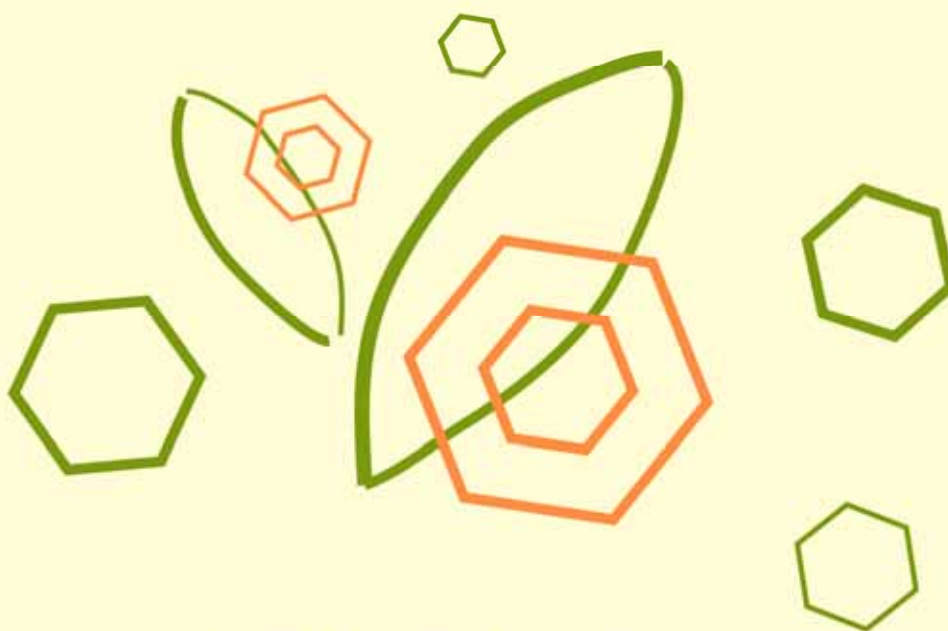


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**Η ΧΡΗΣΗ ΒΟΡΟΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΩΝ ΕΠΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΠΕΝΙΑΣ ΒΟΡΙΟΥ
ΣΤΟ ΦΥΤΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*Olea europaea* L.)**



ΒΑΣΙΛΕΙΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΗ

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

ΑΘΗΝΑ 2007

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Η χρήση βορονικών οξέων για τη μελέτη των επιπτώσεων της
τροφοπενίας βορίου στο φυτό της ελιάς (*Olea europaea* L.)

ΒΑΣΙΛΕΙΑ Δ. ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΗ

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

ΑΘΗΝΑ 2007

Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης εγκρίθηκε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνοψης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 8/19-12-2006). Η πενταμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ 13/15-02-2006.

ΠΕΝΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Παναγιώτης Κατινάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Δημήτριος Μπουράνης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)

Χριστίνα Κιτσάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια (Μέλος)

Γεώργιος Αϊβαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	5
Πρόλογος	7
Εισαγωγή	9
I. Ανόργανη διατροφή φυτών	9
I.1. Βασικές αρχές.....	9
I.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος.....	10
I.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού	13
I.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων.....	14
I.5. Τροφopenίες θρεπτικών στοιχείων.....	16
I.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων	16
I.5.2. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη και τον πρωτογενή μεταβολισμό των ανώτερων φυτών	16
I.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στο δευτερογενή	17
II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών	18
II.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου και κυρίαρχα χημικά είδη στα φυτικά κύτταρα	18
II.2. Μορφές εδαφικού βορίου, πρόσληψη από το ριζικό σύστημα των ανώτερων φυτών και πρωτογενής διανομή του βορίου.....	20
II.3. Κατανομή του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο.....	21
II.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού.....	21
II.5. Ο ρόλος του βορίου στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ανώτερων φυτών	22
II.5.1. Το βόριο συμμετέχει στη δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων	23
II.5.2. Το βόριο αποτελεί παράγοντα σταθερότητας και λειτουργικότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης	26
II.5.3. Ο ρόλος του βορίου στο μεταβολισμό των φυτών.....	27
II.5.4. Ο ρόλος του βορίου στη φωτοσυνθετική λειτουργία και τη διανομή σακχάρων	30
II.5.5. Ο ρόλος του βορίου στο δευτερογενή μεταβολισμό	31
III. Το φυτό της ελιάς	33
III.1. Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς.....	33
III.2. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της ελιάς.....	33
III.3. Η επίδραση της έλλειψης βορίου στην ανάπτυξη και φυσιολογία της ελιάς.....	35
Σκοπός της εργασίας	37
Υλικά και Μέθοδοι	39
I. Πειράματα με υδροπονική καλλιέργεια φυταρίων ελιάς	39
I.1. Φυτικό υλικό και περιγραφή των συνθηκών καλλιέργειας	39
I.1.1. Προετοιμασία του φυτικού υλικού και του υποστρώματος καλλιέργειας.....	39
I.1.2. Περιγραφή του συστήματος πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας	39
I.1.3. Συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας	41
I.2. Πειραματική πορεία	42
I.2.1. Χρονοδιάγραμμα πειράματος, κατηγορίες δειγμάτων και πειραματικοί χειρισμοί	42
I.2.2. Παράμετροι ανάπτυξης και βιοχημικές παράμετροι.....	43
I.2.3. Συγκέντρωση βορίου	43
I.2.4. Ανάλυση φαινολικών	45
II. Πειράματα in vitro για τη διερεύνηση του ρόλου των φαινολικών συστατικών στη φυσιολογία του βορίου	46

Περιεχόμενα

II.1. Προσδιορισμός φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών χαρακτηριστικών ακτεοσίδη και ολευροπαΐνης	46
II.2. Επίδραση βορονικού οξέος στο φυτικό υλικό	46
II.2.1. Επίδραση βορονικού οξέος σε ολόκληρα φυτά	46
II.2.2. Επίδραση βορονικού οξέος σε δίσκους φύλλων	47
Αποτελέσματα	49
I.1. Πείραμα επιβολής τροφοπενίας βορίου σε φυτάρια ελιάς υπό συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας	49
I.1.1. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα	49
I.1.2. Συγκέντρωση ολικών διαλυτών φαινολικών στα φύλλα	50
I.1.3. Συγκέντρωση του φαινυλοαιθανοειδούς γλυκοσίτη ακτεοσίδη και του σεκοϊριδοειδούς ολευροπαΐνης στα φύλλα	50
I.2. Πείραμα επίδρασης βορονικού οξέος σε ολόκληρα φυτά	51
I.3. Πείραμα επίδρασης βορονικού οξέος σε δίσκους φύλλων	52
I.3.1. Συγκέντρωση βορονικού οξέος στον κυτταρικό χυμό των δίσκων φύλλων μετά την επίδραση του 3-NBA	53
I.3.2. Συγκέντρωση φαινολικών σε δίσκους φύλλων μετά την επίδραση του 3-NBA	54
I.3.3. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στο αλκαλικό υδρόλυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων δίσκων φύλλων μετά την επίδραση του 3-NBA	54
Συζήτηση	57
Βιβλιογραφία	63
Περίληψη	77

Πρόλογος

Η Φυσιολογία Φυτών αποτελεί ένα σημαντικό και ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο της Γεωπονικής Επιστήμης. Έτσι, η εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της φυσιολογίας της ελιάς, ένα φυτό ευρύτατα καλλιεργούμενο στη χώρα μας (συμπεριλαμβανόμενης και της ιδιαίτερη πατρίδας μου) με ξεχωριστή οικονομική και βιολογική αξία.

Θα ήθελα, λοιπόν, να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Καραμπουρνιώτη πρώτα από όλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την ανάθεση, την επίβλεψη και τη διόρθωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, καθώς και για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Παναγιώτη Κατινάκη και κ. Δημήτριο Μπουράνη και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Χρίστينا Κιτσάκη και κ. Γεώργιο Αϊβαλάκι για τη συμμετοχή τους στην Πενταμελή Εξεταστική Επιτροπή και τη διόρθωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Μεταδιδάκτορα Ερευνητή Γεώργιο Λιακόπουλο για την καθοδήγηση και απεριόριστη βοήθειά του, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε, καθώς και για τη σημαντική συμπαράσταση και φιλία του.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Σωτηρία-Βασιλική Σταυριανάκου και τον Διδάκτορα και επιστημονικό μέλος του εργαστηρίου κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο για τη βοήθεια και τις επιστημονικές συμβουλές τους, καθώς και την πάντα ευχάριστη διάθεσή τους μέσα στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον προπτυχιακό φοιτητή Μανόλη Κοντουδάκη για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της πειραματικής πορείας και για τη σημαντική βοήθειά του μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την κα. Νούλη Σιψά, την υποψήφια Διδάκτορα Γεωργία Τοουλάκου, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βαρβάρα Ψαρούδη, τον προπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Παπαχρήστο και τους γεωπόνους Βαγγέλη Καρβώνη και Ασπασία Κλουβάτου για τη βοήθειά τους και το ευχάριστο κλίμα που καλλιέργησαν κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Κλείνοντας, ευχαριστώ την οικογένειά μου, τους γονείς και τον αδερφό μου, για την υπομονή και συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

Εισαγωγή

I. Ανόργανη διατροφή φυτών

I.1. Βασικές αρχές

Τα ανώτερα φυτά ως αυτότροφοι οργανισμοί είναι ικανά να εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης και ταυτόχρονα να απορροφούν δομικά μόρια από το εδαφικό περιβάλλον, κυρίως νερό και ανόργανα άλατα. Μέσω των παραπάνω διεργασιών συνθέτουν όλα τα οργανικά συστατικά των κυττάρων τους. Αντίθετα, η ύπαρξη των ετερότροφων οργανισμών εξαρτάται από την κατανάλωση των πλούσιων σε ενέργεια οργανικών ουσιών οι οποίες έχουν συντεθεί από τα φυτά. Για το λόγο αυτό οι ανώτεροι φυτικοί οργανισμοί αποτελούν τη βάση της τροφικής αλυσίδας των έμβιων όντων.

Τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία έχουν ιδιαίτερη σημασία για την κανονική ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών καθώς δεν καθορίζουν μόνο τις τελικές αποδόσεις των καλλιεργούμενων φυτών, αλλά, επιπλέον, σοβαρές ελλείψεις σε ένα ή περισσότερα από αυτά μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την επιβίωσή τους. Το σύνολο των θρεπτικών στοιχείων του φυτικού σώματος αντιστοιχεί στο 10% της συνολικής βιομάζας, ενώ το υπόλοιπο αντιστοιχεί στο νερό. Ωστόσο, όλα τα ανόργανα στοιχεία που ανιχνεύονται κατά την ανάλυση του φυτικού σώματος δεν αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για το φυτό, επειδή είναι δυνατόν να προσλαμβάνονται από αυτό όταν βρίσκονται σε αφθονία στο περιβάλλον ανάπτυξής του. Έτσι, απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία θεωρούνται μόνο όσα εξασφαλίζουν την ομαλή ανάπτυξη του φυτού και συμμετέχουν στο φυτικό μεταβολισμό. Σύμφωνα με τους Arnon and Stout (1939), για να θεωρηθεί ένα θρεπτικό στοιχείο απαραίτητο, πρέπει να πληρεί τις παρακάτω τρεις βασικές προϋποθέσεις:

-
- a) Το φυτό να μην μπορεί να αναπτυχθεί και να συμπληρώσει το βιολογικό του κύκλο χωρίς την παρουσία του στοιχείου αυτού,
 - β) το στοιχείο να μην μπορεί να αντικατασταθεί από άλλο στοιχείο και
 - γ) το στοιχείο να συμμετέχει στη σύνθεση της ξηρής ουσίας και η δράση του να είναι άμεση.
-

Τα θρεπτικά στοιχεία τα οποία εκπληρούν τις προϋποθέσεις αυτές και θεωρούνται απαραίτητα για τη θρέψη των φυτών ανέρχονται σε 16. Εκτός από τον άνθρακα (C), το υδρογόνο (H) και το οξυγόνο (O), απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία θεωρούνται: το άζωτο (N), ο φωσφόρος (P), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), το θείο (S), ο σίδηρος (Fe), το μαγγάνιο (Mn), ο ψευδάργυρος

Εισαγωγή

(Zn), ο χαλκός (Cu), το μολυβδαίνιο (Mo), το βόριο (B) και το χλώριο (Cl). Από το 1988 το νικέλιο προστέθηκε στον κατάλογο των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων για τα ανώτερα φυτά, αυξάνοντας τον αριθμό τους σε 17. Ορισμένα άλλα ανόργανα στοιχεία θεωρούνται χρήσιμα ή και απαραίτητα σε ιδιαίτερες ομάδες ανώτερων ή κατώτερων φυτών όπως το νάτριο (Na), το κοβάλτιο (Co), το βανάδιο (V), το πυρίτιο (Si), το σελήνιο (Se), το γάλλιο (Ga), το αργίλιο (Al), το ιώδιο (I) και το τιτάνιο (Ti). Τα θρεπτικά αυτά στοιχεία επειδή θεωρούνται απαραίτητα σε ορισμένα μόνο φυτικά είδη ή επειδή η παρουσία τους είναι ευνοϊκή αλλά όχι καθοριστική για την ανάπτυξη ορισμένων φυτικών ειδών, δεν περιλαμβάνονται στον κατάλογο των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων. Τα στοιχεία αυτά αποτελούν την ομάδα των χρήσιμων ή ευεργετικών θρεπτικών στοιχείων. Τα στοιχεία λανθάνιο (La) και δημήτριο (Ce) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μείγματα για διαφυλλικούς ψεκασμούς σε μεγάλης κλίμακας πειράματα στην Κίνα, ενώ έχει αναφερθεί και η επίδραση βαρέων μετάλλων όπως του καδμίου, χρωμίου, μόλυβδου και υδραργύρου στα ανώτερα φυτά. Τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, ανάλογα με τις σχετικές ποσότητες που απαιτούνται στα φυτά, χωρίζονται σε δύο ομάδες: α) τα μακροστοιχεία και β) τα ιχνοστοιχεία ή μικροστοιχεία. Τέλος, τα θρεπτικά στοιχεία ταξινομούνται, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, σε μεταλλικά θρεπτικά στοιχεία, όπως είναι το κάλιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μολυβδαίνιο και το νικέλιο και σε μη μεταλλικά ιόντα, όπως είναι το άζωτο, το θείο, ο φωσφόρος, το βόριο και το χλώριο (Δροσόπουλος, 1998).

1.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος

Οι τροφικές απαιτήσεις των φυτικών οργανισμών ικανοποιούνται με την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων τόσο από την ατμόσφαιρα (κυρίως υπό τη μορφή του CO₂) όσο και από το εδαφικό περιβάλλον. Το τελευταίο αποτελεί τη βάση της ανόργανης διατροφής των φυτών. Τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους απορροφώνται στην πλειοψηφία τους υπό μορφή ιόντων (πίνακας 1), ενώ ορισμένα από αυτά απαντούν στο εδαφικό διάλυμα και απορροφώνται από τα φυτά υπό συγκεκριμένες μόνο χημικές μορφές. Για παράδειγμα, το άζωτο απορροφάται κυρίως ως ανόργανο νιτρικό ιόν (NO₃⁻) και σε μερικές περιπτώσεις ως αμμωνιακό ιόν (NH₄⁺), ενώ ο φωσφόρος κυρίως με τη μορφή ιόντων H₂PO₄⁻ και δευτερευόντως ως HPO₄⁻², ανάλογα με το pH του εδάφους (η απορρόφηση των ανιόντων H₂PO₄⁻ είναι ταχύτερη σε χαμηλά pH, ενώ αυτή των HPO₄⁻² κυριαρχεί σε υψηλότερα pH). Το θείο απαντά στο έδαφος υπό τη μορφή κυρίως σιδηροσουλφιδίων, αλλά και στοιχειώδους θείου. Παρ' όλο ότι το ατμοσφαιρικό SO₂ μπορεί να προσληφθεί από τα εναέρια μέρη των ανώτερων φυτών, την κυριότερη πηγή θείου αποτελούν τα

ανιόντα SO_4^{-2} του εδάφους τα οποία προσλαμβάνονται από το ριζικό σύστημα. Ο σίδηρος απορροφάται με τη μορφή του ιόντος Fe^{+2} , ενώ οι χηλικές ενώσεις του αποτελούν τις περισσότερο διαλυτές μορφές του σιδήρου στο έδαφος και στο εδαφικό διάλυμα. Ο χαλκός απορροφάται με τη μορφή του δισθενούς ιόντος Cu^{+2} και σχηματίζει χηλικές ενώσεις με τα χουμικά και φουλβικά οξέα της οργανικής ουσίας, ενώ σε υγρά και κακώς αεριζόμενα εδάφη ο Cu^{+2} ανάγεται σε ασταθή και αδιάλυτο Cu^+ . Ο ψευδάργυρος προσλαμβάνεται υπό τη μορφή δισθενούς κατιόντος Zn^{+2} , ενώ σε υψηλότερα pH υπό μορφή μονοσθενούς κατιόντος (ZnOH^+). Το βόριο απαντά στα εδαφικά διαλύματα (σε τιμές του pH από 5 έως 9) με τη μορφή του ασθενούς οξέος (H_3BO_3) ή B(OH)_3 , με την οποία κυρίως απορροφάται από τις ρίζες (Δροσόπουλος, 1992 και 1998), ενώ σε pH ανώτερα του 7 έως 8 το βορικό οξύ προσλαμβάνει υδροξύλια από το νερό και σχηματίζει το βορικό ανιόν $[\text{B(OH)}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{B(OH)}_4^- + \text{H}_3\text{O}^+]$.

Πίνακας 1. Τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία των ανώτερων φυτών και οι επικρατέστερες μορφές με τις οποίες απορροφούνται.

Στοιχείο	Συμβολισμός	Μορφή απορρόφησης
Μακροστοιχεία		
Υδρογόνο	H	H_2O
Άνθρακας	C	CO_2
Οξυγόνο	O	O_2, CO_2
Άζωτο	N	$\text{NO}_3^-, \text{NH}_4^+$
Κάλιο	K	K^+
Ασβέστιο	Ca	Ca^{+2}
Μαγνήσιο	Mg	Mg^{+2}
Φωσφόρος	P	$\text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{HPO}_4^{-2}, \text{PO}_4^{-3}$
Θείο	S	$\text{SO}_4^{-2}, \text{SO}_3^{-2}$
Ιχνοστοιχεία		
Χλώριο	Cl	Cl^-
Βόριο	B	$\text{BO}_3^{-3}, \text{HB}_4\text{O}_7^-$
Σίδηρος	Fe	Fe^{+2}
Μαγγάνιο	Mn	Mn^{+2}
Ψευδάργυρος	Zn	Zn^{+2}
Χαλκός	Cu	Cu^{+2}
Νικέλιο	Ni	Ni^{+2}
Μολυβδαίνιο	Mo	MoO_4^{-2}

Εισαγωγή

Η παροχή θρεπτικών στοιχείων στο ριζικό σύστημα των φυτών επηρεάζεται από τη στερεά, την υγρή και την αέρια φάση του εδάφους. Η υγρή φάση του εδάφους αποτελείται από το εδαφικό διάλυμα, το οποίο αποτελεί ένα αραιό διάλυμα θρεπτικών στοιχείων κατιόντων και ανιόντων, η σύνθεση και η συγκέντρωση του οποίου μεταβάλλεται καθώς εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από την ποσότητα του νερού που υπάρχει στο έδαφος. Ο όγκος του εδάφους της εδαφικής περιοχής πλησίον του ριζικού συστήματος, από το εδαφικό διάλυμα της οποίας πραγματοποιείται η απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων, ονομάζεται όγκος ή ζώνη απορρόφησης. Το εδαφικό διάλυμα περιέχει τα άμεσα διαθέσιμα θρεπτικά στοιχεία σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις και, επομένως, η απορρόφησή τους προκαλεί την εξάντληση της υγρής φάσης, η οποία εμπλουτίζεται εκ νέου σε θρεπτικά στοιχεία από τη στερεά φάση. Σε αντίθεση με την περιορισμένη και ευμετάβλητη σύνθεση του εδαφικού διαλύματος, τα κολλοειδή συστατικά του εδάφους αποτελούν τη μεγαλύτερη αποθήκη θρεπτικών στοιχείων, η οποία βρίσκεται πάντα υπό συνθήκες στοιχειομετρικής ισορροπίας με το εδαφικό διάλυμα. Συνεπώς, η ελάττωση της συγκέντρωσης των ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα, λόγω απορρόφησης από το ριζικό σύστημα των φυτών, προκαλεί απόσπαση ιόντων από την περιοχή των κολλοειδών και διάχυσή τους προς το θρεπτικό διάλυμα, ενώ ταυτόχρονα ιόντα H^+ , τα οποία εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών, διαχέονται προς τα κολλοειδή και αντικαθιστούν στις θέσεις δέσμευσης τα κατιόντα που εγκαταλείπουν το κολλοειδές. Η στερεά φάση του εδάφους θεωρείται η κύρια εδαφική αποθήκη, το μέγεθος της οποίας είναι συνάρτηση των αρνητικών φορτίων των κολλοειδών αργιλλοπυριτικών και ένυδρων οξειδίων συστατικών του εδάφους καθώς και της οργανικής ύλης, η οποία χάρη στην παρουσία καρβοξυλικών και φαινολικών ομάδων διαθέτει σημαντικά αρνητικά φορτία, τα οποία δεσμεύουν σημαντικές ποσότητες κατιόντων. Αντίθετα με τα κατιόντα, τα ανιόντα δεν μπορούν να δεσμευτούν από τα ομόσημα αρνητικά φορτισμένα κολλοειδή και τείνουν να εκπλυθούν από το νερό της βροχής ή να διεισδύσουν σε μεγάλο βάθος στο έδαφος, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αξιοποιηθούν από τα φυτά (Δροσόπουλος, 1992 και 1998).

Τα ιόντα του εδάφους μπορούν να εισέλθουν στη ρίζα μέσω τριών εναλλακτικών μηχανισμών:

α) Απευθείας πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων. Μπορεί να συμβεί με επαφή των ριζών με τη στερεά φάση του εδάφους, χωρίς τη μεσολάβηση του εδαφικού διαλύματος και βασίζεται στη δυνατότητα ανταλλαγής των δεσμευμένων στα κολλοειδή του εδάφους ιόντων, με ιόντα υδρογόνου, τα οποία απεκκρίνονται

από τις ρίζες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση των ιόντων των κολλοειδών και τον εμπλουτισμό τους με H^+ .

β) Μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος προς τη ρίζα. Μπορεί να συμβεί αυθόρμητα μέσω διάχυσης από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης προς μια χαμηλής συγκέντρωσης. Η ύπαρξη περιοχών με διαφορά συγκεντρώσεων οφείλεται στην απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων από τις ρίζες των φυτών με ταχύτερες υψηλότερες από αυτές της ανανέωσής τους από τις ευρύτερες εδαφικές περιοχές.

γ) Μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων μπορεί να γίνει και δια μαζικής ροής μέσω της ταχείας κίνησης του νερού προς τις ρίζες, ως αποτέλεσμα της λειτουργίας του διαπνευστικού ρεύματος. Το νερό εισέρχεται στις ρίζες ταχύτερα απ' ότι τα ιόντα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ιόντων κοντά στις ρίζες. Η συσσώρευση αυτή διευκολύνει την ανεμπόδιστη απορρόφηση των ιόντων από τις ρίζες.

Η ταχύτητα μετακίνησης των ιόντων δια μαζικής ροής είναι κατά πολύ υψηλότερη συγκριτικά με την δια διαχύσεως κίνηση (Δροσόπουλος, 1992).

1.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού

Η πρόσληψη των ιόντων είναι εντονότερη στην περιοχή κοντά στο κορυφαίο μερίστωμα της ρίζας ενώ μειώνεται δραματικά κατά μήκος του άξονα. Η πρόσληψη ενός ιόντος προϋποθέτει την κίνησή του από το εδαφικό διάλυμα προς τα διάφορα σημεία του φυτικού σώματος (είτε στο υπόγειο είτε στο υπέργειο μέρος του φυτού), πορεία η οποία περιλαμβάνει απορρόφηση από τους επιφανειακούς ιστούς της ρίζας και μετακίνηση κατά μήκος των εσωτερικών ιστών της ρίζας έως τα αγγεία του ξύλου. Η πορεία των ιόντων, δια μέσου του φλοιώδους παρεγχύματος προς το εσωτερικό της ρίζας, μπορεί να ακολουθήσει δύο εναλλακτικές οδούς:

α) Με διάχυση στον ελεύθερο χώρο της ρίζας, δηλαδή παθητική πορεία των ιόντων μέσω του αποπλάστη. Η μη μεταβολική αυτή κίνηση των ιόντων, γνωστή ως αποπλαστική κίνηση, πραγματοποιείται χωρίς τη συμβολή του κυτταροπλάσματος και αφορά σε κίνηση διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεσοκυττάρων χώρων και παρουσιάζει, συνεπώς, τη μικρότερη αντίσταση.

β) Αντίθετα, η πορεία των ιόντων μέσω του κυτταροπλάσματος και από κύτταρο σε κύτταρο, δια μέσου των πλασμοδεσμών, αποτελεί την συμπλαστική κίνηση η οποία παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη αντίσταση.

Εισαγωγή

Και οι δύο πορείες λειτουργούν ταυτόχρονα. Με την αποπλαστική κίνηση τα ιόντα διακινούνται ταχύτατα από το εξωτερικό διάλυμα μέχρι την ενδοδερμίδα της ρίζας, ενώ μέσω της συμπλαστικής κίνησης πραγματοποιείται η επιλογή των επιθυμητών ιόντων και μέσω μηχανισμών ενεργού μεταφοράς συσσωρεύονται τα ιόντα των οποίων η εξωτερική συγκέντρωση είναι χαμηλή. Η πρόσληψη των ιόντων συμβαίνει αρχικά στα κύτταρα της επιδερμίδας και τα εξωτερικά κύτταρα του φλοιού ενώ στη συνέχεια τα ιόντα κινούνται με συνδυασμό αποπλαστικής και συμπλαστικής κίνησης έως την περιοχή της ενδοδερμίδας. Ωστόσο, η δίοδος των ιόντων διαμέσου της ενδοδερμίδας απαιτεί τη μετατροπή της κίνησης από αποπλαστική σε συμπλαστική. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη της κασπαρικής λωρίδας η οποία δημιουργείται από εναποθέσεις φελίνης (σουβερίνης) στα τοιχώματα των κυττάρων της ενδοδερμίδας. Ακολουθώντας, τα ιόντα κινούνται συμπλαστικά έως και τα κύτταρα του ξυλώδους παρεγχύματος. Τέλος, φορτώνονται στα αγγεία του ξύλου είτε παθητικά μέσω διάχυσης, είτε μέσω ενεργού μεταφοράς (Δροσόπουλος, 1992 και 1998). Η μεταφορά ιόντων από τον αποπλαστικό προς τον συμπλαστικό χώρο και αντίστροφα πραγματοποιείται μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών, είτε παθητικά μέσω πρωτεϊνικών διόδων χαμηλής αντίστασης (πρωτεΐνες διευκολυνόμενης μεταφοράς και κανάλια ιόντων) λόγω ευνοϊκής διαβάθμισης ηλεκτροχημικού δυναμικού, είτε ενεργητικά μέσω φορέων. Οι φορείς εκμεταλλεύονται τη διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού, η οποία διαμορφώνεται συνήθως από τη λειτουργία αντλιών πρωτονίων (H^+ -ΑΤΡασών), μέσω των οποίων μεταφέρονται H^+ από το κυτταρόπλασμα προς τον αποπλάστη ή το χυμοτόπιο. Μια κατηγορία μεμβρανικών πρωτεϊνών, μέσω των οποίων μπορούν να μεταφερθούν μόρια αντίθετα με τη διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού, είναι οι μεταφορείς ABC. Οι πρωτεΐνες αυτές δαπανούν μεταβολική ενέργεια και ταυτόχρονα πραγματοποιούν τη μεταφορά (Rea, 2007)

Τα ιόντα από τη στιγμή που θα εισέλθουν εντός των αγγείων του ξύλου κινούνται μέσω του διαπνευστικού ρεύματος προς τα υπέργεια μέρη του φυτού. Η διαπνοή μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση και μεταφορά ιόντων από τα πρωτογενή σημεία απορρόφησης προς τα υπέργεια όργανα μέσω των αγγείων του ξύλου. Η κίνηση των ιόντων εντός των αγγείων του ξύλου γίνεται μέσω μαζικής ροής, ενώ δευτερεύουσα κίνηση (αναδιανομή) μπορεί να γίνει και μέσω του ηθμού (Δροσόπουλος, 1992).

1.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων

Τα μακροστοιχεία συμμετέχουν στην κατασκευή του φυτικού σώματος και στη δομή του μορίου των μεταβολικών προϊόντων, λαμβάνουν μέρος σε ενεργειακές μετατροπές και σχετίζονται με τη ρύθμιση ωσμωτικών παραμέτρων. Ο άνθρακας,

το υδρογόνο και το οξυγόνο αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών και αποτελούν το 94% της ξηρής ουσίας των φυτών. Εκτός όμως από τον δομικό τους ρόλο, εξασφαλίζουν και την απαιτούμενη μεταβολική ενέργεια μέσω της οξειδωτικής διάσπασης των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπών κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Επί πλέον ο άνθρακας, το υδρογόνο, το οξυγόνο, το άζωτο, ο φωσφόρος και το θείο αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών. Σε σύγκριση με τα μακροστοιχεία, τα μικροστοιχεία απαιτούνται σε περιορισμένες ποσότητες και τα περισσότερα συμμετέχουν ως προσθετικές ομάδες ή παράγοντες ενεργοποίησης διαφόρων ενζύμων. Λειτουργούν, επίσης, ως παράγοντες σταθεροποίησης της λεπτής δομής του πρωτοπλάσματος και των οργανιδίων του κυττάρου (Δροσόπουλος, 1992 και 1998).

Η κατάταξη των θρεπτικών στοιχείων με βάση το ρόλο τους έχει ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία, ωστόσο παρουσιάζει δυσκολίες διότι ορισμένα, τουλάχιστον, εξ αυτών έχουν ταυτόχρονα δομικό και λειτουργικό ρόλο. Το μαγνήσιο, για παράδειγμα, αποτελεί ένα σημαντικό κατασκευαστικό συστατικό της χλωροφύλλης, αλλά έχει και το ρόλο του συνενζυμικού παράγοντα. Το ασβέστιο, επίσης, αποτελεί σημαντικό δομικό συστατικό του δικτύου των πηκτινικών πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ ταυτόχρονα δρα ως παράγοντας μεταγωγής κυτταρικών σημάτων μέσω του συστήματος καλμοντουλίνης-ασβεστίου (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Ποσοτικά, η ελάχιστη απαίτηση για την παρουσία κάθε θρεπτικού στοιχείου στο φυτικό σώμα περιγράφεται με τον όρο οριακή συγκέντρωση. Η οριακή συγκέντρωση εξασφαλίζει την αύξηση, ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου ενός συγκεκριμένου φυτικού είδους κάτω από ορισμένες συνθήκες. Όταν η συγκέντρωση του θρεπτικού στοιχείου στο φυτικό ιστό βρίσκεται κάτω από την κρίσιμη συγκέντρωση, τότε θεωρείται ανεπαρκής και περιορίζει την αύξηση του φυτού. Στις συνθήκες αυτές το φυτό παρουσιάζει χαρακτηριστικά συμπτώματα έλλειψης, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν και στο θάνατο. Συγκέντρωση του θρεπτικού στοιχείου υψηλότερη της οριακής συμβάλλει στην παραγωγικότητα του φυτού έως ένα ανώτατο όριο. Η υπέρβαση του ανώτατου αυτού ορίου προκαλεί ανάσχεση της ανάπτυξης λόγω τοξικών φαινομένων. Στην περίπτωση των μακροστοιχείων σπάνια παρατηρούνται τοξικά επίπεδα, ωστόσο στην περίπτωση των ιχνοστοιχείων εμφανίζονται αυξημένα συχνότητα. Για ορισμένα, μάλιστα, ιχνοστοιχεία τα όρια μεταξύ ανεπάρκειας και τοξικότητας είναι πολύ στενά. Στις περιπτώσεις αυτές, η υπερβολική διαθεσιμότητά τους στα φυτά μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε τοξικότητα (Δροσόπουλος, 1998).

Εισαγωγή

1.5. Τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων

Όταν η συγκέντρωση των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων στα φυτικά κύτταρα είναι χαμηλότερη της απαιτούμενης, είτε λόγω χαμηλής συγκέντρωσής τους στο εδαφικό διάλυμα είτε λόγω αδυναμίας απορρόφησης τους, ο φυτικός οργανισμός εμφανίζει μορφολογικές και φυσιολογικές διαταραχές. Οι διαταραχές αυτές αντιπροσωπεύουν παθολογικές καταστάσεις που είναι γνωστές ως τροφοπενίες. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων τροφοπενίας είναι δυνατόν να εμφανιστεί με τη μορφή συνδρόμου λόγω της αλληλεπίδρασης των θρεπτικών στοιχείων μεταξύ τους, σε συνδυασμό με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες. Οι τροφοπενίες συνοδεύονται από την εμφάνιση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων στα διάφορα όργανα (φύλλα, μεριστώματα, καρπούς κ.λ.π.), τα οποία αίρονται με τη χορήγηση του υπό έλλειψη θρεπτικού στοιχείου (Δροσόπουλος, 1992 και 1998).

1.5.1. Αντίληψη και απάντηση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων

Η αντίδραση των φυτών στην έλλειψη θρεπτικών στοιχείων περιλαμβάνει τα τρία στάδια τα οποία εμπλέκονται στην αντιμετώπιση όλων των παραγόντων καταπόνησης (Καραμπουρνιώτης, 2003). Κατά το στάδιο της αντίληψης τα φυτικά κύτταρα αντιλαμβάνονται τα εξωτερικά ερεθίσματα (έλλειψη στοιχείου) μέσω εξειδικευμένων δεκτών, οι οποίοι μεταβάλλουν ορισμένες ιδιότητές τους, σηματοδοτώντας την έναρξη μιας ακολουθίας μηχανισμών. Το στάδιο της μεταγωγής αφορά σε όλα τα γεγονότα που μεσολαβούν από την αντίληψη του ερεθίσματος έως την εμφάνιση της απάντησης, δηλαδή περιλαμβάνει μεταβολές τόσο στην έκφραση γονιδίων όσο και σε μεταβολικό επίπεδο. Στο τελικό στάδιο εμφανίζεται η απάντηση του φυτικού οργανισμού με τη μορφή εγκλιματισμού στις νέες συνθήκες θρέψης.

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

Η ανόργανη θρέψη των ανώτερων φυτών επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα τον πρωτογενή μεταβολισμό και πιθανή έλλειψη κάποιου θρεπτικού στοιχείου έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ορισμένων λειτουργικών διαταραχών στα φυτά, όπως η δυσλειτουργία ενζυμικών συστημάτων ή η απώλεια της δομής και λειτουργικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεμβρανών (Taiz and Zeiger, 1998). Εκτός των παραπάνω, η τροφοπενία ορισμένων θρεπτικών στοιχείων επηρεάζει τη βιοσύνθεση των υδατανθράκων και των αμινοξέων.

1.5.3. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στο δευτερογενή μεταβολισμό

Παρόλο που οι επιδράσεις της θρεπτικής κατάστασης στον πρωτογενή μεταβολισμό έχουν μελετηθεί και διευκρινιστεί σε μεγάλο βαθμό, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο δευτερογενής μεταβολισμός αντιδρά στο θρεπτικό καθεστώς, έχουν εξεταστεί ελάχιστα (Aerts and Charin, 2000). Εκτός από τις γενικές μεταβολικές αντιδράσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα, τα φυτά αντιδρούν στην καταπόνηση αναπτύσσοντας και διατηρώντας υψηλές συγκεντρώσεις ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών με συγκεκριμένες ιδιότητες (Dixon and Paiva, 1995; Koricheva et al., 1998). Η συσσώρευση αρωματικών δευτερογενών μεταβολιτών στα ανώτερα φυτά, λόγω έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, είναι σύνηθες φαινόμενο (Dixon and Paiva, 1995). Ο φωτοσυνθετικά παραγόμενος οργανικός άνθρακας κατανέμεται δυναμικά στην ανάπτυξη (πρωτογενείς δομές) ή στην άμυνα (δευτερογενείς μεταβολίτες). Η κατανομή του άνθρακα στους δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελεί μια επένδυση σε δομικούς αμυντικούς μηχανισμούς (Wittstock and Gerschenzon, 2002) και ένας τρόπος αξιοποίησης του πλεονάσματος σκελετών άνθρακα (Bryant et al., 1983). Όμως, επειδή η κατανομή σε ανάπτυξη και σε άμυνα μπορεί να συμβεί ταυτόχρονα στα φυτά (Hamilton et al., 2001), οι συγκεντρώσεις ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών αυξάνονται υπέρμετρα όταν η ανάπτυξη (η χρήση των οργανικών μορίων) είναι περισσότερο περιορισμένη απ' ό,τι η φωτοσύνθεση (η παραγωγή οργανικών μορίων), όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της έλλειψης αζώτου ή βορίου, ανοργάνων στοιχείων των οποίων η έλλειψη επηρεάζει πολύ περισσότερο την ανάπτυξη νέων οργάνων από ό,τι την παραγωγή υδατανθράκων.

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να συνθέτουν μια πληθώρα φαινολικών συστατικών που συμμετέχουν σε σημαντικές οικοφυσιολογικές λειτουργίες, όπως αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και του βιοτικού ή αβιοτικού περιβάλλοντος (Harborne, 1988; Seigler, 1998). Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων συχνά αυξάνει τις συγκεντρώσεις των φαινολικών στους φυτικούς ιστούς (Tan, 1980; Gerschenzon, 1984; Brown et al., 1984; Chishaki and Horiguchi, 1997; Herms and Mattson, 1992) είτε με συσσώρευσή τους στις υπάρχουσες 'δεξαμενές' είτε επιδρώντας απευθείας στις μεταβολικές διαδικασίες που οδηγούν σε *de novo* σύνθεση μορίων. Σε πολλά φυτά ένα σημαντικό μέρος της δεξαμενής των φαινολικών συστατικών εκκρίνεται στη φυλλική επιφάνεια από εξειδικευμένους ιστούς (είτε εκκριτικούς αδένες είτε αδενώδεις τρίχες), με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εμπλουτισμένου πολύπλοκου μείγματος δευτερογενών μεταβολιτών, αποτελούμενο κυρίως από τερπενοειδή, άγλυκα φλαβονοειδή και απλά φαινολικά (Wollenweber and Dietz, 1981; Wagner, 1991; Gibson, 1996; Fahn, 2000). Η εμφάνιση φαινολικών συστατικών (και άλλων δευτερογενών

Εισαγωγή

μεταβολιτών) σε αυτά τα μείγματα σχετίζεται με την άμυνα έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Kelsey et al., 1984; Karamanoli, 2002). Η μεταφορά δευτερογενών μεταβολιτών, μέσω έκπλυσης ή αποδόμησης οργανικών φυτικών υλικών, στο έδαφος σχετίζεται με την εμφάνιση αλληλοπαθητικής δράσης, αναστέλλοντας ή διεγείροντας την ανάπτυξη των γειτονικών φυτών (Inderjit and Duke, 2003).

II. Το βόριο ως θρεπτικό στοιχείο των φυτών

Το βόριο είναι ένα απαραίτητο μικροστοιχείο, το οποίο απαιτείται για την ανάπτυξη όλων των ανώτερων φυτών και ορισμένων ειδών θαλάσσιων φυκών, διατόμων και κυανοβακτηρίων. Αντιθέτως, τα φύκη του γλυκού νερού και τα ζώα δε φαίνεται να έχουν ανάγκη από βόριο (Δροσόπουλος, 1992, 1998; Loomis and Durst, 1992; Matoh, 1997). Ωστόσο, νεώτερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η παρουσία βορίου παρουσιάζει ευνοϊκές επιδράσεις σε ζωικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Nielsen, 2000).

II.1. Χημικά χαρακτηριστικά του βορίου και κυρίαρχα χημικά είδη στα φυτικά κύτταρα

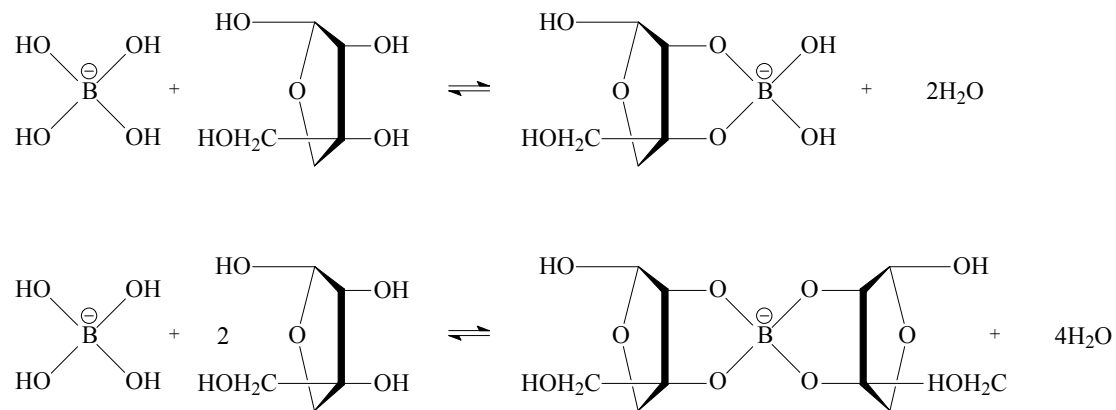
Το βόριο είναι μεταλλοειδές στοιχείο με σταθερό σθένος +3 και ατομικό αριθμό 5 (Δροσόπουλος, 1992). Περιλαμβάνει δύο φυσικά, μη ραδιενεργά ισότοπα, το ¹¹B (με συμμετοχή που κυμαίνεται από 79,7 έως 80,9%) και το ¹⁰B (με συμμετοχή από 19,1 έως 20,3%), τα οποία διαμορφώνουν ένα μέσο ατομικό βάρος περίπου 10,81.

Το βόριο στα βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών κυττάρων, απαντάται με τη μορφή του βορικού οξέος. Πρόκειται για ένα πολύ ασθενές οξύ κατά Lewis, με $K_a = 6 \times 10^{-10}$, ενώ η διισταμένη μορφή του είναι το τετραϋδρόξυ-βορικό ανιόν. Αυτές οι δύο χημικές μορφές του βορίου είναι και οι μοναδικές που απαντώνται στα φυτικά κύτταρα εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεων και των τιμών pH που επικρατούν (Power and Woods, 1997). Συγκεκριμένα, στο κυτταρόπλασμα η επικρατούσα μορφή του βορικού οξέος είναι το αδιάστατο μόριο κατά περίπου 98%, ενώ λιγότερο από το 2% ανιχνεύεται ως βορικό ανιόν. Στον αποπλαστικό χώρο τα ποσοστά αυτά παρουσιάζονται ελαφρώς τροποποιημένα (99,95 και 0,05% περίπου) λόγω των χαμηλότερων τιμών pH (Woods, 1996; Brown et al., 2002).

Τόσο από πλευράς Φυσιολογίας όσο και από πλευράς παραλαβής και ανάλυσης, το βόριο των φυτικών κυττάρων μπορεί να διακριθεί σε δύο κλάσματα, το υδατοδιαλυτό και το αδιάλυτο στο νερό κλάσμα (Matoh, 1997; Dannel et al., 1998; Hu and Brown, 1994). Το υδατοδιαλυτό κλάσμα αντιπροσωπεύει σε μεγάλο βαθμό το βόριο του συμπλάστη και παραλαμβάνεται με απλή εκχύλιση σε υδατικά

μέσα ή ως συστατικό του κυτταρικού χυμού (Dannel et al., 1998; Stavrianaou et al., 2006). Το αδιάλυτο κλάσμα αντιπροσωπεύει σε μεγάλο βαθμό το βόριο των κυτταρικών τοιχωμάτων και αναλύεται μέσω καύσης ή όξινης υδρόλυσης των υπολειμμάτων της υδατικής εκχύλισης (Dannel et al., 1998). Το διαλυτό κλάσμα είναι γενικά μικρότερο του αδιάλυτου και μειώνεται ακόμα περισσότερο σε περιπτώσεις τροφοπενίας βορίου (Shive and Barnett, 1973; Hu and Brown, 1994).

Το βορικό οξύ έχει την μοναδική, μεταξύ όλων των θρεπτικών στοιχείων, ικανότητα να σχηματίζει σταθερά διεστερικά σύμπλοκα με πολυόλες, μόρια με περισσότερα του ενός υδροξύλια στον ανθρακικό τους σκελετό (Shelp, 1993; van den Berg et al., 1994). Λόγω της αντίδρασης του βορικού οξέος με ζεύγη υδροξυλίων, τα παραγόμενα σύμπλοκα είναι κυκλικοί διεστέρες. Επιπλέον, λόγω της ύπαρξης δύο ζευγών όξινων υδροξυλίων στο βορικό ανιόν, σχηματίζονται τόσο μονο- όσο και δι-εστερικά σύμπλοκα (van den Berg et al., 1994; εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σχηματισμός διεστερικών συμπλόκων μεταξύ βορικού ανιόντος και απιόζη. *Επάνω:* σχηματισμός μονο-υποκατεστημένου συμπλόκου βορικού ανιόντος με απιόζη, *Κάτω:* σχηματισμός δι-υποκατεστημένου συμπλόκου βορικού ανιόντος με απιόζη.

Το βορικό οξύ μπορεί να συμπλοκοποιήσει σημαντικά μόρια του κυτταρικού περιβάλλοντος, όπως σάκχαρα και παράγωγά τους (σακχαροαλκοόλες και ουρονικά οξέα), υδροξυοξέα, γλυκοπρωτεΐνες και ορισμένα ορθο-διφαινολικά συστατικά (όπως το καφεϊκό και το υδροξυφερουλικό οξύ), τα οποία εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα (Power and Woods, 1997; Dembitsky et al., 2002). Στα περισσότερα φυτικά είδη, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση του βορικού οξέος και των πολυολικών μορίων (Pfeffer et al., 1999), το βόριο απαντάται κυρίως με τη μορφή συμπλόκου και λιγότερο με τη μορφή ελεύθερου βορικού οξέος (Matsunaga and Nagata, 1995; O'Neill et al., 1996; Chuda et al., 1997; Hu et al., 1997; Ishii et al., 1999).

Εισαγωγή

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

Το βόριο απαντά σε τέσσερις μορφές στο έδαφος: ως συστατικό διαφόρων ορυκτών, προσροφημένο στις επιφάνειες των αργίλλων και των ένυδρων οξειδίων του σιδήρου και αργιλίου, ως συστατικό της οργανικής ύλης και ως ελεύθερο βορικό οξύ στο εδαφικό διάλυμα. Το αδιάστατο βορικό οξύ αποτελεί την κύρια μορφή στο εδαφικό διάλυμα και ταυτόχρονα τη βασική μορφή με την οποία το βόριο απορροφάται από τις ρίζες, σε τιμές του pH από 5 έως 9 (Δροσόπουλος, 1992). Σε pH ανώτερα του 7 έως 8 το βορικό οξύ προσλαμβάνει υδροξύλια από το νερό και σχηματίζει το βορικό ανιόν $[B(OH)_3 + 2H_2O \leftrightarrow B(OH)_4^- + H_3O^+]$. Το εδαφικό pH επηρεάζει σημαντικά τη διαθεσιμότητα του βορίου. Κατά συνέπεια, σε αλκαλικά εδάφη με εδαφικό pH υψηλότερο του 6,3 – 6,5 και με υψηλή περιεκτικότητα αργίλου παρατηρείται σημαντική μείωση της διαθεσιμότητας του βορίου και πρόσληψής του από τα φυτά, λόγω προσρόφησης του σχηματιζόμενου βορικού ανιόντος $B(OH)_4^-$. Μειωμένη διαθεσιμότητα βορίου παρουσιάζουν επιπλέον τα εδάφη ξηρών περιοχών, λόγω πολυμερισμού του βορίου και μείωσης της ικανότητας πρόσληψής του από τις ρίζες με μαζική ροή (Δροσόπουλος, 1998).

Η είσοδος του βορίου εντός των φυτικών κυττάρων επιτελείται μέσω παθητικής και ενεργού μεταφοράς (Dordas et al., 2000; Raven 1980; Dannel et al., 2002; Takano et al., 2002). Στην πρώτη περίπτωση, η οποία επικρατεί υπό συνθήκες υψηλής διαθεσιμότητας βορίου από το έδαφος, οι ανάγκες των φυτών μπορούν να ικανοποιηθούν, δεδομένης της ύπαρξης ικανού διαπνευστικού ρεύματος (Δροσόπουλος, 1998). Η μεταφορά του βορίου από τις ρίζες στα φύλλα γίνεται δια μέσου των αγγείων του ξύλου (Raven, 1980) και σχετίζεται στενά όχι μόνο με τη μαζική ροή του νερού προς την επιφάνεια των ριζών, αλλά και με τη ροή εντός των αγγείων του ξύλου (Δροσόπουλος, 1992). Στην περίπτωση όπου η διαθεσιμότητα του εδαφικού βορίου είναι χαμηλή, η απορρόφηση του βορίου σε ποσότητες ικανές να καλύψουν τις ανάγκες των φυτικών οργανισμών στηρίζεται σε μηχανισμούς ενεργού μεταφοράς. Οι τελευταίοι επάγονται από χαμηλές συγκεντρώσεις βορίου στο εδαφικό διάλυμα και εδράζονται είτε στα κύτταρα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας είτε στα σημεία φόρτωσης του ανιόντος χυμού των ξυλωδών αγγείων (Dannel et al., 2002, Dannel et al., 1997, Pfeffer et al., 1999; Takano et al., 2002; Stavrianakou et al., 2006).

II.3. Κατανομή του βορίου σε υποκυτταρικό επίπεδο

Τα αποθέματα του στοιχείου κατανέμονται σε μεγάλο ποσοστό στα κυτταρικά τοιχώματα, ειδικά στα δικότυλα φυτά (Hu and Brown, 1994; Matoh et al., 1992). Σε κύτταρα καρότου (*Daucus carota*) (Loomis and Durst, 1991) και καπνού (*Nicotiana tabacum*) (Hu and Brown, 1994), το ποσοστό του βορίου στα κυτταρικά τοιχώματα υπό συνθήκες έλλειψης ανέρχεται σε 96% και 97% αντίστοιχα του συνολικού κυτταρικού βορίου. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο σε φυτά με υψηλά περιεχόμενα σε πηκτινικά πολυμερή. Με βάση το παραπάνω, τα μονοκότυλα φυτά, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα περιεχόμενα σε πηκτίνη, χαρακτηρίζονται και από χαμηλότερες απαιτήσεις σε βόριο συγκριτικά με τα δικότυλα φυτά ανεξαρτήτως του θρεπτικού καθεστώτος (Hu et al., 1996). Το δεσμευμένο βόριο στα κυτταρικά τοιχώματα δε λειτουργεί ως αποθηκευτική 'δεξαμενή' για μελλοντική χρήση (Li et al., 2001) καθώς οι δυνατότητες επανεκκίνησης του πηκτινικού βορίου είναι πολύ περιορισμένες σε λογικές κλίμακες χρόνου (Pfeffer et al., 1997; Dannel et al., 2000).

Η συγκέντρωση του συμπλαστικού βορίου υπόκειται σε έντονες διακυμάνσεις ανάλογα με την εξωτερική διαθεσιμότητα και τα φαινόμενα επαναδιανομής του. Υπό συνθήκες έλλειψης η συγκέντρωση του συμπλαστικού βορίου μπορεί να μειωθεί δραματικά (Hu and Brown, 1994). Το βόριο πιστεύεται πως κατανέμεται σχετικά ομοιόμορφα μεταξύ υποκυτταρικών διαμερισμάτων, κυρίως κυτταροπλάσματος και χυμοτοπίου (Thellier et al., 1979; Dannel et al., 2002). Ωστόσο, τα έως σήμερα στοιχεία για την υποκυτταρική κατανομή του βορίου παραμένουν εξαιρετικά περιορισμένα.

II.4. Κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτού

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαδρομή των απορροφούμενων από το έδαφος θρεπτικών στοιχείων περιλαμβάνει την κατ' ακτίνα κίνηση από το φλοιώδες παρέγχυμα της ρίζας έως τα ξυλώδη αγγεία και ακολούθως την κίνηση του ανιόντος χυμού μέχρι τα σημεία απόληξης του διαπνευστικού ρεύματος, είναι αναμενόμενο να συγκρατείται μέρος αυτών, ανάλογα με τη φύση του κάθε στοιχείου και τις επιμέρους ανάγκες των ιστών. Το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα έντονο στην περίπτωση του βορίου καθώς κατά την αποπλαστική, κυρίως, κίνηση συγκρατείται σε μεγάλο ποσοστό από τα πηκτινικά πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων, ανάλογα με το ποσοστό κάλυψης των αναγκών των κυττάρων (Matoh et al., 1992). Συνεπώς, ιδιαίτερα σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας, αναμένεται μια κλιμάκωση συγκεντρώσεων με υψηλότερες αυτές του ριζικού συστήματος, λόγω προτεραιότητας στη συγκράτηση, συγκριτικά με το υπέργειο μέρος των φυτών (Stavrianakou et al., 2006).

Εισαγωγή

Η κατανομή του βορίου σε επίπεδο φυτικού σώματος επηρεάζεται έντονα από το βαθμό της κινητικότητας του βορικού οξέος στον ηθμό, καθώς η τελευταία παράμετρος σχετίζεται με τη δυνατότητα επαναδιανομής του στοιχείου. Εάν η κινητικότητα του βορίου είναι χαμηλή, αναμένεται αύξηση των συγκεντρώσεων με την ηλικία του οργάνου. Αντίθετα, σε φυτά με υψηλή κινητικότητα του βορίου, τα αποθέματα των ώριμων οργάνων είναι διαθέσιμα προς επαναδιανομή σε σημεία του φυτού με υψηλές απαιτήσεις, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις του στοιχείου να είναι υψηλότερες στα νέα όργανα συγκριτικά με τα ωριμότερα, ειδικά υπό καθεστώς έλλειψης του στοιχείου στο έδαφος. Σε μελέτη των Fernández-Escobar et al. (1999) στην ελιά έχει βρεθεί ότι υπό συνθήκες ανεπαρκούς εφοδιασμού βορίου τα νεαρά όργανα της ελιάς εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση βορίου συγκριτικά με τα ώριμα. Το φαινόμενο της επαναδιανομής βορίου στην ελιά έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Liakopoulos et al., 2005; Delgado et al., 1994; Perica et al., 2001a, 2001b). Τα αποθέματα βορίου στα ώριμα φύλλα είναι επανεκκινήσιμα, γεγονός που σε συνθήκες έλλειψης βορίου έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της συγκέντρωσης του βορίου των ώριμων τροφοπενιακών φύλλων (Liakopoulos et al., 2005).

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

Οι μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που προκαλούνται από την έλλειψη βορίου υποδηλώνουν πως το συγκεκριμένο στοιχείο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των ανώτερων φυτών (Dugger, 1983; Marschner, 1995; Römheld and Marschner, 1991; Shelp, 1993). Η έλλειψη βορίου περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών και κυρίως των αναπαραγωγικών τους οργάνων (Blevins and Lukaszewski, 1998; Brown et al., 2002). Μερική έλλειψη βορίου έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικρόσωμων φυτών με λιγότερα φύλλα, συνήθως παχύτερα και μικρότερα σε επιφάνεια (Stavrianakou et al., 2005).

Συγκεκριμένα, τα συμπτώματα από την τροφοπενία βορίου εξαρτώνται από το βαθμό κινητικότητάς του στο φυτικό σώμα. Σε φυτά με χαμηλή κινητικότητα του στοιχείου, τα πρώτα όργανα που επηρεάζονται είναι τα νεότερα φύλλα, τα οποία αποχρωματίζονται και ξηραίνονται, καθώς και τα κορυφαία μεριστώματα των βλαστών και τα ακραία μεριστώματα του ριζικού συστήματος, τα οποία νεκρώνονται. Στα ώριμα φύλλα εμφανίζεται χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων του ελάσματος, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται χλώρωση των κορυφαίων τμημάτων του ελάσματος. Επίσης, παρατηρείται πτώση ανθέων και αναπτυσσόμενων καρπών, ενώ σε πολλά λαχανοκομικά φυτά εμφανίζονται νεκρωμένες κορυφές και σκουρόχρωμες ή μελανόχρωμες εστίες στο

βραχυγονατωμένο βλαστό (Δροσόπουλος, 1998). Ένα άλλο κοινό σύμπτωμα της έλλειψης βορίου σε πολλά φυτικά είδη είναι τα βραχύτερα μεσογονάτια, τα οποία δίνουν στο φυτό την εμφάνιση ροζέττας (Marschner, 1995; Δροσόπουλος, 1998). Η αναλογία της υπόγειας προς την υπέργεια βιομάζα (κυρίως λόγω περιορισμού του υπέργειου μέρους σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με το υπόγειο) παρουσιάζει αύξηση σε συνθήκες έλλειψης βορίου (Marschner, 1995). Σε συνθήκες τροφопενίας βορίου περιορίζεται η αύξηση των μεριστωμάτων των ριζών, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση ή και πλήρη παρεμπόδιση της αύξησης της πρωτογενούς ρίζας αλλά και των πλαγίων ριζών, με συνέπεια την παραγωγή περιορισμένου ριζικού συστήματος και την εμφάνιση χονδροειδούς και θυσσανώδους ρίζας. Η επίδραση αυτή του βορίου αφορά τόσο την επιμήκυνση όσο και τη διαίρεση των κυττάρων.

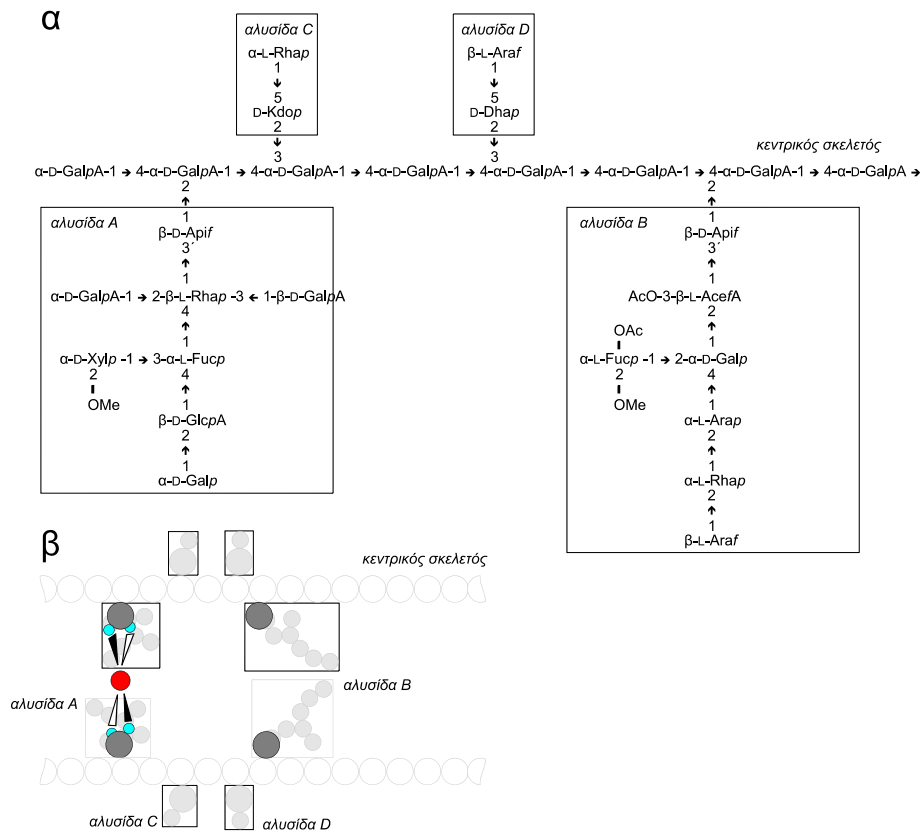
II.5.1. Το βόριο συμμετέχει στη δομή και λειτουργία των κυτταρικών τοιχωμάτων

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι μια σύνθετη δομή αποτελούμενη από τμήματα με διαφορετική χημική σύσταση και ιδιότητες. Η κύρια λειτουργία του κυτταρικού τοιχώματος αφορά στην ακεραιότητα και στη διαμόρφωση του σχήματος και των μηχανικών ιδιοτήτων του κυττάρου (Matoh, 1997). Είναι τεκμηριωμένο ότι η ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση την επάρκεια βορίου και ότι η έλλειψη του στοιχείου έχει επίπτωση στη δομή και τις μηχανικές του ιδιότητες (Loomis and Durst, 1992; Brown and Hu, 1997; Matoh, 1997; Fleischer et al., 1999). Η ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος απαιτεί συνεχή τροφοδοσία με βόριο επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό του στοιχείου στα φυτά βρίσκεται σε μη διαθέσιμη μορφή για την υποστήριξη των αναπτυσσόμενων κυττάρων (Loomis and Durst, 1992; Hu and Brown, 1994; Brown and Hu, 1994).

Σχετικά πρόσφατα (Kaneko et al., 1996; Kobayashi et al., 1996) βρέθηκε ότι το βόριο συμμετέχει στη δομή της πηκτίνης του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (το δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα περιέχει ελάχιστη πηκτίνη). Επόμενες εργασίες αποσαφήνισαν ότι το βορικό οξύ λειτουργεί ως συνδετικό μόριο μεταξύ των αλυσίδων ραμνογαλακτουρονάνης II (RG-II) της πηκτίνης και συγκεκριμένα μεταξύ των υπολειμμάτων της αποϊζης των πηκτινικών αλυσίδων (O'Neill et al., 1996) και ότι απουσία των παραπάνω διαδεσμών, λόγω έλλειψης βορίου, έχει δραματικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών (O'Neill et al., 2001). Η RG-II είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους δομικό πολυμερές του πηκτινικού κλάσματος, το οποίο εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα των αναπτυσσόμενων φυτικών κυττάρων (O'Neill et al., 1991; O'Neill et al., 1996). Η RG-II έχει απομονωθεί από τα κυτταρικά τοιχώματα δικότυλων (Darvill et al.,

Εισαγωγή

1978; Kobayashi et al., 1996), μονοκότυλων (Thomas et al., 1989; Stevenson et al., 1988) και ενός γυμνόσπερμου φυτικού είδους (Thomas et al., 1987), ενώ απαντάται και στο κόκκινο κρασί (Doco and Brillouet, 1993). Αποτελεί το μοναδικό έως σήμερα πολυσακχαρίτη ο οποίος περιέχει βόριο και ο οποίος έχει απομονωθεί από βιολογική πηγή (Kobayashi et al., 1996; Matoh et al., 1993; Ishii and Matsunaga, 1996). Η δομή της RG-II είναι σταθερή ανεξαρτήτως του φυτού από



Εικόνα 2. Μερική δομή της ραμνογαλακτουρονάνης-II. **(α)** Ο κεντρικός σκελετός της RG-II αποτελείται από μονάδες α-D-γαλακτοσυλο-πυρανοσυλ-ουρονικού οξέος (GalpA) στο οποίο ενώνονται τέσσερις πλάγιες αλυσίδες ολιγοσακχαριτών (A-D). Η A-αλυσίδα ενώνεται στον κεντρικό σκελετό με μια μονάδα β-D-απισουλ-φουρανοζίτη (Arif). Οι ομάδες Arif της A-αλυσίδας συμμετέχουν ανά δύο στο σχηματισμό του συμπλόκου RG-II-B-RG-II **(β)** Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι γλυκοφουρανόζες δημιουργούν τα σταθερότερα διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ στη συγκεκριμένη δομή, η απιόζη αποτελεί το μόνο γλυκοφουρανοζίτη με ελεύθερες γειτονικές υδρόξυλομάδες με cis-διαμόρφωση. Άλλες συντημήσεις: AcefA, 3-C-καβροξυ-5-δεοξυ-L-ξυλοφουρανοζίτης; Araf, αραβινοφουρανοζίτης; Arap, αραβινο-πυρανοζίτης; Dhap, 3-δεοξυ-D-λυξο-εππουλο-πυρανοσυλ-αρικό οξύ; Fucp, φουκο-πυρανοζίτης; Galp, γαλακτο-πυρανοζίτης; GlcpA, γλυκο-πυρανοσυλ-ουρονικό οξύ; Kdor, 3-δεοξυ-D-μαννο-οκτουλο-πυρανοσυλονικό οξύ; 2-OMeFucp, 2-O-μεθυλο-φουκο-πυρανοζίτης; 2-OMeXylp, 2-O-μεθυλο-ξυλο-πυρανοζίτης; Rhap, ραμνο-πυρανοζίτης; OAc, O-ακετύλιο.

το οποίο έχει απομονωθεί. Κατά το σχηματισμό των διαδεσμών με το βορικό οξύ, δύο μόρια μονομερούς RG-II σχηματίζουν σύμπλοκο με ένα μόριο βορικού οξέος (Kobayashi et al., 1996, εικόνα 2).

Ο παραπάνω ρόλος του βορίου (Blevins and Lukaszewski, 1998; Goldbach et al., 2001; Brown et al., 2002; Dannel et al., 2002; O'Neill et al., 2004) είναι ο πλέον αποσαφηνισμένος έως σήμερα. Η συμμετοχή του βορίου στην πηκτινή επηρεάζει όχι μόνο τη σταθερότητα και ελαστικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων, διαμορφώνοντας έτσι τα μηχανικά τους χαρακτηριστικά, αλλά σχετίζεται και με το μέγεθος των πόρων του κυτταρικού τοιχώματος, διαδραματίζοντας έτσι και λειτουργικό ρόλο (Fleischer et al., 1998; Fleischer et al., 1999). Τα αποτελέσματα πολλών μελετών έχουν δείξει ότι η έλλειψη βορίου αλλάζει τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, προκαλώντας μειωμένη αντίσταση στη μηχανική καταπόνηση, μεγέθυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων και απώλεια της επαφής μεταξύ των κυττάρων (Loomis and Durst, 1992). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το βόριο επιδρά στη δομή του τοιχώματος ακόμα και σε μη αναπτυσσόμενα κύτταρα (Fleischer et al., 1998). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης των Fleischer et al. (1998), ο θάνατος των κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια του φυτού *Chenopodium album* σε μέσο καλλιέργειας ανεπαρκές σε βόριο, προκαλείται πρωταρχικά από την αλλοίωση των μηχανικών χαρακτηριστικών του τοιχώματος. Ο θάνατος των διαφοροποιημένων κυττάρων συνοδεύεται από την απελευθέρωση κυτταρικών οργανιδίων. Τα αυξημένα όρια του μεγέθους των πόρων του τοιχώματος σε τροφοπενιακά κύτταρα είναι χαρακτηριστικά ενός αποδιοργανωμένου πηκτινικού δικτύου και οφείλονται, όπως και η διόγκωση των κυτταρικών τοιχωμάτων, στην έλλειψη του σχηματισμού του συμπλόκου του βορικού οξέος με τα μονομερή της RG-II, φαινόμενο το οποίο όμως είναι αναστρέψιμο (Fleischer et al., 1998; Ishii et al., 2001). Η προσθήκη βορικού οξέος στα τροφοπενιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση του βορίου στα κυτταρικά τοιχώματα και την αποτροπή της ρήξης του τοιχώματος και, επιπλέον, μειώνει το μέγεθος των πόρων του τοιχώματος στα φυσιολογικά επίπεδα (Ishii et al., 2001; Fleischer et al., 1998).

Ωστόσο, όπως υποδεικνύουν μελέτες, η σύνθεση υλικών του κυτταρικού τοιχώματος σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου δε φαίνεται να επηρεάζεται σε ρίζες τομάτας (Kouchi and Kumazawa, 1976), σε φύλλα ηλιανθου (Yamanouchi, 1973), σε καλλιεργούμενα κύτταρα καρότου (Goldbach and Amberger, 1986) και άλλα καλλιεργούμενα είδη (Hu et al., 1996). Αυτή η φαινομενική ασυμφωνία δείχνει ότι το βόριο πιθανόν να μην παίζει ρόλο στη σύνθεση των υλικών του τοιχώματος, η οποία αποτελεί κυτταροπλασματική δραστηριότητα, αλλά πιθανόν να συμμετέχει στη συναρμολόγηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος στον αποπλάστη

Εισαγωγή

(Matoh, 1997). Η πιο δραματική εκδήλωση της απαίτησης σε βόριο φαίνεται στην ανάπτυξη (επιμήκυνση) του γυρεοσωλήνα (Schmucker, 1933 και 1934) αρκετών ανώτερων φυτών. Σύμφωνα με τους Loomis and Durst (1992), η άμεση αντίδραση της παραπάνω διαδικασίας, κατά την απομάκρυνση του βορίου από το μέσο καλλιέργειας, υποδηλώνει ότι το βόριο συμμετέχει στη συναρμολόγηση του κυτταρικού τοιχώματος. Το βόριο θεωρείται βασικό και για την ανάπτυξη φυματίων των ριζών στα ψυχανθή φυτά (Bolaños et al., 1994), η λειτουργία των οποίων δεν είναι ικανοποιητική όταν η παροχή βορίου είναι περιορισμένη και τα κυτταρικά τοιχώματα δεν είναι επαρκώς οργανωμένα.

Η απαίτηση των φυτών σε βόριο καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το περιεχόμενο της RG-II των κυτταρικών τοιχωμάτων. Το γεγονός αυτό προκύπτει και από την παρατήρηση ότι τα υψηλότερα ποσοστά βορίου στους φυτικούς ιστούς βρίσκονται υπό τη μορφή του μη διαθέσιμου βορίου των πηκτινικών πολυμερών (Shelp et al., 1995; Brown and Hu, 1994). Κατά συνέπεια, οι απαιτήσεις σε βόριο μεταξύ των μονοκότυλων και των δικότυλων φυτών είναι διαφορετικές, ακολουθώντας τις αντίστοιχες διαφορές στην ποσότητα της πηκτίνης (Hu et al., 1996). Συγκεκριμένα, τα δικότυλα παρουσιάζουν υψηλότερες απαιτήσεις σε βόριο (20–70 mg/kg ξηρής ουσίας) συγκριτικά με τα μονοκότυλα αγρωστώδη φυτά (5–10 mg/kg ξηρής ουσίας). Επιπλέον, πολύ μεγαλύτερες ανάγκες σε βόριο (80–100 mg/kg ξηρής ουσίας) παρουσιάζουν τα φυτά που παράγουν κόμμεα (Loomis and Durst, 1992; Shelp et al., 1995; Welch, 1995; Δροσόπουλος, 1992 και 1998).

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

Υπάρχει πλήθος πειραματικών δεδομένων σύμφωνα με τα οποία το βόριο σχετίζεται τόσο με τη δομική όσο και τη λειτουργική ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Blevins and Lukaszewski, 1998). Η τροφοπενία βορίου αλλάζει την περατότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών (Robertson and Loughman, 1974; Pollard et al., 1977; Wang et al., 1999; Alpaslan and Gunes, 2001), επηρεάζει τη ροή ιόντων μέσω της δραστηριότητας των μεμβρανικών αντλιών πρωτονίων (Ferrol et al., 1993; Obermeyer et al., 1996) και της δραστηριότητας άλλων μεμβρανικών ενζύμων (Goldbach et al., 1990; Barr and Crane, 1991; Lawrence et al., 1995; Cara et al., 2002). Άλλες άμεσες επιδράσεις αφορούν στην αλλαγή των ιδιοτήτων του κυτταροσκελετού (Bassil et al., 2004), τη μεταφορά δομικών υλικών του κυτταρικού τοιχώματος (Yu et al., 2002) και την αλλαγή στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου της μεμβράνης και του αποπλαστικού χώρου (Muhling et al., 1998). Ο ρόλος του βορίου στη λειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητά του

να σχηματίζει σύμπλοκα με συστατικά των μεμβρανών με δομή *cis*-διόλης, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Η πρόσδεση του βορίου σε πολυυδροξυλομάδες των μεμβρανών διεγείρει την ενεργότητα της προσδεμένης στη μεμβράνη ΑΤΡάσης και έτσι διατηρείται η δομική ακεραιότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και ο έλεγχος της διαπερατότητάς τους (Cakmak et al., 1995; Ferrol et al., 1993; Goldbach et al., 1990; Pollard et al., 1977; Roldan et al., 1992; Tang and Della Fuente, 1986). Ωστόσο, άμεσες πειραματικές αποδείξεις για τον παραπάνω ρόλο του βορίου δεν έχουν έως σήμερα εμφανιστεί.

Η έλλειψη βορίου σχετίζεται με άμεσες και εκτεταμένες αλλαγές στη ροή ιόντων μέσω των κυτταροπλασματικών μεμβρανών. Οι επιδράσεις αυτές ίσως να οφείλονται στην οξειδωτική καταστροφή και στις δομικές μετατροπές των κυτταροπλασματικών μεμβρανών που προκαλούνται από ενεργές μορφές οξυγόνου (Tanada, 1995). Στο κουκί (*Vicia faba*) η έλλειψη βορίου μειώνει το ρυθμό απορρόφησης φωσφορικών ιόντων (Robertson and Loughman, 1974) και Rb^+ , ιδιαίτερα στις κορυφές των ριζών (Robertson and Loughman, 1973). Επίσης, επίδραση του βορίου στην εισροή και εκροή φωσφορικών ιόντων παρατηρήθηκε και στο καλαμπόκι (*Zea mays*) (Pollard et al., 1977). Η έλλειψη βορίου επηρεάζει επίσης την εκροή K^+ και συνεπώς εμπλέκεται στον έλεγχο των διαστάσεων του στοματικού πόρου των στοματίων, όπως βρέθηκε σε απομονωμένες επιδερμίδες του φυτού *Commelina communis* (Roth-Bejerano and Itai, 1981). Η αύξηση των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών υπό τροφοπενία βορίου πιθανόν να σχετίζεται με αλλαγές στις μεμβράνες, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν την περατότητα των ιόντων. Έχει βρεθεί ότι η έλλειψη βορίου προκαλεί σημαντική αύξηση στη διαπερατότητα της μεμβράνης σε κύτταρα φύλλου ηλίανθου (Cakmak et al., 1995; Tang and Della Fuente, 1986), ιδιαίτερα μετά από έκθεση των φύλλων σε υψηλές εντάσεις φωτός, προφανώς λόγω της συσσώρευσης των ενεργών μορφών οξυγόνου οι οποίες προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στις μεμβράνες (Cakmak et al., 1995). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Findeklee and Goldbach (1996), η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης θεωρείται ως δευτερογενής επίδραση της έλλειψης βορίου, ενώ νεώτερη έρευνα απέτυχε να δείξει οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ φαινολικών συστατικών ή οξείδωσης τους και απώλειας του ελέγχου της περατότητας της πλασματικής μεμβράνης υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου (Pfeffer et al., 1998).

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

Η τροφοπενία βορίου στα ανώτερα φυτά προκαλεί ποικίλα και πολλές φορές αντίθετα αποτελέσματα ως συνέπεια εκτεταμένων μεταβολικών αλλαγών. Λόγω της ιδιότητάς του να σχηματίζει σύμπλοκα κυμαινόμενης σταθερότητας με

Εισαγωγή

διαφορετικά υποστρώματα, ένζυμα και μεμβρανικά συστατικά, έχουν κατά καιρούς διατυπωθεί πολλές υποθέσεις σύμφωνα με τις οποίες το βόριο εμπλέκεται σε πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες. Αυτές περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ενζύμων και το μεταβολισμό των υδατανθράκων, του RNA, του ινδολυλοξικού οξέος (IAA), των φαινολικών συστατικών και του αναπνευστικού μεταβολισμού (Loomis and Durst, 1992; Δροσόπουλος, 1998). Ορισμένες από τις επιπτώσεις της έλλειψης βορίου εντοπίζονται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και συγκεκριμένα στο μεταβολισμό των φωσφοροπεντοζών (PPP): Σύμφωνα με τους Lee και Aronoff (1967) και τον Dugger (1983), ο σχηματισμός του σταθερού συμπλόκου 6-φωσφογλουκονικού-βορικού και η παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας της δευδρογενάσης του 6-φωσφογλουκονικού οξέος μειώνονται υπό συνθήκες έλλειψης βορίου με συνέπεια την ενίσχυση της PPP οδού. Σύμφωνα με τους Gomes-Rodriguez et al. (1987), υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, η ενζυμική δραστηριότητα της δευδρογενάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (το πρώτο ένζυμο του PPP) ενισχύεται περισσότερο από την αντίστοιχη δραστηριότητα της δευδρογενάσης του 6-φωσφογλουκονικού οξέος. Έτσι, διαπιστώνεται αύξηση της ροής υποστρωμάτων από τη γλυκόλυση προς την κατεύθυνση της μεταβολικής οδού PPP, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση φαινολικών ουσιών (Dugger, 1983). Επίσης, η συνακόλουθη αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης των πολυφαινολών οδηγεί στην αύξηση των συγκεντρώσεων συστατικών του τύπου των κινονών στην περιοχή του αποπλάστη, όπως της καφεϊκής κινόνης. Υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, η αύξηση των παραπάνω φαινολικών συστατικών πιστεύεται πως επιδρά αρνητικά στην περατότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και στη δραστηριότητα ορισμένων μεμβρανικών ενζύμων. Ωστόσο, νεώτερες έρευνες δεν έχουν επιβεβαιώσει την παραπάνω συσχέτιση μεταξύ τροφοπενίας βορίου, μεταβολισμού των φαινολικών και περατότητας των πλασματικών μεμβρανών (Pfeffer et al., 1998). Επίσης, έχουν διατυπωθεί υποθέσεις σχετικά με το ρόλο του βορίου στη βιοσύνθεση λιγνίνης μέσω σχηματισμού σταθερών συμπλόκων βορίου-φαινολικών οξέων και ιδιαίτερα του καφεϊκού οξέος.

Υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, η συγκέντρωση των αυξινών είναι συχνά πολύ υψηλότερη από τη φυσιολογική, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συμπτώματα της έλλειψης βορίου οφείλονται στην αυξημένη στάθμη ορισμένων ορμονών (Δροσόπουλος, 1992). Τα υψηλότερα επίπεδα ινδολυλοξικού οξέος (IAA) αποδίδονται στην παρεμπόδιση της δραστηριότητας της οξειδάσης του IAA λόγω συσσώρευσης φαινολικών συστατικών, όπως το καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ, τα οποία αποτελούν παρεμποδιστές του ενζύμου (Coke and Whittington, 1968; Rajaratnam and Lowry, 1974; Pilbeam and Kirkby, 1983; Shkol'nik, 1984).

Ανάλογα φαινορικά συστατικά προωθούν την κατ' ακτίνα διαίρεση των κυττάρων, η οποία προκαλεί ανατομικές μεταβολές όμοιες προς αυτές που προκαλούνται από το IAA. Πιστεύεται πως οι μορφολογικές αλλαγές που προκαλούνται από την έλλειψη βορίου οφείλονται στην υπερβολική συγκέντρωση IAA στους τροφοπενιακούς ιστούς (Pilbeam and Kirkby, 1983). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις IAA δε διαφέρουν μεταξύ φυσιολογικών και τροφοπενιακών φυτών (Fackler et al., 1985; Hirsch et al., 1982) και τα συμπτώματα που οφείλονται στην έλλειψη βορίου δεν προσομοιάζουν με αυτά της υπερβολικής συγκέντρωσης IAA (Hirsch and Torrey, 1980).

Η τροφοπενία βορίου προκαλεί πτώση της στάθμης των νουκλεοξέων. Στην περίπτωση του DNA συνιστά δευτερογενή επίδραση, αφού η σύνθεσή του συνεχίζεται επί αρκετό χρόνο μετά την παρεμπόδιση της αύξησης. Αντίθετα, η σύνθεση του RNA επηρεάζεται άμεσα και ταχύτατα από την τροφοπενία βορίου. Η χαμηλή συγκέντρωση των RNA στα τροφοπενιακά φυτά οφείλεται στην αύξηση της αποδομότητάς τους, λόγω της ενεργοποίησης της RNAάσης (Blevins and Lukaszewski, 1998).

Η τροφοπενία βορίου είναι πιθανόν να διαταράσσει το μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος, το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση των μεριστωματικών λειτουργιών και στην προώθηση της ανάπτυξης (Cordoba-Pedregosa et al., 1996; Liso et al., 1984). Έχει παρατηρηθεί μείωση της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος στα ακρορίζια φυτών του γένους *Cucurbita*, καθώς και στα ακραία μεριστώματα των βλαστών και στα νεαρά φύλλα ηλίανθου, ως αντίδραση στην έλλειψη βορίου (Lukaszewski and Blevins, 1996; Cakmak and Römheld, 1997), ενώ η βοριούχος λίπανση στην πατάτα (*Solanum tuberosum*) αυξάνει τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στους κονδύλους (Monday and Munshi, 1993). Υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου σε φύλλα ηλίανθου, εκτός από το ασκορβικό οξύ, μειώνονται και οι μη πρωτεϊνικές ενώσεις που περιέχουν σουλφυδριλικές ομάδες (θειόλες). Η μείωση της συγκέντρωσης των θειολών και του ασκορβικού οξέος ενδεχομένως σχετίζεται με την οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τη συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (Cakmak and Römheld, 1997), καθώς οι ενώσεις αυτές αποτελούν τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά των κυττάρων (Cakmak, 1994; Foyer et al., 1994). Επίσης, ως αποτέλεσμα της έλλειψης βορίου, παρατηρείται σημαντική μείωση στα επίπεδα της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Η μείωση αυτή μπορεί να είναι κρίσιμη επειδή εκθέτει τα τροφοπενιακά κύτταρα σε καταστροφή, λόγω οξειδωτικής καταπόνησης, σε συνδυασμό και με την αυξημένη παραγωγή κινονών και ενεργών μορφών οξυγόνου (Cakmak and Römheld, 1997). Η αναγωγάση της γλουταθειόνης είναι απαραίτητη για τη διατήρηση υψηλών συγκεντρώσεων

Εισαγωγή

γλουταθειόνης και εμπλέκεται άμεσα στην αποτοξίνωση του H_2O_2 (Foyer et al., 1994). Πιθανόν η μείωση της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης να σχετίζεται με την πρόσδεση των κινονών στα σημεία πρόσδεσης του NADPH στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Bironaite et al., 1989). Επομένως, υπό συνθήκες τροφопενίας βορίου, η ανθεκτικότητα των κυττάρων απέναντι στο οξειδωτικό φορτίο μειώνεται (Tanada, 1995).

II.5.4. Ο ρόλος του βορίου στη φωτοσυνθετική λειτουργία και τη διανομή σακχάρων

Σύμφωνα με όλες τις έως σήμερα πειραματικές ενδείξεις, το βόριο δεν εμπλέκεται άμεσα με τη φωτοσυνθετική λειτουργία (Blevins and Lukaszewski, 1998; Dell and Huang, 1997). Ωστόσο, η τροφопενία βορίου προκαλεί ορισμένες δευτερογενείς επιδράσεις στη φωτοσύνθεση. Σε αυτές περιλαμβάνεται η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φύλλων, η αυξημένη αγωγιμότητα των στοματίων, η μεταβολή της κατάστασης των φωτοσυνθετικών χρωστικών, η αποδιοργάνωση των θυλακοειδών μεμβρανών του χλωροπλάστη και η αυξημένη ευαισθησία στη φωτοπαρεμπόδιση (Cakmak et al., 1995; Kastori et al., 1995; Dell and Huang, 1997; El-Shintinawy, 1999). Εξαιτίας της έμμεσης εμπλοκής του βορίου στη φωτοσύνθεση, οι επιδράσεις της έλλειψής του ποικίλλουν και εξαρτώνται από το φυτικό είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παρατηρούμενη μείωση της φωτοσυνθετικής ταχύτητας πιθανόν να οφείλεται στον περιορισμό της ανάπτυξης νέων οργάνων και τον περιορισμό της ολικής φυλλικής επιφάνειας (Cakmak and Römheld, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998). Σε ορισμένες περιπτώσεις η έλλειψη βορίου προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών και οδηγεί σε αποδιοργάνωση των μεμβρανών των θυλακοειδών, μειώνοντας έτσι τη φωτοχημική ικανότητα του PSII (Goldbach et al., 1991; Kastori et al., 1995; El-Shintinawy, 1999; Cakmak and Römheld, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998).

Σε μελέτη των Stavrianakou et al. (2005) σε φύλλα του φυτού *Dittichia viscosa* (Asteraceae) βρέθηκε ότι η έλλειψη βορίου δεν επηρεάζει αρνητικά μια σειρά από παραμέτρους που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τη φωτοσύνθεση, όπως η στοματική πυκνότητα, η συγκέντρωση χλωροφύλλης, η φωτοσυνθετική ικανότητα και η φωτοχημική ικανότητα του PSII. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μία μη σημαντική αύξηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φύλλων του *D. viscosa* ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου, η οποία αποδόθηκε στο αυξημένο πάχος του ελάσματος. Σε φύλλα ελιάς, η παράμετρος F_o παρουσίασε αύξηση λόγω έλλειψης βορίου (Liakopoulos et al. 2005), υποδηλώνοντας πιθανή αδράνεια των φωτοχημικών κέντρων του PSII ή εξασθένιση της μεταφοράς ενέργειας από το φωτοσυλλεκτικό μηχανισμό προς τα φωτοχημικά κέντρα (Demmig and Björkman,

1987). Επίσης, σημειώθηκε μείωση της παραμέτρου Fm στα τροφοπενιακά νεαρά φύλλα, η οποία σχετίζεται με αδυναμία μεταφοράς ενέργειας διαμέσου του PSII ως αποτέλεσμα φωτοαναστολής (Bolhàr-Nordenkampf and Öquist, 1993; El-Shintinawy, 1999).

Παρά τη διαταραχή της φωτοσυνθετικής λειτουργίας, λόγω έλλειψης βορίου, τα κύτταρα των τροφοπενιακών φύλλων συσσωρεύουν μη δομικούς διαλυτούς υδατάνθρακες και άμυλο (Dugger, 1983; Kastori et al., 1995; Shelp, 1993), υποδεικνύοντας μειωμένους ρυθμούς εξαγωγής φωτοσυνθετικών προϊόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να σχετίζεται τόσο με περιορισμό της αντίστοιχης ζήτησης σε οργανικό άνθρακα από τα σημεία μεταβολικής κατανάλωσης, λόγω παρεμπόδισης της ανάπτυξης, όσο και με αυτή καθεαυτή τη διαδικασία της μεταφοράς. Ωστόσο, υπό συνθήκες σοβαρής τροφοπενίας βορίου στην ελιά, τόσο η λεπτή δομή των στοιχείων μεταφοράς και των συνοδών κυττάρων του ηθμού όσο και ο ρυθμός εξόδου υδατανθράκων από τα φύλλα δε φάνηκε να επηρεάζονται (Liakourou et al. 2005).

II.5.5. Ο ρόλος του βορίου στο δευτερογενή μεταβολισμό

II.5.5.1. Ο ρόλος του βορίου στο μεταβολισμό των αρωματικών ενώσεων

Η γενική θρεπτική κατάσταση των φυτών, αλλά και ειδικότερα οι παράμετροι της θρέψης του βορίου, επηρεάζουν έντονα το μεταβολισμό των φαινυλοπροπανοειδών (Brown et al. 2002; Marschner, 1995; Blevins and Lukaszewski, 1998; Camacho-Christóbal et al., 2002). Η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών αποτελεί καθολική αντίδραση των τροφοπενιακών ιστών. Ως πιθανότερες αιτίες του φαινομένου αυτού θεωρούνται η αύξηση του ρυθμού βιοσύνθεσης των φαινολικών και η μειωμένη ενσωμάτωσή τους σε δομές όπως αυτή της λιγνίνης του κυτταρικού τοιχώματος (Marschner, 1995; Cakmak and Römheld, 1997). Όσον αφορά στην αυξημένη βιοσύνθεση, έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί εκ των οποίων ο πρώτος αναφέρεται στην άρση της παρεμπόδισης ή στην ενίσχυση της ενεργότητας συγκεκριμένων ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού των φαινυλοπροπανοειδών, όπως η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), και ο δεύτερος στην αύξηση ροής υποστρωμάτων, κυρίως μέσω της οδού PPP, προς την οδό των φαινυλοπροπανοειδών. Αποτέλεσμα της αυξημένης βιοσύνθεσης είναι η αλλαγή του προτύπου χρήσης των φωτοσυνθετικών προϊόντων. Σύμφωνα με την υπόθεση ισορροπίας ανάπτυξης/διαφοροποίησης (Herms and Mattson, 1992) και τις προβλέψεις των Koricheva et al. (1998), σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων η ανάπτυξη και διαδοχικά η πρωτεϊνοσύνθεση περιορίζονται και το πλεόνασμα του άνθρακα εκτρέπεται προς τη σύνθεση φαινυλοπροπανοειδών. Έτσι, η έλλειψη βορίου

Εισαγωγή

φαίνεται να αυξάνει τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών, προάγοντας το μεταβολικό μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών (Cakmak and Römheld, 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998), πιθανόν λόγω της μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης (Pilbeam and Kirkby, 1983; Cakmak and Römheld, 1997). Η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών σε τροφοπενιακούς ιστούς, ως αποτέλεσμα είτε της ενίσχυσης της οδού PPP (Dugger, 1983) είτε του περιορισμού της βιοσύνθεσης φαινολικών αλκοολών (Pilbeam and Kirkby, 1983), είναι λιγότερο έντονη στα μονοκότυλα φυτά σε σύγκριση με τα δικότυλα (Shkol'nik, 1984). Επίσης, η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών ενισχύεται υπό συνθήκες αυξημένων εντάσεων φωτεινής ακτινοβολίας (Chattopadhyay et al., 1994; Mole et al., 1988).

Η έλλειψη βορίου, κυρίως στα δικότυλα φυτά, αυξάνει τη δραστηριότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούν φαινολικά ως υποστρώματα όπως η αμμώνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL), (Cakmak and Römheld, 1997; Ruiz et al., 1998; Camacho-Christóbal et al., 2002; Shkol'nik, 1984). Σε συνθήκες τροφοπενίας βορίου η δραστηριότητα της πολυφαινολοξειδάσης (PPO), η οποία εντοπίζεται κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων (Zawistowski et al., 1991), αυξάνεται προοδευτικά, ιδιαίτερα σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτός (Marschner, 1995), καθώς η δραστηριότητά της (όπως και της PAL) επάγεται από την αύξηση της έντασης του φωτός (Bolwell and Butt, 1983). Φυτικά είδη με διαφορετική ευαισθησία στην έλλειψη βορίου, διαφέρουν όσον αφορά στη δραστηριότητα της PPO υπό συνθήκες έλλειψης βορίου. Έτσι, παρόμοια με τη συγκέντρωση των φαινολικών, η δραστηριότητα της PPO είναι υψηλότερη σε φυτικά είδη με μεγαλύτερη ευαισθησία στην έλλειψη βορίου (π.χ. ηλίανθος) απ' ότι σε φυτικά είδη με μικρότερη ευαισθησία (π.χ. σιτάρι) (Shkol'nik, 1984; Shkol'nik et al., 1981a).

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

Σύμφωνα με τις χημικές ιδιότητές του, το βορικό οξύ μπορεί να σχηματίσει διεστερικά σύμπλοκα με ορισμένα φαινολικά, όπως το καφεϊκό και το 5-υδροξυφερουλικό οξύ, τα οποία διαθέτουν δομή cis-διόλης (ορθο-διφαινόλες). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ταυτόχρονη παρουσία βορικού οξέος και ορθο-διφαινολών στο κύτταρο και η συνακόλουθη δημιουργία συμπλόκων μειώνει τη διαθεσιμότητα των φαινολικών υποστρωμάτων για περαιτέρω μεταβολικές τροποποιήσεις (Lewis, 1980). Αντίστοιχα, η έλλειψη βορίου μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη διαθεσιμότητα φαινολικών συστατικών σε ελεύθερη μορφή (Pilbeam and Kirkby, 1983; Cakmak and Römheld, 1997). Τα παραπάνω φαινόμενα παρέχουν το θεωρητικό υπόβαθρο για τη διατύπωση της υπόθεσης σύμφωνα με την οποία ο σχηματισμός και η αποσύσταση συμπλόκων του βορικού οξέος με βασικά, από

πλευράς μεταβολισμού, φαινορικά συστατικά, όπως το καφεϊκό και το γαλλικό οξύ, σχετίζεται με το γενικότερο έλεγχο του μεταβολισμού των φαινολικών συστατικών (Shkol'nik, 1984). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Brown et al. (2002), οι χαμηλές όσο και ποικίλες συγκεντρώσεις βορικού οξέος στα κύτταρα, αλλά και η ποικιλομορφία των υποκαταστατών των παραπάνω συμπλόκων δε συνάδουν υπέρ της καθολικότητας ενός τέτοιου μοντέλου ελέγχου. Ωστόσο, η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ βορικού οξέος και συγκεκριμένων, από πλευράς δομής και λειτουργίας, φαινολικών συστατικών δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Μία πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ βορίου και φαινολικών συστατικών θα μπορούσε να εδράζεται στα κυτταρικά τοιχώματα. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι ένας ανάλογος τύπος αλληλεπίδρασης έχει ήδη βρεθεί μεταξύ πηκτινικών πολυμερών και βορικού οξέος στο πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα. Επίσης, μπορεί να ληφθεί υπόψη η καθολική και εκτεταμένη παρουσία φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα. Μεγάλος αριθμός ανάλογων δομών συνδέεται, μέσω εστερικών δεσμών, με δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Lozonaya et al., 1999). Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι, υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, μειώνεται η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων σε φαινορικά ελευθερούμενα μέσω αλκαλικής υδρόλυσης (Liakopoulos et al., δημοσιεύτα αποτελέσματα). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να υποδηλώνει την σύνδεση φαινολικών συστατικών μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ στα κυτταρικά τοιχώματα.

III. Το φυτό της ελιάς

III.1. Η σημασία της καλλιέργειας της ελιάς

Η ελιά καλλιεργείται από την αρχαιότητα για τους καρπούς και το υψηλής θρεπτικής αξίας ελαιόλαδο, διαδραματίζοντας έτσι πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών όπου έχει αναπτυχθεί. Παράλληλα, όμως, η καλλιέργεια της ελιάς αξιοποιεί εκτάσεις οι οποίες είναι ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες και επιπλέον συμβάλλει στην προστασία των εδαφών από τις διαβρώσεις. Η ελαιοκαλλιέργεια καλύπτει παγκοσμίως έκταση 100 εκατομμυρίων στρεμμάτων, ενώ από την καλλιεργούμενη αυτή έκταση το 98% περίπου βρίσκεται στη λεκάνη της Μεσογείου (Ποντίκης, 2000).

III.2. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της ελιάς

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη (Ποντίκης, 2000). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει περίπου 40 είδη και υποείδη κατανεμημένα σε Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Ωκεανία (Médail et al., 2001). Από τα

Εισαγωγή

παραπάνω, το είδος *Olea europaea* παρουσιάζει την ευρύτερη εξάπλωση, ενώ ειδικότερα η *O. europaea* var *europaea* αποτελεί το αρχαιότερο καλλιεργούμενο υποείδος στη λεκάνη της Μεσογείου.

Η ελιά είναι δένδρο αιωνόβιο, αειθαλές, ύψους 5-20 μέτρων. Το ύψος του δένδρου επηρεάζεται από τη ζωηρότητα του υποκειμένου ή της ποικιλίας, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές φροντίδες. Ο κορμός της ελιάς είναι κυλινδρικός, λείος και τεφροπράσινος στα νεαρά δένδρα, ενώ στα μεγάλης ηλικίας δένδρα είναι ρυτιδωμένος, φελλοποιημένος και χρώματος τεφρού ή σκοτεινού. Το ριζικό σύστημα των ελαιόδενδρων αναπτύσσεται κάθετα μέχρι τον τρίτο ή τέταρτο χρόνο και αργότερα αντικαθίσταται από ένα άλλο θυσανώδες, ενώ η αύξηση των βλαστών διακρίνεται σε επάκρια και πλάγια. Τα φύλλα της ελιάς είναι απλά, αντίθετα, βραχύμισχα, λογχοειδή, παχιά και δερματώδη, και στην πάνω επιφάνειά τους καλύπτονται με χυτίνη, ενώ στην κάτω φέρουν μεγάλο αριθμό τριχών και στομάτια. Οι οφθαλμοί της ελιάς διακρίνονται σε ξυλοφόρους και μικτούς ανθοφόρους. Τα άνθη είναι περίγυνα, μικρά, λευκοκίτρινα και βραχύμισχα και φέρονται κατά βοτρυώδεις ταξιανθίες στις μασχάλες των φύλλων πλάγια των βλαστών της προηγούμενης βλαστικής περιόδου. Τέλος, ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη σφαιρική ή ελλειψοειδής.

Η ελιά παίζει σημαντικό ρόλο στη μεσογειακή διατροφή και επιδρά ευεργετικά στην υγεία λόγω των περιεχόμενων συστατικών των προϊόντων της ελαιοκαλλιέργειας. Το ελαιόλαδο, όπως όλα τα φυτικά έλαια, αποτελείται από ένα σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (τριγλυκερίδια) και ένα μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα. Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα αντιστοιχεί στο 99% του ελαίου, ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν υψηλή βιολογική σημασία λόγω του ότι δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός του ανθρώπου, οπότε το ελαιόλαδο αποτελεί καλή πηγή για τη λήψη τους. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες, σε συνδυασμό με άλλα δευτερεύοντα συστατικά, ανήκουν στο μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιόλαδου (Ποντίκης, 2000). Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν πολυάριθμα φαινολικά οξέα (Le Floch, 1998; Liakopoulos et al., 2001), σεκοϊριδοειδή (Gariboldi et al., 1986) και φλαβονοειδή (Le Tutour and Guedon, 1992; Pieroni et al., 1996; Savournin et al., 2001), με τους γλυκοσίτες των τελευταίων να αντιπροσωπεύουν την πλουσιότερη τάξη διαλυτών φαινολικών των φύλλων (Savournin et al., 2001). Έντονη είναι, επίσης, η παρουσία σεκοϊριδοειδών με κυρίαρχα την ολευροπαΐνη και το λιγστροσίδιο (Damtoft et al., 1993; Soler-Rivas et al., 2000).

III.3. Η επίδραση της έλλειψης βορίου στην ανάπτυξη και φυσιολογία της ελιάς

Το βόριο θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα ιχνοστοιχεία για τη θρέψη της ελιάς και το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τη συχνότητα εμφάνισης της τροφοπενίας βορίου στις ελαιοκομικές περιοχές της χώρας μας (Γαβαλάς, 1978). Η θρεπτική κατάσταση των ελαιόδεντρων, από πλευράς βορίου, έχει άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις τόσο στην φυσιολογία του φυτού όσο και την ποσότητα και ποιότητα του προϊόντος (Γαβαλάς, 1978, Παναγόπουλος, 1997).

Η έλλειψη βορίου είναι υπεύθυνη για την καθυστέρηση έναρξης της βλάστησης (ιδιαίτερα κατά την άνοιξη), την παρεμπόδιση της ανθοφορίας και της καρποφορίας και τη σημαντική πτώση της παραγωγικότητας, καθώς τα ελαιόδεντρα, υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, δεν παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και ικανοποιητικό φορτίο καρπών (Γαβαλάς, 1978; Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Bonggi and Pallioti, 1994; Tsadilas and Chatzoulakis, 1999; Ποντίκης, 2000; Παναγόπουλος, 1997). Το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα στα ελαιόδεντρα, που πάσχουν έντονα από τροφοπενία βορίου, είναι η ύπαρξη πληθώρας ξηρών κλαδίσκων σε όλη την κόμη, μια μορφή γνωστή ως 'σκούπα'. (Γαβαλάς, 1978; Ποντίκης, 2000; Παναγόπουλος, 1997). Ο κορυφαίος οφθαλμός των αναπτυσσόμενων βλαστών νεκρώνεται και σε έντονες τροφοπενιακές καταστάσεις βορίου δε σχηματίζονται ανθοφόροι οφθαλμοί. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται έντονη ανθόπτωση η οποία οδηγεί τα δέντρα σε ακαρπία, ενώ σε ηπιότερες περιπτώσεις τα δέντρα ανθίζουν και καρποδένουν, αλλά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού παρατηρείται έντονη καρπόπτωση (Ποντίκης, 2000; Παναγόπουλος, 1997). Ένα άλλο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της έλλειψης βορίου στα φύλλα ελιάς είναι η χλώρωση του κορυφαίου τμήματος του ελάσματος των φύλλων λόγω της μειωμένης συγκέντρωσης χλωροφυλλών (Γαβαλάς, 1978; Ποντίκης, 2000; Παναγόπουλος, 1997). Το σύμπτωμα αυτό εμφανίζεται αρχικά στα κορυφαία φύλλα των νέων βλαστών και στη συνέχεια και στα κατώτερα. Η ξήρανση της κορυφής του ελάσματος εμφανίζεται μόνο σε ορισμένα παλαιά φύλλα, ενώ σε προχωρημένες φάσεις της τροφοπενίας παρατηρείται μικροφυλλία και ανάπτυξη ροπαλόμορφων φύλλων (Ποντίκης, 2000; Παναγόπουλος, 1997).

Η έλλειψη βορίου επηρεάζει έντονα το δευτερογενή μεταβολισμό της ελιάς. Εκτός από την επαγωγή του μονοπατιού του σικιμικού οξέος και την αύξηση των ολικών φαινολικών, τα φύλλα παρουσιάζουν υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων φαινολικών ουσιών, οι οποίες πιθανόν να σχετίζονται με τη συγκεκριμένη τροφοπενία. Η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών στα φύλλα επηρεάζει, με τη σειρά της, ιδιαίτερα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των ελαιόδεντρων όπως το πάχος του ελάσματος, την ειδική φυλλική μάζα και την

Εισαγωγή

παρουσία ουσιών με αμυντικές ιδιότητες, όπως τα φαινολικά και τα ιριδοειδή (Liakopoulos et al., 2005; Liakopoulos and Karabourniotis, 2005). Επιπλέον, υπό συνθήκες έλλειψης βορίου έχουν απομονωθεί και αναγνωριστεί σε φύλλα ελιάς δύο νέα ιριδοειδή, παράγωγα του σεκολογανικού οξέος, το 6'-*E*-*p*-κουμαρόυλο-σεκολογανικό οξύ και ο 6'-*O*-[(2*E*)-2,6-διμέθυλο-8-υδρόξυλο-2-οκτενοϋλοξυ]-σεκολογανοσίδης (Karioti et al., 2006).

Σκοπός της εργασίας

Είναι γνωστό ότι η διατροφή των φυτών με βόριο έχει άμεση επίδραση στο μεταβολισμό των φαινολικών συστατικών (Shkol'nik et al., 1981; Pilbeam and Kirkby, 1983; Cakmak et al., 1995; Ruiz et al., 1998; Ruiz et al., 1999; Cara et al., 2002; Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Stavrianakou et al., 2006). Έως τώρα, η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών υπό τροφопενία βορίου αποδίδεται στην αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος (Cakmak and Römheld, 1997). Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η αύξηση ορισμένων φαινολικών συστατικών δεν μπορεί να εξηγηθεί αποκλειστικά μέσω της ενίσχυσης του μεταβολισμού (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Liakopoulos et al., αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί μια κυτταρική δομή στην οποία πιθανόν διαδραματίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ βορικού οξέος και ορισμένων φαινολικών συστατικών. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η πιθανή ύπαρξη φαινολικών συστατικών ενωμένων στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ. Ήδη είναι γνωστό πως το βορικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό δομικό ρόλο στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω ενός μηχανισμού ανάλογου με αυτόν της υπόθεσης εργασίας, μέσω συναρμογής των πηκτινικών αλυσίδων του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (O'Neill et al., 2004).

Για την πειραματική προσέγγιση της υπόθεσης εργασίας πραγματοποιήθηκε υδροπονική καλλιέργεια φυτών ελιάς υπό ελεγχόμενες συνθήκες θρέψης. Στη λήξη της περιόδου καλλιέργειας μελετήθηκαν τα φαινολικά συστατικά του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των φύλλων της ελιάς. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα κατεργάστηκαν με τον ανταγωνιστή του βορικού οξέος 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ (3-NBA). Το 3-NBA ως ισχυρότερο οξύ από το βορικό και διαθέτοντας ένα αντί δύο ζευγών υδροξυλίων στο μόριό του εκδιώκει το βορικό οξύ από τις υπάρχουσες θέσεις δέσμευσης, προκαλώντας έτσι τεχνητή έλλειψη βορικού οξέος. Σκοπός του χειρισμού ήταν να εξεταστεί η ύπαρξη φαινολικών συστατικών τα οποία προσδένονται στα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διαδεσμών του βορικού οξέος. Επίσης, επιχειρήθηκε η διερεύνηση της επίδρασης των ελλειμματικών συγκεντρώσεων βορικού οξέος στην παραπάνω ομάδα συστατικών.

Υλικά και Μέθοδοι

I. Πειράματα με υδροπονική καλλιέργεια φυταρίων ελιάς

I.1. Φυτικό υλικό και περιγραφή των συνθηκών καλλιέργειας

I.1.1. Προετοιμασία του φυτικού υλικού και του υποστρώματος καλλιέργειας

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

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

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

I.1.2. Περιγραφή του συστήματος πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας

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

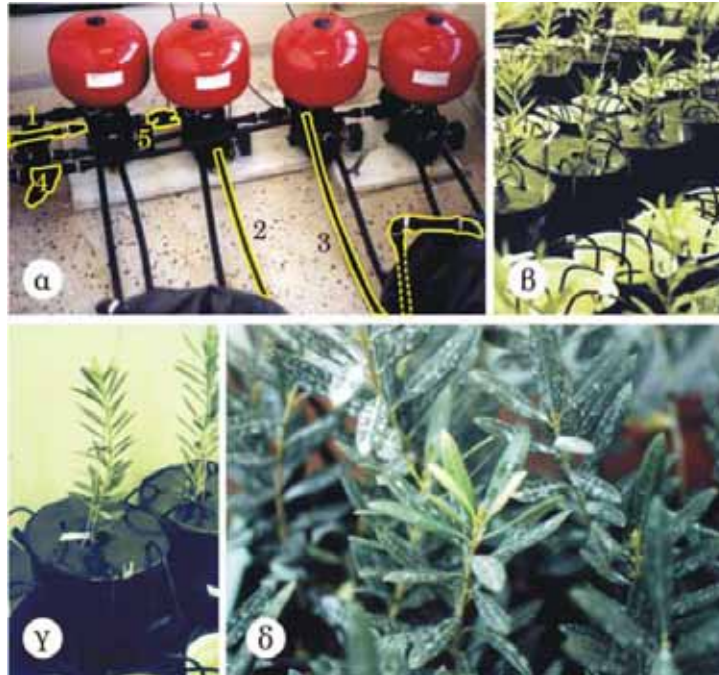
Υλικά και Μέθοδοι

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

Το σύστημα πειραματικής υδροπονικής καλλιέργειας (εικόνα 3) αποτελείτο από τέσσερα ανεξάρτητα κυκλώματα διανομής θρεπτικού διαλύματος κλειστού τύπου χωρίς ανακύκλωση. Τα θρεπτικά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία όγκου 100 l και για την τροφοδοσία κάθε κυκλώματος χρησιμοποιήθηκε αντλία τύπου DAB JET 81 M-P (DAB Pumps S.P.A., Mestrino, Italy) με δοχείο πίεσης όγκου 24 l. Η αντλία είχε μανομετρικό ύψος 102 m και παροχή 0,06-37,00 m³ h⁻¹. Λόγω των μικρών απαιτήσεων παροχής και με σκοπό την αποφυγή επαναλαμβανόμενων εκκινήσεων κατά τη διάρκεια της άρδευσης, καθώς και για την τακτική ανακίνηση των θρεπτικών διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε δευτερεύον κύκλωμα επαναφοράς στο δοχείο φύλαξης. Η πίεση στο κύκλωμα ρυθμιζόταν με βάνια στο σωλήνα του κυρίως κυκλώματος, ενώ η πυκνότητα και ο χρόνος των αρδεύσεων ρυθμιζόταν αυτόματα από προγραμματιστή άρδευσης τύπου Junior 6M (Irritrol Systems, Riverside, CA, USA).

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

Για την αξιολόγηση της ομοιομορφίας μεταξύ των σταλακτών του συστήματος έγιναν δοκιμές άρδευσης με δοκιμαστικά δοχεία και μετρήθηκε ο όγκος του θρεπτικού διαλύματος που συγκεντρωνόταν σε κάθε δοχείο. Η τυπική



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

απόκλιση του όγκου του θρεπτικού διαλύματος ήταν μικρότερη από 2-9% του μέσου όρου. Για την εξασφάλιση ισορροπίας το υπόστρωμα τοποθετήθηκε στα δοχεία ανάπτυξης και αρδευόταν κανονικά με το θρεπτικό διάλυμα δύο μέρες πριν την τοποθέτηση των φυτών.

1.1.3. Συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας

Τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θάλαμο σύμφωνα με συγκεκριμένη διάταξη (εικόνα 4) και οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία και φωτοπερίοδος) επιλέχθηκαν έτσι ώστε να αντιστοιχούν στην περίοδο έκπτυξης της νέας βλάστησης. Για την έναρξη ή τη λήξη της φωτοπεριόδου οι λαμπτήρες θέτονταν σε λειτουργία ή εκτός λειτουργίας προοδευτικά, ώστε η μετάβαση από τη σκοτοπερίοδο προς τη φωτοπερίοδο, με πλήρη ένταση ακτινοβολίας και αντίστροφα, να διαρκεί περίπου 1 h.

Υλικά και Μέθοδοι



Εικόνα 4. Διάταξη των πειραματοφύτων στο θάλαμο ανάπτυξης. Οι αριθμοί δείχνουν την πειραματική μεταχείριση.

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

1.2. Πειραματική πορεία

1.2.1. Χρονοδιάγραμμα πειράματος, κατηγορίες δειγμάτων και πειραματικοί χειρισμοί

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

τη μέτρηση της συγκέντρωσης του βορίου περιελάμβαναν 4 επαναλήψεις, ενώ αυτές για τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών περιελάμβαναν 9 επαναλήψεις.

1.2.2. Παράμετροι ανάπτυξης και βιοχημικές παράμετροι

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

1.2.3. Συγκέντρωση βορίου

1.2.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση ολικού βορίου

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του ολικού βορίου έλαβε χώρα και στις δύο δέσμες όλων των χειρισμών (B23, B2, B05 και B00) σε τέσσερις επαναλήψεις. Το έλασμα των φύλλων κάθε κατηγορίας χωρίστηκε σε δύο μέρη και απορρίφθηκε η κεντρική νεύρωση. Το ένα μέρος, αφού μετρήθηκε το νωπό βάρος, τοποθετήθηκε στους 90 °C ώστε να μετρηθεί το ολικό βόριο. Ακολούθησε λειοτριβήση αυτού και τοποθέτηση ~30 mg ξηρής ουσίας σε πορσελάνινες κάψες (εξευγενισμένες με πλύσεις διαλύματος HCl 0,6 N και απιονισμένου νερού) και στη συνέχεια ξηρή καύση σε θερμοκρασία 500 °C (ανύψωση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4,2 °C min⁻¹ και παραμονή στην παραπάνω θερμοκρασία για 6 h). Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η τέφρα εκχυλίστηκε με 0,5 ml διαλύματος HCl 6 N και το εκχύλισμα αραιώθηκε σε τελικό όγκο 4,5 ml με νερό. Για την παρασκευή των διαλυμάτων, καθώς και για τις εκχυλίσεις, χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

1.2.3.2. Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση κλάσματος αδιάλυτου βορίου

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

1.2.3.3. Μέτρηση συγκέντρωσης βορίου μέσω χρωματικής αντίδρασης αζωμεθίνης

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης βορίου ακολουθήθηκε η μέθοδος της χρωματικής αντίδρασης με αζωμεθίνη (Banuelos et al., 1992). Όγκος 2 ml από το

Υλικά και Μέθοδοι

εκχύλισμα της τέφρας ρυθμίστηκε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος $\text{AcNH}_4/\text{AcOH}/\text{Na}_2\text{EDTA}$, pH 5,7 και αντέδρασε με 1 ml διαλύματος αζωμεθίνης (0,45 g/100ml ασκορβικού οξέος 1%). Μετά από 20 min μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 420 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης τύπου Shimadzu UV-Vis 160A (Shimadzu Co., Tokyo, Japan). Η συγκέντρωση βορίου υπολογίστηκε βάση καμπύλης αναφοράς (0,004; 0,02; 0,04; 0,1; 0,3; 2,0 ppm B; 7 σημεία: R^2 0,9999) και τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε διάλυμα 0,6 N HCl. Σε όλα τα στάδια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκεύη για την αποφυγή επιρύπανσης με βόριο.

1.2.3.4. Μέτρηση συγκέντρωσης βορίου μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Για το χρωματογραφικό προσδιορισμό του βορικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Matoh et al. (1997) όπως τροποποιήθηκε από τους Stavrianakou et al. (2006a). Η συγκέντρωση του βορίου με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης προσδιορίστηκε σε δείγματα του κυτταρικού χυμού. Για την προετοιμασία των δειγμάτων όγκος έως 100 μl δείγματος αραιώθηκε έως 1000 μl με νερό και αντέδρασε με 50 μl αντιδραστήριου CA (150 mg χρωμοτροπικού οξέος, 186 mg $\text{EDTA}-2\text{Na}/5$ ml H_2O) και 50 μl αντιδραστήριου TBA (1,61 g βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο/5 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 1M, pH 4,8). Το μείγμα παρέμεινε για 10 min και ακολούθως διηθήθηκε με φίλτρο μεμβράνης 0,2 μm Chromafil CA-20/25 (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, το βορικό οξύ αναλύεται χρωματογραφικά και ανιχνεύεται στα 350 nm και ως σύμπλοκο με το χρωμοτροπικό οξύ. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε στήλη ανάστροφης φάσης APEX ODS 5 μm, 250 x 4,6 mm (Jones Chromatography Limited, Mid Glamorgan, UK) συνδεδεμένη σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης τύπου Jasco NLG980-02/PU980/UV970 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Όγκος 20 μl του μείγματος αντίδρασης διαχωρίστηκε με κινητή φάση η οποία προετοιμάστηκε ως ακολούθως: 3,5 g βρωμιούχου τετραβουτυλαμμώνιου και 33 ml 1M HCl σε 550 ml MeOH και ακολούθως αραιώση στα 1000 ml με H_2O . Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min^{-1} και η ανίχνευση έγινε στα 350 nm. Η παραπάνω μέθοδος έδωσε κατώτατο όριο μέτρησης ως 0,02 ppm B. Για την επίτευξη του ορίου αυτού η διαδικασία απαλλάχτηκε των προσμείξεων με τη χρήση εξευγενισμένων σκευών και νερού Ultrapure (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, μέγιστη [B]<0,2 ppb) για την προετοιμασία όλων των αντιδραστηρίων.

Λόγω της ανίχνευσης του συμπλόκου βορικού οξέος-χρωμοτροπικού οξέος στα 350 nm, η μέθοδος είναι κατάλληλη για τη μέτρηση ιχνοποσοτήτων βορικού

οξέος, ενώ πλεονεκτεί και όσον αφορά στον ελάχιστο όγκο δείγματος, έως και 100 μl, ο οποίος απαιτείται για τη διεξαγωγή της.

I.2.4 Ανάλυση φαινολικών

I.2.4.1. Μέτρηση διαλυτών φαινολικών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) εξοπλισμένο με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού UV-970 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). Ο διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη Zorbax Stablebond SB-C18 column (5-mm particle size; 250 · 4,6 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη χρωματογραφική ανάλυση ορισμένος όγκος εκχυλίσματος διηθήθηκε από φίλτρο μεμβράνης 0,2 μm Chromafil CA-20/25 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) και η εισαγωγή του δείγματος έγινε με βαλβίδα εισαγωγής 7725i (Reodyne, Rohnhert Park, California, USA) χωρητικότητας 20 μl. Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου, ενώ τα μείγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητή φάση ήταν: A: 10% MeCN σε 1% H₃PO₄ και B: MeCN. Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα έκλουσης: αρχικές συνθήκες: (A:B) 94:6; gradient για 15 min προς 89:11; ισοκρατικό για 3 min; gradient για 22 min προς 66:34; gradient για 1 min προς 0:100; ισοκρατικό για 4 min; επαναφορά στις αρχικές συνθήκες και εξισορρόπηση για 10 min. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹ και η ανίχνευση έγινε στα 281 και 333 nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Borwin Chromatographic Software, ver. 1. 21. 60 (JMBS Development, Fontaine, France). Οι κορυφές έκλουσης αναγνωρίστηκαν με σύγκριση με πρότυπες ουσίες, με βάση το χρόνο συγκράτησης, τα φάσματα απορρόφησης καθώς και με συγχρωματογράφιση. Η καταγραφή των φασμάτων απορρόφησης πραγματοποιήθηκε με παύση ροής χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή. Τα φάσματα απορρόφησης ελήφθησαν στην αιχμή της κορυφής έκλουσης και κατά περίπτωση σε διαφορετικά σημεία της καμπύλης της κορυφής έκλουσης, για τη διαπίστωση της καθαρότητας των εκλουόμενων συστατικών. Η συγκέντρωση των εκλουόμενων συστατικών μετρήθηκε μέσω του εμβαδού των κορυφών έκλουσης και με τη βοήθεια καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν με εκτέλεση αναλύσεων προτύπων διαλυμάτων.

II. Πειράματα in vitro για τη διερεύνηση του ρόλου των φαινολικών συστατικών στη φυσιολογία του βορίου

II.1. Προσδιορισμός φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών χαρακτηριστικών ακτεοσίδη και ολευροπαΐνης

Το πρότυπο του ακτεοσίδη προήλθε μετά από καλλιέργεια φυτών σε ελλειμματικές συγκεντρώσεις βορίου και εκχύλιση των φύλλων. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε έως ξηρού και υποβλήθηκε σε μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού έως την απομόνωση καθαρών συστατικών. Η δομή των τελευταίων προσδιορίστηκε μέσω φασματοσκοπίας (1D και 2D H-NMR και ^{13}C -NMR). Το πρότυπο της ολευροπαΐνης προήλθε από ανεξάρτητο εργαστήριο και η καθαρότητά του ελέγχθηκε χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά.

Για τις δύο ουσίες πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές χρωματογραφικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του χρόνου συγκράτησης και των φασματοσκοπικών τους χαρακτηριστικών στο σύστημα χρωματογραφικού διαχωρισμού που επιλέχθηκε.

II.2. Επίδραση βορονικού οξέος στο φυτικό υλικό

Τα πειράματα μέσω επίδρασης βορονικού οξέος στο φυτικό υλικό στηρίχθηκαν στην ιδιότητα των βορονικών οξέων να ανταγωνίζονται το βορικό οξύ για τις θέσεις δέσμευσης του τελευταίου. Έτσι, τα βορονικά οξέα, τα οποία είναι ισχυρότερα οξέα από το βορικό οξύ, παρεμποδίζουν το σχηματισμό συμπλόκων του με πολυόλες ή εκδιώκουν το βορικό οξύ από τις υπάρχουσες θέσεις δέσμευσης (Bassil et al., 2004).

Ως βορονικό οξύ επιλέχθηκε το 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ (3-NBA) λόγω του χαρακτηριστικού του ως ισχυρότερο οξύ από το βορικό οξύ και της ύπαρξης φαινολικού δακτυλίου, ο οποίος επιτρέπει την ανάλυσή του μέσω χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ανίχνευσης στο υπεριώδες φως.

II.2.1. Επίδραση βορονικού οξέος σε ολόκληρα φυτά

Για τη διαπίστωση της εισόδου ή όχι του 3-NBA μέσω του ριζικού συστήματος των φυτών, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό διάλυμα B23 στο οποίο είχε προστεθεί 3-NBA συγκέντρωσης 2 mM. Στο παραπάνω διάλυμα όγκου 1 l εισήχθη φυτό με γυμνό ριζικό σύστημα. Στο διάλυμα υπήρχε συνεχής διοχέτευση αέρα για την οξυγόνωση του ριζικού συστήματος. Το φυτό παρέμεινε κάτω από ένταση ακτινοβολίας περίπου $200 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και φυτό-μάρτυρας με θρεπτικό διάλυμα B23 χωρίς την προσθήκη 3-NBA. Τα δύο φυτά παρέμειναν στη διάταξη για 3 ώρες. Ακολούθησε εξαγωγή των φυτών, πλύσιμο με απιονισμένο νερό και χωρισμός υπέργειου-υπόγειου μέρους. Το υπόγειο μέρος εισήχθη σε

θάλαμο Schölander για την εξαγωγή του ανιόντος χυμού. Συλλέχθηκαν ~200 μl χυμού και συντηρήθηκαν στους -20 °C. Η μέτρηση του 3-NBA στον ανιόντα χυμό έγινε χρωματογραφικά, όπως περιγράφεται παραπάνω ($R_t = 21.24 \text{ min}$), και με ανίχνευση στα 277 nm (0.261 AU (268955 $\mu\text{V}\times\text{s}$)/40 μM /διαλύτης H_2O).

II.2.2. Επίδραση βορονικού οξέος σε δίσκους φύλλων

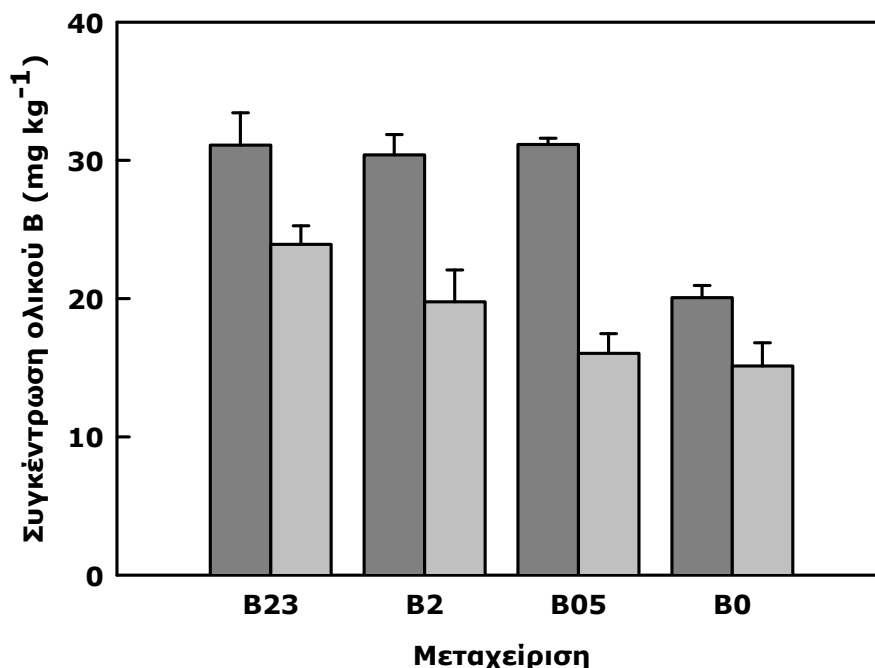
Για το χειρισμό ιστών του φύλλου με 3-NBA, δίσκοι φύλλων των χειρισμών B23/B2/B05/B0 αφαιρέθηκαν με φελλοτρυπητήρα. Οι δίσκοι εισήχθησαν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα MES/KOH 50 mM, pH 6,0. Στο ήμισυ των δειγμάτων προστέθηκε 3-NBA σε συγκέντρωση 0,5 mM. Ακολούθως οι δίσκοι παρέμειναν για 2 h στα διαλύματα επώασης σε κενό -900 mbar. Μετά την επώαση οι δίσκοι αφαιρέθηκαν, πλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αναλύθηκαν για το περιεχόμενο διαλυτό βορικό οξύ και τα περιεχόμενα φαινολικά του κυτταρικού χυμού.

Αποτελέσματα

1.1. Πείραμα επιβολής τροφοπενίας βορίου σε φυτάρια ελιάς υπό συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας

1.1.1. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα

Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (ημέρα 51^η). Η μέτρηση της συγκέντρωσης ολικού βορίου πραγματοποιήθηκε σε νεαρά και ώριμα φύλλα (για ορισμό της ηλικίας των φύλλων βλ. 'Υλικά και Μεθόδους') και για τις τέσσερις μεταχειρίσεις συγκέντρωσης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας. Η συγκέντρωση βορίου κυμάνθηκε μεταξύ ορίων επάρκειας, τουλάχιστον για τα νεαρά φύλλα, ενώ μειώθηκε με το βαθμό έλλειψης βορίου στο θρεπτικό διάλυμα σε μετρίως ελλειμματικά επίπεδα (εικόνα 5). Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση του ολικού βορίου στα νεαρά φύλλα ήταν υψηλότερη αυτής των ώριμων για δεδομένη πειραματική μεταχείριση. Είναι αξιοσημείωτο ότι, στα νεαρά φύλλα, μείωση της συγκέντρωσης βορίου παρατηρήθηκε μόνο στη μεταχείριση από την οποία έλλειπε παντελώς το βόριο στο θρεπτικό διάλυμα. Το γεγονός αυτό σχετίζεται, μεταξύ άλλων, με το φαινόμενο της επανεκκίνησης βορίου από τα



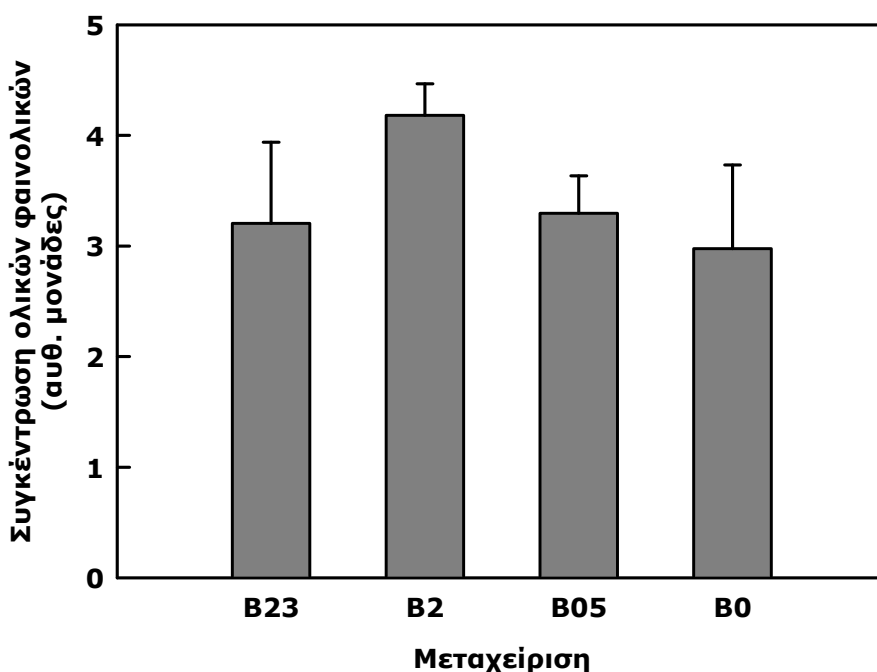
Εικόνα 5. Συγκέντρωση ολικού βορίου στα φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51^η ημέρα) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Με σκούρες ράβδους παριστάνεται η συγκέντρωση βορίου των νεαρών φύλλων και με ανοικτές ράβδους η συγκέντρωση βορίου των ώριμων φύλλων. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

Αποτελέσματα

ώριμα όργανα. Πράγματι, σε όλες τις ελλειμματικές σε βόριο μεταχειρίσεις, η συγκέντρωση ολικού βορίου των ώριμων φύλλων μειώθηκε ανάλογα με το βαθμό έλλειψης συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες (B23, εικόνα 5).

1.1.2. Συγκέντρωση ολικών διαλυτών φαινολικών στα φύλλα

Στην εικόνα 6 παριστάνεται η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών φαινολικών των νεαρών φύλλων στη λήξη του πειράματος για τις τέσσερις μεταχειρίσεις. Οι τιμές ελήφθησαν ως ολική επιφάνεια ολοκλήρωσης των κορυφών έκλουσης, με ανίχνευση στα 284 και 333 nm μετά το διαχωρισμό των ουσιών σε αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Παρατηρούμε πως οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων είναι μικρές και πιθανώς μη αξιολογήσιμες.

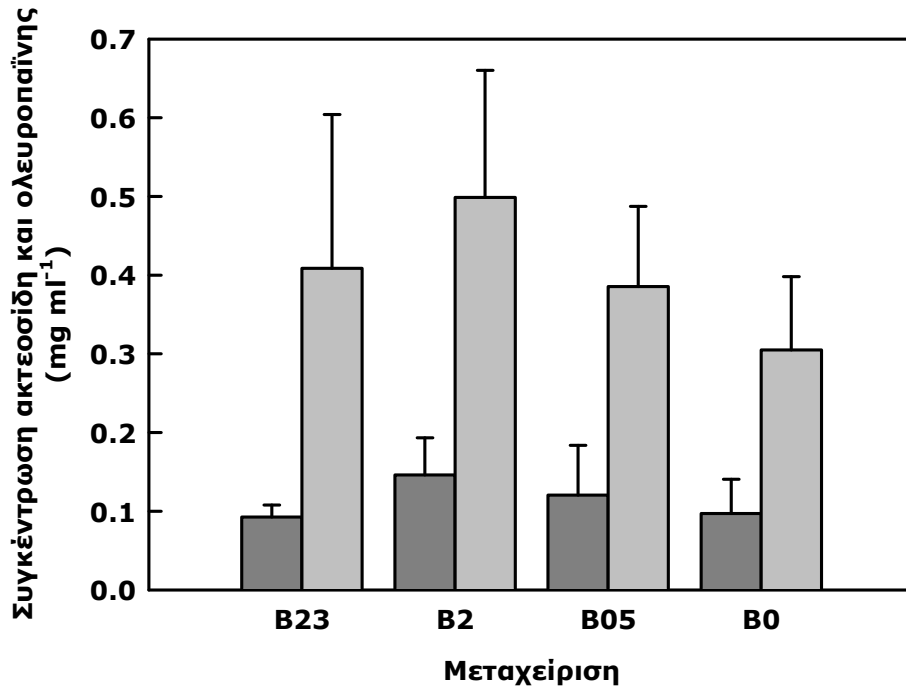


Εικόνα 6. Συγκέντρωση ολικών διαλυτών φαινολικών στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51^η ημέρα) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

1.1.3. Συγκέντρωση του φαινυλοαιθανοειδούς γλυκοσίτη ακτεοσίδη και του σεκοϊριδοειδούς ολευροπαΐνης στα φύλλα

Μετά από χρωματογραφικό διαχωρισμό των εκχυλισμάτων μετρήθηκε η συγκέντρωση δύο χαρακτηριστικών για την υπόθεση εργασίας δευτερογενών μεταβολιτών. Πρόκειται για έναν φαινυλοαιθανοειδή γλυκοσίτη, παράγωγο του καφεϊκού οξέος, με το κοινό όνομα ακτεοσίδη και ένα γλυκοσιλιωμένο σεκοϊριδοειδές, την ολευροπαΐνη. Ο ακτεοσίδη μελετάται διότι σε προηγούμενες εργασίες έχει βρεθεί ότι η τροφοπενία βορίου αυξάνει τη συγκέντρωσή του στα

φύλλα. Από την άλλη μεριά, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η συγκέντρωση της ολευροπαΐνης αυξάνεται υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου. Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των δύο μεταβολιτών στα φύλλα για κάθε πειραματική μεταχείριση. Παραδόξως, η συγκέντρωση και των δύο μεταβολιτών παρουσίασε μικρή αύξηση στις μεταχειρίσεις B2 και B05, ενώ η συγκέντρωση του ακτεοσίδη παρέμεινε αμετάβλητη και η συγκέντρωση της ολευροπαΐνης μειώθηκε στη μεταχείριση B0 συγκριτικά με το μάρτυρα (εικόνα 7).



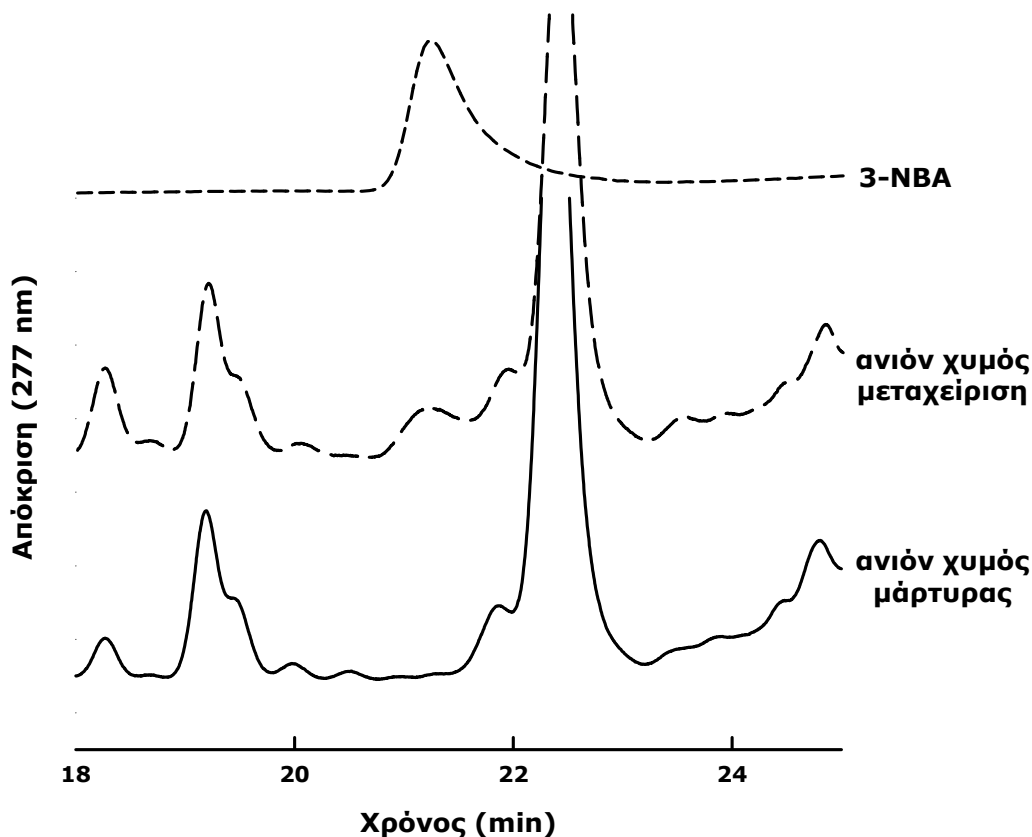
Εικόνα 7. Συγκέντρωση ακτεοσίδη (σκούρες ράβδοι) και ολευροπαΐνης (ανοικτές ράβδοι) στα νεαρά φύλλα των πειραματοφύτων στη λήξη του πειράματος (51^η ημέρα) για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές συγκέντρωσης αναφέρονται στο εκχύλισμα και είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

1.2. Πείραμα επίδρασης βορονικού οξέος σε ολόκληρα φυτά

Έγινε προσπάθεια εφαρμογής βορονικού οξέος σε ολόκληρα φυτά σε υδροπονική καλλιέργεια μέσω του ριζικού συστήματος. Ως βορονικό οξύ επιλέχθηκε το 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ (3-NBA) για τρεις λόγους. Αρχικά επειδή πρόκειται για οξύ ισχυρότερο του βορικού (βλ. 'Υλικά και Μέθοδοι'), ακολούθως επειδή είναι υδατοδιαλυτό και τρίτον, επειδή λόγω του φαινολικού υπολείμματος του μορίου του μπορεί να ανιχνευθεί με HPLC μέσω της απορρόφησής του στα 277 nm. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ελάχιστη συγκέντρωση στο διάλυμα για την ανίχνευση του 3-NBA ήταν τα 2 mM (εικόνα 8). Ωστόσο, σε αυτή τη συγκέντρωση στο διάλυμα, η συγκέντρωσή του στον ανιόντα χυμό των φυτών βρέθηκε περίπου 667 φορές μικρότερη (~3 μM). Το γεγονός αυτό αποδίδεται, πέραν από την

Αποτελέσματα

πιθανή μειωμένη απορροφητικότητα του από το ριζικό σύστημα, στην ισχυρή συγκράτησή του από τα συστατικά των κυττάρων ή/και τα κυτταρικά τοιχώματα κατά την ακτινική του κίνηση έως τα αγγεία του ξυλώματος, αλλά και ακόμα από τα ίδια τα ξυλώδη αγγεία.



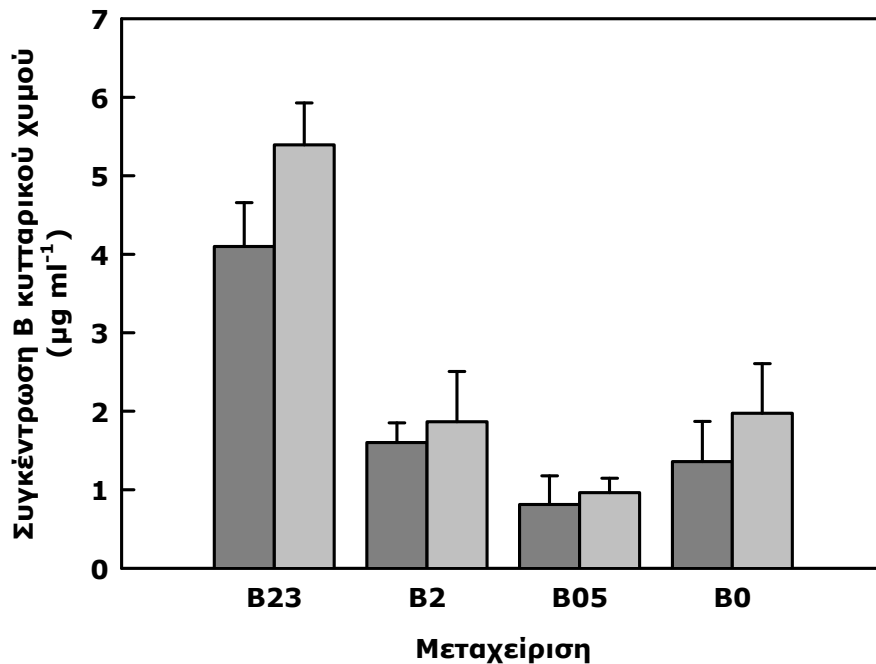
Εικόνα 8. Χρωματογραφική ανάλυση του ανιόντος χυμού φυτών ελιάς τα οποία παρέμειναν σε υδροπονική καλλιέργεια για 3 h με ή χωρίς την παρουσία 3-NBA στο διάλυμα. Στο κορυφαίο χρωματογράφημα παρουσιάζεται η κορυφή έκλουσης που αντιστοιχεί στο 3-NBA σε πρότυπο διάλυμά του (40 μM). Στο μεσαίο χρωματογράφημα (ανιόντας χυμός φυτού που δέχθηκε τη μεταχείριση του 3-NBA) φαίνεται η κορυφή έκλουσης του 3-NBA με χρόνο συγκράτησης 21,24 min. Στο βασικό χρωματογράφημα (ανιόντας χυμός φυτού μάρτυρα) το 3-NBA απουσιάζει.

1.3. Πείραμα επίδρασης βορονικού οξέος σε δίσκους φύλλων

Λόγω της αδυναμίας εισόδου του 3-NBA σε ολόκληρα φυτά μέσω του ριζικού συστήματος, τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε απομονωμένους δίσκους φύλλων. Το βασικό πείραμα αυτής της κατηγορίας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως φυτικό υλικό νεαρά φύλλα από το κυρίως πείραμα υδροπονικής καλλιέργειας από την τελική δειγματοληψία (βλ. 'Αποτελέσματα', Ενότητα I.1). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε 3-NBA σε συγκέντρωση 0,5 mM.

Ι.3.1. Συγκέντρωση βορικού οξέος στον κυτταρικό χυμό των δίσκων φύλλων μετά την επίδραση του 3-NBA

Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα δείγματα κυτταρικού χυμού και το περιεχόμενο βορικό οξύ μετρήθηκε μέσω HPLC (βλ. 'Υλικά και Μέθοδοι'). Στην εικόνα 9 φαίνεται η συγκέντρωση βορικού οξέος σε δείγματα των τεσσάρων πειραματικών χειρισμών, χωρίς την επίδραση 3-NBA, καθώς και σε δείγματα των τεσσάρων πειραματικών χειρισμών μετά από επώαση για 2 h σε διάλυμα με 3-NBA σε συγκέντρωση 0,5 mM. Οι πειραματικοί χειρισμοί, στους οποίους το βόριο στο θρεπτικό διάλυμα ήταν σε ελλειμματικά επίπεδα (B2 έως B0), είχαν ως αποτέλεσμα την έντονη μείωση των συγκεντρώσεων του βορικού οξέος στον κυτταρικό χυμό των φύλλων, συγκριτικά με το μάρτυρα (B23, εικόνα 9). Επιπλέον, η επίδραση του 3-NBA στα παραπάνω δείγματα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του βορικού οξέος στον κυτταρικό χυμό σε ποσοστά έως και 45% (εικόνα 9).

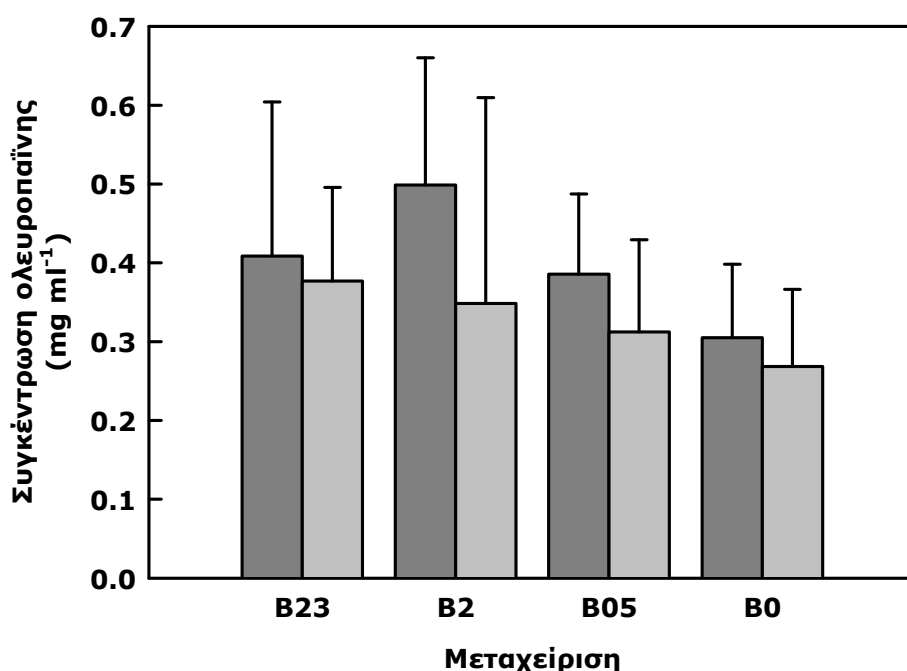


Εικόνα 9. Συγκέντρωση βορικού οξέος στον κυτταρικό χυμό δίσκων φύλλων για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις μετά την επίδραση του βορονικού οξέος 3-NBA (ανοικτές ράβδοι) συγκριτικά με δείγματα μάρτυρες (σκούρες ράβδοι). Οι τιμές συγκέντρωσης αναφέρονται στον κυτταρικό χυμό και είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

Αποτελέσματα

Ι.3.2. Συγκέντρωση φαινολικών σε δίσκους φύλλων μετά την επίδραση του 3-NBA

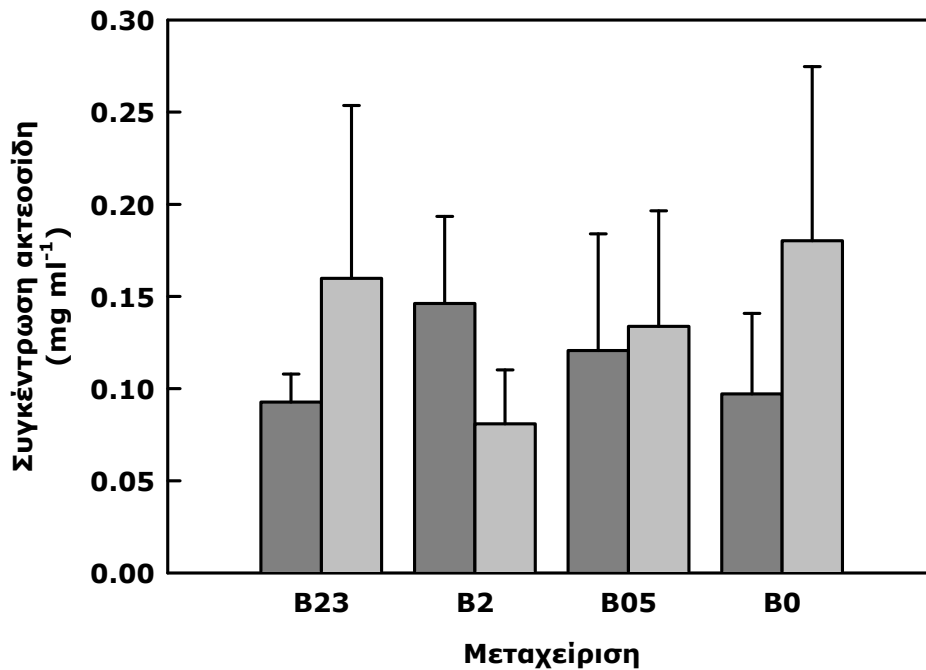
Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η συγκέντρωση της ολευροπαΐνης σε δείγματα των τεσσάρων πειραματικών χειρισμών, χωρίς την επίδραση 3-NBA, καθώς και σε δείγματα των τεσσάρων πειραματικών χειρισμών μετά από επώαση για 2 h σε διάλυμα με 3-NBA σε συγκέντρωση 0,5 mM. Σε όλους τους πειραματικούς χειρισμούς η επίδραση του 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της ολευροπαΐνης στα κύτταρα συγκριτικά με τους αντίστοιχους μάρτυρες (εικόνα 10). Αντίθετα με την ολευροπαΐνη, σχεδόν σε όλους τους πειραματικούς χειρισμούς βορίου, η επίδραση του 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του ακτεοσίδη η οποία έφτασε έως και το 85% (εικόνα 11).



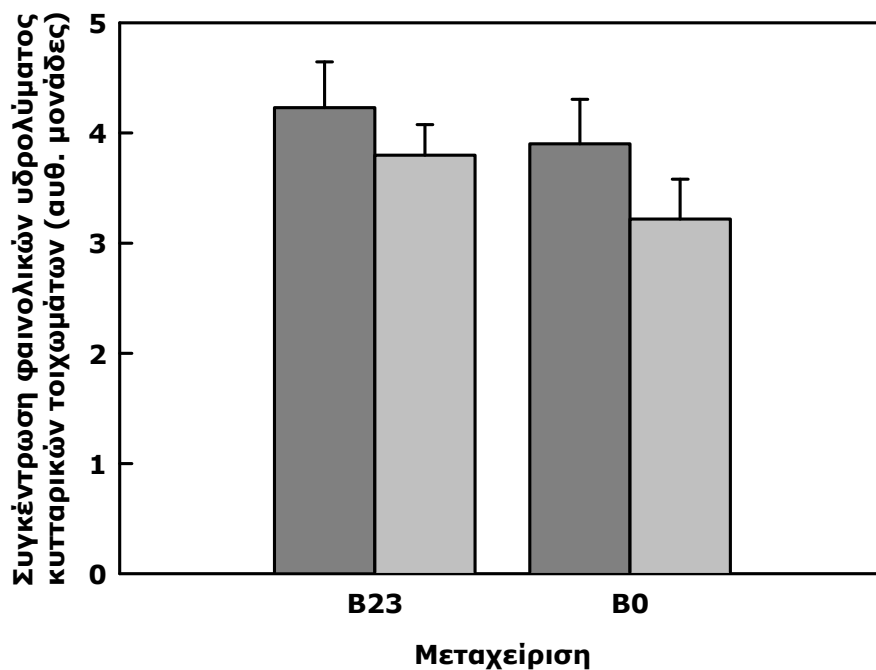
Εικόνα 10. Συγκέντρωση ολευροπαΐνης στα κύτταρα δίσκων φύλλων για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις μετά την επίδραση του βορονικού οξέος 3-NBA (ανοικτές ράβδοι) συγκριτικά με δείγματα μάρτυρες (σκούρες ράβδοι). Οι τιμές συγκέντρωσης αναφέρονται στο εκχύλισμα και είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

Ι.3.3. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών στο αλκαλικό υδρόλυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων δίσκων φύλλων μετά την επίδραση του 3-NBA

Μετά τη μέτρηση των διαλυτών μορίων στους δίσκους πραγματοποιήθηκε απομόνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Ακολούθως, τα δείγματα των κυτταρικών τοιχωμάτων υποβλήθηκαν σε αλκαλική υδρόλυση και το οργανικό



Εικόνα 11. Συγκέντρωση ακτεοσίδης στα κύτταρα δίσκων φύλλων για τις τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις μετά την επίδραση του βορονικού οξέος 3-NBA (ανοικτές ράβδοι) συγκριτικά με δείγματα μάρτυρες (σκούρες ράβδοι). Οι τιμές συγκέντρωσης αναφέρονται στο εκχύλισμα και είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 12. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών υδρολύματος κυτταρικών τοιχωμάτων για τις δύο ακραίες (B23 και B0) πειραματικές μεταχειρίσεις μετά την επίδραση του βορονικού οξέος 3-NBA (ανοικτές ράβδοι) συγκριτικά με δείγματα μάρτυρες (σκούρες ράβδοι). Οι τιμές είναι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

Αποτελέσματα

μέρος του υπερκείμενου του υδρολύματος υποβλήθηκε σε HPLC για την ανάλυση των απελευθερωμένων φαινολικών ουσιών. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών στα παραπάνω δείγματα για τους δύο ακραίους πειραματικούς χειρισμούς, B23 και B0. Ο ελλειμματικός σε βόριο χειρισμός B0 είχε ως αποτέλεσμα τη μικρή μείωση της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων συγκριτικά με το μάρτυρα (B23, εικόνα 12). Και στους δύο πειραματικούς χειρισμούς, η επίδραση του 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων στα κύτταρα συγκριτικά με τους αντίστοιχους μάρτυρες (εικόνα 12).

Συζήτηση

Πραγματοποιήθηκε υδροπονική καλλιέργεια φυτών ελιάς υπό ελεγχόμενες συνθήκες θρέψης και χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις βορικού οξέος στο θρεπτικό διάλυμα, 23/2/0,5 και 0,0 μM . Από αυτές, η πρώτη θεωρείται επαρκής (μεταχείριση μάρτυρα) ενώ οι τρεις επόμενες θεωρούνται ελλειμματικές. Στη λήξη της περιόδου καλλιέργειας μελετήθηκαν τα φαινολικά συστατικά του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των φύλλων της ελιάς. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα κατεργάστηκαν με τον ανταγωνιστή του βορικού οξέος 3-νιτροφαινυλοβορονικό οξύ (3-NBA). Το 3-NBA ως ισχυρότερο οξύ από το βορικό και διαθέτοντας ένα αντί δύο ζευγών υδροξυλίων στο μόριό του εκδιώκει το βορικό οξύ από τις υπάρχουσες θέσεις δέσμησης, προκαλώντας έτσι τεχνητή έλλειψη βορικού οξέος. Σκοπός του χειρισμού ήταν να εξεταστεί η ύπαρξη φαινολικών συστατικών τα οποία προσδένονται στα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διαδεσμών του βορικού οξέος. Επίσης, επιχειρήθηκε η διερεύνηση των ελλειμματικών συγκεντρώσεων βορικού οξέος στην παραπάνω ομάδα συστατικών (εικόνα 13).

Η ανταπόκριση των φυτών στην καλλιέργεια, όσον αφορά στη συγκέντρωση βορίου των φύλλων, παρουσιάστηκε σύμφωνη με τους τέσσερις πειραματικούς χειρισμούς (εικόνα 5). Ωστόσο, οι απόλυτες συγκεντρώσεις βορίου δεν ήταν ακραία χαμηλές (σε προηγούμενα πειράματα οι συγκεντρώσεις βορίου των τροφοπενιακών φύλλων κυμάνθηκαν στα επίπεδα των $5 \text{ mg B kg}^{-1} \text{ ξ.β.}$). Αυτό αποδίδεται στην ατομικότητα των συγκεκριμένων φυτών σε σχέση με παρελθόντα πειράματα και συγκεκριμένα στο ρυθμό ανάπτυξης έως την εμφάνιση της τροφοπενίας.

Γενικά, είναι γνωστό ότι η θρεπτική κατάσταση των φυτών, όσον αφορά στο βόριο, επιδρά στο μεταβολικό προφίλ των φαινολικών συστατικών (Shkol'nik et al., 1981; Pilbeam and Kirkby, 1983; Cakmak et al., 1995; Ruiz et al., 1998; Ruiz et al., 1999; Cara et al., 2002; Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Stavrianakou et al., 2006). Οι έως τώρα διαπιστωμένες αιτίες για την αύξηση των φαινολικών συστατικών, υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου, αφορούν στην αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος (Cakmak and Römheld, 1997). Στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών του διαλυτού κλάσματος των κυττάρων των φύλλων (εικόνα 6). Το γεγονός αυτό σχετίζεται ενδεχομένως με τα μη ακραία επίπεδα τροφοπενίας των φυτών ή άλλη αδιευκρίνιστη αιτία.

Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η αύξηση ορισμένων φαινολικών συστατικών δεν μπορεί να εξηγηθεί αποκλειστικά μέσω της

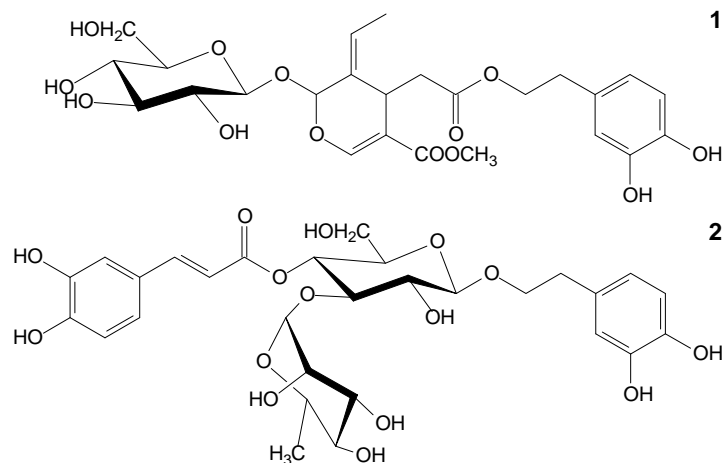
Συζήτηση

ενίσχυσης της σχετικής βιοσυνθετικής οδού (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005; Liakopoulos et al., αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Συνεπώς, είναι πιθανή η ύπαρξη και άλλων μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ βορίου και φαινολικών συστατικών πέραν της *de novo* βιοσύνθεσης. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί μια κυτταρική δομή στην οποία πιθανόν διαδραματίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ βορικού οξέος και ορισμένων φαινολικών συστατικών. Το παραπάνω είναι λογικό για δύο λόγους: (α) Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί δομή με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, τόσο δομικά σχετιζόμενα με τη λιγνίνη (Raven, 1980) όσο και μη λιγνινικά φαινολικά, κυρίως παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος, τα οποία είναι προσδεδεμένα στα δομικά πολυμερή, μεταξύ άλλων και με εστερικούς δεσμούς (Lozovaya et al., 1999). (β) Σύμφωνα με τις χημικές ιδιότητες του βορικού οξέος, είναι δυνατή η συμμετοχή του στη δημιουργία σταθερών διαδεσμών μεταξύ ορθο-διφαινολικών συστατικών και αντίστοιχης δομής φαινολικών ή υδατανθρακικών υπολειμμάτων του κυτταρικού τοιχώματος (Power and Woods, 1997; Dembitsky et al., 2002). Ήδη είναι γνωστό πως το βορικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό δομικό ρόλο στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω ενός μηχανισμού ανάλογου με αυτόν της υπόθεσης εργασίας, μέσω συναρμογής των πηκτινικών αλυσίδων του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (O'Neill et al., 2004).

Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, εξετάστηκε η πιθανή συμμετοχή του βορικού οξέος στη δημιουργία συμπλόκων διφαινολικών συστατικών και διυδροξυ-ομάδων των υπολειμμάτων του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διεστερικών δεσμών (εικόνα 13). Προτείνεται ότι, εάν υφίσταται ένας τέτοιος μηχανισμός στο κυτταρικό τοίχωμα, η έλλειψη βορίου θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε μείωση της περιεκτικότητας του κυτταρικού τοιχώματος σε φαινολικά, όπως αυτή μετράται μετά από αλκαλική υδρόλυση (εικόνα 12). Αυτό συμβαίνει διότι μέσω αλκαλικής υδρόλυσης διασπώνται κυρίως οι εστερικοί δεσμοί και συνεπώς και αυτοί μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών. Προηγούμενα αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας συνάδουν με την παραπάνω πρόβλεψη. Συγκεκριμένα, η μείωση των φαινολικών του κυτταρικού τοιχώματος σε φύλλα ελιάς βρέθηκε ανάλογη με το βαθμό έλλειψης βορίου και επιπλέον, αντιστρόφως ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσής τους στο διαλυτό κλάσμα του κυττάρου. Οι παραπάνω επιδράσεις παρουσίασαν συσχέτιση με την ηλικία των φύλλων (Κλουβάτου, 2006).

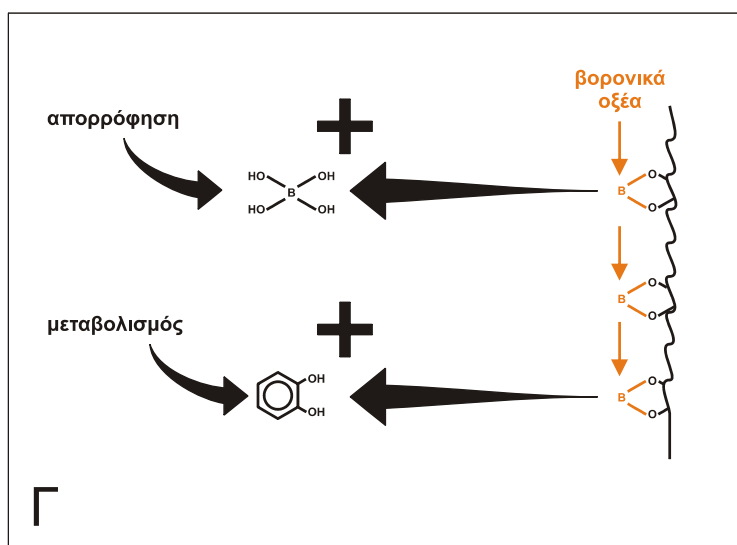
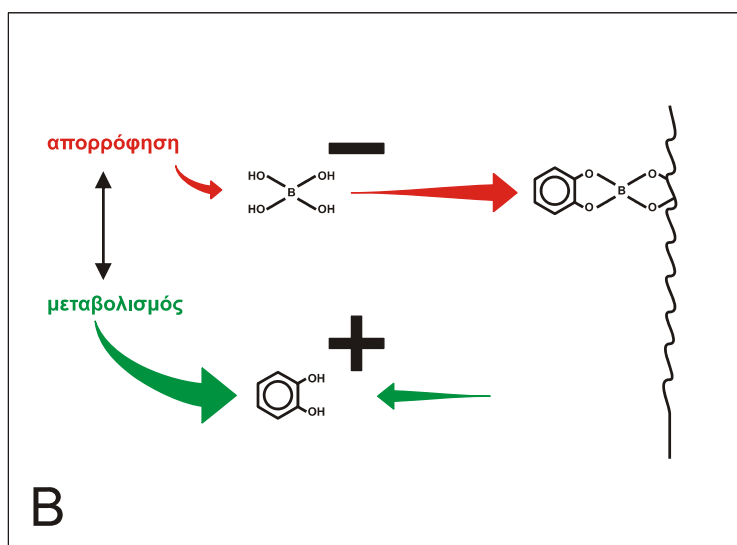
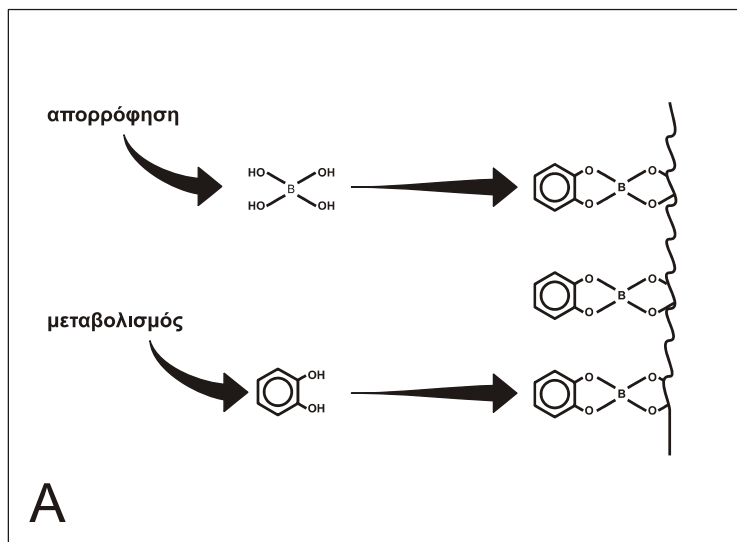
Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έλλειψη βορίου μειώνει τη συγκέντρωση των εστεροποιημένων φαινολικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Ωστόσο δε διαπιστώνουν την άμεση εμπλοκή του βορικού οξέος στη συμπλοκοποίηση των φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν ένα επόμενο βήμα προς την

πειραματική προσέγγιση της υπόθεσης εργασίας. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω του πειραματικού χειρισμού των δειγμάτων φύλλων με το βορονικό οξύ 3-NBA. Το συγκεκριμένο οξύ είναι ισχυρότερο του βορικού οξέος και επομένως αναμένεται να εκδιώκει το τελευταίο από τις θέσεις δέσμευσης (Bassil et al., 2004). Συνεπώς, εάν μετά το χειρισμό ενός δείγματος με το 3-NBA προκύψει μείωση των φαινολικών του κυτταρικού τοιχώματος, συμπεραίνεται πως αυτά αντιστοιχούν σε φαινολικά συστατικά τα οποία ήταν προσδεδεμένα στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ. Ταυτόχρονα, ο χειρισμός αυτός θα έχει ως αποτέλεσμα και την ελευθέρωση ποσότητας βορικού οξέος στο υδατικό μέσο (εικόνα 9). Τα φαινολικά συστατικά που θα μετρηθούν μετά την αλκαλική υδρόλυση θα αντιστοιχούν μόνο σε αυτά που βρίσκονταν προσδεδεμένα στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω εστερικών συστημάτων διαφορετικών αυτού των διεστερικών δεσμών μέσω βορικού οξέος. Πράγματι, σύμφωνα με την εικόνα 12, η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο αλκαλικό υδρόλυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων μειώθηκε τόσο ως αποτέλεσμα της έλλειψης βορίου όσο και ως αποτέλεσμα της επίδρασης του 3-NBA σε δίσκους φύλλων. Σημειώνεται ότι η επίδραση του 3-NBA θεωρείται ότι προκαλεί φυσιολογικές αντιδράσεις στα κύτταρα ανάλογες με αυτές της έλλειψης βορίου (Bassil et al., 2004). Είναι, επίσης, αξιοσημείωτο ότι ο συνδυασμός επίδρασης του βορονικού οξέος σε τροφοπενιακά φύλλα είχε προσθετική επίδραση στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο αλκαλικό υδρόλυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων (εικόνα 12).



Ακολουθώντας την ίδια λογική με το παραπάνω πείραμα, διερευνήθηκε η επίδραση του 3-NBA στη σύσταση του διαλυτού κλάσματος των φαινολικών συστατικών. Εξετάστηκαν δύο φαινολικά συστατικά τα οποία διαθέτουν δομή διφαινόλης, η ολευροπαΐνη (**1**) με δομή *cis*-(HO)₂-R και ο ακτεοσίδης (**2**) με δομή *cis*-(HO)₂-R-*cis*-(OH)₂. Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, η επίδραση του 3-NBA αναμένεται να προκαλέσει αύξηση της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών τα

Συζήτηση



Εικόνα 13. Προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ του βορικού οξέος και των φαινολικών συστατικών στα κυτταρικά τοιχώματα. Εκτός από τον διαπιστωμένο δομικό ρόλο του βορικού οξέος στη συναρμογή των αλυσίδων των πηκτινικών πολυμερών, προτείνεται ότι το βορικό οξύ δρα ως συνδετικό μόριο μεταξύ διυδροξυ-ομάδων υπολειμμάτων του κυτταρικού τοιχώματος και ορθο-διφαινολικών συστατικών. Το βορικό οξύ προέρχεται από απορρόφηση από τη ρίζα ενώ τα ορθο-διφαινολικά συστατικά από το δευτερογενή μεταβολισμό (Α). Σύμφωνα με το μοντέλο, υπό συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας βορικού οξέος (Β), η αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων φαινολικών συστατικών είναι αποτέλεσμα όχι μόνο της αύξησης της βιοσύνθεσής τους αλλά και της μειωμένης εναπόθεσής τους. Ενδείξεις για την ισχύ του παραπάνω μοντέλου παρέχονται από την επίδραση βορονικών οξέων στα κύτταρα (Γ). Λόγω της εκδίωξης του βορικού οξέος από τις όποιες θέσεις δέσμευσής του (μεταξύ των οποίων μεγάλο ποσοστό αφορά στην αποπλαστική περιοχή), αναμένεται αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου βορικού οξέος και των ορθο-διφαινολικών συστατικών. Μετά από τον παραπάνω χειρισμό, αναμένεται αντίστοιχα μείωση στα φαινολικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος.

οποία διαθέτουν δομή *cis*-διόλης. Μια τέτοια αύξηση θα αποτελεί ένδειξη της πρόσδεσης των συγκεκριμένων φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίδραση του 3-NBA στη συγκέντρωση της ολευροπαΐνης υπήρξε αρνητική (εικόνα 10). Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του ακτεοσίδη με την εφαρμογή του 3-NBA σε δύο τουλάχιστον από τους τέσσερις πειραματικούς χειρισμούς (εικόνα 11), χωρίς όμως η αύξηση αυτή να είναι στατιστικά αξιολογήσιμη. Αντίστοιχα, η τροφοπενία βορίου δεν προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της ολευροπαΐνης, αλλά είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση της συγκέντρωσης του ακτεοσίδη σε φύλλα ελιάς (Liakopoulos and Karabourniotis, 2005).

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του χειρισμού του 3-NBA στους δίσκους φύλλων αφορά, επίσης, και στην αναμενόμενη αύξηση του βορικού οξέος (εικόνα 9). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίδραση του 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του βορικού οξέος σε όλους τους πειραματικούς χειρισμούς (εικόνα 9). Ωστόσο, η αύξηση κυμάνθηκε, ανάλογα με τον πειραματικό χειρισμό, έως και 45% συγκριτικά με τον εκάστοτε μάρτυρα. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως υποδηλώνει ότι η αποτελεσματικότητα του χειρισμού του 3-NBA δεν εξαντλήθηκε κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που επιλέχθηκαν. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι, σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία (Loomis and Durst, 1992; Matoh et al., 1993; Hu and Brown, 1994; Dannel et al., 2002), το ποσοστό του κυτταρικού βορίου που εναποτίθεται στα κυτταρικά τοιχώματα είναι σημαντικά υψηλότερο από αυτό του κυτταροπλάσματος

Συζήτηση

και συνεπώς υψηλότερο από αυτό που αντιστοιχεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του βορικού οξέος, όπως μετρήθηκε στην παρούσα εργασία.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία έδειξε ότι η τροφοπενία βορίου μειώνει τη συγκέντρωση ορισμένων φαινολικών στο κυτταρικό τοίχωμα. Πειράματα με το βορονικό οξύ 3-NBA, το οποίο δρα ως ανταγωνιστής του βορικού οξέος για τις θέσεις δέσμευσης, έδειξαν ότι ενδεχομένως ορισμένα από τα φαινολικά των κυτταρικών τοιχωμάτων βρίσκονται προσδεδεμένα με διαδεσμούς, οι οποίοι δημιουργούνται μέσω βορικού οξέος. Η ύπαρξη φαινολικών συστατικών προσδεδεμένων μέσω βορικού οξέος στο κυτταρικό τοίχωμα έχει ιδιαίτερη σημασία για τη φυσιολογία του βορίου αλλά και τη χημεία του κυτταρικού τοιχώματος. Η πιθανή ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού θα μπορεί να ερμηνεύσει ορισμένα αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία το βόριο έχει εξειδικευμένη και άμεση επίδραση στη σύσταση των φαινολικών συστατικών των φυτικών κυττάρων, η οποία δε βασίζεται στην *de novo* βιοσύνθεση των ουσιών αυτών. Επιπλέον, η ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με το ποσοστό του βορίου του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο συμμετέχει στην πρόσδεση φαινολικών συστατικών, καθώς και με τις προϋποθέσεις υπό τις οποίες το βόριο αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί για αξιοποίηση από το φυτό.

Βιβλιογραφία

- Aerts, R. and Chapin, F.S. III. 2000. The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv. Ecol. Res.*, 30:1–67.
- Alpaslan, M. and Gunes, A. 2001. Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant Soil*, 236:123-128.
- Arnon, D.I. and Stout, P.R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, 14:371–375.
- Banuelos, G.S., Cardon, G. Pflaum, T. and Akohoue, S. 1992. Comparison of dry ashing and wet acid digestion on the determination of boron in plant tissue. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23:2383–2397.
- Barr, R. and Crane, F.L. 1991. Boron stimulates NADH oxidase activity of cultured carrot cells. *In: Current topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol. 10. Eds D.D. Randall, D.G. Blenvis and C.D. Miles. Columbia: Univ. Mo. Press.
- Bassil, E., Hu, H.N. and Brown, P.H. 2004. Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiology*, 136:3383-3395.
- Bironaite, A.D., Cenas, N.K. and Kulys, J.J. 1989. The inhibition of glutathione reductase by quinines. *Eur. J. Biochem.*, 178:693–703.
- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M. 1998. Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:481–500.
- Bolaños, L., Esteban, E., de Lorenzo, C., Fernández-Pascual, M., de Felipe, M.R., Gàrate, A. and Bonilla, I. 1994. Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) Rhizobium nodules. *Plant Physiol.*, 104:85–90.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R. and Öquist, G.O. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. *In Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*. Eds. D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhàr-Nordenkamp, R.C. Leegood and S.P. Long. Chapman & Hall, London, pp 193–206.
- Bolwell, G.P. and Butt V.S. 1983. Photoinduced changes in *o*-diphenol oxidase and *p*-coumarate hydroxylase activities in spinach beet seedlings and leaves. *Phytochem.*, 22:37–45.

Βιβλιογραφία

- Bongi, G. and Pallioti, A. 1994. Olive. *In Environmental Physiology of Fruit Crops*, Vol. 1. Eds. B. Schaffer and P.C. Anderson. CRC Press, Boca Raton, pp 165–188.
- Brown, P.H., Graham, R.D. and Nicholas, D.J.D. 1984. The effects of manganese and nitrate supply on the levels of phenolics and lignin in young wheat plants. *Plant Soil*, 81:437–440.
- Brown, P.H. and Hu, H. 1994. Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.*, 91:435–441.
- Brown, P.H. and Hu, H. 1997. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? *Plant Soil*, 196:211–215.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biol.*, 4:205–223.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S. III and Klein, D.R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40:357–368.
- Camacho–Christóbal, J.J., Anzellotti, D. and González–Fontes, A. 2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short–term boron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.*, 40:997–1002.
- Cakmak, I. 1994. Activity of ascorbate–dependent H₂O₂–scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium– and potassium–deficient leaves, but not in phosphorus–deficient leaves. *J. Exp. Bot.*, 45:1259–1266.
- Cakmak, I., Kurz, H. and Marschner, H. 1995. Short–term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron–deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.*, 95:11–18.
- Cakmak, I. and Römheld, V. 1997. Boron deficiency–induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*, 193:71–83.
- Cara, F.A., Sánchez, E., Ruiz, J.M. and Romero, L. 2002. Is phenol oxidation responsible for the short term effects of boron deficiency on plasma–membrane permeability and function in squash roots? *Plant Physiol. Biochem.*, 40:853–858.
- Chattopadhyay, S., Datta, S.K. and Mahato, S.B. 1994. Production of L–DOPA from cell suspension culture of *Mucuna pruriens f. pruriens*. *Plant Cell Rep.*, 13:519–522.
- Chishaki, N. and Horiguchi, T. 1997. Responses of secondary metabolism to nutrient deficiency. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43:987–991.
- Chuda, Y., Ohnishi–Kameyama, M. and Nagata, T. 1997. Identification of the forms of boron in seaweed by ¹¹B NMR. *Phytochemistry*, 46:209–213.

- Coke, L. and Whittington W.J. 1968. The role of boron in plant growth, IV. Interrelationships between boron and indol-3-yl-acetic acid in the metabolism of bean radicles. *J. Exp. Bot.*, 19:295–308.
- Cordoba–Pedregosa, M.D.C., Gonzalez–Reyes, J.A., Canadillas, M.D.S., Navas, P. and Cordoba, F. 1996. Role of apoplastic and cell wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol.*, 112:1119–1125.
- Damtoft, S., Franzyk, H. and Jensen, S.R. 1993. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*, 34:1291–1299.
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 1997. Effect of pH and boron concentration in the nutrient solution on translocation of boron in the xylem of sunflower. *In: Boron in Soils and Plants*. Eds. R.W. Bell and B. Rerkasem. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 1998. Compartmentation of boron in roots and leaves of sunflower as affected by boron supply. *Journal of Plant Physiology*, 153:615–622.
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 2000. Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotopes ¹⁰B and ¹¹B. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27:397–405.
- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 2002. Update on boron in higher plants– Uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biolog.*, 4:193–204.
- Darvill, A.G., McNeil, M. and Albersheim, P. 1978. Structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.*, 62:418–422.
- Delgado, A., Benlloch, M. and Fernández–Escobar, R. 1994. Mobilization of boron in olive tress during flowering and fruit development. *HortScience*, 29:616–618.
- Dell, B. and Huang, L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil*, 193:103–120.
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al–Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I. and Srebnik, M. 2002. Natural occurrence of boron–containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science*, 163:931–942.
- Demmig, B. and Björkman, O. 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta*, 171:171–184.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995. Stress–induced secondary metabolism. *Plant Cell*, 7:1085–1097.

Βιβλιογραφία

- Doco, T. and Brillouet, J.-M. 1993. Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydr. Res.*, 243:333-343.
- Dordas, C. and Brown, P.H. 2000. Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *Journal of Membrane Biology*, 175:95-105
- Dugger, W.M. 1983. Boron in plant metabolism. *In* Encyclopedia of Plant Physiology, new series, Vol. 15. Eds. A. Lauchli and R.L. Bielecki. Springer-Verlag, Berlin, pp 626-650.
- El-Shintinawy, F. 1999. Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves. *Phytosynthetica*, 36:565-573.
- Fackler, U., Goldbach, H., Weiler, E.W. and Amberger, A. 1985. Influence of boron deficiency on indol-3yl-acetic acid and abscissic acid levels in root and shoot tips. *J. Plant Physiol.*, 119:295-299.
- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *In*: Advances in Botanical Research. Plant Trichomes, Vol. 31. Eds. D.L. Hallahan and J.C. Gray. Academic Press, London, UK, pp. 37-76.
- Fernández-Escobar, R., Moreno, R. and García-Creus, M. 1999. Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle. *Sci. Hortic.*, 82:25-45.
- Ferrol, N. Belver, A., Roldan, M., Rodriguez-Rosales, M.P. and Donaire, J.R. 1993. Effects of boron on proton transport and membrane properties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cell microsomes. *Plant Physiol.*, 103:763-769.
- Findelee, P. and Goldbach, H.E. 1996. Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Cucurbita pepo* roots. *Bot. Acta.*, 109:463-465.
- 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 Physiol.*, 117:1401-1410.
- Fleischer, A., O' Neill, M.A. and Ehwald, R. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.*, 121:829-838.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.*, 92:696-717.
- Gariboldi, P., Jommi, G. and Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea* L. *Phytochemistry*, 25:865-869.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *In*: Phytochemical Adaptations to Stress. Eds.

- B.N. Timmermann, C. Steelink and F.A. Loewus. Plenum Press, New York, USA, pp 270–320.
- Gibson, A.C. 1996. Structure–function relations of warm desert plants. Springer, Berlin, Germany.
- Goldbach, H.E. and Amberger, A. 1986. Influence of boron nutrition on cell wall polysaccharides in cell cultures of *Daucus carota* L. *J. Plant Physiol.*, 123:263–269.
- Goldbach, H.E., Hartmann, D. and Rötzer, T. 1990. Boron is required for the ferricyanide–induced proton release by auxins in suspension–cultured cells of *Daucus carota* and *Lycopersicon esculentum*. *Physiol. Plant.* 80:114–118.
- Goldbach, H.E., Blaser–Grill, J., Lindemann, N., Porzelt, M., Hörmann, C., Lupp, B. and Gessner, B. 1991. Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic processes. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.*, 10:2211–2229.
- Goldbach, H.E., Yu, Q., Wingender, R., Schultz, M., Wimmer, M., Findeklee, P. and Baluska, F. 2001. Rapid responses of roots to boron deprivation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 164:173–181.
- Gomes–Rodriguez, M.V., Luna del Castillo de D. and Alvarez–Tinaut, M.C. 1987. The evolution of glucose–6P–dehydrogenase and 6P–gluconate–dehydrogenase activities and the ortho–diphenolic content of sunflower leaves cultivated under different boron treatments. *J. Plant Nutr.*, 10:2211–2229.
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H. and Berenbaum, M.R. 2001. The carbon–nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecol. Lett.*, 4:86–95.
- Harborne, J.B. 1988. Introduction to ecological chemistry. Academic Press, London, UK.
- Herms, D.A. and Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.*, 67:283–335.
- Hewitt, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, East Malling, Maidstone, Kent.
- Hirsch, A.M and Torrey, J.G. 1980. Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin. *Can. J. Bot.*, 58:856–866.
- Hirsch, A.M., Pengelly, W.L. and Torrey, J.G. 1982. Endogenous IAA levels in boron–deficient and control root tips of sunflower. *Bot. Gaz.*, 143:15–19.

Βιβλιογραφία

- Hu, H. and Brown, P.H. 1994. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin; evidence for a structural role of boron in cell wall. *Plant Physiol.*, 105:681–689.
- Hu, H., Brown, P.H. and Labavitch, J.H. 1996. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.*, 47:227–232.
- Hu, H., Penn, S.G., Lebrilla, C.B. and Brown, P.H. 1997. Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. *Plant Physiol.*, 113:649–655.
- Inderjit, S.O. and Duke, S.O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217:529–539.
- Ishii, T. and Matsunaga, T. 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr Res.*, 284:1–9.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M.A., Darvill, A. and Albersheim, P. 1999. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II selfassembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.*, 274:13098–13104.
- Ishii, T., Matsunaga, T. and Hayashi, N. 2001. Formation of rhamnogalacturonan II–borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant Physiol.*, 126(4):1698–1705.
- Kaneko, S., Ishii, T. and Matsunaga, T. 1996. A boron-rhamnogalacturonan II complex from bamboo shoot cell walls. *Phytochem.*, 44:243–248.
- Karamanoli, K. 2002. Secondary metabolites as allelochemicals in plant defence against microorganisms of the phyllosphere. *In: Allelopathy. From Molecules to Ecosystems.* Eds. M. Reigosa, N. Pedrol. Science Publishers, Enfield, UK, pp. 277–288.
- Karioti, A., Chatzopoulou, A., Bilia, A.R., Liakopoulos, G., Stavrianiakou, S. and Skaltsa, H. 2006. Secoiridoid glucosides in *Olea europaea* under B deficiency. Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency.
- Kastori, R., Plesnicar, M., Pankovic, D. and Sakac, Z. 1995. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflower leaves as affected by boron deficiency. *J. Plant Nutr.*, 18:1751–1763.
- Kelsey, R.G., Reynolds, G.W. and Rodriguez, E. 1984. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. *In: Biology and Chemistry of Plant Trichomes.* Eds. E. Rodriguez, P.L. Healey and I. Mehta. Plenum Press, New York., USA.

- Kobayashi, M., Matoh, T. and Azuma, J. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.*, 110:1017-1020.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E. and Keinänen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*, 83:212-226.
- Kouchi, H. and Kumazawa, K. 1976. Anatomical responses of root tips to boron deficiency: III. Effect of boron deficiency on sub-cellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 22:53-71.
- Lawrence, K., Bhalla, P. and Misra, P.C. 1995. Changes in (NADP)H-dependent redox activities in plasmalemma-enriched vesicles isolated from boron- and zinc-deficient chick pea roots. *Journal of Plant Physiology*, 146:652-657.
- Lee, S.G. and Aronoff, S. 1967. Boron in plants. A biochemical role. *Science*, 158:798-799.
- Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A. and Valcárcel, M. 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 46:1123-1130.
- Le Tutour, B. and Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31:1173-1178.
- Lewis, D.H. 1980. Are there inter-relations between the metabolic role of boron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen? *New Phytol.*, 84:261-270.
- Li, C., Pfeffer, H., Dannel, F., Römheld, V. and Bangerth, F. 2001. Effects of boron starvation on boron compartmentation, and possibly hormone-mediated elongation growth and apical dominance of pea (*Pisum sativum*) plants. *Physiol. Plant.*, 111:212-219.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S. and Karabourniotis, G. 2001. Analysis of epicuticular phenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata. *Ann. Bot.*, 87:641-648.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Filippou, M., Fasseas, C., Tsadilas, C., Drossopoulos, I. and Karabourniotis, G. 2005. Boron remobilization at low boron supply in olive (*Olea europaea*) in relation to leaf and phloem mannitol concentrations. *Tree Physiol.*, 25:157-165.

Βιβλιογραφία

- Liakopoulos, G. and Karabourniotis, G. 2005. Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: a combined growth chamber and field study. *Tree Physiology*, 25:307-315.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M.B. and Arrigoni, O. 1984. Relationship between ascorbic acid and cell division. *Exp. Cell Res.*, 150:314-320.
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. 1991. Boron and cell walls. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.*, 10:149-178.
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3:229-239.
- Lozovaya, V.V., Gorshkova, T.A., Yablokova, E.V., Rumyantseva, N.I., Valieva, A., Ulanov, A. and Widholm, J.M. 1999. Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (buckwheat, soybean and flax). *Phytochemistry*, 50:395-400.
- Lukaszewski, K.M. and Blevins, D.G. 1996. Root growth inhibition in boron-deficient or aluminium-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiol.*, 112:1135-1140.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK, pp 385-388.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, USA, pp 379-396.
- Matoh, T., Ishigaki, K., Mizutani, M., Matsunaga, W. and Takabe, K. 1992. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. Requirement for and intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. *Plant Cell Physiol.*, 33:1135-1141.
- Matoh, T., Ishigaki, K.-I., Kaori, O. and Azuma, J.-I. 1993. *Plant Cell Physiol.*, 34:639-642.
- Matoh, T. 1997. Boron in plant cell walls. *Plant Soil*, 193:59-70.
- Matoh, T., Akaike, R. and Kobayashi, M. 1997. A sensitive and convenient assay for boron in plant using chromotropic acid and HPLC. *Plant Soil*, 192:115-118.
- Matsunaga, T. and Nagata, T. 1995. In vivo ^{11}B NMR observation of plant tissue. *Anal. Sci.*, 11:889-892.
- Médail, F., Quézel, P., Besnard, G. and Khadari, B. 2001. Systematics, ecology and phylogeographic significance of *Olea europaea* L. ssp. *maroccana* (Greuter & Burdet) P. Vargas *et al.*, a redictual olive tree in south-west Morocco. *Bot. J. Linn. Soc.*, 137:249-266.

- Mole, S., Ross, J.A.M. and Waterman, P.G. 1988. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. I. *Chemical Changes. J. Chem. Ecol.*, 14:1-21.
- Monday, N.I. and Munshi, C.B. 1993. Effect of boron on enzymatic discolouration and phenolic and ascorbic acid content of potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 41:554-556.
- Muhling, K.H., Wimmer, M. and Goldbach, H.E. 1998. Apoplastic and membrane-associated Ca^{2+} in leaves and roots as affected by boron deficiency. *Physiol. Plant.*, 102: 179-184.
- Nielsen, F. 2000. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 16:512-514.
- Obermeyer, G., Kriechbaumer, R., Strasser, D., Maschessnig, A. and Bentrup, F-W. 1996. Boric acid stimulates the plasma membrane H^{+} -ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiol. Plant.*, 98:281-290.
- O'Neill, M.A., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1991. In *Methods of Plant Biochemistry*. Vol. 2. Ed. P.M. Dey. Academic Press, London, pp 415-441.
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1996. Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimmer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.*, 271:22923-22930.
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P. and Darvill, A.G. 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*, 294:846-849.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P. and Darvill, A.G. 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55: 109-139.
- Perica, S., Bellaloui, N., Greve, C., Hu, H. and Brown, P.H. 2001a. Boron transport and soluble carbohydrate concentrations in olive. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 126:291-296.
- Perica, S., Brown, P.H., Connell, J.H., Nyomora, ARMS., Dordas, C. and Hu, H. 2001b. Foliar boron application improves flower fertility and fruit set of olive. *HortScience*, 36:714-716.
- Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 1997. Compartmentation of boron in roots and its translocation to the shoot of sunflower as affected by short term changes in boron supply. In: *Boron in Soils and Plants*. Eds. R.W. Bell and B. Rerkasem. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Βιβλιογραφία

- Pfeffer, H., Dannel, F., and Römheld, V. 1998. Are there connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? *Physiol. Plant*, 104:479–485.
- Pfeffer H. Dannel F. and Römheld V. 1999. Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower? *Journal of Plant Physiology*, 155:34–40.
- Pieroni, A., Heimler, D., Pieters, L., van Poel, B. and Vlietinck, A.J. 1996. *In vitro* anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Pharmazie*, 51:765–767.
- Pilbeam, D.J. and Kirkby, E.A. 1983. The physiological role of boron in plants. *J. Plant Nutr.*, 6:563–582.
- Pollard, A.S., Parr, A. and Loughman, B.C. 1977. Boron in relation to membrane function in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 28:831-841.
- Power, P.P. and Woods, W.G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil*, 193:1–13.
- Rajarathnam, J.A. and Lowry, J.B. 1974. The role of boron in the oil-palm (*Elaeis guinensis*). *Ann. Bot.*, 38:193–200.
- Raven, J.A. 1980. Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.*, 84:231–249.
- Rea, P.A. 2007. Plant ATP-binding cassette transporters. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58:347-375.
- Robertson, G.A. and Loughman, B.C. 1973. Rubidium uptake and boron deficiency in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.*, 24:1046–1052.
- Robertson, G.A. and Loughman, B.C. 1974. Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba*. *New Phytol.*, 73:291–298.
- Roldan, M., Belver, A., Rodriguez-Rosales, P., Ferrol, N. and Donaire, J.D. 1992. *In vivo* and *in vitro* effects of boron on the plasma membrane proton pump of sunflower roots. *Physiol. Plant.*, 84:49–54.
- Römheld, V. and Marschner, H. 1991. Functions of micronutrients in plants. *In* Micronutrients in Agriculture, 2nd ed. Eds. J.J. Mordvedt, F.R. Cox, L.M. Shuman and R.M. Welch. SSSA Book Series, No. 4, Madison, WI, USA, pp 297–328.
- Roth-Bejerano, N. and Itai, C. 1981. Effect of boron on stomatal opening in epidermis strips of *Commelina communis*. *Physiol. Plant.*, 52:302–304.
- Ruiz, J.M., Bretones, G., Baghour, M., Ragala, L., Belakbir, A. and Romero, L. 1998. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry*, 48:267–272.

- Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Rivero, R.M. and Romero, L. 1999. Response of phenolic metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Physiologia Plantarum*, 106:151-157.
- Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K. and Balansard, G. 2001. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 49:618-621.
- Schmucker, T. 1933. Zur Blütenbiologie Tropischer Nymphaea-Arten. II. (Bor als entscheidender faktor.) *Planta*, 18:641-650.
- Schmucker, T. 1934. Über den Einfluß von Borsäure auf Pflanzen, insbesondere keimende Pollenkörner. *Planta*, 23:264-283.
- Seigler, D.S. 1998. Plant secondary metabolism. Kluwer, Boston, USA.
- Shelp, B.J. 1993. Physiology and biochemistry of boron in plants. *In* Boron and Its Role in Crop Protection. Ed. U. C. Gupta. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 53-85.
- Shelp, B.J., Marentes, E., Kitheka, A.M. and Vivekanandan, P. 1995. Boron mobility in plants. *Physiol. Plant.*, 94:356-361.
- Shive J.B. and Barnett N.M. 1973. Boron deficiency effects on peroxidase, hydroxyproline and boron in cell walls and cytoplasm of *Helianthus annuus* L. hypocotyls. *Plant Cell Physiol.*, 14:573-583.
- Shkol'nik, M.Y., Kupnikova, T.A., Timofeeva, S.S. and Stom, D.I. 1981. Intensification of quinine formation from exogenous polyphenols by homogenates of the leaves of sunflower plants reared under conditions of boron deficiency. *Fiziologiya Rastenii*, 28:541-546.
- Shkol'nik, M.Y., Kupnikova, T.A. and Smirnov, Y.S. 1981a. Activity of polyphenol oxidase and sensitivity to boron deficiency in monocots and dicots. *Fiziol. Rast.*, 28:391-397.
- Shkol'nik, M.Y. 1984. Trace Elements in Plants. Developments in Crop Science (6), Elsevier, New York, pp 68-109.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C. and Wichers, H.G. 2000. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 80:1013-1023.
- Stavrianiakou, S., Liakopoulos, G., Karvonis, E., Resta, E. and Karabourniotis G. 2006a. Low-boron acclimation induces uptake of boric acid against a concentration gradient in root cells of *Olea europaea*. *Functional Plant Biology*, 33:189-193.
- Stavrianiakou, S., Liakopoulos, G. and Karabourniotis, G. 2006b. Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environ. Exp. Bot.*, 56:293-300.

Βιβλιογραφία

- Stevenson, T.T., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1988. Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Carbohydr. Res.*, 182:207–226.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420:337-340.
- Tan, S.C. 1980. Phenylalanine ammonia-lyase and the phenylalanine ammonia-lyase inactivating system: effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Aust. J. Plant Physiol.*, 7:159–167.
- Tanada, T. 1995. Boron as a transducer in some physiological process of plants. *J. Plant Nutr.*, 18:1743–1750.
- Tang, P.M. and Della Fuente, R.K. 1986. The transport of indole-3-acetic acid in boron- and calcium-deficient sunflower hypocotyls segments. *Plant Physiol.*, 81:646–650.
- Thellier, M., Duval, Y. and Demarty, M. 1979. Borate exchange of Lemna minor as studied with the help of the enriched stable isotopes of a nuclear reaction. *Plant Physiology*, 63:283–288.
- Thomas, J.R., McNeil, M., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1987. Structure of plant cell walls XIX. Isolation and characterisation of wall polysaccharides from suspension-cultured Douglas fir cells. *Plant Physiol.*, 83:659-671.
- Thomas, J.R., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1989. Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from walls of suspension – cultured rice cells. *Carbohydr. Res.* 185:261–277.
- Tsadilas, C.D. and Chartzoulakis, K.S. 1999. Boron deficiency in olive trees in Greece in relation to soil boron concentration. *Acta Hort.*, 474:341–344.
- Van den Berg, R., Peters, J.A. and Van Bekkum, H. 1994. *Carbohydr. Res.*, 253:1-12.
- Wagner, G.J. 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.*, 96:675–679.
- Wang, Z.Y., Tang, Y.L., Zhang, F.S. and Wang, H. 1999. Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves. *J. Plant Nutr.*, 22: 543-550.
- Welch, R.M. 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14:49–82.
- Wittstock, U. and Gershenzon, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defence against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:300 – 307.

- Wollenweber, E. and Dietz, V.H. 1981. Occurrence and distribution of free flavonoids aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20:869–932.
- Woods, W.G. 1996. A review of possible boron speciation relating to its essentiality. *J. Tr. Elem. Exp. Med.*, 9:153-163.
- Yamanouchi, M. 1973. The role of boron in higher plants II. The influence of boron on the formation of pectic substances. *Bull. Fac. Agri. Tottori Univ.* XXV, 21-27.
- Yu, Q., Hlavacka, A., Matoh, T., Volkmann, D., Menzel, D., Goldbach, H.E. and Baluska, F. 2002. Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. *Plant Physiol.*, 130:415-421.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol Oxidase. *In Oxidative Enzymes in Foods*. Eds. D.S. Robinson and A.M. Eskin. Elsevier Science Publishers, England, pp 217–273.
- Γαβαλάς, Ν.Α. 1978. Η ανόργανος θρέψις και η λίπανσις της ελιάς. Έκδοση Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. 1992. Η ανόργανη διατροφή των φυτών. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. 1998. Φυσιολογία Φυτών ΙΙ. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Καραμπουρνιώτης, Γ.Α. 2003. Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Κλουβάτου, Α. 2006. Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου των φαινολικών συστατικών τα οποία συσσωρεύονται στην ελιά (*Olea europaea* L.) υπό συνθήκες ανεπάρκειας βορίου. Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παναγόπουλος, Χ.Γ. 1997. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Ποντίκης, Κ.Α. 2000. Ειδική Δενδροκομία, Ελαιοκομία. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Περίληψη

Είναι γνωστό ότι η έλλειψη βορίου προκαλεί συσσώρευση φαινολικών συστατικών στα φυτά. Ωστόσο, έως σήμερα, η επίδραση αυτή έχει αποδοθεί αποκλειστικά στην *de novo* βιοσύνθεση παρόλο που υφίστανται ενδείξεις ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων φαινολικών συστατικών μπορεί να οφείλεται και σε άλλους μηχανισμούς. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε το ενδεχόμενο της απελευθέρωσης φαινολικών μεταβολιτών υπό συνθήκες έλλειψης βορίου από το κυτταρικό τοίχωμα. Σύμφωνα με την υπόθεση εργασίας, φαινολικά συστατικά, τα οποία βρίσκονται ενωμένα στα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος μέσω διαδεσμών με το βορικό οξύ υπό συνθήκες επάρκειας του στοιχείου, μπορούν να ελευθερωθούν προς το διαλυτό κυτταρικό κλάσμα υπό συνθήκες τροφοπενίας. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υδροπονική καλλιέργεια φυτών ελιάς ηλικίας ενός έτους υπό ελεγχόμενες συνθήκες θρέψης, με επίπεδα του βορίου στο θρεπτικό διάλυμα από επαρκή (23 μM) έως μηδενικά (0 μM). Επιπλέον, δείγματα ιστών κατεργάστηκαν με τον ανταγωνιστή του βορικού οξέος 3-NBA, το οποίο ως ισχυρότερο οξύ από το βορικό και διαθέτοντας ένα αντί δύο ζευγών υδροξυλίων στο μόριό του, εκδιώκει το βορικό οξύ από τις υπάρχουσες θέσεις δέσμευσης, προκαλώντας έτσι τεχνητή έλλειψη βορικού οξέος. Υπό τις παραπάνω συνθήκες, εξετάστηκε η σύσταση του διαλυτού κλάσματος καθώς και των κυτταρικών τοιχωμάτων σε φαινολικά συστατικά και ιδιαίτερα σε δύο φαινολικούς μεταβολίτες, την ολευροπαΐνη και τον ακτεοσίδη, μόρια τα οποία παρουσιάζουν δομή *cis*-διόλης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών του διαλυτού κλάσματος των κυττάρων των φύλλων μεταξύ των μεταχειρίσεων. Ωστόσο, η επίδραση 3-NBA σε δίσκους φύλλων, αύξησε τη συγκέντρωση του βορικού οξέος του κυτταρικού χυμού έως και 45% συγκριτικά με τον εκάστοτε μάρτυρα. Η επίδραση του 3-NBA στη συγκέντρωση της ολευροπαΐνης υπήρξε αρνητική, ενώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του ακτεοσίδη. Αξιοσημείωτα, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στο αλκαλικό υδρόλυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων μειώθηκε, τόσο ως αποτέλεσμα της έλλειψης βορίου όσο και ως αποτέλεσμα της επίδρασης του 3-NBA. Συμπερασματικά, η έλλειψη βορίου προκαλεί απελευθέρωση βορικού οξέος από το κυτταρικό τοίχωμα με ταυτόχρονη μείωση των φαινολικών συστατικών. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι υπό συνθήκες έλλειψης βορίου, ορισμένα φαινολικά συστατικά μπορούν να απελευθερωθούν από το κυτταρικό τοίχωμα προς το διαλυτό κλάσμα.

