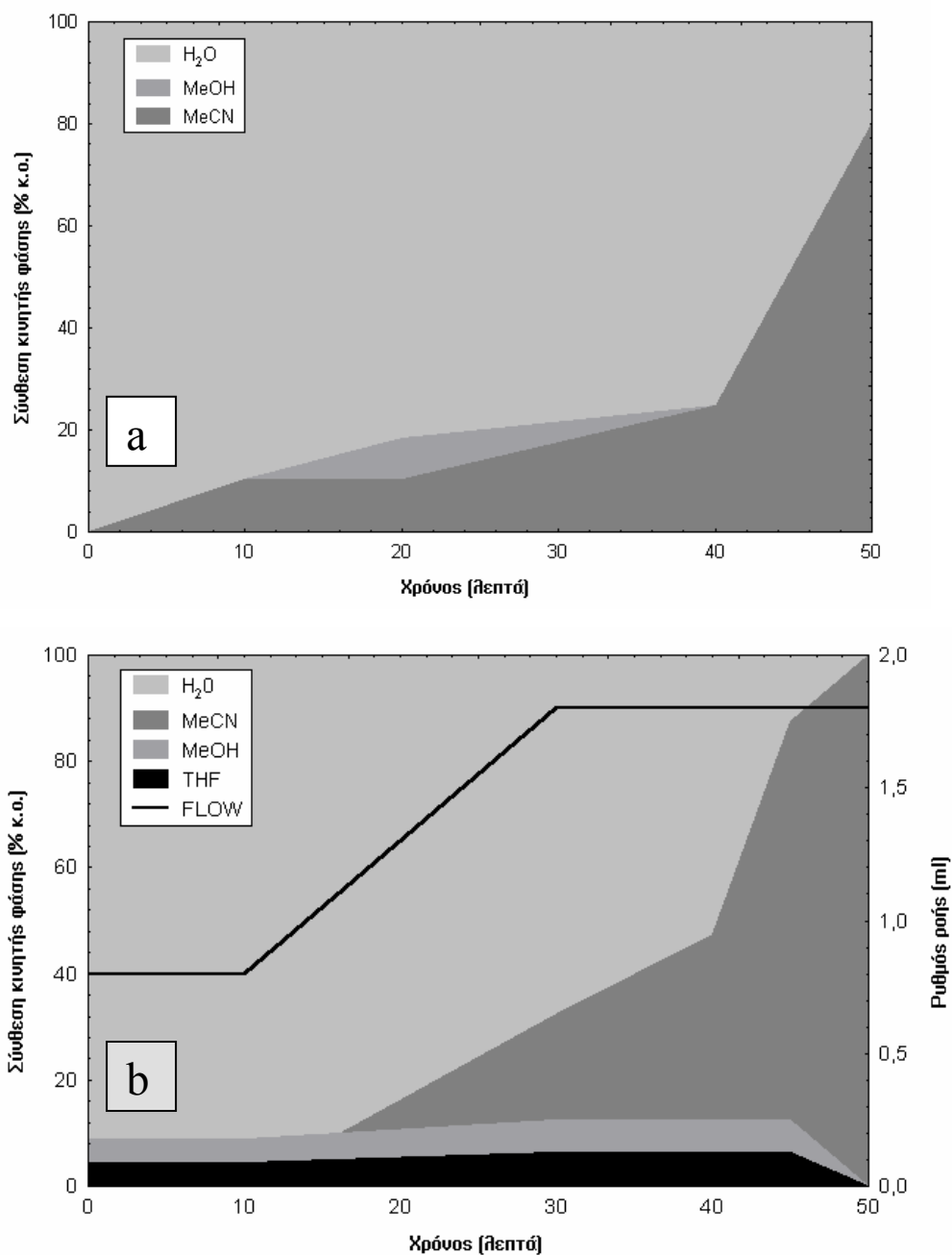
Νωπά δείγματα βάρους 200-500 mg κονιορτοποιήθηκαν με υγρό άζωτο και εκχυλίστηκαν με 80% MeOH παρουσία άμμου εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα, τελικού όγκου 10 ml, φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 15 λεπτά, το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε έως ξηρού σε θερμοκρασία 40 °C υπό ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 1-3 ml MeOH ανάλογα με το δείγμα.

Γ.12. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΕΦΥΜΕΝΙΑΔΙΚΟΥ ΕΚΚΡΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ

Το υπέργειο τμήμα του φυτού εμβαπτίστηκε σε χλωροφόρμιο για 30 s (Wollenweber, 1985). Στη συνέχεια παραλήφθηκε τμήμα του δείγματος, το οποίο συμπυκνώθηκε έως ξηρού στους 30 °C παρουσία ρεύματος αζώτου. Ακολούθησε επαναδιάλυση σε MeOH και διφασικό σύστημα με πετρελαϊκό αιθέρα για την απομάκρυνση των κηρών και των λοιπών λιπιδιακής φύσεως συστατικών, ενώ ο σχηματισμός της διαχωριστικής επιφάνειας μεταξύ των φάσεων υποβοηθήθηκε με την προσθήκη σταγόνων νερού (Harborne, 1973). Η υποκείμενη φάση επανασυμπυκνώθηκε έως ξηρού στους 30 °C παρουσία ρεύματος αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε MeOH.

Γ.13. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Για τις χρωματογραφικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) τύπου Jasco (Jasco Corporation, Japan) το οποίο διέθετε περισταλτική αντλία (Jasco PU-980), σύστημα διαβάθμισης σύστασης (gradient) (Jasco LG-980-02), σύστημα διατήρησης σταθερής θερμοκρασίας της στήλης 7971 column heater (Jones Chromatography Limited, Mid Glamorgan, UK) και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Jasco UV-970. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε στήλη αντιθέτου φάσεως, APEX ODS 5 μ m, 25,0x4,6 mm (Jones Chromatography Limited, Mid Glamorgan, UK). Σε σειρά με την αναλυτική στήλη υπήρχε προστήλη ίδιου υλικού πλήρωσης. Η λειτουργία του όλου συστήματος ελεγχόταν από υπολογιστή, στον οποίο καταγράφονταν οι μετρήσεις. Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε μέσω σύγκρισης των χρόνων συγκράτησης (R_t), κοινή χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων με πρότυπες ουσίες και τα φάσματα απορρόφησής τους στην περιοχή από 200-370 nm. Το ίδιο σύστημα χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σαλικυλικού οξέος των φύλλων. Για την ανάλυση των εσωτερικών φαινολικών των εκχυλισμάτων των φύλλων και των ριζών



Εικόνα Γ.6. Διαγράμματα έκλουσης φαινολικών συστατικών εκχυλισμάτων φύλλων και ριζών (a) και επεφυμενδικού εκπλύματος φύλλων (b).

χρησιμοποιήθηκε σύστημα έκλουσης με χρονική διαβάθμιση σύστασης της κινητής φάσης (gradient elution). Το πρόγραμμα έκλουσης είχε ως εξής, ροή κινητής φάσης 1 ml/λεπτό, 0-10 λεπτά 100% H₂O pH 1,5 ρυθμισμένο με HCOOH προς 10,4% MeCN / 10-20 λεπτά 10,4% MeCN προς 10,4% MeCN + 8% MeOH / 20-40 λεπτά 10,4%MeCN + 8%MeOH προς 25% MeCN / 40-50 λεπτά 25%MeCN προς 80% MeCN (Εικόνα Γ.6a). Η θερμοκρασία διατηρείτο στους 40 °C. Η ανίχνευση έγινε στα 280 nm.

Για την ανάλυση των επιεφυμενιδικών φαινολικών των φύλλων χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα έκλουσης που είχε ως εξής, 0-10 λεπτά ροή 0,8 ml/λεπτό και 4,5% MeOH + 4,5% THF (ισοκρατικά) / 10-30 λεπτά ροή 0,8 προς 1,8 ml/λεπτό και 4,5% MeOH + 4,5% THF προς 6,25% MeOH + 6,25% THF + 20% MeCN / 30-40 λεπτά ροή 1,8ml/λεπτό και 6,25% MeOH + 6,25% THF + 20% MeCN προς 6,25% MeOH + 6,25% THF + 35% MeCN / 40-45 λεπτά ροή 1,8 ml/λεπτό και 6,25% MeOH + 6,25% THF + 35% MeCN προς 6,25% MeOH + 6,25% THF + 75% MeCN / 45-50 λεπτά ροή 1,8 ml/λεπτό και 6,25% MeOH + 6,25% THF + 75% MeCN προς 100% MeCN (Εικόνα Γ.6b). Η θερμοκρασία διατηρείτο στους 40°C και η ανίχνευση έγινε στα 280 και 350 nm.

Γ.14. ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Οι απορροφήσεις, καθώς και τα φάσματα απορρόφησης των εκχυλισμάτων ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Jasco V-530, συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Δ. Αποτελέσματα

Δ.1. Η ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΒΟΡΙΟΥ ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ, ΣΤΟΥΣ ΒΛΑΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΦΥΛΛΑ

Η συγκέντρωση βορίου στα φυτά-μάρτυρες (εκφρασμένη ως μg βορίου g^{-1} Ξ.Β. των ιστών) εμφανίστηκε υψηλότερη στα φύλλα έναντι εκείνης στις ρίζες και στους βλαστούς (Πίνακας Δ.1). Παρόμοια εικόνα παρουσίασε και η συγκέντρωση βορίου στα φυτά στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Στα φυτά αυτά η συγκέντρωση βορίου στους βλαστούς παρουσίασε μία αύξηση (μη στατιστικά σημαντική) 25% έναντι εκείνης στους βλαστούς των φυτών-μαρτύρων (Πίνακας Δ.1). Η εικόνα αυτή των διαφορών συγκέντρωσης B ανάμεσα στα διαφορετικά όργανα ανατράπηκε στα φυτά τα οποία εμφάνισαν τροφοπενία βορίου. Τα φυτά αυτά εμφάνισαν υψηλότερη συγκέντρωση B στις ρίζες έναντι εκείνης στους βλαστούς και στα φύλλα (Πίνακας Δ.1). Τα φυτά του πειραματικού αυτού χειρισμού εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση B στα διαφορετικά όργανα, έναντι των φυτών-μαρτύρων (Πίνακας Δ.1). Οι διαφορές εμφανίζονται υψηλότερες ανάμεσα στα φύλλα των φυτών των δύο πειραματικών χειρισμών (14,7 φορές υψηλότερη συγκέντρωση στα φυτά-μάρτυρες), και χαμηλότερες ανάμεσα στους βλαστούς (2,2 φορές) και στις ρίζες (1,6 φορές). Οι διαφορές αυτές μεγεθύνονται εάν υπολογιστεί η συσσώρευση B ανά κατηγορία οργάνου (φύλλα, βλαστός, ρίζα) των φυτών των δύο πειραματικών χειρισμών. Συγκεκριμένα η συσσώρευση B (ως μg B στα φυτικά όργανα) εμφανίστηκε 110 φορές υψηλότερη στα φύλλα των φυτών-μαρτύρων έναντι των φυτών με τροφοπενία B, ενώ 40 και 11 φορές υψηλότερη στο βλαστό και στη ρίζα αντίστοιχα (Πίνακας Δ.2).

Πίνακας Δ.1. Η συγκέντρωση βορίου στα φύλλα, στους βλαστούς και στις ρίζες στα φυτά των τριών πειραματικών χειρισμών. Τα σύμβολα α και b υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$ και $P < 0.01$ αντίστοιχα.

Παράμετρος	Μάρτυρας	B -			SA +	
	MO $\pm$ ΤΣ	MO $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή		MO $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή
Συγκέντρωση βορίου στα φύλλα (μg B g^{-1} Ξ.Β.)	35,84 $\pm$ 1,93	2,44 $\pm$ 0,94	-93	b	39,33 $\pm$ 3,19	10
Συγκέντρωση βορίου στους βλαστούς (μg B g^{-1} Ξ.Β.)	16,30 $\pm$ 1,41	7,55 $\pm$ 2,83	-54	b	20,34 $\pm$ 2,33	25
Συγκέντρωση βορίου στις ρίζες (μg B g^{-1} Ξ.Β.)	27,63 $\pm$ 0,61	16,84 $\pm$ 2,69	-39	b	28,98 $\pm$ 1,57	5

Πίνακας Δ.2. Η συσσώρευση βορίου στα φύλλα, στους βλαστούς και στις ρίζες στα φυτά των τριών πειραματικών χειρισμών. Οι τιμές σε παρένθεση υποδηλώνουν το ποσοστό % επί του συνολικού βορίου του φυτού το οποίο εντοπίζεται στα επιμέρους όργανα για κάθε πειραματικό χειρισμό. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

Παράμετρος	Μάρτυρας	B -			SA +	
	ΜΟ ± ΤΣ	ΜΟ ± ΤΣ	% μεταβολή		ΜΟ ± ΤΣ	% μεταβολή
Συσσώρευση βορίου στα φύλλα (μg B)	18,70 ± 2,85 (71,7)	0,17 ± 0,05 (24,6)	-99	b	18,96 ± 2,39 (69,2)	1
Συσσώρευση βορίου στους βλαστούς (μg B)	2,76 ± 0,34 (10,6)	0,07 ± 0,02 (10,2)	-97	b	3,65 ± 0,87 (13,0)	33
Συσσώρευση βορίου στις ρίζες (μg B)	4,61 ± 0,79 (17,6)	0,43 ± 0,05 (65,2)	-91	b	4,69 ± 0,51 (17,7)	2

Δ.2. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΦΥΤΩΝ *D. VISCOSA* ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Κατά την πρώτη ημερομηνία μέτρησης (12/2/2000) τα συμπτώματα της τροφοπενίας βορίου ήταν πλέον ορατά. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις δραματικές αλλαγές σε ορισμένες αναπτυξιακές παραμέτρους του υπέργειου τμήματος των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου έναντι των αντίστοιχων παραμέτρων των φυτών-μαρτύρων. Τα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου έδειξαν την τάση να αποκτήσουν τη μορφή της ροζέττας, αφού εμφάνισαν τάση υστέρησης στην ανάπτυξη των φύλλων των πλάγιων βλαστών και επομένως και στη δημιουργία πλάγιων βλαστών (Πίνακας Δ.3). Τα φυτά αυτά διέθεταν επίσης σημαντικά μικρότερο συνολικό αριθμό φύλλων. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι τα φύλλα των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου ήταν κατά κανόνα μικρότερα σε μέγεθος, με συνολική επιφάνεια κατά 69% μικρότερη. Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν στη σύγκριση της επιφάνειας των φύλλων του κύριου βλαστού (Πίνακας Δ.3). Κατά την ίδια ημερομηνία μέτρησης, τα φυτά τα οποία προορίζονταν για τον πειραματικό χειρισμό χορήγησης σαλικυλικού οξέος δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε αναπτυξιακές παραμέτρους, όπως άλλωστε ήταν φυσικό, έναντι των φυτών μαρτύρων (Πίνακας Δ.3).

Κατά τη δεύτερη ημερομηνία μέτρησης (25/2/2000) η οποία σηματοδότησε και το τέλος των πειραμάτων, οι αρχικές μετρήσεις όσον αφορά στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου επιβεβαιώθηκαν, ενώ οι διαφορές μεταξύ των παραμέτρων εντάθηκαν. Συγκεκριμένα τα φυτά των δύο πειραματικών χειρισμών (φυτά-μάρτυρες και φυτά ανεπτυγμένα απουσία βορίου) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των αναπτυξιακών παραμέτρων οι οποίες εξετάστηκαν, εκτός του αριθμού των φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών του κύριου βλαστού (Πίνακας Δ.4). Όσον αφορά στα φυτά στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ, στατιστικά σημαντικές διαφορές (σε επίπεδο 5%) εμφανίστηκαν τόσο στον αριθμό των φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών των πλάγιων βλαστών, όσο και στο συνολικό τους αριθμό (Πίνακας Δ.4).

Κατά την ημερομηνία αυτή και με την τελική συγκομιδή των φυτών, πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις οι οποίες απαιτούν την καταστροφική

Πίνακας Δ.3. Οι τιμές ορισμένων αναπτυξιακών παραμέτρων των φυτών όπως μετρήθηκαν στις 12/2/2000. Οι τιμές αφορούν σε Μ.Ο. $\pm$ Τ.Σ. δώδεκα επαναλήψεων. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

Παράμετρος	Μάρτυρας ΜΟ $\pm$ ΤΣ	B -			SA +	
		ΜΟ $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή		ΜΟ $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή
Αριθμός φύλλων κύριου βλαστού	10,92 $\pm$ 0,43	9,17 $\pm$ 0,24	-16	b	10,73 $\pm$ 0,27	-2
Αριθμός φύλλων πλάγιων βλαστών	5,17 $\pm$ 0,97	2,17 $\pm$ 1,04	-58		4,18 $\pm$ 0,98	-19
Συνολικός αριθμός φύλλων	16,08 $\pm$ 1,35	11,33 $\pm$ 0,98	-30	b	14,91 $\pm$ 1,10	-7
Λόγος φύλλων κύριου/πλάγιων βλαστών	2,25 $\pm$ 0,40	4,00 $\pm$ 1,21	78		2,68 $\pm$ 0,48	19
Αριθμός φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών του κύριου βλαστού	1,00 $\pm$ 0,12	0,67 $\pm$ 0,14	-33		1,00 $\pm$ 0,13	0
Αριθμός φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών των πλάγιων βλαστών	1,92 $\pm$ 0,42	2,17 $\pm$ 0,64	13		1,55 $\pm$ 0,34	-19
Συνολικός αριθμός φυλλιδίων υπό έκπτυξη	2,92 $\pm$ 4,8	2,83 $\pm$ 0,61	-3		2,55 $\pm$ 0,41	-13
Λόγος φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών κύριου/πλάγιων βλαστών	0,50 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,11	-34		0,59 $\pm$ 0,12	18
Επιφάνεια φύλλων κύριου βλαστού (cm ²)	13,51 $\pm$ 1,54	4,27 $\pm$ 0,72	-68	b	13,42 $\pm$ 0,90	-1
Μέση επιφάνεια φύλλων κύριου βλαστού	1,20 $\pm$ 0,12	0,46 $\pm$ 0,07	-62	b	1,24 $\pm$ 0,06	3
Επιφάνεια φύλλων πλάγιων βλαστών	1,20 $\pm$ 0,33	0,35 $\pm$ 0,23	-71		0,74 $\pm$ 0,24	-38
Μέση επιφάνεια φύλλων πλάγιων βλαστών	0,23 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,03	-48		0,16 $\pm$ 0,02	-30
Συνολική επιφάνεια φύλλων	14,70 $\pm$ 1,74	4,62 $\pm$ 0,72	-69	b	14,20 $\pm$ 1,01	-3

απομάκρυνση των φυτικών οργάνων και οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα Δ.5 και στις εικόνες Δ.1 και Δ.2. Όπως φαίνεται στις εικόνες αυτές τόσο το υπέργειο, όσο και το υπόγειο τμήμα των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου εμφάνισαν δραματικές αλλαγές στην ανάπτυξή τους, έναντι των φυτών των δύο άλλων πειραματικών χειρισμών. Στην περίπτωση των φυτών στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ, δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς αδρές διαφορές έναντι των φυτών μαρτύρων (εικόνες Δ.1 και Δ.2). Τα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (ως μειώσεις) στο ξηρό βάρος των

φύλλων, των βλαστών και των ριζών, στο ύψος, στη συνολική βιομάζα, στον αριθμό πλάγιων κλάδων καθώς και στο μήκος και στην επιφάνεια κάτοψης των ριζών τους. Στατιστικά σημαντικές επίσης διαφορές εμφανίστηκαν σε δύο κρίσιμες παραμέτρους, το ειδικό μήκος ρίζας και την ειδική επιφάνεια των φύλλων (Πίνακας Δ.5). Αντίθετα, τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στις παραμέτρους οι οποίες αναγράφονται στον Πίνακα Δ.5.

Πίνακας Δ.4. Οι τιμές των αντίστοιχων αναπτυξιακών παραμέτρων (ως προς τις τιμές του Πίνακα Δ.3) των φυτών όπως μετρήθηκαν στις 25/2/2000. Οι τιμές αφορούν σε Μ.Ο. $\pm$ Τ.Σ. δώδεκα επαναλήψεων. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

Παράμετρος	Μάρτυρας ΜΟ $\pm$ ΤΣ	B -			SA +		
		ΜΟ $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή		ΜΟ $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή	
Αριθμός φύλλων κύριου βλαστού	25,33 $\pm$ 0,75	17,58 $\pm$ 3,12	-31	b	25,45 $\pm$ 0,92	0	
Αριθμός φύλλων πλάγιων βλαστών	105,58 $\pm$ 12,19	22,00 $\pm$ 3,46	-79	b	85,54 $\pm$ 9,48	-19	
Συνολικός αριθμός φύλλων	130,92 $\pm$ 12,70	39,58 $\pm$ 5,66	-70	b	111,00 $\pm$ 10,11	-15	
Λόγος φύλλων κύριου/πλάγιων βλαστών	0,28 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,13	196	b	0,32 $\pm$ 0,03	14	
Αριθμός φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών του κύριου βλαστού	1,33 $\pm$ 0,22	1,75 $\pm$ 0,43	32		1,00 $\pm$ 0,00	-25	
Αριθμός φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών των πλάγιων βλαστών	26,17 $\pm$ 4,56	6,50 $\pm$ 2,06	-75	b	15,36 $\pm$ 1,81	-41	a
Συνολικός αριθμός φυλλιδίων υπό έκπτυξη	27,50 $\pm$ 4,51	8,25 $\pm$ 2,04	-70	b	16,36 $\pm$ 1,81	-41	a
Λόγος φυλλιδίων υπό έκπτυξη των οφθαλμών κύριου/πλάγιων βλαστών	0,06 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,08	450	b	0,07 $\pm$ 0,01	17	
Επιφάνεια φύλλων κύριου βλαστού (cm ²)	100,25 $\pm$ 9,17	13,86 $\pm$ 3,51	-86	b	99,15 $\pm$ 8,74	-1	
Μέση επιφάνεια φύλλων κύριου βλαστού	3,92 $\pm$ 0,30	0,78 $\pm$ 0,18	-80	b	3,86 $\pm$ 0,29	-2	
Επιφάνεια φύλλων πλάγιων βλαστών	99,69 $\pm$ 19,39	4,66 $\pm$ 1,15	-95	b	74,31 $\pm$ 14,94	-25	
Μέση επιφάνεια φύλλων πλάγιων βλαστών	0,84 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,04	-76	b	0,80 $\pm$ 0,10	-5	
Συνολική επιφάνεια φύλλων	199,95 $\pm$ 26,60	18,52 $\pm$ 4,56	-91	b	173,46 $\pm$ 21,56	-13	

Πίνακας Δ.5. Οι τιμές ορισμένων αναπτυξιακών παραμέτρων των φυτών όπως μετρήθηκαν στις 25/2/2000. Οι τιμές αφορούν σε Μ.Ο. $\pm$ Τ.Σ. δώδεκα επαναλήψεων. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

Παράμετρος	Μάρτυρας	B -			SA +	
	ΜΟ $\pm$ ΤΣ	ΜΟ $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή		ΜΟ $\pm$ ΤΣ	% μεταβολή
Ξ.Β. Φύλλων (g)	0,53 $\pm$ 0,06	0,07 $\pm$ 0,02	-87	b	0,46 $\pm$ 0,03	-13
Ξ.Β. Βλαστών (g)	0,18 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,00	-95	b	0,17 $\pm$ 0,02	-6
Ξ.Β. Ρίζας (g)	0,17 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	-83	b	0,16 $\pm$ 0,01	-6
Υπόγεια/Υπέργεια βιομάζα	0,24 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,08	75		0,26 $\pm$ 0,03	10
Συνολική βιομάζα (g)	0,87 $\pm$ 0,10	0,11 $\pm$ 0,02	-88	b	0,79 $\pm$ 0,05	-10
Μήκος ρίζας (cm)	15,49 $\pm$ 0,66	8,03 $\pm$ 1,17	-48	b	15,70 $\pm$ 0,96	1
Ειδικό μήκος ρίζας (cm g ⁻¹ Ξ.Β.)	115,55 $\pm$ 23,89	354,13 $\pm$ 48,95	206	b	104,70 $\pm$ 11,04	-9
Επιφάνεια κάτοψης ρίζας (cm ²)	27,15 $\pm$ 2,46	3,31 $\pm$ 0,79	-88	b	23,68 $\pm$ 2,08	-13
Υψος φυτού (cm)	16,04 $\pm$ 1,12	2,69 $\pm$ 0,52	-83	b	16,47 $\pm$ 1,30	3
Ειδική επιφάνεια φύλλων (cm ² g ⁻¹)	501,89 $\pm$ 19,08	367,68 $\pm$ 28,04	-27	b	470,05 $\pm$ 18,11	-6
Αριθμός πλάγιων κλάδων	14,92 $\pm$ 0,87	6,00 $\pm$ 0,89	-60	b	13,91 $\pm$ 0,69	-7



Εικόνα Δ.1. Αντιπροσωπευτική εικόνα του υπέργειου τμήματος φυτών *D. viscosa* **a.** Φυτό-μάρτυρας. **b.** Φυτό ανεπτυγμένο απουσία βορίου. **c.** Φυτό στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Το πλαίσιο έχει διαστάσεις 16×16 cm.



Εικόνα Δ.2. Αντιπροσωπευτική εικόνα του υπόγειου τμήματος φυτών *D. viscosa* **a.** Φυτό-μάρτυρας. **b.** Φυτό ανεπτυγμένο απουσία βορίου. **c.** Φυτό στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Η μπάρα έχει μήκος 5 cm.

Δ.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΑΝΑΤΟΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ *D. VISCOSA* ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Τα φύλλα του φυτού *D. viscosa* διαθέτουν αδενώδεις τρίχες τόσο στην αποαξονική, όσο και στην προσαξονική τους επιφάνεια. Οι αδενώδεις αυτές τρίχες εκκρίνουν ρητινώδες επιεφυμενιδικό υλικό, το οποίο παρουσία κατάλληλων επαγωγέων φθορισμού παρουσιάζει έντονο κίτρινο-πορτοκαλί φθορισμό κάτω από κατάλληλες συνθήκες μικροσκοπικής παρατήρησης (Εικόνα Δ.3). Το υλικό αυτό, μετά από τη διάρρηξη της εφυμενίδας της κεφαλής της αδενώδους τρίχας, εξαπλώνεται στην επιφάνεια των φύλλων (Εικόνα Δ.3). Χαρακτηριστικό επίσης φθορισμό, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, παρουσιάζουν και τα στομάτια, τόσο της αποαξονικής, όσο και της προσαξονικής επιφάνειας των φύλλων του φυτού *D. viscosa* (Εικόνα Γ.4). Το χαρακτηριστικό αυτό μας επέτρεψε να μετρήσουμε και των αριθμό των στοματίων στα φύλλα, τα οποία χαρακτηρίζονται ως αμφιστοματικά (βλ. επίσης «Υλικά και Μέθοδοι»).

Οι μετρήσεις του αριθμού των αδενωδών τριχών και των στοματίων ανά μονάδα φυλλικής επιφανείας κατά την τελική συγκομιδή των φυτών, δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών πειραματικών χειρισμών (Πίνακας Δ.6). Οι μικροσκοπικές αυτές παρατηρήσεις κατέγραψαν απλώς μια τάση μείωσης του αριθμού των στοματίων, κυρίως της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου. Μια γενική διαπίστωση η οποία εξάγεται από τις τιμές του Πίνακα Δ.6 είναι ότι η αποαξονική επιφάνεια των φύλλων του φυτού φέρει μεγαλύτερο αριθμό αδενωδών τριχών και στοματίων ανά μονάδα επιφάνειας, έναντι της προσαξονικής. Δραματικές αλλαγές παρατηρούνται στο πάχος του φύλλου των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου. Συγκεκριμένα τα φυτά αυτά παρουσιάζουν μία στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους τους κατά 62%, έναντι των φυτών μαρτύρων, η οποία είναι εμφανής και στις αντίστοιχες εγκάρσιες τομές (εικόνα Δ.3).

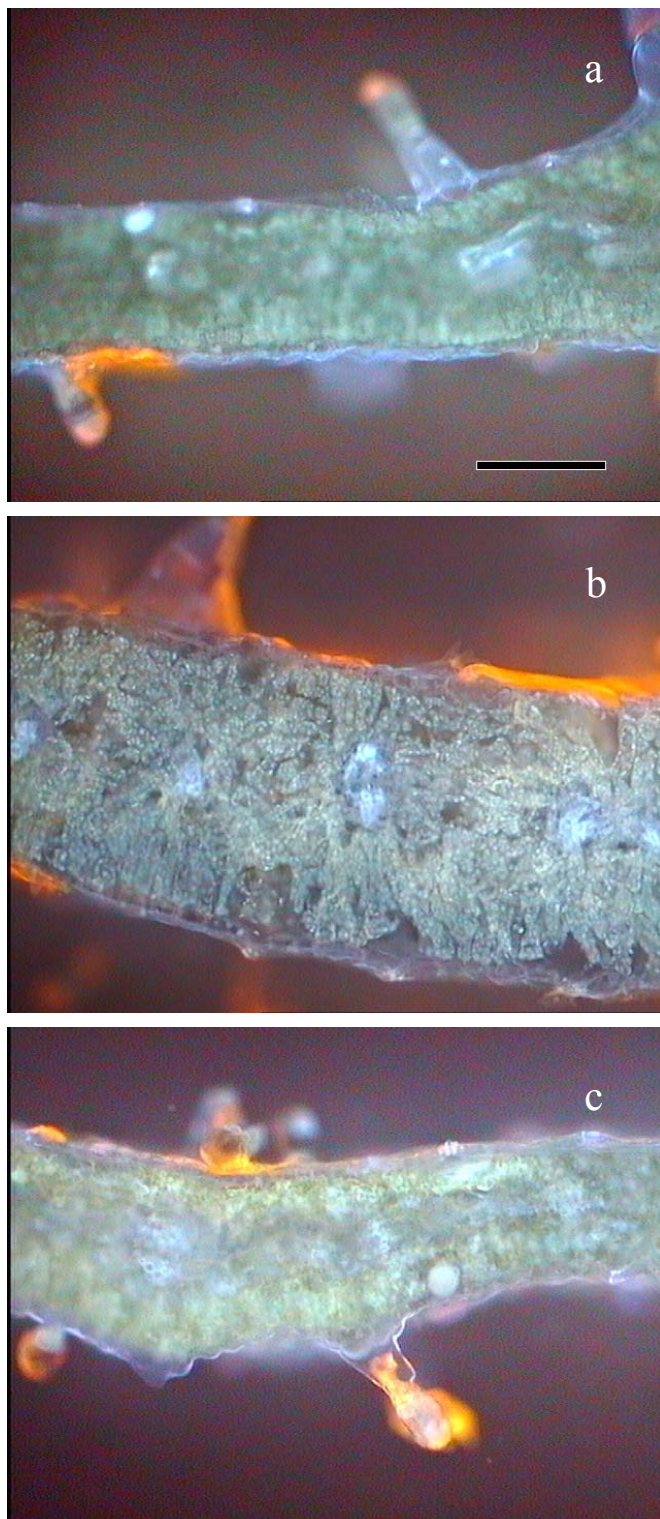
Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων του Πίνακα Δ.6 προκύπτουν επίσης ορισμένες σημαντικές διαπιστώσεις οι οποίες επιβεβαιώνονται με την κατασκευή γραφημάτων ευθείας παλινδρόμησης: **1.** Παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ του

Πίνακας Δ.6. Οι τιμές των ανατομικών χαρακτηριστικών των φυτών των τριών πειραματικών χειρισμών, όπως μετρήθηκαν στις 25/2/2000. Οι τιμές αφορούν σε Μ.Ο. $\pm$ Τ.Σ. έξι επαναλήψεων. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

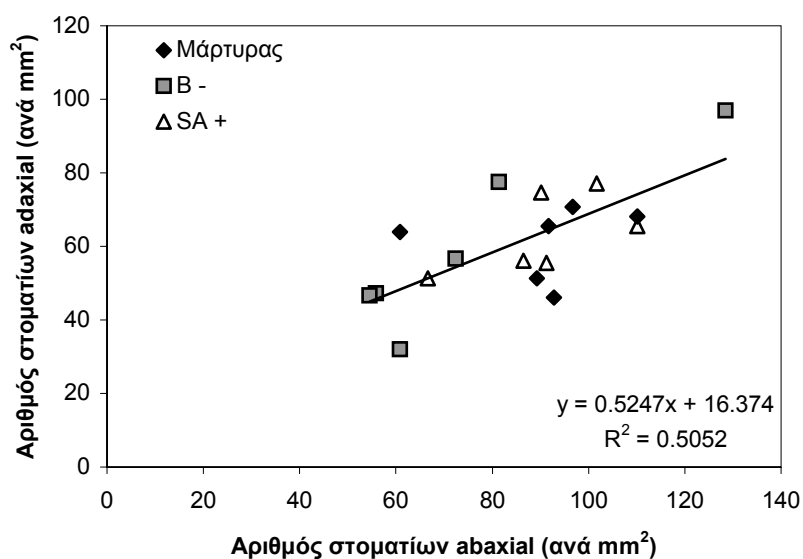
Παράμετρος	Μάρτυρας	B -			SA +	
	ΜΟ ± ΤΣ	ΜΟ ± ΤΣ	% μεταβολή		ΜΟ ± ΤΣ	% μεταβολή
Αριθμός αδενωδών τριχών της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων (αδ. τρίχες mm ⁻²)	14,07 ± 1,76	14,61 ± 2,34	4		14,33 ± 1,37	2
Αριθμός αδενωδών τριχών της προσαξονικής επιφάνειας των φύλλων (αδ. τρίχες mm ⁻²)	11,27 ± 1,02	10,92 ± 2,5	-3		12,73 ± 0,79	13
Αριθμός στοματίων της αποαξονικής επιφάνειας των φύλλων (στομάτια mm ⁻²)	90,23 ± 6,61	75,55 ± 11,39	-16		91,04 ± 6,04	1
Αριθμός στοματίων της προσαξονικής επιφάνειας των φύλλων (στομάτια mm ⁻²)	60,98 ± 4,04	59,5 ± 9,69	-2		63,39 ± 4,39	4
Πάχος φύλλου (μm)	197,22 ± 18,24	320,42 ± 13,23	62	b	213,33 ± 9,51	8

αριθμού των στοματίων ανά μονάδα επιφάνειας τα οποία βρίσκονται στην αποαξονική επιφάνεια και του αντίστοιχου αριθμού της προσαξονικής επιφάνειας (εικόνα Δ.4). **2.** Αντίστοιχη συσχέτιση προκύπτει και μεταξύ του αριθμού των αδενωδών τριχών της προσαξονικής και αποαξονικής επιφάνειας (εικόνα Δ.5). **3.** Συνδυάζοντας επίσης αποτελέσματα των Πινάκων Δ.5 και Δ.6, προκύπτει η ενδιαφέρουσα, αν και αναμενόμενη, αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πάχους των φύλλων και του δείκτη ειδικής επιφάνειας φύλλων (SLA) (εικόνα Δ.6).

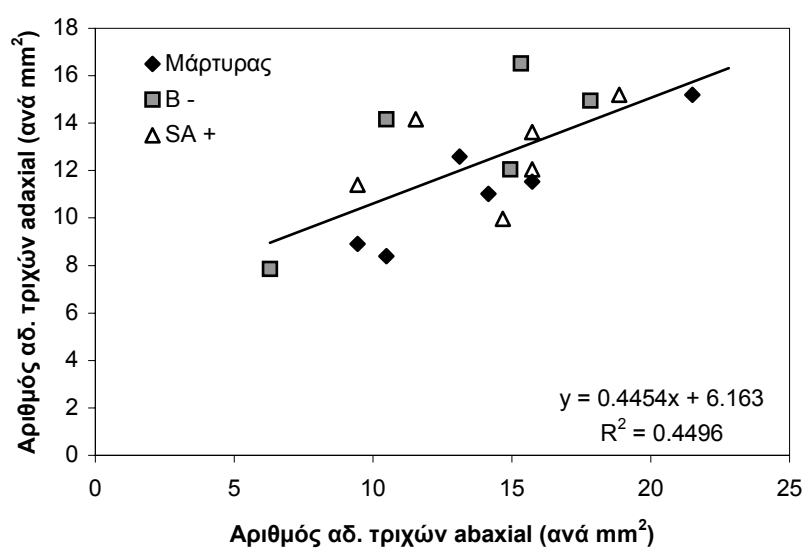
Παράλληλα με τη μελέτη των ανατομικών χαρακτηριστικών των φύλλων, πραγματοποιήθηκαν εγκάρσιες τομές του ριζικού άξονα με στόχο να εντοπιστούν πιθανές αδρές διαφορές μεταξύ των φυτών των τριών διαφορετικών πειραματικών χειρισμών. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν μια εντονότερη συσσώρευση ουσιών (πιθανώς φαινολικών) στα κύτταρα του φλοιού τα οποία βρίσκονται κοντά στην ενδοδερμίδα, αλλά μόνο στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου



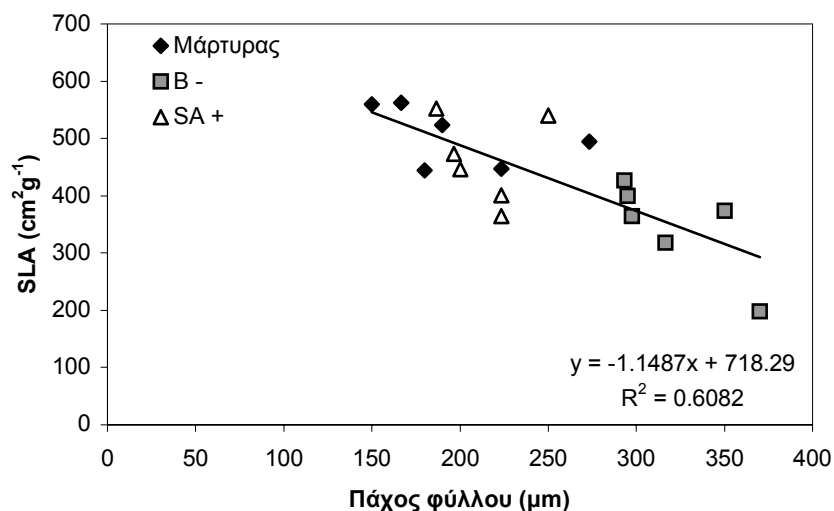
Εικόνα Δ.3. Εγκάρσιες τομές φύλλων φυτών *D. viscosa* όπως εμφανίζονται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Φίλτρο εκπομπής: G 365. Ως επαγωγέας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η διφαινυλο βορικό οξύ-αιθανολαμίνη 0,6 % (Naturstoff Reagent-NR). **a.** Φύλλο φυτού-μάρτυρα. **b.** Φύλλο φυτού ανεπτυγμένου απουσία βορίου. **c.** Φύλλο φυτού στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Φαίνεται καθαρά ο λαμπρός πορτοκαλί φθορισμός του εκκρίματος (ένδειξη ύπαρξης φλαβονοειδών) και ο μπλε φθορισμός της εφυμενίδας (ένδειξη ύπαρξης απλών φαινολικών ενώσεων). Φαίνεται επίσης καθαρά το μεγαλύτερο πάχος των φύλλων των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου. Μπάρα=100μm.



Εικόνα Α.4. Γράφημα της ευθείας παλινδρόμησης μεταξύ του αριθμού των στοματίων ανά mm² της αποαξονικής (abaxial) και του αντίστοιχου αριθμού της προσαξονικής (adaxial) επιφάνειας των φύλλων του φυτού *D. viscosa*.



Εικόνα Α.5. Γράφημα της ευθείας παλινδρόμησης μεταξύ του αριθμού των αδενωδών τριχών ανά mm² της αποαξονικής (abaxial) και του αντίστοιχου αριθμού της προσαξονικής (adaxial) επιφάνειας των φύλλων του φυτού *D. viscosa*.

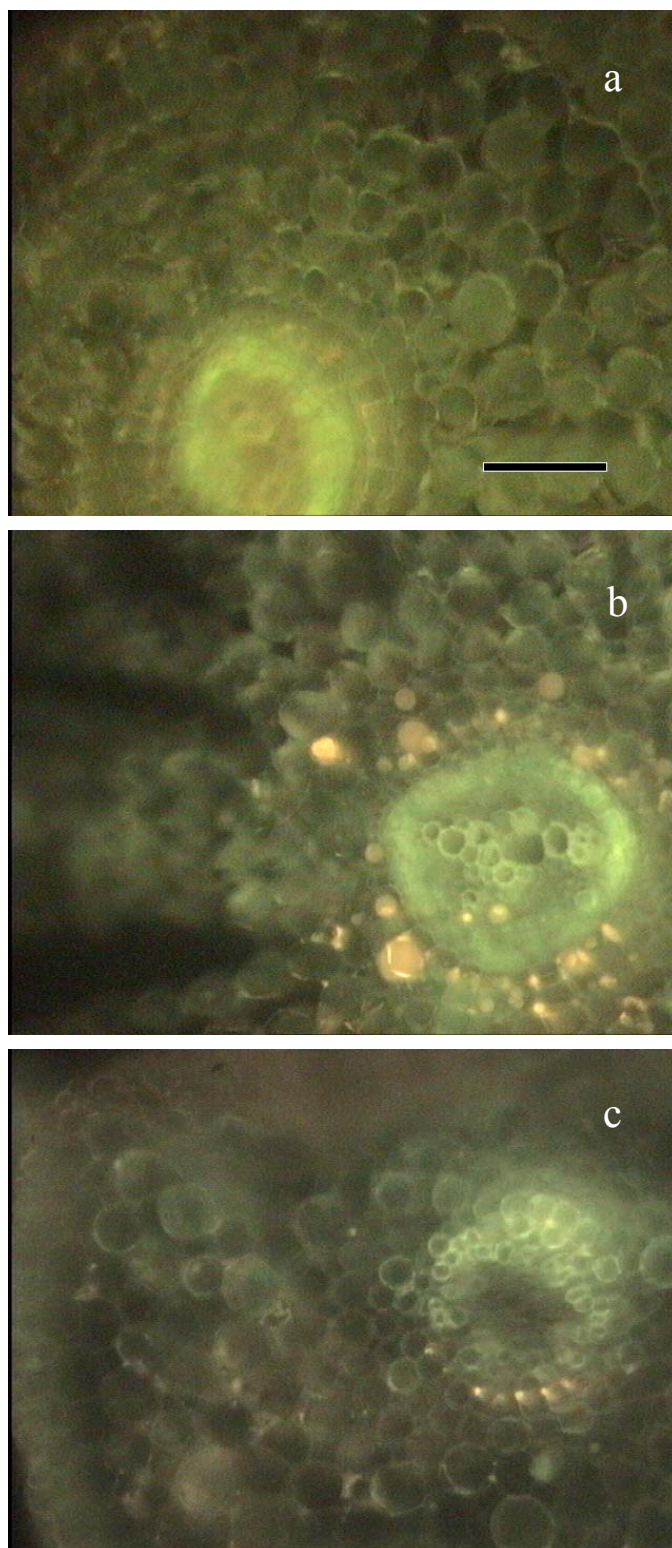


Εικόνα Δ.6. Γράφημα της ευθείας παλινδρόμησης μεταξύ του δείκτη ειδικής επιφάνειας φύλλων (SLA) και του πάχους των φύλλων του φυτού *D. viscosa*.

(εικόνα Δ.8). Ως επαγωγέας φθορισμού για τις παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το NR, ουσία η οποία επάγει την εμφάνιση έντονου κίτρινου-πορτοκαλί φθορισμού των φλαβονοειδών όταν διεγείρονται με μπλε φως (λεπτομέρειες στα «Υλικά και Μέθοδοι»). Οι ουσίες αυτές εμφανίζουν σκοτεινό καφέ φθορισμό παρουσία NR σε UV ακτινοβολία (εικόνα Δ.7).



Εικόνα Δ.7. Εγκάρσια τομή κεντρικής ρίζας φυτού *D. viscosa* το οποίο έχει αναπτυχθεί απουσία βορίου όπως εμφανίζεται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Φίλτρο εκτομής G 365. Ως επαγωγέας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε διάλυμα διφαινόλο βορικό οξύ-αιθανολαμίνης 0,6 % (Naturstoff Reagent-NR) (βλ. «Υλικά και Μέθοδοι»). Συνθήκες μικροφωτογράφισης ίδιες με αυτές της Εικόνας Δ.7. Οι εναποθέσεις φαινολικών ενώσεων εμφανίζονται στις συνθήκες αυτές ως σκούρες καφέ κηλίδες. Μπάρα=100μm.



Εικόνα Α.8. Εγκάρσιες τομές κεντρικής ρίζας φυτών *D. viscosa* όπως εμφανίζονται στο μικροσκόπιο φθορισμού. Φίλτρο εκπομπής : 450-490. Ως επαγωγέας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η διφαινύλο βορικό οξύ-αιθανολαμίνη 0,6 % (Naturstoff Reagent-NR) (βλ. «Υλικά και Μέθοδοι»). **a.** Ρίζα φυτού-μάρτυρα. **b.** Ρίζα φυτού ανεπτυγμένου απουσία βορίου. **c.** Ρίζα φυτού στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Φαίνεται καθαρά η εναπόθεση συστατικών τα οποία εκπέμπουν λαμπρό πορτοκαλί φθορισμό στα κύτταρα του φλοιού του φυτού το οποίο έχει αναπτυχθεί απουσία βορίου. Μπάρα=100μm.

Δ.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΦΥΤΩΝ *D. VISCOSA* ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Δ.4.1. Φωτοσυνθετική λειτουργία

Ο λόγος μεταβλητού προς μέγιστο φθορισμό της χλωροφύλλης (F_v/F_m), δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών χειρισμών, τόσο κατά την πρώτη, όσο και κατά τη δεύτερη ημερομηνία μέτρησης (Πίνακας Δ.7) ενώ οι τιμές κυμάνθηκαν στα φυσιολογικά επίπεδα. Η παράμετρος F_v/F_m αποτελεί δείκτη της λειτουργικής κατάστασης του φωτοσυστήματος PSII και συνήθως η άριστη τιμή F_v/F_m για τα υγιή φυτά κυμαίνεται μεταξύ 0,800 και 0,850 (Demmig and Björkman 1987; Bohlar-Nordenkampf and Oquist 1993). Κατά την πρώτη ημερομηνία μέτρησης (17/2/2000) παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών α και β στα φύλλα των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου (στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο $P < 0.001$), ενώ κατά τη δεύτερη ημερομηνία μέτρησης (25/2/2000) δεν

Πίνακας Δ.7. Οι τιμές της παραμέτρου F_v/F_m και της συγκέντρωσης των ολικών χλωροφυλλών στις δύο ημερομηνίες μέτρησης για τα φυτά των τριών πειραματικών χειρισμών. Στις 25/2/2000 καταγράφηκε επί πλέον η φωτοσυνθετική ικανότητα των φύλλων των αντίστοιχων φυτών. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

	17/2/2000						
Παράμετρος	Μάρτυρας	B -				SA +	
	MO ± ΤΣ	MO ± ΤΣ	% μεταβολή		MO ± ΤΣ	% μεταβολή	
F _v /F _m	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0		0,80 ± 0,01	-2	
Χλωροφύλλες α+β (μg cm ⁻²)	18,09 ± 0,85	22,40 ± 0,86	24	b	17,87 ± 0,89	-1	
	25/2/2000						
F _v /F _m	0,83 ± 0,01	0,83 ± 0,00	0		0,81 ± 0,01	-2	
Χλωροφύλλες α+β (μg cm ⁻²)	23,51 ± 0,69	22,27 ± 1,29	-5		21,53 ± 0,85	-8	
Φωτοσυνθετική ικανότητα (μmole O ₂ m ⁻² sec ⁻¹)	14,39 ± 1,51	23,12 ± 3,98	61	a	14,60 ± 2,16	1	

παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών πειραματικών χειρισμών (Πίνακας Δ.7). Είναι χαρακτηριστικό ότι η φωτοσυνθετική ικανότητα των φύλλων των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου εμφανίστηκε σημαντικά υψηλότερη (σε επίπεδο $P < 0.05$) έναντι αυτής των φυτών μαρτύρων ή των φυτών στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ (Πίνακας Δ.7). Τα φυτά των δύο τελευταίων χειρισμών δεν παρουσίασαν διαφορές στη φωτοσυνθετική τους ικανότητα.

Δ.4.2. Σχετική συγκέντρωση των συστατικών των εκχυλισμάτων ριζών και φύλλων οι οποίες απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος

Η σχετική συγκέντρωση των συστατικών αυτών, ως απορρόφηση στα 280, 300 ή 350 nm (στην περιοχή αυτή του φάσματος απορροφούν κυρίως φαινολικές ενώσεις) παρουσίασε εντυπωσιακή αύξηση (έξι έως οκτώ φορές) στις ρίζες των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου (Πίνακας Δ.8, Εικόνα Δ.9). Η διαφορά αυτή ήταν μόνο ποσοτική, αφού δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς διαφορές στα φάσματα απορρόφησης των εκχυλισμάτων (Εικόνα Δ.10). Η χρωματογραφική ανάλυση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων σε HPLC έδειξε ότι πράγματι, δεν υπήρχαν εμφανείς διαφορές στη ποιοτική σύσταση των δειγμάτων (Εικόνα Δ.19). Η χορήγηση σαλικυλικού οξέος επέφερε μία αύξηση (της τάξης του 50%) στη σχετική συγκέντρωση των ουσιών αυτών, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική (Πίνακας Δ.8, Εικόνα Δ.9). Δεν υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις για συσσώρευση σαλικυλικού οξέος στις ρίζες των φυτών στις οποίες χορηγήθηκε η ουσία (Εικόνα Δ.19).

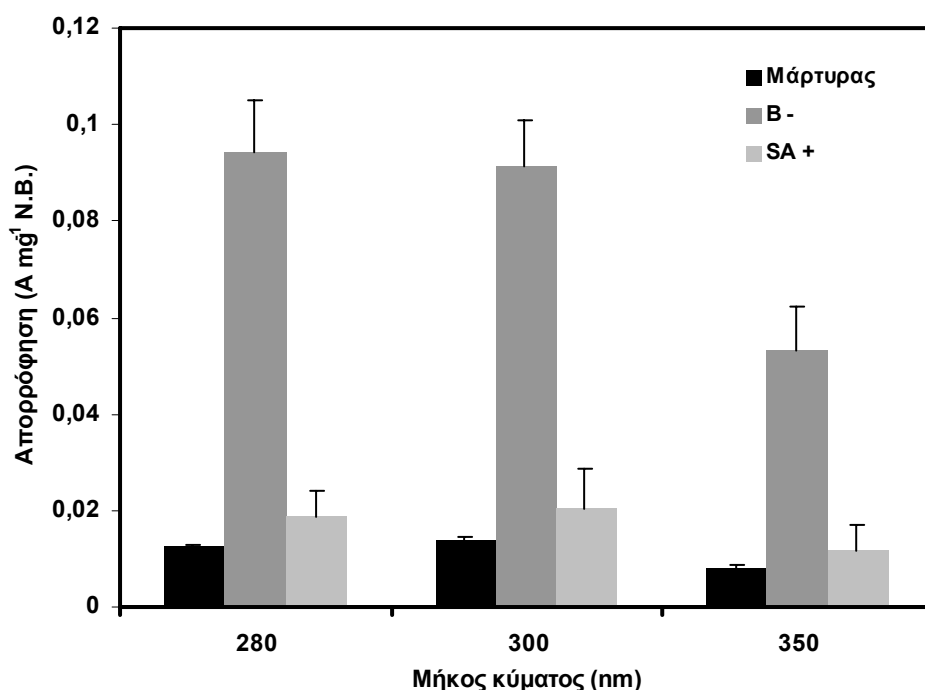
Η σχετική συγκέντρωση των ενώσεων των εκχυλισμάτων οι οποίες απορροφούν στη UV περιοχή του φάσματος στα φύλλα των φυτών (από τα οποία είχε προηγουμένως αφαιρεθεί το επεφυμενιδικό έκκριμα με χλωροφόρμιο) των τριών πειραματικών χειρισμών έδωσε ανάλογα αποτελέσματα. Η συγκέντρωση ήταν τρεις έως τέσσερις φορές υψηλότερη στα φύλλα των φυτών, τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου (Πίνακας Δ.8, Εικόνα Δ.11). Η χορήγηση σαλικυλικού οξέος προκάλεσε επίσης μία αύξηση στη συγκέντρωση των ουσιών στα φύλλα (20-30%), χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική. Ανάλογα αποτελέσματα λαμβάνονται, ανεξάρτητα του τρόπου έκφρασης της συγκέντρωσης (Εικόνα Δ.13). Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των εσωτερικών φαινολικών των φύλλων δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα φάσματα απορρόφησης (Εικόνα Δ.12). Ανάλογα η χρωματογραφική ανάλυση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων σε HPLC δεν έδειξε εμφανείς μεταβολές μεταξύ των δειγμάτων (Εικόνα Δ.20).

Η σχετική συγκέντρωση των ενώσεων των επιεφυμενιδικών εκκριμάτων του φυτού, οι οποίες απορροφούν στη UV περιοχή του φάσματος δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών πειραματικών χειρισμών. Μια τάση αύξησης (της τάξης του 22-11%) παρατηρήθηκε στα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία βορίου, ενώ αντίθετα τάση μείωσης παρατηρήθηκε στα φυτά στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ (Εικόνα Δ.14). Επίσης δεν παρουσιάστηκαν εμφανείς διαφορές στα φάσματα απορρόφησης των επιεφυμενιδικών εκκριμάτων (Εικόνα Δ.15). Η χρωματογραφική ανάλυση των αντίστοιχων εκχυλισμάτων σε HPLC έδειξε ότι πράγματι, υπήρχε μια εντυπωσιακή σταθερότητα στην ποιοτική σύσταση των δειγμάτων (Εικόνες Δ.21 και Δ.22). Οι κορυφές έκλυσης #6 και #7 χαρακτηρίστηκαν

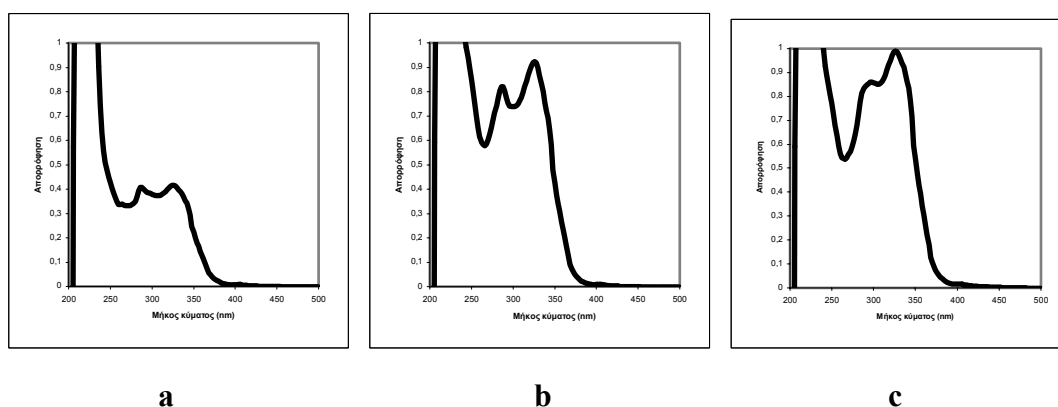
Πίνακας Δ.8. Η σχετική συγκέντρωση των ενώσεων που απορροφούν σε μήκη κύματος 280, 300 και 350 nm για τα εκχυλίσματα (a) των εσωτερικών φαινολικών των ριζών και των φύλλων και (b) του επιεφυμενιδικού εκκρίματος, εκφρασμένη ως απορρόφηση ανά μονάδα νωπού βάρους (ρίζες και φύλλα) και ανά μονάδα επιφάνειας (επιεφυμενιδικά). Οι τιμές αφορούν σε Μ.Ο. τριών επαναλήψεων. Ακολουθούνται οι συμβολισμοί του Πίνακα Δ.1.

(a)		$A_{280} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$	$A_{300} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$	$A_{350} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$
Ρίζες	Μάρτυρας	0.012	0.014	0.008
	B -	0.094	0.092	0.053
	% μεταβολή	663	567	581
		b	b	b
	SA +	0.019	0.020	0.012
	% μεταβολή	52	49	48
Φύλλα	Μάρτυρας	0.034	0.034	0.036
	B -	0.103	0.129	0.099
	% μεταβολή	207	273	172
			a	a
	SA +	0.040	0.045	0.045
	% μεταβολή	20	30	23

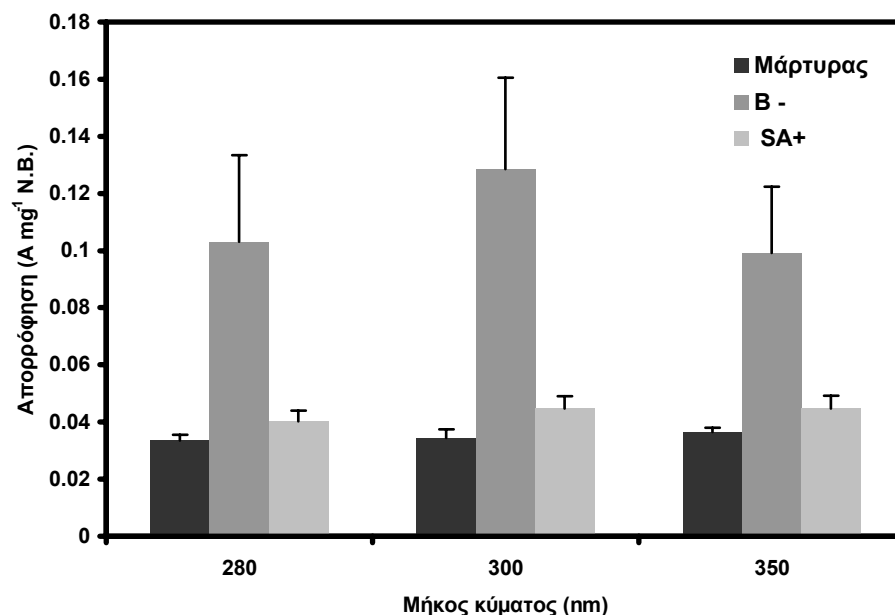
(b)		$A_{280} \text{ cm}^{-2}$	$A_{300} \text{ cm}^{-2}$	$A_{350} \text{ cm}^{-2}$
Επιεφυμενιδικά	Μάρτυρας	0.935	0.752	0.249
	B -	1.137	0.913	0.276
	% μεταβολή	22	21	11
	SA +	0.784	0.630	0.216
	% μεταβολή	-16	-16	-13



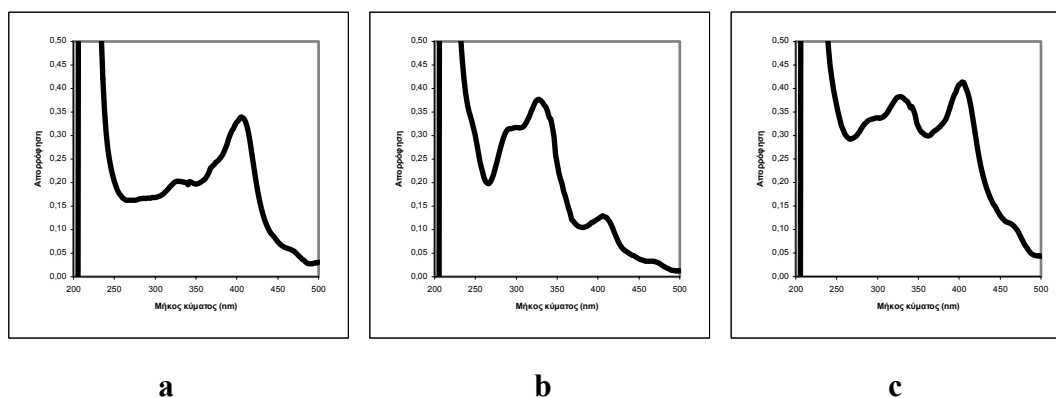
Εικόνα Δ.9. Η σχετική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (ως απορρόφηση μεθανολικού εκχυλίσματος στο αντίστοιχο μήκος κύματος, ανά μονάδα νωπού βάρους του ιστού) στις ρίζες των φυτών των τριών πειραματικών χειρισμών. Η τιμή $A_{280} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$ υποδηλώνει απορρόφηση (στα 280 nm) εκχυλίσματος συνολικού όγκου 1 ml, το οποίο προέρχεται από ρίζα 1 mg N.B. και με οπτικό μήκος διέλευσης 1 cm. Αντίστοιχα για τις τιμές $A_{300} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$ και $A_{350} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$



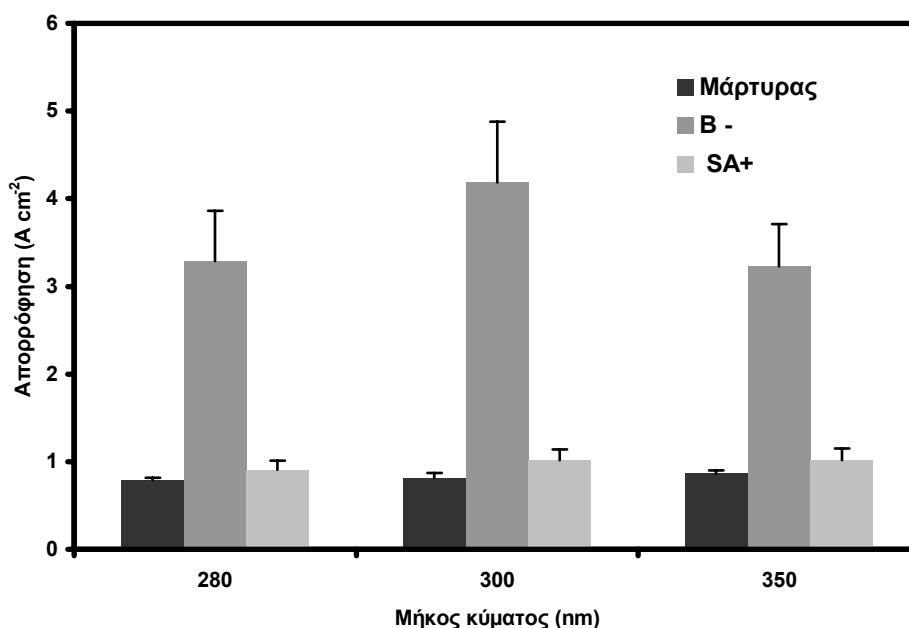
Εικόνα Δ.10. Φάσματα απορρόφησης μεθανολικών εκχυλισμάτων ριζών αντιπροσωπευτικών φυτών, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. **α.** Φυτό-μάρτυρας **β.** Φυτό το οποίο αναπτύχθηκε απουσία βορίου **γ.** Φυτό στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Οι κλίμακες απορρόφησης δεν είναι ποσοτικά ανάλογες.



Εικόνα Δ.11. Η σχετική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (ως απορρόφηση μεθανολικού εκχυλίσματος στο αντίστοιχο μήκος κύματος, ανά μονάδα νερού βάρους του ιστού) στα φύλλα των φυτών των τριών πειραματικών χειρισμών. Από τα φύλλα είχε προηγουμένως αφαιρεθεί το επεφυμενιδικό έκκριμα με χρήση χλωροφορμίου. Η τιμή $A_{280} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$ υποδηλώνει απορρόφηση (στα 280 nm) εκχυλίσματος συνολικού όγκου 1 ml, το οποίο προέρχεται από φύλλο 1 mg N.B. και με οπτικό μήκος διέλευσης 1 cm. Αντίστοιχα για τις τιμές $A_{300} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$ και $A_{350} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$



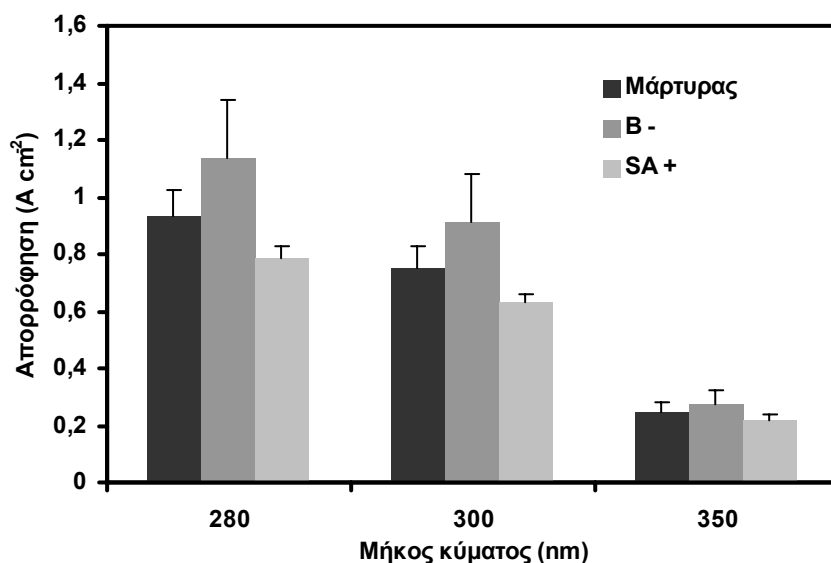
Εικόνα Δ.12. Φάσματα απορρόφησης μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων αντιπροσωπευτικών φυτών, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Από τα φύλλα είχε προηγουμένως αφαιρεθεί το επεφυμενιδικό έκκριμα με χρήση χλωροφορμίου. **α.** Φυτό-μάρτυρας **β.** Φυτό το οποίο αναπτύχθηκε απουσία βορίου **γ.** Φυτό στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Οι κλίμακες απορρόφησης δεν είναι ποσοτικά ανάλογες.



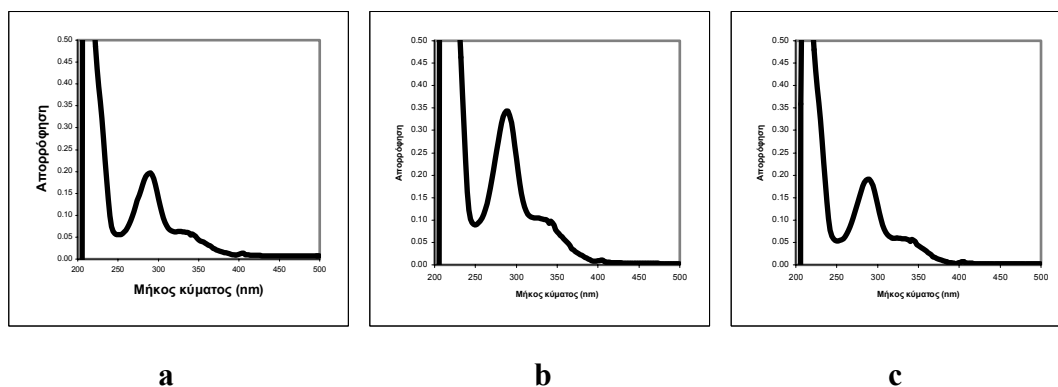
Εικόνα Δ.13. Η σχετική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (ως απορρόφηση μεθανολικού εκχυλίσματος στο αντίστοιχο μήκος κύματος, ανά μονάδα επιφάνειας του ιστού) στα φύλλα των φυτών των τριών πειραματικών χειρισμών. Από τα φύλλα είχε προηγουμένως αφαιρεθεί το επιεφυμενιδικό έκκριμα με χρήση χλωροφορμίου. Η τιμή $A_{280} \text{ cm}^{-2}$ υποδηλώνει απορρόφηση (στα 280 nm) εκχυλίσματος συνολικού όγκου 1 ml, το οποίο προέρχεται από φύλλο επιφάνειας 1 cm^2 και με οπτικό μήκος διέλευσης 1 cm. Αντίστοιχα για τις τιμές $A_{300} \text{ cm}^{-2}$ και $A_{350} \text{ cm}^{-2}$.

ως 3-μεθυλαιθέρας της κεμπφερόλης και 3, 3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης, αντίστοιχα. Ο χαρακτηρισμός στηρίχτηκε στους χρόνους συγκράτησης προτύπων ουσιών, σε συγχρωματογράφηση του δείγματος και των προτύπων ουσιών, καθώς και στα φάσματα απορρόφησης των κορυφών και των προτύπων στη UV περιοχή (Εικόνα Δ.23, βλ. επίσης «Υλικά και Μέθοδοι»).

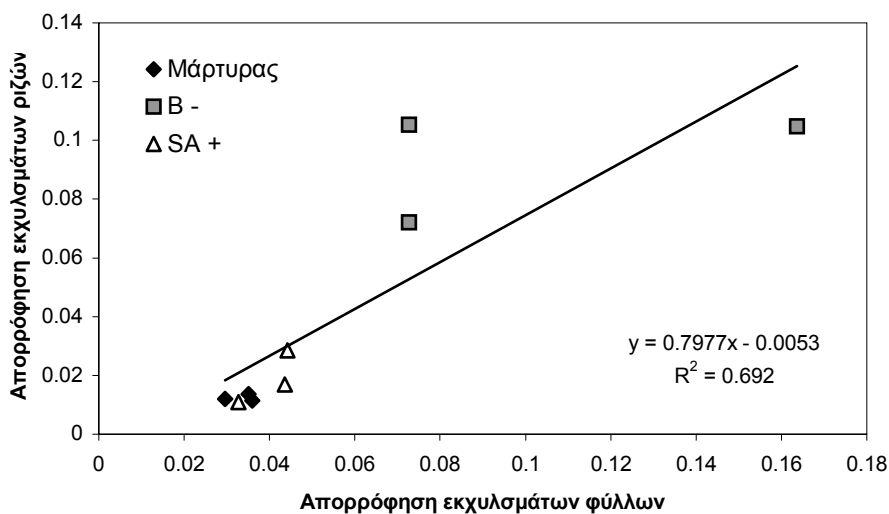
Η κατασκευή γραφημάτων ευθείας παλινδρόμησης έδειξε ότι παρατηρείται θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των φαινολικών (εκφρασμένη ως A_{280} , A_{300} , A_{350} ανά μονάδα N.B. των ιστών) των φύλλων, και της αντίστοιχης των ριζών, ανεξαρτήτως πειραματικού χειρισμού (Εικόνες Δ.16-18). Η ισχυρότερη συσχέτιση προκύπτει όταν η συγκέντρωση εκφραστεί ως $A_{300} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$ ($R^2 = 0.81$).



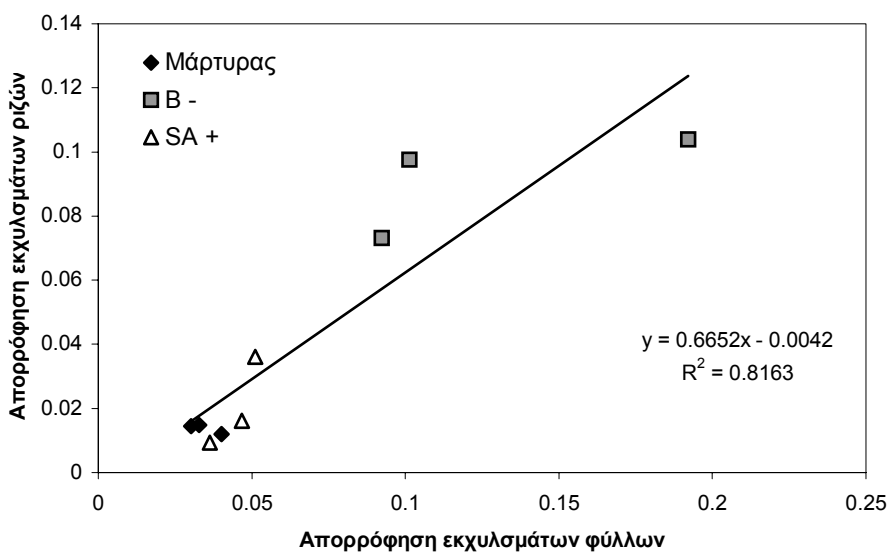
Εικόνα Δ.14. Η σχετική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (ως απορρόφηση χλωροφορμικού εκχυλίσματος στο αντίστοιχο μήκος κύματος, ανά μονάδα επιφάνειας του ιστού) στα επιεφυμενδικά εκκρίματα των φύλλων των φυτών των τριών πειραματικών χειρισμών. Η τιμή $A_{280} \text{ cm}^{-2}$ υποδηλώνει απορρόφηση (στα 280 nm) επιεφυμενδικού εκχυλίσματος συνολικού όγκου 1 ml, το οποίο προέρχεται από φύλλο επιφάνειας 1 cm^2 και με οπτικό μήκος διέλευσης 1 cm. Αντίστοιχα για τις τιμές $A_{300} \text{ cm}^{-2}$ και $A_{350} \text{ cm}^{-2}$.



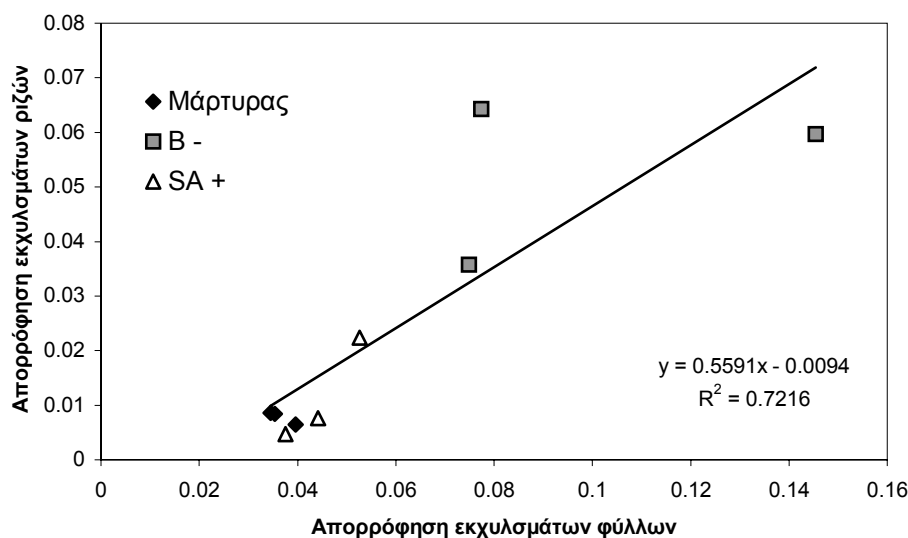
Εικόνα Δ.15. Φάσματα απορρόφησης χλωροφορμικών εκχυλισμάτων του επιεφυμενδικού εκκρίματος φύλλων αντιπροσωπευτικών φυτών, τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. **a.** Φυτό μάρτυρας **b.** Φυτό το οποίο αναπτύχθηκε απουσία βορίου **c.** Φυτό στο οποίο χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ. Οι κλίμακες απορρόφησης δεν είναι ποσοτικά ανάλογες.



Εικόνα Α.16. Γράφημα της ευθείας παλινδρόμησης μεταξύ της σχετικής συγκέντρωσης των ενώσεων των εκχυλισμάτων των φύλλων που απορροφούν σε μήκος κύματος 280 nm και της αντίστοιχης των ριζών του φυτού *D. viscosa*. Η σχετική συγκέντρωση είναι εκφρασμένη ως $A_{280} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$



Εικόνα Α.17. Γράφημα της ευθείας παλινδρόμησης μεταξύ της σχετικής συγκέντρωσης των ενώσεων των εκχυλισμάτων των φύλλων που απορροφούν σε μήκος κύματος 300 nm και της αντίστοιχης των ριζών του φυτού *D. viscosa*. Η σχετική συγκέντρωση είναι εκφρασμένη ως $A_{300} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$



Εικόνα Α.18. Γράφημα της ευθείας παλινδρόμησης μεταξύ της σχετικής συγκέντρωσης των ενώσεων των εκχυλισμάτων των φύλλων που απορροφούν σε μήκος κύματος 350 nm και της αντίστοιχης των ριζών του φυτού *D. viscosa*. Η σχετική συγκέντρωση είναι εκφρασμένη ως $A_{350} \text{ mg}^{-1} \text{ N.B.}$

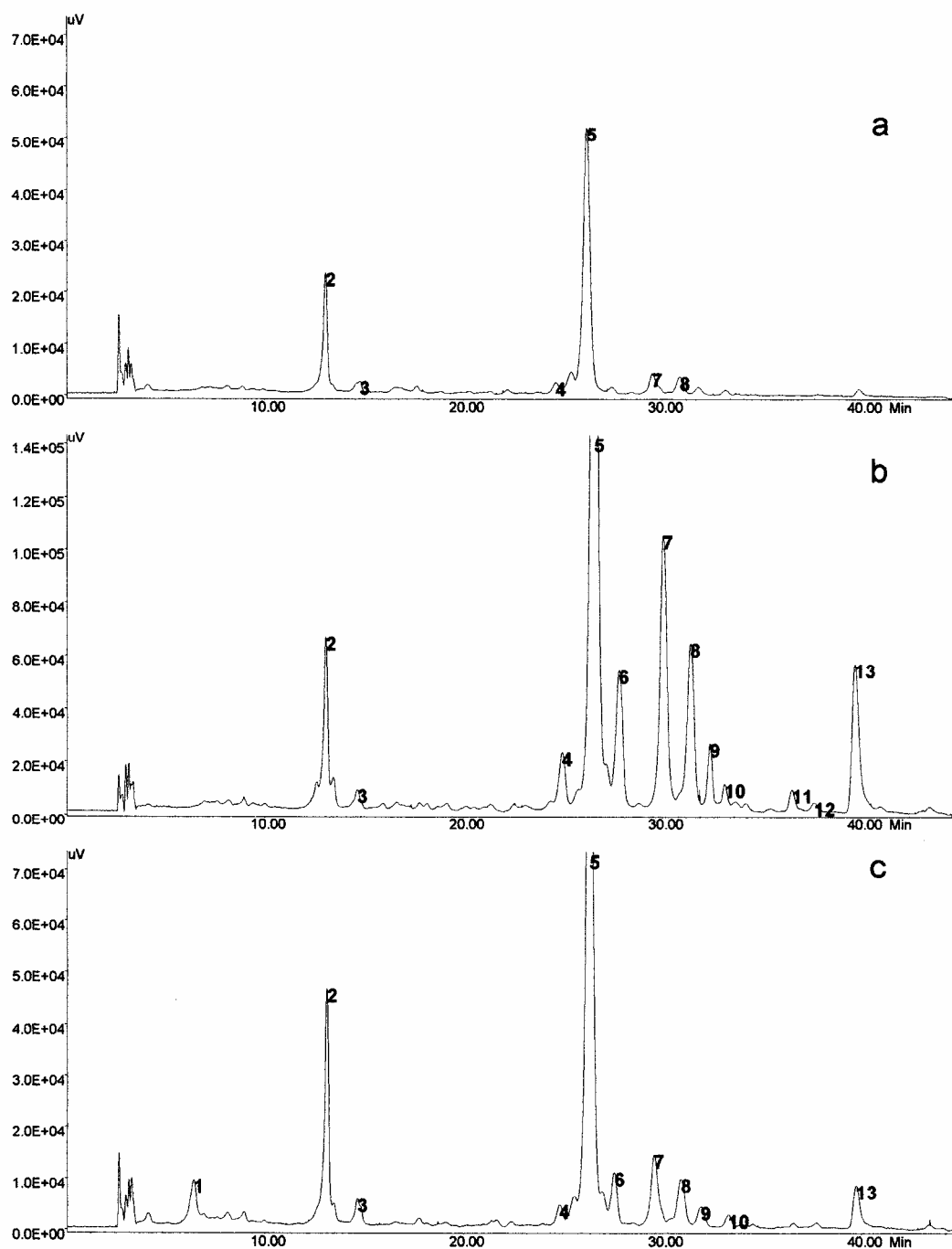
Δ.4.3. Χρωματογραφική ανάλυση εσωτερικών φαινολικών ριζών και φύλλων και επιεφυμενιδικών φαινολικών συστατικών των φύλλων

Η χρωματογραφική ανάλυση των εσωτερικών φαινολικών των ριζών έδειξε σημαντικές ποσοτικές αλλαγές σε όλο το εύρος των φαινολικών συστατικών (απλά φαινολικά και φαινολοξέα), γλυκοζυλιωμένα και άγλυκα φλαβονοειδή (Εικόνα Δ.19). Ποιοτικές αλλαγές δεν παρατηρήθηκαν με εξαίρεση την κορυφή έκλουσης #1 που εμφανίστηκε σε όλες τις αναλύσεις που αφορούσαν φυτά της μεταχείρισης (SA+) και την κορυφή έκλουσης #13 που δεν εμφανίστηκε σε σημαντικές συγκεντρώσεις στα φυτά-μάρτυρες. Επίσης πρέπει να επισημανθεί ότι η κορυφή έκλουσης #4 που χαρακτηρίστηκε ως σαλικυλικό οξύ δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση μεταξύ της μεταχείρισης (SA+) και του μάρτυρα ($8,1 \pm 4,5$ (T.Σ.) $\mu\text{g g}^{-1}$ N.B. και $5,4 \pm 1,1$ $\mu\text{g g}^{-1}$ N.B. αντιστοίχως) ενώ η συγκέντρωσή της εμφανίστηκε αυξημένη στα φυτά της μεταχείρισης (B-) ως $262,2 \pm 104,1$ $\mu\text{g g}^{-1}$ N.B (Εικόνα Δ.19).

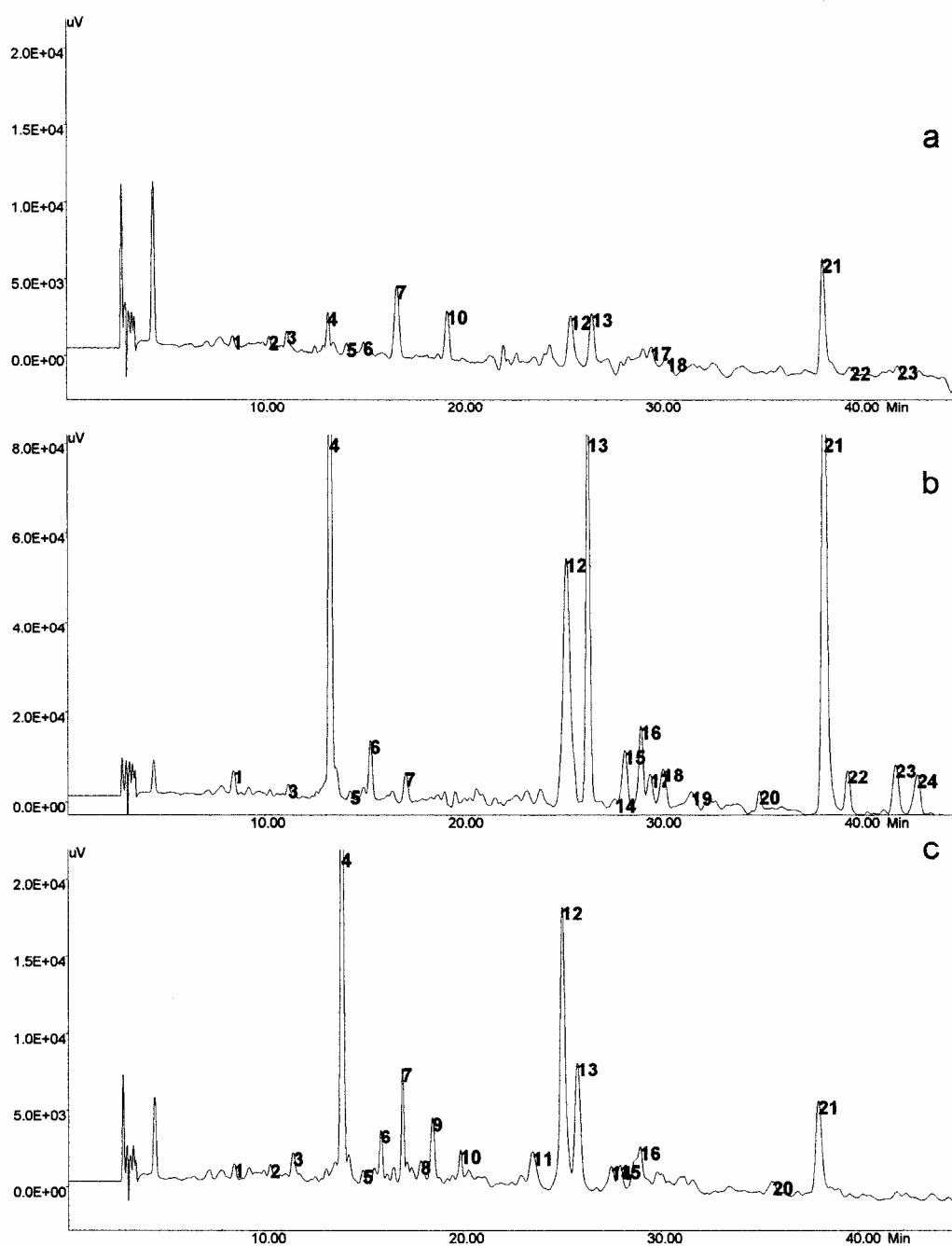
Στα εκχυλίσματα των εσωτερικών φαινολικών των φύλλων των φυτών (B-) η χρωματογραφική ανάλυση έδειξε μια αύξηση στην συγκέντρωση όλων σχεδόν των συστατικών ενώ ορισμένα από αυτά, όπως η κορυφή έκλουσης #4, εμφανίστηκαν σε μεγαλύτερη αναλογία (Εικόνα Δ.20). Η σχετική συγκέντρωση των φαινολικών στα

εκχυλίσματα των φύλλων των φυτών της μεταχείρισης (SA+) εμφάνισε μικρή αύξηση στα φάσματα απορρόφησης που δεν θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική (Πίνακας Δ.8 και Εικόνα Δ.12). Ωστόσο στις αναλύσεις HPLC αρκετές κορυφές έκλουσης εμφανίστηκαν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες στα φυτά-μάρτυρες (Εικόνα Δ.20, κορυφές έκλουσης #4 και #11-13).

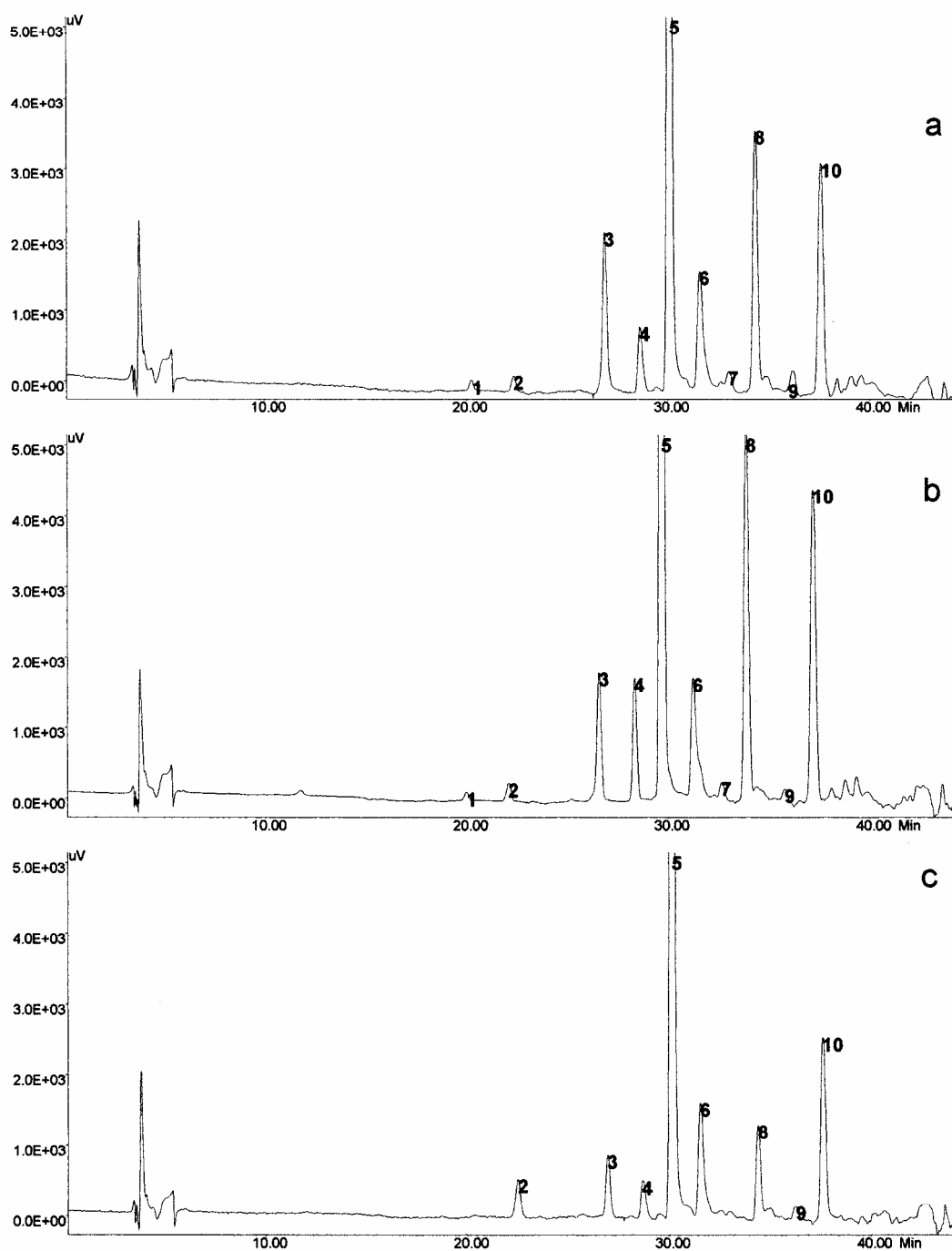
Τα επεφυμενιδικά φαινολικά συστατικά των φύλλων ήταν αποκλειστικά λιπόφιλα άγλυκα και μεθυλιωμένα φλαβονοειδή, σύμφωνα με την χρωματογραφική ανάλυση. Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση ανάμεσα στις μεταχειρίσεις δεν παρουσίασε διαφορές (Εικόνες Δ.21 και Δ.22). Τα συστατικά που αντιστοιχούν στις κορυφές έκλουσης χαρακτηρίστηκαν σύμφωνα με τα φάσματα απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή ενώ δύο συστατικά βρέθηκε, σύμφωνα με τη σύγκριση με τους χρόνους συγκράτησης πρότυπων συστατικών και τα φασματικά χαρακτηριστικά τους, ότι αντιστοιχούν στις ενώσεις 3-μεθυλαιθέρας της κεμπφερόλης και 3,3'-διμεθυλαιθέρας της κερκετίνης (Εικόνες Δ.21 και Δ.22, κορυφές έκλουσης #6 και #7). Όσον αφορά στα υπόλοιπα συστατικά, αυτά ανάλογα με το χαρακτηριστικό φάσμα ορισμένων ομάδων φλαβονοειδών φαίνεται ότι ανήκουν στις φλαβανόνες/διϋδροφλαβονόλες (κορυφές έκλουσης #3-5, 8, 9) ενώ η κορυφή έκλουσης #10 χαρακτηρίζεται ως ισοφλαβόνη (Εικόνα Δ.23).



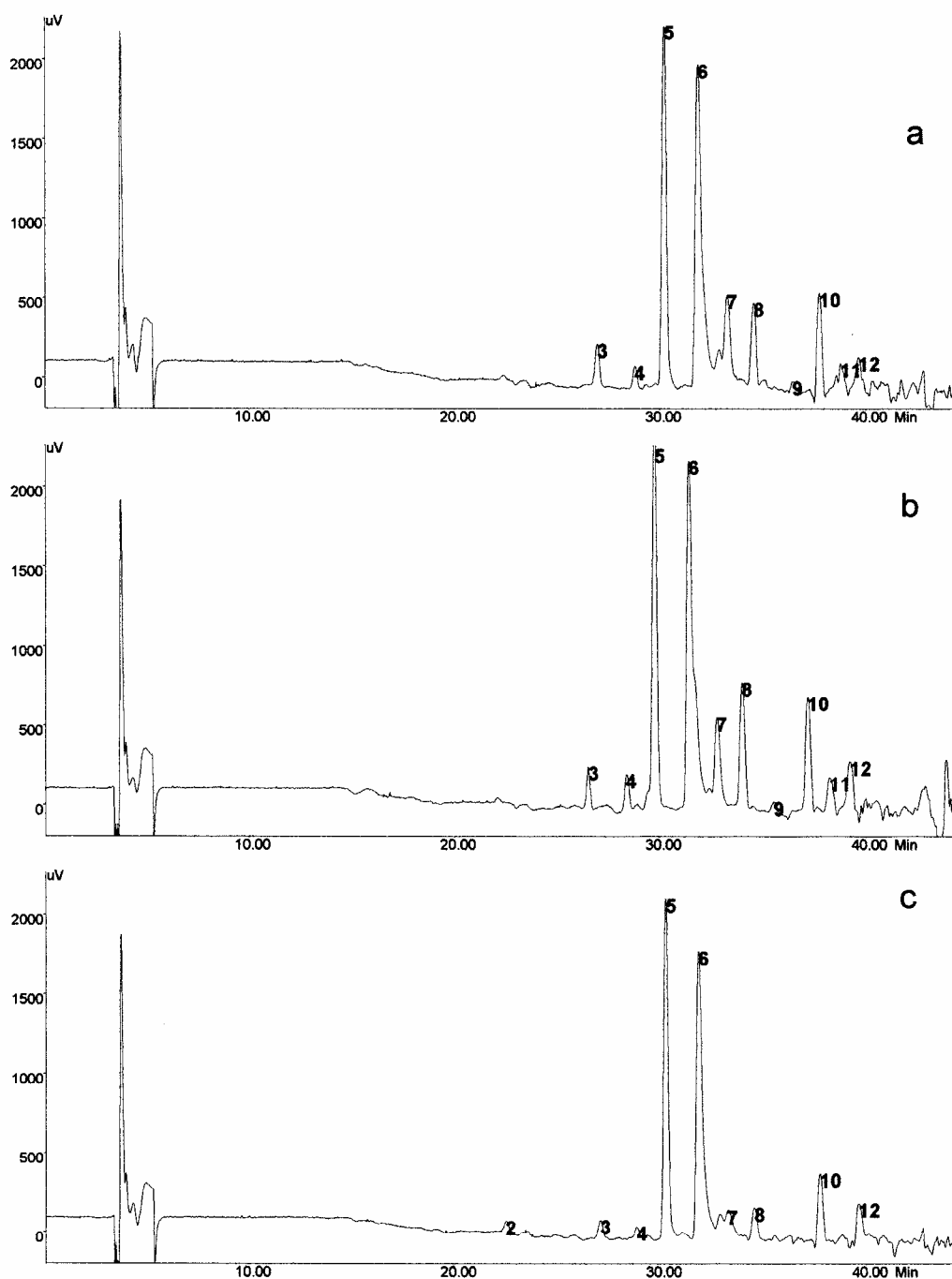
Εικόνα Α.19. Χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων των ριζών. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από φυτό μάρτυρα (α), φυτά (B-) (β) και φυτά (SA+) (γ). Ανίχνευση στα 280 nm. Οι κλίμακες απορρόφησης δεν είναι ποσοτικά ανάλογες. Η κορυφή έκλουσης #4 αντιστοιχεί στο σαλικυλικό οξύ.



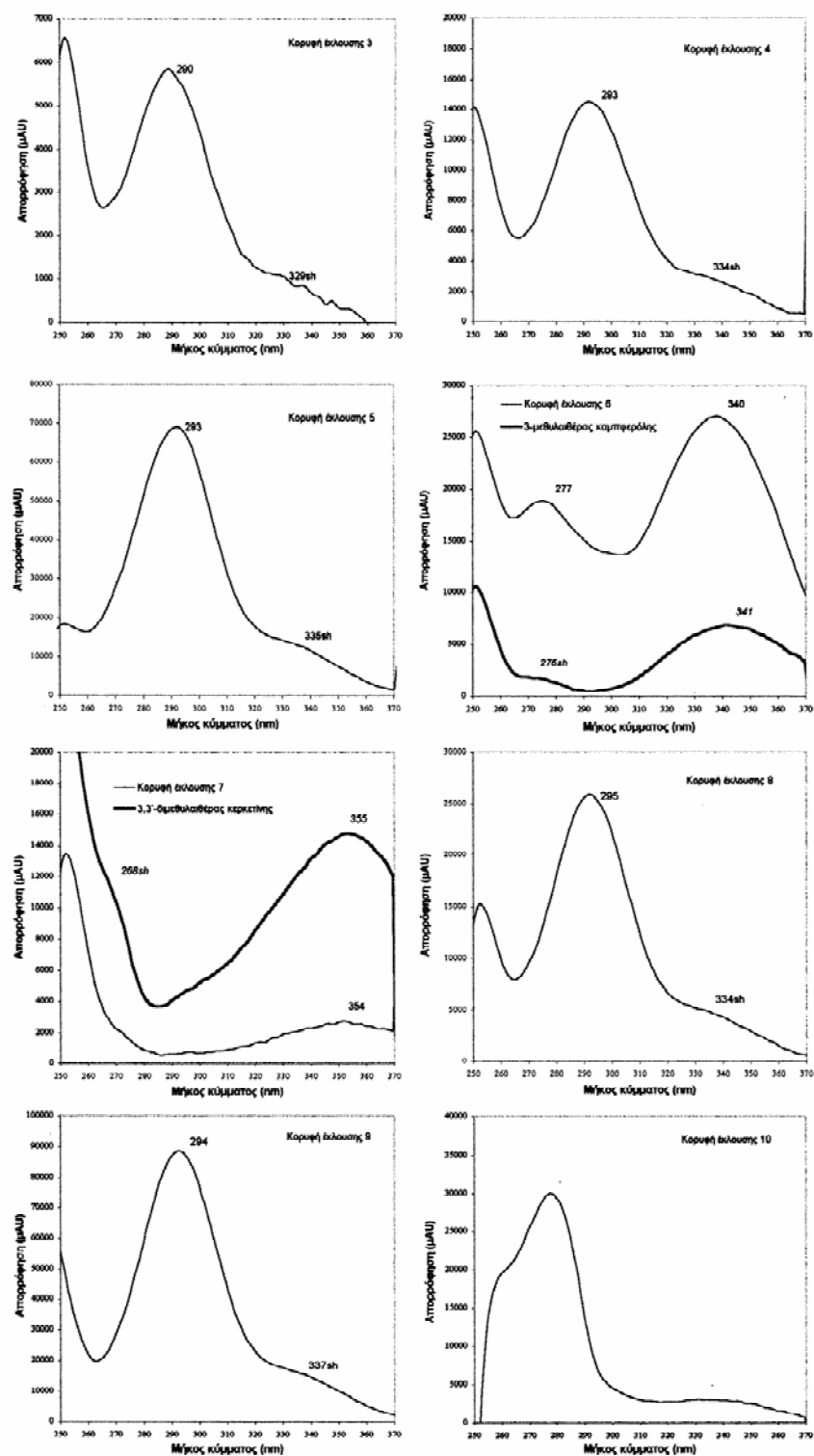
Εικόνα Α.20. Χρωματογραφική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων των φύλλων. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από φυτό μάρτυρα (α), φυτά (B-) (β) και φυτά (SA+) (γ). Ανίχνευση στα 280 nm. Οι κλίμακες απορρόφησης δεν είναι ποσοτικά ανάλογες.



Εικόνα Α.21. Χρωματογραφική ανάλυση των επιεφμενιδικών φαινολικών συστατικών των φύλλων. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από φυτό μάρτυρα (α), φυτά (B-) (β) και φυτά (SA+) (γ). Ανίχνευση στα 280 nm. Ταυτοποιημένα συστατικά: 3-μεθυλαιθέρας κεμπφερόλης (6), 3,3'-διμεθυλαιθέρας κερκετίνης (7). Οι κλίμακες απορρόφησης είναι ποσοτικά ανάλογες.



Εικόνα Δ.22. Χρωματογραφική ανάλυση των επιφυμενιδικών φαινολικών συστατικών των φύλλων. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από φυτό μάρτυρα (α), φυτά (B-) (β) και φυτά (SA+) (γ). Ανίχνευση στα 350 nm. Ταυτοποιημένα συστατικά: 3-μεθυλαιθέρας κεμπερόλης (6), 3,3'-διμεθυλαιθέρας κερκετίνης (7). Οι κλίμακες απορρόφησης είναι ποσοτικά ανάλογες.



Εικόνα Α.23. Φάσματα απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή των κορυφών έκλυσης των επεφουμενδικών συστατικών των φύλλων όπως λήφθηκαν από τον UV-ανιχνευτή του συστήματος HPLC. Για τις κορυφές έκλυσης #6 και #7 φαίνονται και τα αντίστοιχα φάσματα απορρόφησης προτύπων συστατικών με βάση τα οποία χαρακτηρίστηκαν. Τα UV-maxima που φαίνονται με πλάγια γραφή αντιστοιχούν στο πρότυπο συστατικό.

Ε. Συζήτηση

Η έλλειψη βορίου επηρέασε όλες σχεδόν τις αναπτυξιακές παραμέτρους του φυτού *D. viscosa*, οι οποίες εξετάστηκαν. Τα συμπτώματα τροφοπενίας βορίου τα οποία εμφανίστηκαν (ανάσχεση της ανάπτυξης, νέκρωση του κορυφαίου μεριστώματος του κεντρικού βλαστού, πρόωγη ανάπτυξη πλάγιας βλάστησης, μορφή ροζέτας στο υπέργειο τμήμα, κοντόχοντρη ρίζα, λιγότερα σε αριθμό, μικρότερα και παχύτερα, σκούρου πράσινου χρώματος φύλλα) είναι παρόμοια προς αυτά τα οποία αναφέρονται στη σχετική βιβλιογραφία για μια σειρά φυτών (βλ. «Εισαγωγή»). Τα επίπεδα συγκέντρωσης βορίου στα φυτά-μάρτυρες κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα, σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Δροσόπουλος, 1992). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στα φυτά, τα οποία εκδήλωσαν τροφοπενία B, τα επίπεδα του στοιχείου στα φύλλα και στους βλαστούς ήταν εξαιρετικά χαμηλά, ενώ τα επίπεδα στη ρίζα συγκρατήθηκαν σε τιμές οι οποίες δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως ακραίες. Βεβαίως εάν υπολογιστεί η συσσώρευση του στοιχείου στα επί μέρους όργανα, τότε φαίνεται καθαρά η υστέρηση των φυτών τα οποία εκδήλωσαν την τροφοπενία έναντι των φυτών-μαρτύρων. Όταν τα φυτά αναπτύσσονται απουσία B, τότε παρατηρείται μία ανατροπή του προτύπου κατανομής του στοιχείου στα επί μέρους όργανα. Δίδεται η εντύπωση ότι η ρίζα συγκρατεί το σύνολο σχεδόν των λιγοστών αποθεμάτων βορίου, ενώ τα υπέργεια όργανα αδυνατούν να τροφοδοτηθούν με αυτό. Το γεγονός είναι αναμενόμενο, αφού σύμφωνα με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας το σύνολο σχεδόν του B (κυρίως των δικότυλων φυτών), βρίσκεται δεσμευμένο στα κυτταρικά τοιχώματα. Εντύπωση προξενεί το μέγεθος των επιπτώσεων της έλλειψης βορίου στη ρίζα, παρά το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται δραματικές αλλαγές στη συγκέντρωση του στοιχείου στο όργανο αυτό. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η μη ισορροπη ανάπτυξη του φυτού και η ανεπαρκής τροφοδοσία της ρίζας με φωτοσυνθετικά προϊόντα, είτε λόγω χαμηλής συνολικής παραγωγικότητας του υπέργειου τμήματος, είτε λόγω αδυναμίας μετακίνησης.

Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η έλλειψη βορίου όχι μόνο δεν προκάλεσε κάποια ορατή δυσλειτουργία στη φωτοσύνθεση (όσον αφορά στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II και στα επίπεδα των φωτοσυνθετικών χρωστικών), αλλά αντίθετα στις συνθήκες αυτές τα φυτά παρουσίασαν αύξηση της φωτοσυνθετικής τους ικανότητας. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί σε έμμεση επίδραση των συμπτωμάτων της τροφοπενίας, και συγκεκριμένα της αύξησης του πάχους του φύλλου. Η αύξηση του πάχους του φύλλου μπορεί να επιφέρει αύξηση της

εσωτερικής επιφάνειας του μεσόφυλλου και πιθανόν και αύξηση του αριθμού των φωτοσυνθετικών κυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας. Εάν δεν υπάρχουν περιορισμοί στη διάχυση του CO₂ προς τα φωτοσυνθετικά κύτταρα (όπως στη περίπτωση μέτρησης της φωτοσυνθετικής ικανότητας στην παρούσα εργασία, βλ. «Υλικά-Μέθοδοι») η αύξηση του πάχους του φύλλου μπορεί να επιφέρει μια καθαρή αύξηση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας ανά επιφάνεια φύλλου. Θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι δεν υπάρχουν ανάλογα δεδομένα (αύξησης της φωτοσυνθετικής ικανότητας) στη διεθνή βιβλιογραφία για ανώτερα φυτά (βλ. «Εισαγωγή»).

Η τροφοπενία βορίου επηρέασε σημαντικά τη συσσώρευση των φαινολικών συστατικών στα φύλλα και τις ρίζες. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα δεδομένα της σχετικής βιβλιογραφίας (βλ. «Εισαγωγή»). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές ποιοτικές αλλαγές στην σύσταση των εκχυλισμάτων τόσο της ρίζας όσο και των φύλλων.

Η τροφοπενία βορίου δεν επηρέασε σημαντικά την παραγωγή των επεφυμενιδικών συστατικών. Τα φύλλα του φυτού επέδειξαν εντυπωσιακή σταθερότητα όσον αφορά στα χαρακτηριστικά της απέκκρισης του επεφυμενιδικού υλικού. Ο αριθμός των αδενωδών τριχών ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου παρέμεινε σταθερός, παρόλο ότι το πάχος αυξήθηκε και η επιφάνεια των φύλλων μειώθηκε σημαντικά.

Εντυπωσιακή σταθερότητα επέδειξε επίσης και η ποιοτική σύσταση του επεφυμενιδικού εκκρίματος, όπως αυτή εμφανίστηκε στα χρωματογραφήματα HPLC. Ανάλογη σταθερότητα, όσον αφορά στα επεφυμενιδικά συστατικά του ίδιου φυτού, παρατηρήθηκε και σε πειράματα στα οποία το φυτό *D. viscosa* αναπτύχθηκε σε φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα UV-B ακτινοβολίας (Stefanou and Manetas, 1997b). Και στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε αύξηση των επεφυμενιδικών συστατικών παρουσία του παράγοντα καταπόνησης (UV-B ακτινοβολία), ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν ποιοτικές διαφορές στα φάσματα απορρόφησης. Από την άλλη πλευρά θα πρέπει να τονιστεί ότι το φυτό *D. viscosa* διαθέτει χλωροπλάστες και στους δύο τύπους αδενωδών τριχών τους οποίους φέρει στα φύλλα του (Werker and Fahn, 1981). Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να καθιστά τα επιδερμικά αυτά εξαρτήματα αυτόνομα, τουλάχιστον εν μέρει, στην παραγωγή του εκκρίματος και ως εκ τούτου η απέκκριση δεν επηρεάζεται σημαντικά από παράγοντες οι οποίοι καταπονούν τα υπόλοιπα κύτταρα (Mc Caskill and Croteau, 1998). Η σύνθεση του επεφυμενιδικού εκκρίματος σε φαινολικά συστατικά εμφανίζεται λιγότερο πλούσια

συγκριτικά με τις αναφορές στην βιβλιογραφία. Οι Wollenweber *et al.* (1991) αναφέρουν την ύπαρξη συνολικά 22 φλαβονοειδών στο έκκριμα των φύλλων. Πολλά από αυτά δεν είχαν προηγουμένως ανιχνευτεί. Ο σχετικά περιορισμένος αριθμός συστατικών, τα οποία ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία σε σχέση με την βιβλιογραφία μπορεί να αποδοθεί αφ' ενός μεν στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των φυτών, αφετέρου δε στη χρήση διαφορετικής μεθόδου παραλαβής του εκκρίματος. Συγκεκριμένα οι Wollenweber *et al.* (1991) χρησιμοποίησαν ακετόνη αντί του χλωροφορμίου. Ενδέχεται η χρήση διαφορετικού διαλύτη να επηρέασε τη σύσταση του δείγματος. Σε γενικές γραμμές η ποιοτική σύνθεση του εκκρίματος εξαρτάται από τους εδαφοκλιματικούς παράγοντες (Stefanou and Manetas, 1997a), ενώ στο φυτό *Cistus ladanifer* έχει παρατηρηθεί έντονη χρονική διακύμανση όσον αφορά στη σύσταση του επιφυμειδικού εκκρίματος (Chaves *et al.*, 1993). Επίσης οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μπορεί να σχετίζονται με το γεγονός ότι τα φυτά του πειράματος αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με χαμηλές εντάσεις PAR και υπερϊώδους ακτινοβολίας καθώς και υψηλή σχετική υγρασία. Ένα σημείο που θα πρέπει να διευκρινιστεί στο μέλλον είναι ο τρόπος και τα σημεία παραγωγής καθώς και αν και υπό ποια μορφή μετακινούνται τα συστατικά του εκκρίματος στην τελική τους θέση. Αυτό θα επέτρεπε την συσχέτιση των πειραματικών χειρισμών και της φυσιολογικής κατάστασης του φυτού με τη σύσταση του εκκρίματος.

Συνοψίζοντας, η τροφοπενία βορίου επέδρασε θετικά επί του μεταβολισμού των φαινολικών του φυτού (όπως άλλωστε αναμενόταν, βλ. «Εισαγωγή») αφού παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών αυτών και στις ρίζες και στα φύλλα. Ωστόσο φαίνεται ότι η τροφοπενία βορίου δεν προκάλεσε την εμφάνιση νέων φαινολικών συστατικών, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των φαινολικών στο φυτό αυτό είναι σχετικά σταθερά σε αριθμό.

Η χορήγηση σαλικυλικού οξέος μέσω του υποστρώματος, δεν απέδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών στα εσωτερικά φαινολικά συστατικά των φύλλων και ριζών αλλά ούτε και στα φαινολικά συστατικά του επιφυμειδικού εκκρίματος. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν ούτε ποιοτικές αλλαγές στη σύσταση. Σε γενικές γραμμές η εικόνα την οποία παρουσίασαν τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε σαλικυλικό οξύ ήταν όμοια με εκείνη των φυτών-μαρτύρων. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί (α) στη χαμηλή συγκέντρωση της ουσίας στο θρεπτικό διάλυμα. (β) στη χρονικά περιορισμένη εφαρμογή της ουσίας και (γ) στον αποκλεισμό της ουσίας στο

εξωτερικό διάλυμα και μη εισόδου της στα κύτταρα της ρίζας. Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η μελέτη της επίδρασης του σαλικυλικού οξέος στο φυτό αυτό απαιτεί πρόσθετα πειράματα ώστε να διευκρινιστεί αν και υπό ποιες συνθήκες υπάρχει δυνατότητα αξιοποίησης της εφαρμογής του στην αυξημένη παραγωγή εκκρίματος.

Z. Βιβλιογραφία

- Abu Zarga, M.H., Hamed, E.M., Sabri, S.S., Voelter, W. and Zeller, K-P. 1998.** *Journal of Natural Products* 61: 798-800.
- Aerts, R. and Chapin, F.S. III. 2000.** The mineral nutrition of wild plants revised: a re-evaluation of processes and patterns. *In: Advances in ecological research* vol. 30 pp. 1-67.
- Ahmed, S.S. and Müller, K. 1979.** Seasonal changes and the effect of nitrogen-and-potash-fertilization on the solanine and alpha-chaconine content in various parts of the potato plant. *Zeitschrift Pflanzenernaehr Bodenkd* 141: 275-279.
- Allen, E.A., Hoch, H.C., Steadman, J.R. and Stavelly, R.J. 1991.** Influence of leaf surface features on spore deposition and the epiphytic growth of phytopathogenic fungi. *In: Microbial Ecology of Leaves*, Andrews J.H. and Hirano S.S. (eds.), pp. 87-110, Springer-Verlag, New York.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C. 1998.** Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Antoniw, J.F. and White, R.F. 1980.** The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco. *Phytopathologische Zeitschrift* 98: 331-341.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. 1997.** Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- 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. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol. 10. Columbia: Univ. Mo. Press.
- Barz, W. and Hoesel, W. 1979.** Metabolism and degradation of phenolic compounds in plants. *In: Recent Advances in Phytochemistry*, Swain T., Harborne J.B. and Van Sumere C.F. (eds), Vol. 12 pp. 339-369. Plenum Press, New York.
- Beggs, C.J., Stoltzer-Jehle, A. and Wellman, E. 1985.** Isoflavonoid formation as an indicator of UV stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves: The significance of photo-repair in assessing potential damage by increased solar UV-B radiation. *Plant Physiology* 79: 630-634.

- Beggs, C.J. and Wellmann, E. 1994.** Photocontrol of flavonoid biosynthesis *In: Photomorphogenesis in Plants* 2nd edition, Kendrick R.E. and Kronenberg G.H.M. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Benton, J. 1997.** Hydroponics. A practical guide for the soilless grower. St. Lucie Press, Boca Raton, Florida.
- Bernards, M.A. and Lewis, N.G. 1992.** Akl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry* **31**: 3409-3412.
- 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.
- Bohlar-Nordenkamp, H.R. and Oquist 1993.** Functional leaf anatomy. *In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment*, Hall D.O., Schurlock J.M.O., Bohlar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long S.P. (eds), pp. 91-112. Chapman and Hall. London.
- Bohlmann, F. and Gupta, K.R. 1982.** Ineupatolide-like sesquiterpene lactones from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry* **21**: 1443-1445.
- Boots, K.J.M., van der Zaal, B.J., Velterop, J., Quint, A., Mennes, A.M., Hooykaas, P.J.J. and Libbenga, K.R. 1993.** Further characterization of expression of auxin-induced genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell-suspension cultures. *Plant Physiology* **102**: 513-520.
- Bornman, J.F. 1999.** Localisation and functional significance of flavonoids and related compounds. *In: Stratospheric Ozone Depletion: The Effects of Enhanced UV-B Radiation on Terrestrial Ecosystems*, Rozema J. (ed.), pp. 59-69, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Brown, P.H. and Hu, H. 1996.** Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Annals of Botany* **77**: 497-505.
- Brown, P.H. and Shelp, B.J. 1997.** Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85-101.
- Bryant, J.P., Chao III, F.S. and Klein R.D. 1983.** Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* **40**: 357-368.
- Cakmak, I. and Römheld, V. 1997.** Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil* **193**: 71-83.

- Cakmak, I., Kurz, H. and Marshner, 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.
- Caldwell, M., Robberrecht, R. and Flint, S.D. 1983.** Internal filters: prospects of UV acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum* **58**: 445-450.
- Camacho-Cristóbal, J.J. and González-Fontes, A. 1999.** Boron deficiency causes a drastic decrease in nitrate content and nitrate reductase activity, and increases the content of carbohydrates in leaves from tobacco plants. *Planta* **209**: 528-536.
- Carrington, J.C., Bisseling, T., Collmer, A. and Jones, J.D.G. 1999.** Highlights from the ninth international congress on molecular plant-microbe interactions. *The Plant Cell* **11**: 2063-2069.
- Ceccherelli, P., Curini, M. and Marcotullio, M.C. 1988.** Structure of cyperanic acid, a new sesquiterpene from *Dittrichia viscosa*. *Journal of Natural Products* **51**(5): 1006-1009.
- Ceccherelli, P., Curini, M., Marcotullio, M.C. and Menghini, A. 1985.** Sesquiterpene acids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry* **24**(12): 2987-2989.
- Chapin, F.S. III. 1980.** The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**: 233-260.
- Chaves, N. and Escudero, J.C. 1999.** Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions, Inderjit, Dakshini K.M.M. and Foy C.L. (eds) pp. 267-285, CRC Press.
- Chaves, N., Escudero, J.C. and Gutierrez-Merino C. 1993.** Seasonal variation of exudate of *Cistus ladanifer*. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 2577-2591.
- Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D.F. 1993.** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886.
- Clark, R.J. and Menary, R.C. 1980.** The effect of irrigation and nitrogen on the yield and composition of peppermint oil (*Mentha piperita* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* **31**: 489-498.
- Clarkson, D.T. and Hanson, J.B. 1980.** The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 239-298.
- Dakora, F.D. 1995.** Plant flavonoids: Biological molecules for useful exploitation. *Australian Journal of Plant Physiology*. **22**: 87-99.

- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H. and Scott, I.M. 1998.** Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* **116**: 1351-1357.
- Delaney, T.P. 1997.** Genetic dissection of acquired resistance to disease. *Plant Physiology* **113**: 5-12.
- Dell, B. and Huang, L. 1997.** Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil* **193**: 103-120.
- Demmig, B. and Björkman, O. 1987.** Comparison of the effects of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O_2 evolution in leaves of higher plants. *Planta* **171**: 171-184.
- Dempsey, D'M. A., Shah, J. and Klessig, D.F. 1999.** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* **18**: 547-575.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. and Bhattacharyya, M.K. 1995.** Engineering disease resistance in plants: An overview. *In: Molecular Methods in Plant Pathology*, Singh R.P. and Singh U.S. (eds.), pp. 249-270, CRC Press, Boca Raton.
- Doak K.D. and Miller P.R. 1968.** Influence of mineral nutrition on pigmentation in sorghum. *Agronomy Journal* **60**: 430-432.
- Dong, X. 1998.** SA, JA, ethylene and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 316-323.
- Δροσόπουλος Ι. 1992.** Η ανόργανη διατροφή των φυτών. Αθήνα, εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Dugger, W.M. 1983.** Boron in plant metabolism. *In: Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 15B, Lauchli A. and Bielecki R.L. (eds.), pp. 625-650, Springer-Verlag, Berlin.
- Durner, J., Shah, J. and Klessig, D.F. 1997.** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **2**: 266-274.
- Ebel, J. and Hahlbroch, K. 1982** Biosynthesis *In: The flavonoids: Advances in research*, Harborne J.B. and Mabry T.J. (eds), Chapman and Hall, London.
- Estiarte, M., Fillella, I., Serra J. And Penuelas J. 1994.** Effects of nutrient and water stress on leaf Phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia* **99**: 387-391.

- Fahn, A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *In: Advances in botanical research. Incorporating advances in plant pathology. Plant trichomes*, Hallahan D.L. and Gray J.C. (eds). Vol 31, pp. 37-76. Academic Press.
- Fisher, R.F. and Long, S.R. 1992.** *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**: 655-660.
- Fleischer, A., Titel, C. and Ehwald, R. 1998.** The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiology* **117**: 1401-1410.
- Fodor, J., Gullner, G., Ádam, A.L., Barna, B., Kömives, T. and Kiraly, Z. 1997.** Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiology* **114**: 1443-1451.
- Frassinet-Tachet, L., Baltz, R., Chong, J., Kauffmann, S., Fritig, B. and Saindrenan, P. 1998.** Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Letters* **437**: 319-323.
- Freeman G.C. and Mossadeghi N. 1970.** Effects of sulfate nutrition on flavor components of onion (*Allium cepa*). *Journal of Sciences of Foods and Agriculture* **21**: 610-615.
- Freeman G.C. and Mossadeghi N. 1971.** Influence of sulfate nutrition on the flavor components of garlic (*Allium sativum*) and wild onion (*Allium vineale*). *Journal of Sciences of Foods and Agriculture* **22**: 330-334.
- Freeman G.C. and Mossadeghi N. 1972.** Influence of sulfate nutrition on flavor components of three cruciferous plants: radish (*Raphanus sativus*), cabbage (*Brassica oleracea capitata*) and white mustard (*Sinapis alba*). *Journal of Sciences of Foods and Agriculture* **23**: 387-402.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. 1993.** Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756.
- Garcia-González, M., Mateo, P. and Bonilla, I. 1991.** Boron requirement for envelope structure and function in *Anabaena* PCC 7119 heterocysts. *Journal of Experimental Botany* **42**: 925-929.
- Gartian, J.A., McKey, D.B., Waterman, P.G., Mbi, C.N. and Struhsaker, T.T. 1980.** A comparative study of the phytochemistry of two African rain forests. *Biochemical Systematics and Ecology* **8**: 401- 422.

- Gershenzon J. 1984.** Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *In: Phytochemical Adaptations to Stress, Recent Advances in Phytochemistry*, Timmermann B.N., Stellink C. and Loewus F.A. (eds). pp. 273- 320. Plenum Press, New York.
- Glass, ADM 1973.** Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. *Plant Physiology* **51**: 1037-1041.
- Glass, ADM 1974.** Influence of phenolic acids on ion uptake. III. Inhibition of potassium uptake. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1037-1041.
- Godiard, L., Grant, M.R., Dietrich, R.A., Kiedrowski, S. and Dangl, J.L. 1994.** Perception and response in plant disease resistance. *Current Opinion in Genetics and Development* **4**: 662-671.
- Goldbach, H.E. 1984.** Influence of boron nutrition on net uptake and efflux of ^{32}P and ^{14}C -glucose in *Helianthus annuus* roots and cell cultures of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology* **118**: 431-438.
- Goldbach, H.E., Blaser-Grill, J., Lindemann, N., Porzelt, M., Hörmann, C., Lupp, B. and Gessner, B. 1991.** Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic process. *Current Topics in Plant Biochemical Physiology* **10**: 195-220.
- Gomez-Rodriguez M.V., Luna del Castillo de D. and Alvarez-Tinaut M.C. 1987.** The evolution of glucose-6P-dehydrogenase activities and the ortho-diphenolic content of sunflower leaves cultivated under different boron treatments. *Journal of Plant Nutrition* **10**: 2211-2229.
- Grande, M., Torres, P., Piera, F. and Bellido, S.I. 1992.** Triterpenoides from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry* **31**: 1826-1828.
- Grime J.P. 1977.** Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* **111**: 1169- 1194.
- Hahlbrock, K. 1981.** Flavonoids. *In: Biochemistry of Plants*, Stumpf P.K. and Conn E.E. (eds.), Vol. 7, pp. 425-456, Academic Press, New York.
- Hall, A.B., Balum, U. and Fites, R.C. 1982.** Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. debris on seed germination. *American Journal of Botany* **69**: 776-783.
- Hanson, K.R. and Havir, E.A. 1981.** Phenylalanine ammonia-lyase. *In: The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Secondary Plant Products, Conn.

- Harborne, J.B. 1997.** Biochemical Plant Ecology. *In: Plant Biochemistry*, Dey P.M. and Harborne J.B. (eds.), pp. 503-529, Academic Press, London.
- Harborne, J.B. 1993.** Introduction to Ecological Biochemistry, 4th ed., Academic Press, New York.
- Harborne, J.B. 1989.** General procedures and measurement of total phenolics. *In: Methods in Plant Biochemistry*, Harborne J.B. (ed.), Vol. 1, pp. 1-28, Academic Press, London.
- Harborne, J.B. 1973.** Phenolic compounds. *In: Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall Ltd. pp. 33-88.
- Heldt, H.-W. 1997.** Phenylpropanoids. *In: Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press.
- Herms, D.A. and Mattson, W.J. 1992.** The dilemma of plants: To grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**: 283- 330.
- 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.
- Horvath, D.M. and Chua, N.-H. 1996.** Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Molecular Biology* **31**: 1061-1072.
- Hu, H., Penn, S.G., Lebrilla, C.B. and Brown, P.H. 1997.** Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. *Plant Physiology* **113**: 649-655.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Paldi, E. 1998.** Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* **208**: 175-180.
- Jones, C.G. and Hartley, S.E. 1999.** A protein competition model of Phenolic allocation. *Oikos* **86**: 27-44.
- Καββάδας Α. Σ. 1956.** Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Αθήναι. Τόμος Δ.
- Καραμπουρνιώτης Γ. 1999.** Οι Δευτερογενείς Μεταβολίτες. Σημειώσεις Μεταπτυχιακού επιπέδου.
- Καραμπουρνιώτης Γ. 1998.** Η Άμυνα των φυτών. Σημειώσεις Μεταπτυχιακού επιπέδου.

- Karabourniotis, G., Kofidis, G., Fasseas, C., Liakoura, V. and Drossopoulos, I. 1998.** Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *American Journal of Botany* **85**: 1007-1012.
- Karabourniotis, G., Kyparissis, A. and Manetas, Y. 1993.** Leaf hairs of *Olea europaea* protect underlying tissues against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Environmental and Experimental Botany* **33**: 341-345.
- Karabourniotis, G., Papadopoulos, K., Papamarkou, M. and Manetas, Y. 1992.** Ultraviolet-B radiation absorbing capacity of leaf hairs. *Physiologia Plantarum* **86**: 414-418.
- 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.
- Kennedy, C.W. and Bush, L.P. 1983.** Effect of environmental and management factors on the accumulation of N-acetyl and N-formyl loline alkaloids in tall fescue. *Crop Science* **23**: 547-552.
- Kim, S.-R., Kim, Y. and An, G. 1993.** Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (*nos*) promoter. *Plant Physiology* **103**: 97-103.
- Kobayashi, M. and Matoh, T. 1997.** In vitro reconstruction of the boron-polysaccharide complex purified from cultured tobacco BY-2 cells. In: Boron in Soils and Plants, Bell R.W. and Rerkasem B. (eds.), pp. 237-241, Kluwer.
- Kobayashi, M., Matoh, T. and Azuma J. 1996.** Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiology* **110**: 1017-1020.
- Koepe D.E., Southwick L.M. and Bittell J.E. 1976.** The relationship of tissue chlorogenic acid concentrations and leaching of phenolics from sunflowers grown under varying phosphate nutrient conditions. *Canadian Journal of Botany* **54**: 593-599.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. 1994.** The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *Bioessays* **16**: 123-132.
- Koge, M. 1978.** Comparative physiological studies on boron in plant nutrition. IV. Effects of boron on the incorporation of radioactive substances into tomato root protein. *Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi* **49**: 200-203.

- Lamarre, M. 1983.** Influence de la fertilization N, P et K sur la composition chimique du tabac a cigarette. *Canadian Journal of Plant Science* **63**: 523-529.
- Lamb, C.G., Lawton M.A., Dron M. and Dixon R.A. 1989.** Signals and transduction mechanisms for activation of plant defences against microbial attack. *Cell* **56**: 215-224
- Lancaster, P.A. and Brooks, J.E. 1983.** Cassava leaves as human food. *Economic Botany* **37**: 331-348.
- Larque-Saavedra, A. 1978.** The antitranspirant effect of acetylsalicylic acid on *Phaseolus vulgaris* L. *Physiologia Plantarum* **43**: 126-128.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S. and Ryals, J. 1994.** Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell* **6**: 581-588.
- Lehman R. H. and Rice E.L. 1972.** Effect of deficiencies of nitrogen, potassium and sulfur on chlorogenic acids and scopolin in sunflower. *The American Midland Naturalist* **87**: 71-80.
- Leon, J., Yalpani, N., Lawton, M.A. and Raskin, I. 1993.** Salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *In: Plant signals in interactions with other organisms*, Schultz J. and Raskin I. (eds.) pp. 262-265 Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.
- Leslie, C.A. and Romani, R.J. 1986.** Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Reports* **5**: 144-146.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. 1993.** Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y. and Dong, X. 1999.** Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SN11, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* **98**: 329-339.
- Liakoura, V., Stefanou, M., Manetas, Y., Cholevas, C. and Karabourniotis, G. 1997.** Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environmental and Experimental Botany* **38**: 223-229.
- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. 1983.** Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **11**:591-592.

- Lois, R. 1994.** Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* **194**: 498-503.
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. 1992.** Chemistry and biology of boron. *BioFactors* **3**: 229-239.
- Lovatt, C.J., Albert, L.S. and Trembley, G.C. 1981.** Synthesis and catabolism of uridine nucleotides in boron-deficient squash roots. *Plant Physiology* **68**: 1389-1394.
- Lukaszewski, K.M. and Blevins, D.G. 1996.** Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash plants may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiology* **112**: 1-6.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raskin, I. 1990.** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004.
- Maleck, K. and Dietrich, R.A. 1999.** Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science* **4**: 215-219.
- Maleck, K. and Lawton, K. 1998.** Plant strategies for resistance to pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 208-213.
- Manetas, Y., Grammatikopoulos, G. and Kyparissis, A. 1998.** The use of the portable, non-destructive, SPAD-502 (Minolta) chlorophyll meter with leaves of varying trichome density and anthocyanin content. *Journal of Plant Physiology* **153**: 513-516.
- Maoz, M., Kashman, Y. and Neeman, I. 1999.** Isolation and identification of a new antifungal sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Planta Medica* **65**: 281-282.
- Markham, K. R. 1982.** Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.
- Marshner, H. 1995.** Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, London.
- 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.
- Mattson, WJ. JR. 1980.** Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**: 119- 161.

- Mauch-Mani, B. and Métraux, J.-P. 1998.** Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* **82**: 535-540.
- McBee, G.G. and Miller, F.R. 1980.** Hydrocyanic acid potential in several sorghum breeding lines as affected by nitrogen fertilization and variable harvests. *Crop Science* **20**: 232-234.
- Mc Caskill, D. and Croteau, R. 1998.** Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissue in plants. *Nature Biotechnology* **17**: 31-36.
- McDonald, R.C. Manley, T.R., Barry, T.N., Forss, D.A. and Sinclair, A.G. 1981.** Nutritional evaluation of kale (*Brassica oleraceae*) diets. 3. Changes in plant composition induced by soil fertility practices, with special reference to SMCO and glucosinolate concentrations. *Journal of Agricultural Science* **97**: 13-23.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B. 1990.** Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006.
- Μιλτιάδου Δ., Σταυριανάκου Σ., Καραμπουρνιώτης Γ.** Οι μη αδενώδεις τρίχες συνεισφέρουν στη χημική άμυνα των φύλλων έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων. 7ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Βοτανικής Εταιρείας, Αλεξανδρούπολη, Οκτώβριος 1998.
- Murphy, A.M., Chivasa, S., Singh, D.P. and Carr, J.P. 1999.** Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in Plant Science* **4**: 155-160.
- Nicholson, R.L. and Hammerschmidt, R. 1992.** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. **30**: 369-389.
- Noppakoonwong, R.N., Rerkasem, B., Bell, R.W., Dell, B. and Loneragan, J.F. 1997.** Prognosis and diagnosis of boron deficiency in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) in the field by using plant analysis. *In: Proceedings of Boron in Soils and Plants*, Bell R.W. and Rerkasem, B. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Phillips, D.A. and Kapulnik, Y. 1995.** Plant isoflavonoids, pathogens and symbiots. *Trends in Microbiology* **3**: 58-64.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. 1999.** Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science* **4**: 52-58.

- 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.
- Poulton, J.E. 1990.** Cyanogenesis in plants. *Plant Physiology* **94**: 401-404.
- Powers P.P. and Woods W.G. 1997.** The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant and Soil* **193**: 1-13.
- Rai, V.K., Sharma, S.S. and Sharma, S. 1986.** Reversal of ABA-induced stomatal closure by phenolic compounds. *Journal of Experimental Botany* **37**: 129-134.
- Raskin, I. 1992.** Role of salicylic acid in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 439-463.
- Raskin, I., Turner, I. and Melander, W.R. 1989.** Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 2214-2218.
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R. and Meeuse, B.D.J. 1987.** Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* **237**: 1545-1546.
- Reyes-Chilpa, R., Viveros-Rodriguez, N., Gomez-Garibay, F. and Alavez-Solano, D., 1995.** Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology* **21**: 455-463.
- Rhoads, D.M. and McIntosh, L., 1993.** The salicylic acid-inducible alternative oxidase gene *aox1* and genes encoding pathogenesis-related proteins share regions of sequence similarity in their promoters. *Plant Molecular Biology* **21**: 615-624.
- Robbertse, P.J., Lock, J.J., Stoffberg, E. and Coetzer, L.A. 1990.** Effect of boron on directionality of pollen tube growth in *Petunia* and *Agapanthus*. *South African Journal of Botany* **56**: 487-492.
- Robertson, G.A. and Loughman, B.C. 1974.** Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. *New Phytologist* **73**: 291-298.
- Rozema, J., Staaij, J.v.d., Björn, L.-O. and Baker, N.d. 1999.** Depletion of stratospheric ozone and solar UV-B radiation: Evolution of land plants, UV-screens and functions of polyphenolics. In: *Stratospheric Ozone Depletion: The Effects of Enhanced UV-B Radiation on Terrestrial Ecosystems*, Rozema J. (ed.), pp. 3-19, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. and Hunt, M.D. 1996.** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**: 1809-1819.

- Sanz, J.F., Ferrando, C. and Marco, J.A. 1991.** Oxygenated nerolidol esters and eudesmane acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry* **33**(11): 3653-3655.
- Sasse, F., Heckenberg, U. and Berlin, J. 1982.** Accumulation of beta-carboline alkaloids and serotonin by cell cultures of *Peganum harmala* L. I. Correlation between plants and cell cultures and influence of medium constituents. *Plant Physiology* **69**: 400-404.
- Seigler, D.S. 1977.** Primary roles for secondary compounds. *Biochemical Systematics and Ecology* **5**: 195- 199.
- Seigler, D.S. 1998.** Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers.
- Sharma, Y.J., Leon, J., Raskin, I. and Davis, K.R. 1996.** Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 5099-5104.
- Shain, L. 1995.** Stem defence against pathogens. *In*: Plant stems: Physiology and functional morphology, Cartuer B.L. (ed). Academic Press N.Y.
- Shelp, B.J. 1990.** The influence of boron nutrition on nitrogen partitioning in broccoli plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **21**: 49-60.
- Shelp, B.J. 1988.** Boron mobility and nutrition in broccoli (*Brassica oleracea* var. italica). *Annals of Botany* **61**: 83-91.
- Shirley, B.W. 1996.** Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science* **1**: 377-382.
- Shkol'nik, M.Y. 1984.** Trace elements in plants. *In*: Developments in Crop Science (6), pp. 68-109, Elsevier, New York.
- Shulaev, V., Silverman, P. and Raskin, I. 1997.** Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* **385**: 718-721.
- Skaltsa, H., Vercokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G. and Manetas, Y. 1994.** UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry* **37**: 987-999.
- Smith, C.M. 1989.** Plant resistance to insects. Wiley, New York.
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E.J., Midland, S.L., Sims, J.J. and Keen, N.T. 1998.** Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanin ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiology* **116**: 231-238.

- Smyth, D.A. and Dugger, W.M. 1980.** Effects of boron deficiency on ^{86}Rb uptake and photosynthesis in the diatom, *Cylindrotheca fusiformis*. *Plant Physiology* **66**: 692-695.
- Spletzer, M.E. and Enyedi, A.J. 1999.** Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* **89**: 722-727.
- Stephanou, M. and Manetas, Y. 1995.** Allelopathic and water conserving functions of leaf epicuticular exudates in the Mediterranean shrub *Dittrichia viscosa*. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 755-759.
- Stephanou, M. and Manetas, Y. 1997a.** The effects of seasons, exposure, enhanced UV-B radiation and water stress on leaf epicuticular and internal UV-B absorbing capacity of *Cistus creticus*: a Mediterranean field study. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1977-1985.
- Stephanou, M. and Manetas, Y. 1997b.** Ultraviolet-B radiation effects on the Mediterranean ruderal *Dittrichia viscosa*. *Plant Ecology* **128**: 109-112.
- Stephanou, M. and Manetas, Y. 1997c.** Seasonal variations in the UV-B absorbing capacity and allelopathic potential of *Dittrichia viscosa* leaf rinsates. *Canadian Journal of Botany* **75**: 1371-1374.
- Stewart, G.R. and Lahrer, F. 1980.** Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. *In: The Biochemistry of Plants*, vol. 5, Amino acids and derivatives. Mifflin, B.J. (eds) pp. 609-635. Academic Press, New York.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Métraux, J.-P. 1997.** Systemic acquired resistance. *Annual Reviews in Phytopathology* **35**: 235-270.
- Strack, D. 1997.** Phenolic metabolism. *In: Plant Biochemistry*, P.M. Dey and J.B. Harborne (eds.), pp. 387-416, Academic Press, London.
- Swain, T., 1977.** Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 479-501.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998.** Plant defenses: Surface protectants and secondary metabolites. *In: Plant Physiology* 2nd ed., pp. 347-376, Sinauer Associates, Inc.
- Takasaki, M., Kawaguchi, S., Kobayashi, M., Takabe, K. and Matoh, T. 1997.** Immunocytochemistry of the borate-rhamnogalacturonan II complex in cell walls of radish roots. *In: Boron in Soils and Plants*, Bell, R.W. and Rerkasem, B (eds), pp. 243-249. Kluwer Academic Publishers.

- Tevini, M. 1994.** UV-B effects on terrestrial plants and aquatic organisms. *Progress in Botany* **55**: 174-190.
- Tevini, M. 1993.** Effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial plants. *In: UV-B radiation and ozone depletion*, M. Tevini (ed.), pp. 125-153. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Uknes, S., Vernooij, B., Morris, S., Chandler, D., Steiner, H.-Y., Specker, N., Hunt, M., Neuenschwander, U., Lawton, K., Starrett, M., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Görlach, J., Lanahan, M., Salmeron, J., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. 1996.** Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. *New Phytologist* **133**: 3-10.
- Ulubelen, A., Öksüz, S. and Gören, N. 1987.** Sesquiterpene acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry* **26**(4): 1223-1224.
- Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1998.** H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* **3**: 330-334.
- Vaughan, D. and Ord, B.G. 1990.** Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *Journal of Science of Food and Agriculture* **52**: 289-299.
- Vernooij, B., Uknes, S., Ward, E. and Ryals, J. 1994.** Salicylic acid as a plant molecule in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 275-279.
- Walker, D.A. 1993.** Polarographic measurement of oxygen. *In: Photosynthesis and Production in a changing environment*, Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhar-Nordenkamp H.R., Leegood R.C. and Long S.P. (eds). Chapman and Hall, London.
- Wallace, G. and Fry, S.C. 1994.** Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology* **151**: 229-267.
- Waller, G.R. and Nowacki, E.K. 1978.** Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Press, New York.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.-P. and Ryals, J.A. 1991.** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **3**: 1085-1094.
- Waterman, P.G. and Mole, S. 1994.** Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Oxford UK.

- Werker, E. 2000.** Trichome diversity and development. *In: Advances in botanical research. Incorporating advances in plant pathology. Plant trichomes*, Hallahan D.L. and Gray J.C. (eds). Vol 31, pp. 1-36. Academic Press.
- Werker E. and Fahn A. 1981.** Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.-Development, ultrastructure and secretion. *Botanical Gazette* **142**: 461-476.
- Whetten, R. and Sederoff, K. 1995.** Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 1001-1013.
- White, R.F. 1979.** Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410-412.
- Williams, J.D. 1972.** Effects of time of day, moisture stress, and frosting on the alkaloid content of *Phalaris tuberosa*. *Australian Journal of Agricultural Research* **23**: 611-621.
- Wojtaszek, P. 1997.** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681-692.
- Wolfson, J.L. 1982.** Developmental responses of *Pieris rapae* and *Spodoptera eridania* to environmentally induced variation in *Brassica nigra*. *Environmental Entomology* **11**: 207-213.
- Wollenweber, E. 1985.** Exudate flavonoids in higher plants in arid regions. *Plant Systematic Evolution*. **150**: 83-88.
- Wollenweber, E., Mayer, K. and Roitman, J.N. 1991.** Exudate flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry* **30**: 2445-2446.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J. and Raskin, I. 1994.** Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogen-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372-376.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M.A. and Raskin, I. 1993.** Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* **103**: 315-321.
- Zhang, S. and Klessig, D.F. 1997.** Salicylic acid activates a 48-kD kinase in tobacco. *The Plant Cell* **9**: 809-824.