

تأثیر باران اسیدی بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و (*Acer velutinum Boiss*) افرای پلت فیزیولوژیکی

وهب جعفریان^{*}، مهدی صالحی^۲ و رضا فتوحی قزوینی^۲

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، ^۲گروه علوم باگبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۱۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۲/۰۵)

چکیده:

باران اسیدی ناشی از فعالیت‌های صنعتی یکی از تنش‌های جدی است که وقوع آن در اغلب مناطق ایران در سال‌های آینده محتمل است. به‌منظور درک بهتر اثر این تنش بر غشاء سلول، کلروفیل، تولید رادیکال‌های اکسیژن و تاثیری که بر گیاهان دارد بطور موردی، رفتار درخت زیستی‌صنعتی افرای پلت در برابر این آینده هوا مورد مطالعه قرار گرفت. از این‌رو، نهال‌های این درخت در معرض باران اسیدی شیوه‌سازی شده در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار سطح pH = ۳، ۴، ۵، و ۶ به عنوان شاهد، و در سه تکرار به مدت ده روز، قرار گرفتند. در پایان آزمایش، برخی تغییرهای ظاهری از قبیل لکه‌های بافت‌مرده و خمیدگی حاشیه برگ تنها در گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی دارای pH = ۳ مشاهده شد. نتایج نشان داد که با افزایش اسیدیته باران اسیدی میزان نشت یونی (EL) و پراکسیداسیون لیپید (LPO) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان کلروفیل کل در برگ‌ها در مواجهه با باران اسیدی دارای pH = ۳ به‌طور چشمگیری کاهش یافت. این تغییرات حاکی از آسیب غشاء سلول و کاهش سطح فتوسترن بود. بنابر نتایج بدست‌آمده، فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز (SOD) تحت تأثیر باران اسیدی قرار نگرفت، در حالی که میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD) و آسکوربیات‌پراکسیداز (APX) در گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی دارای pH = ۳ به‌طور چشمگیری کاهش یافت. کاهش ظرفیت آنتی‌اسیدانی مصادف با بروز آسیب بود. به عبارت دیگر افرای پلت در برابر باران اسیدی تا pH = ۴ بدليل افزایش آنتی‌اسیدان‌ها مقاوم بوده ولی در برابر باران اسیدی دارای pH = ۳ و بی‌تردید pH‌های پایین‌تر، به دلیل افزایش رادیکال‌ها، کاهش فتوسترن و پراکسیده شدن غشاء آسیب مشهود شد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی هوا، آنزیم‌های آنتی‌اسیدان، افرا، تنش باران اسیدی، لیپید پراکسیداسیون.

مقدمه:

امروزه به بارشی با pH کمتر از ۵/۶ باران اسیدی می‌گویند. بارش اسیدی بیشتر در نتیجه‌ی حل‌شدن دی‌اسید‌گوگرد (SO₂) و اسیدهای نیتروژن (NO_x) با بخار آب موجود در اتمسفر است (Kita *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2001). این گازهای سمی بیشتر در مناطق صنعتی تولید می‌شوند و بسته به غلظت با نسبت‌های مختلفی همراه با دیگر ترکیبات در باران اسیدی وجود دارند (Wu and Han, 2015).

باران‌های اسیدی به‌وجود‌آمده به‌واسطه فعالیت‌های دست-ساخت بشری (anthropogenic activities) یکی از مهمترین انواع آلاینده‌های ثانویه هوا به‌شمار می‌آیند. وجود جریانات جوی و بادها می‌توانند آلاینده‌های هوا را تا مناطقی دورتر از خواستگاهشان انتقال دهد و باعث ایجاد بحران در آن مناطق گردد (Bouwman *et al.*, 2002; Prihatin *et al.*, 2015).

این حال، در برخی گیاهان بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به- خاطر آلودگی هوا توسط Kubo و همکاران (۱۹۹۵) گزارش گردیده است.

افرای پلت (*Acer velutinum* Boiss.) درختی با شاخساره‌های بزرگ و بومی جنگل‌های شمال ایران است، نورپسند بوده و در بوستان‌ها و فضاهای سبز شهری و در صنعت چوب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wiersema and Blanca, 1999). از آنجا که پژوهش‌های ناچیزی درباره اثر آلاینده‌های هوا بر درختان بومی ایران صورت پذیرفته و اطلاعات کمی در زمینه اثرهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی باران اسیدی بر گیاهان در دسترس است، و همچنین از آنجا که گونه‌های پنهان‌برگ نسبت به گونه‌های باریک‌برگ در برابر باران اسیدی حساس‌تر هستند (Wyrwicka and Skłodowska, 2006)، گیاه افرای پلت که در ایجاد فضای سبز با نقش سایه انداز کاربرد دارد و از طرفی دارای ویژگی‌های زیباشناختی شکل برگ و میوه و نیز دارای رشد سریع است، انتخاب گردید تا تاثیر تیمارهای مختلف باران اسیدی روی گیاه مورد مطالعه قرار گیرد. بنابراین، تعدادی از شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پس از اعمال تیمارها اندازه گیری شد تا شدت آسیب باران اسیدی و مقاومت گیاه مشخص گردد.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی: برای انجام این آزمایش از نهال‌های سه ساله‌ی افرا استفاده شد. نهال‌ها به صورت هم اندازه به گلدان‌های پلاستیکی بزرگ (۷۰ سانتی‌متر درازا، ۴۰ سانتی‌متر پهنای دهانه) حاوی ماسه و کود دامی کاملاً پوسیده به نسبت حجمی ۲:۱ که در ته آن‌ها چهار عدد سوراخ برای زه‌آب ایجاد شده بود، انتقال داده شدند. جهت سازگاری، استقرار نهال‌ها و رشد بعدی، به مدت یک ماه با محلول هوگلنند هر سه روز یکبار و سپس به طور میانگین هر پنج روز آبیاری شدند. این آزمایش در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان (رطوبت ۷۵ درصد، بیشینه و کمینه دما به ترتیب ۲۶ و ۱۶ درجه سانتی‌گراد) انجام پذیرفت.

باران اسیدی با اسیدی کردن آب رودخانه‌ها و دریاچه‌ها شرایط زندگی آبزیان را به خطر می‌اندازد (Botkin and Keller, 2003). همچنین باعث آسیب به بناهای تاریخی می‌گردد (Bear, 1964). باران اسیدی با کم کردن pH خاک باعث آزادسازی عناصر سمی مانند آلومینیوم گردیده و نیز فعالیت آن دسته از ریزاندام‌واره‌های مفید خاک که در دامنه‌های بالای pH فعالند را کاهش می‌دهد و در نتیجه از حاصلخیزی خاک می‌کاهد (King et al., 2006; Zhang et al., 2007). باران‌های اسیدی به طور مستقیم در مواجه با برگ‌های گیاهان بر آنان اثر گذاشته و سبب کاهش سرعت رشد (Silva et al., 2005) و در pH‌های پایین‌تر حتی منجر به ریش نابهنجام، پیری و مرگ گیاه می‌شود. مقدار زی‌توده بخش بالای سطح زمین و بخش Singh et al., (2007). باران اسیدی همچنین بر روی اندام‌های تولید مثل گیاهی اثر دارد. در بررسی‌های Bellani و همکاران (۱۹۹۷) بر روی اثرات باران اسیدی بر دانه گرده سیب مشاهده شد که باران اسیدی به طور چشمگیری باعث کاهش زیوایی و جوانه‌زنی دانه گرده می‌گردد. همچنین مشخص شده است که باران اسیدی بر فراساختارهای کلروپلاست اثر می‌گذارد و میزان فتوستتر خالص را بسیار تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wen et al., 2011). کاهش میزان pH باران اسیدی بر میزان کلروفیل برگ گیاهان نیز تأثیر بسزایی دارد (Wyrwicka and Skłodowska, 2006). بنابر پژوهش‌های Velikova و همکاران (۲۰۰۰) باران اسیدی بر تخریب غشای یاخته‌ها اثرات قابل توجهی می‌گذارد. تولید انواع گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن یا ROS (Reactive Oxygen Species) یک رخداد اولیه تحت شرایط مختلف تنش است (Noctor and Foyer, 1998). ROS‌ها در گیاه تحت تنش باران اسیدی در برگ‌ها به وجود می‌آیند (Wang et al., 2014). تنش اکسیداتیو در پاسخ به تنش باران اسیدی در گیاهان در نتیجه تولید انواع ROS نیز ایجاد می‌شود (Gabara et al., 2003). اکسیژن فعال تولیدشده تحت تنش، عامل اصلی پراکسیداسیون لیپیدها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و آسیب‌های اکسیداتیو به DNA است (Athar et al., 2008). با

جدول ۱- ترکیب باران اسیدی (Seufert *et al.*, 1990)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)	NH ₄ NO ₃	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ SO ₄	KHCO ₃	CaCl ₂ ·2H ₂ O
۳/۱	۱/۳	۲/۵	۳/۱	۱/۳	۱/۳	۱/۱

مولار 13mM EDTA، $\text{pH} = 7/8$ mM NBT، $50\text{ }\mu\text{M}$ ریبوفلاوین $2\mu\text{M}$ و $50\text{ }\mu\text{M}$ نیتروبلوترازوپلیوم (NBT) میکرولیتر عصاره خام آنزیمی انجام گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز (SOD) به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 560 نانومتر انجام گردید. یک واحد (IU) از SOD به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که سبب 50% مهار احیای NBT به فرمازان تحت شرایط یاد شده شود. تفاوت بین جذب هر عصاره در مدت زمان روشنایی 16 دقیقه و جذب عصاره بدون آنزیم (کنترل) در همان زمان روشنایی در واقع نشان دهنده بازداشت واکنش خودبخودی و تشکیل فرمازان توسط SOD است (Giannopolitis and Ries, 1977).

برای تعیین فعالیت مخصوص آنزیم SOD گیاهی بر حسب Unit/mg protein از فرمول زیر استفاده می‌شود:

$$\frac{\text{OD}560 \text{ Control} - \text{OD}560 \text{ Sample}}{\frac{1}{2} \text{ OD}560 \text{ Control}} \times \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Reaction Mix}}$$

Units / mg:

روش سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ابتدا بافر فسفات 50 میلی مolar، EDTA یک میلی مolar، آسکوربات $0/5$ میلی مolar و پراکسید هیدروژن یک میلی مolar تهیه شد. سپس سنجش توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در کووت‌های کوارتز در طول موج 290 نانومتر انجام شد (Nakano and Asada, 1981). اگر تغییرهای جذب علیه زمان (OD/min) به ثابت $1/2/8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ تقسیم شود فعالیت آنزیمی به دست می‌آید. برای تعیین فعالیت مخصوص آنزیم آسکوربات پراکسیداز گیاهی از فرمول زیر استفاده می‌شود که فعالیت مخصوص بر حسب Unit/mg protein به دست می‌آید، که یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک میکرومول آسکوربات در مدت زمان یک دقیقه و در دمای 25 درجه سلسیوس است.

شیوه اعمال تیمارها: یک ماه پس از استقرار در گلدان، نهال‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در معرض چهار سطح باران اسیدی (pH های $4, 5, 6$ به عنوان شاهد) که طبق روشن Seufert و همکاران (1990) فراهم شده بود (جدول ۱)، قرار گرفتند. باران اسیدی به صورت محلول پاشی روزانه و به مدت 10 روز انجام گرفت. در این تیمار از توابیع 80 به عنوان سورفتکانت استفاده گردید. نمونه‌های برگی 24 ساعت پس از آخرین محلول پاشی، از بخش‌های گوناگون گیاه، معمولاً از برگ‌های گره‌های دوم، سوم و چهارم مانده به جوانه انتهایی که فعالیت فیزیولوژیکی بالایی دارند، گرفته و بی‌درنگ به آزمایشگاه برده شدند تا میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز، میزان پراکسیداسیون لیپید، کلروفیل کل و نشت یونی در آن‌ها اندازه گیری شوند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: به منظور استخراج و اندازه گیری آنزیم، برگ‌های تازه از گیاه جدا و در هاون چینی با نیتروژن مایع کاملاً هموژنیزه شدند. میزان $0/1$ گرم از برگ منجمد شده با نیتروژن مایع با یک میلی لیتر از بافر استخراج (باfr فسفات 100 میلی مolar با $\text{pH} = 7$ که حاوی $0/1$ و 2% w/v PVPP) به مدت 15 دقیقه با 14000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس، سانتریفوژ شدند. از بخش رویی (سوپرناکتانت) برای سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پراکسیداسیون لیپیدها و تعیین غلظت پروتئین کل (نتایج نشان داده نشده) استفاده شد (De Azevedo *et al.*, 2006).

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز: فعالیت کل آنزیم سوپراکسیدیسموتاز با اندازه‌گیری توانایی اش در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوترازوپلیوم (NBT) تعیین شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در محلول واکنش به حجم $1/5$ میلی لیتر و دارای بافر فسفات (50 میلی

محصول پراکسیداسیون لیپیدها است بر اساس میکرومول در گرم وزن خشک محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

اندازه‌گیری نشت یونی و تعیین کلروفیل کل: برای اندازه‌گیری نشت یونی (EL)، برگ‌های هر نمونه را به طول ۲ میلی متر قطعه قطعه و در لوله‌های آزمایشگاهی قرار داده شدند و سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب مقتدر به آن‌ها اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۱۲ ساعت، هدایت الکتریکی اولیه محیط (EC₁) با استفاده از دستگاه EC سنج مدل Milwaukee Mi 306 اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شدند تا به‌طور کامل همه‌ی الکتروولیت‌های موجود در بافت‌ها آزاد شوند. بعد از آن نمونه‌ها تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خنک شدند و هدایت الکتریکی ثانویه (EC₂) اندازه‌گیری شد و میزان شدنده و هدایت الکتریکی (EC₁) با استفاده فرمول ۱۰۰ (EC₁ / EC₂) = EL محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری کلروفیل مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه برگ گیاه با ۱ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در نهایت عصاره استونی شفاف را جدا کرده و پس از قرار دادن در نیم ساعت تاریکی، اندازه‌گیری کلروفیل با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر انجام گرفت و در نهایت میزان کلروفیل کل طبق فرمول زیر به دست آمد (Tobita and Dionisio-Sese, 1998).

$$\text{Total Ch} = [20/2(A 663) + 80/2(A 645)] V/100 W$$

تجزیه آماری: این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمار باران اسیدی در چهار سطح و سه تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار (9.1) SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

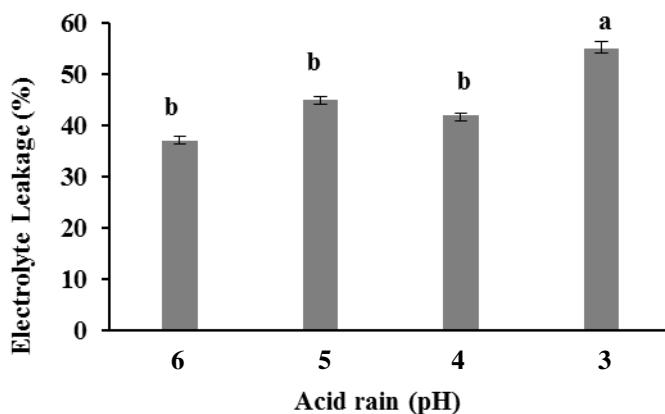
نتایج:

میزان نشت یونی و پراکسیداسیون لیپید: میزان نشت یونی با کاهش میزان pH باران اسیدی تا ۴، به‌طور معنی‌داری افزایش نیافت، ولی در pH=۳ افزایش معنی‌داری یافت. نشت یونی در

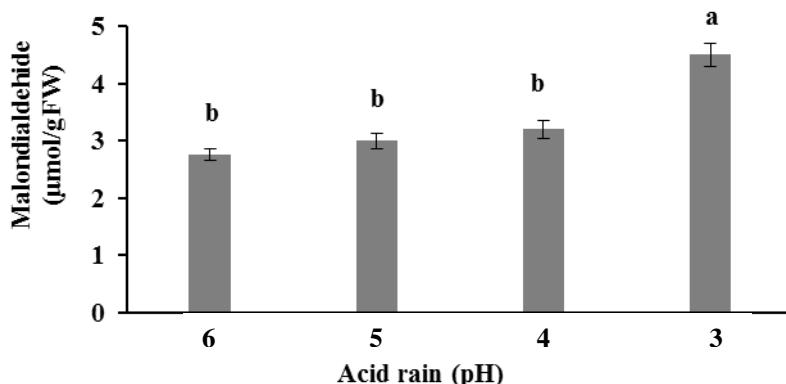
$$\text{Units / mg} = \frac{\text{OD } 290 / \text{min}}{2.8 \times \text{mg protein / ml reaction Mix}}$$

روش سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت پراکسیداز به روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. محلول بافری واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر KH₂PO₄ (pH = ۷)، ۱/۱ میلی‌مولار EDTA، ۱/۱ میلی‌مولار H₂O₂، و ۱۰ میلی‌مولار گایاکول بود. واکنش با افزودن محلول نمونه‌ها به محلول بافری واکنش، آغاز شد. فعالیت آنزیم با تغییر جذب دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه و ضریب خاموشی ۲۶/۶ ۲۶/۶ میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه گردید، و بر حسب protein U/mg protein بیان شد. یک واحد فعالیت این آنزیم معادل تشکیل یک میکرومول تتراگایاکول در دقیقه است.

پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، مقدار ۰/۵ گرم از نمونه درون لوله آزمایش قرار داده شد و ۵ میلی‌لیتر بافر پتانسیم‌فسفات ۵۰ میلی‌مولار به آن اضافه گردید. نمونه حاصله در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول سانتریفیوژ شده ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد (W/V) اسید تیوباربیتوريک که حاوی اسید تری کلرواستيك ۲۰ درصد (W/V) است، اضافه گردید و مخلوط در حمام آب داغ تحت دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. به منظور توقف واکنش، ظرف محتوى مخلوط حرارت داده شده به سرعت درون حمام بخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مخلوط سرد شده با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. غلاظت مالوندی‌آلدهید (MDA) و سایر آلدهیدهای تولیدشده توسط واکنش با تیوباربیتوريک‌اسید (TBA) که سبب تشکیل کمپلکس قرمز (MDA-TBA) در طول موج ۵۳۲ نانومتر می‌شود توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد، سپس جذب بقیه رنگیزهای غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر گردید. برای محاسبه غلاظت MDA از ضریب خاموشی معادل mM⁻¹cm⁻¹ ۱۵۵ استفاده شد و در نهایت مقدار مالوندی‌آلدهید که



شکل ۱- اثر باران اسیدی در pHهای مختلف بر میزان نشت یونی برگ‌های افرای پلت، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد غیر معنی‌دار هستند.



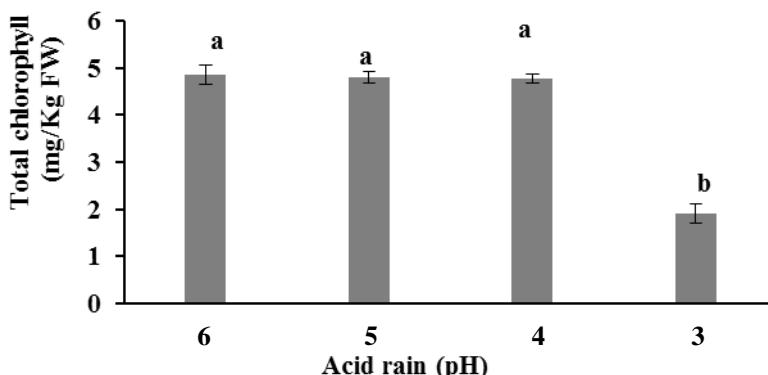
شکل ۲- اثر باران اسیدی در pHهای مختلف بر میزان مالوندی‌آلدهید برگ‌های افرای پلت، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد غیر معنی‌دار هستند.

میزان کلروفیل کل: همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد، در میزان کلروفیل کل با کاهش اسیدیتیه باران تا $pH=4$ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد، ولی در برابر باران اسیدی با $pH=3$ کاهش معنی‌داری در کلروفیل کل دیده شد. میزان کلروفیل کل در گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی دارای $pH=3$ نسبت به گیاهان مواجه‌شده با میزان زیادی کاهش یافت (شکل ۳).

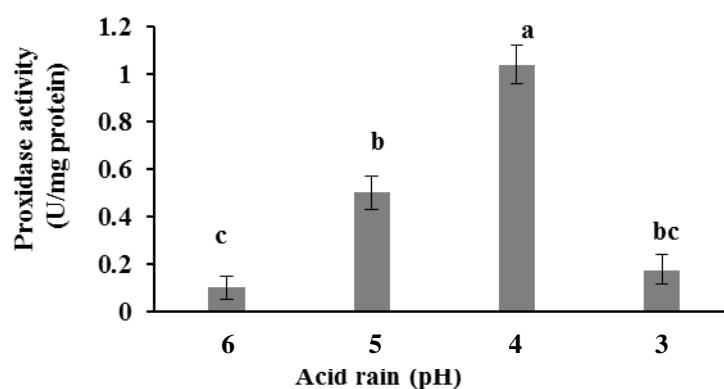
میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربیات پراکسیداز: مقایسه میانگین اثر باران اسیدی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز از روشن توکی معنی‌دار نبود ولی بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربیات-پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با کاهش میزان اسیدیتیه در باران اسیدی تا $pH=4$ میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربیات پراکسیداز نسبت به گیاه شاهد

گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی دارای $pH=3$ نسبت به گیاهان شاهد افزایش چشمگیری داشت و از نظر آماری تفاوت آن‌ها معنی‌دار بود (شکل ۱). این شاخص میزان آسیب‌دیدگی به غشا را نشان می‌دهد و رابطه‌ی معکوسی با پایداری غشا دارد.

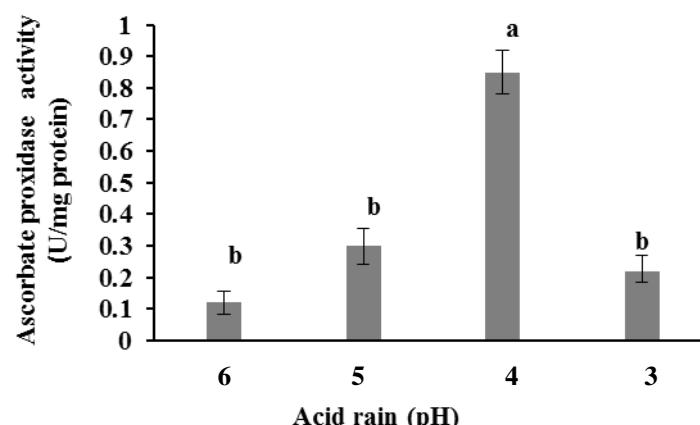
کاهش pH باران اسیدی تا $pH=4$ ، تأثیری بر میزان پراکسیداسیون لیپید غشا نداشت و آن را در سطح تقریباً یکسانی با گیاهان شاهد نگه داشت. تنها گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی $pH=3$ افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپید نشان دادند، به‌طوری که افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد قابل ملاحظه بود (شکل ۲). میزان مالوندی‌آلدهید شاخصی برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید غشا است و رابطه مستقیمی با آن دارد.



شکل ۳- اثر باران اسیدی در pHهای مختلف بر میزان کلروفیل کل برگ‌های افرای پلت، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد غیر معنی‌دار هستند.



شکل ۴- اثر باران اسیدی در pHهای مختلف بر میزان فعالیت پراکسیداز برگ‌های افرای پلت، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد غیر معنی‌دار هستند.



شکل ۵- اثر باران اسیدی در pHهای مختلف بر میزان فعالیت آسکوربیات پراکسیداز برگ‌های افرای پلت، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد غیر معنی‌دار هستند

شکل ۴ و ۵).

تأثیر ریخت‌شناسی باران اسیدی بر برگ‌های افرای پلت:
برگ‌های افرای پلت توانستند در برابر باران اسیدی تا pH=۴ سالم و بدون تغییر باقی بمانند ولی باران اسیدی با pH=۳

افزایش یافتند. میزان فعالیت پراکسیداز و آسکوربیات پراکسیداز در گیاهان تیمارشده با باران اسیدی دارای pH=۳ نسبت به گیاهان تیمارشده با باران اسیدی دارای pH=۴ کمتر بودند، ولی نسبت به گیاهان شاهد تغییر معنی‌داری نکردند (به ترتیب



شکل ۶- سمت راست: گیاه افرای افرای پلت شاهد (تیمار شده با باران $pH = 6$)، سمت چپ: برگ‌های افرای افرای پلت مواجه شده با باران اسیدی $pH = 3$.

(2003). سطوح بالای ROS برای یاخته‌های گیاهی بسیار خطرناک بوده و به غشاها، پروتئین‌ها و DNA آسیب وارد می‌کند. ROS‌ها در گیاهان برنج مواجه شده با باران اسیدی نیز باعث نکروزه شدن برگ‌ها شده است (Wang *et al.*, 2014).

همچنین ROS‌ها اصلی‌ترین عامل برای مرگ بسیاری از گیاهان مواجه شده با تنش‌های سخت محیطی هستند (Del Río *et al.*, 2002).

پراکسیداسیون لیپید واکنشی است که در آن ترکیبات لیپوئیدی غشا از هم متلاشی می‌گردد. پراکسیداسیون لیپید در غشا زمانی رخ می‌دهد که سطوح ROS به حد آستانه خود رسیده باشد (Montillet *et al.*, 2005). افزایش پراکسیداسیون لیپید در برگ‌های افراپس از مواجه شدن با باران اسیدی نشان دهنده میزان آسیب‌دیدن گیاه است. Chen و همکاران (2014) گزارش کردند که در درختان سپیدار مواجه شده با تنش شوری، افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید ناشی از افزایش تویید ROS‌ها است. همچنین Christou و همکاران (2014) دریافتند که تنش‌های محیطی در توت‌فرنگی به واسطهٔ تویید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در سلول‌ها باعث آسیب به بخش‌های مختلف از جمله لیپیدهای غشایی می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که آسیب واردآمده به غشاها یاخته‌ها در برگ‌های افرای افرای پلت در نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از باران اسیدی باشد. افرای افرای پلت توانست تا $pH = 4$ باران مقاومت نشان دهد و $pH = 3$ هیچگونه رنگ‌پریدگی در برگ‌ها ظاهر نشود، اما در $pH = 2$ تخریب کلروفیل به طور چشمگیری صورت گرفته است. کاهش میزان کلروفیل در گیاهان آبوتیلون (Mersie and Foy, 1986) (*Abutilon theophrasti* Medik.)

باعث آسیب جدی و بارز بر برگ‌ها شد. آسیب‌ها شامل بافت مردگی (necrosis) و خمیدگی حاشیه برگ بود (شکل ۶).

بحث:

در این پژوهش، بروز لکه‌های نکروزه بر روی برگ‌های درخت افرای افرای پلت (*A. velutinum* Boiss) تنها در گیاهان مواجه شده با باران اسیدی $pH = 3$ مشاهده شد. بنابر مطالعات میکرومورفولوژی برگی انجام گرفته توسط Bruno (2006)، منافذ روزنه‌ای در درخت گرمسیری جنپا (*Genipa americana* L.) پس از مواجه شدن با باران اسیدی شیبیه‌سازی شده، شکل طبیعی خود را از دست داده و لبه‌ی بیرونی روزنه‌ها از هم گسیخته شدند. کاهش استحکام در یاخته‌های جانبی سلول‌های نگهبان روزنه و تغییر در تراوایی این یاخته‌ها نیز توسط آن‌ها گزارش گردید. افزون بر این، بافت‌مردگی ناشی از باران اسیدی در برگ‌های عنبر سائل Wyrwicka و همکاران (2013) و در خیار توسط Skłodowska (2006) گزارش شده است. خمیدگی حاشیه برگ‌ها و نکروزه شدن در گیاهان آبوتیلون (*Abutilon theophrasti* Medik.) گردیده است (Mersie and Foy, 1986). وجود لکه‌های نکروزه در پژوهش حاضر را می‌توان به پاره شدن غشا و از بین رفن یاخته‌ها به خاطر آسیب واردآمده به آن‌ها توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) برانگیخته شده توسط تنش باران اسیدی، نسبت داد. در حقیقت، باران اسیدی به عنوان یک تنش غیرزیستی سطوح ROS را در بافت‌های گیاهی بالا می‌برد Kong *et al.*, 2000; Velikova *et al.*, 2000; Gabara *et al.*, 2000)

توسط Davis و Swanson (۲۰۰۱) گزارش شده است. افزون بر این، مشخص شده است که آسکوربات پراکسیداز یکی از عوامل مهم پاکسازی و حذف ازن و ROS‌های برگرفته شده از ازن در آپولاست می‌باشد (Chameides, 1989). اخیراً نقش آسکوربات پراکسیداز پروکسیزومی در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی از طریق کاهش تجمع H_2O_2 در گیاه آرابیدوپسیس تراریخته شده به اثبات رسیده است (Guan et al., 2015). بنابر نتایج به دست آمده از این پژوهش، احتمال می‌رود آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز نقش مهمی در محافظت گیاه در برابر باران اسیدی داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی:

طبق این پژوهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اسیدانی در pH آسیب‌زننده بسیار کاهش یافت و آسیب‌های ظاهری بروز پیدا کرد. درخت افرای پلت به خوبی توانست در برابر پایین آوردن pH شدت اسیدیتۀ باران اسیدی تا $pH=4$ مقاومت کند و ظاهر خود را حفظ نماید اما در برابر باران اسیدی با $pH=3$ حساسیت نشان داد و آسیب دید. طبق نتایج این تحقیق، درخت افرای پلت را می‌توان در مناطقی که میزان اسیدیتۀ باران اسیدی تا $pH=4$ هم می‌رسد پرورش داد. روی هم‌رفته، پژوهش‌های گسترده‌ای لازم است تا مکانیسم دقیق اثر باران اسیدی و سیستم‌های مقاومت گیاهان را در برابر باران‌های اسیدی مشخص نماید.

Bouwman, A. F., Van Vuuren, D. P., Derwent, R. G. and Posch, M. (2002) A global analysis of acidification and eutrophication of terrestrial ecosystems. *Water Air Soil Pollution* 141: 349–382.

Bruno F. S., Silva, L. C., Azevedo, A. A. and Aguiar, R. (2006) Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives Biology and Technology* 49: 313-321.

Bueno, P. and Piqueras, A. (2002) Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. *Plant Growth Regulation* 36: 161–167.

Chameides, W. L. (1989) The chemistry of ozone deposition to plant leaves: Role of ascorbic acid,

Wyrwicka and Skłodowska,) (*Cucumis sativus*) (2006) و در درخت عنبر سائل (*Liquidambar formosana*) و شیما (Chen et al., 2013) (*Schima superba*) بسیار وابسته به میزان pH باران اسیدی بکاررفته بود، به گونه‌ای که با کم کردن pH میزان کلروفیل در برگ‌ها کاهش یافت.

فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز در برگ‌های افرا به طور معنی‌داری تحت تأثیر باران اسیدی قرار نگرفت. بر عکس، فعالیت پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش اسیدیتۀ باران افزایش یافتند. ولی ضمن مواجهه با باران اسیدی $pH=3$ بسیار کاهش یافتند. میزان آسکوربات پراکسیداز بالا را می‌توان یکی دیگر از علتهای اصلی سالم ماندن برگ‌ها در مقابل باران اسیدی با pH پایین ذکر کرد. بنابر گزارش Kavitha و همکاران (۲۰۰۸) تنش اسیداتیو موجب افزایش در نسخه Avicennia marina برداری آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های *A. marina* نشسته از این‌ها، بیان ژن‌های می‌شود. آن‌ها همچنین بیان نمودند که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های *A. marina* نقشی در کاستن اثرات زیان‌بار تنش اسیداتیو دارد. گذشته از این‌ها، بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز به خاطر آلودگی هوا توسط Kubo و همکاران (۱۹۹۵) و Rao و همکاران (۱۹۹۶) گزارش گردیده است. همچنین Bueno و Piqueras (۲۰۰۲) ثابت کردند که آسکوربات پراکسیداز از یاخته‌های تنباق در برابر H_2O_2 تحت شرایط تنش‌زا محافظت می‌کند. نقش آسکوربات پراکسیداز در حذف ROS از یاخته‌های *Euphorbia esula* L. در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله شوری، خشکی و سمیت عناصر نیز

منابع:

- Athar, H. R., Khan, A. and Ashraf, M. (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany* 63: 224-231.
- Bear, F. (1964) *Chemistry of the Soil*. Reinhold Publisher Corp., New York, second edition, 515 p.
- Bellani, L. M., Rinallo, C. Muccifora, S. and Gori, P. (1997) Effect of simulated acid rain on pollen physiology and ultrastructure in the apple. *Environmental Pollution* 95: 357-362.
- Botkin, D. B. and Keller, A. (2003) *Environmental Science*, 4th Ed. John Wiley and Sons, USA, pp.485-519.

- ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: Molecular and functional characterization. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 794-804.
- King, H. B., Wang, M. K., Zhuang, S. Y., Hwong, J. L., Liu, C. P. and Kang, M. J. (2006) Sorption of sulfate and retention of cations in forest soils of Lien-Hua-Chi watershed in central Taiwan. *Geoderma* 13: 143-153.
- Kita, I., Sato, T., Kase, Y. and Mitropoulos, P. (2004) Neutral rains at Athens, Greece: a natural safeguard against acidification of rains. *Science of the Total Environment* 327: 285-294.
- Kong, F. X., Liu, Y., Hu, W., Shen, P. P., Zhou, C. L. and Wang, L. S. (2000) Biochemical responses of the mycorrhizae in *Pinus massoniana* to combined effects of Al, Ca and low pH. *Chemosphere* 40: 311-318.
- Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. (1995) Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology* 29: 479-489.
- Kumar, A. J., Gough, W. A., Karagatzides, J. D., Bolton, K. A. and Tsuji, L. J. S. (2001) Testing the validity of a critical sulphur and nitrogen load model in Southern Ont., Canada, using soil chemistry data from MARYP. *Environmental Monitoring and Assessment* 69: 221-230.
- Mersie, W. and Foy, C. L. (1986) Effects of acidity of simulated acid rain and its influence on the phytotoxicity of chlorsulfuron on velvetleaf and barley. *Environmental and Experimental Botany* 26: 341-347.
- Montillet, J. L., Chamnongpol, S. C., Rustérucci, J., Dat, B., van de Cotte, J. P., Agnel, C., Battesti, D., Inzé, F., Van, B. and Triantaphylides, C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H_2O_2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138: 1516-1526.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Prihatin, J., Corebima, A.D. and Abdul Gofur A. (2015) The Effect of exposure of mulberry to acid rain on the defects cocoon of *Bombyx mori* L. *Procedia Environmental Sciences* 23: 186-191.
- Rao, M.V., Paliyath, G. and Ormrod, D. P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110: 125-136.
- Seufert, G., Hoyer, V., Wollmer, H. and Arndt, U. (1990) The Hohenheim long-term experiment. General methods and materials. *Environmental Pollution* 68: 205-229.
- Silva, L. C., Azevedo, A. A., Silva, E. A. M. and Oliva, M. A. (2005) Effects of simulated acid rain on the Environmental Science Technology 23: 595-600.
- Chen, J., Wang, W., Liu, T., Wu, F. and Zheng, H. (2013) Photosynthetic and antioxidant responses of *Liquidambar formosana* and *Schima superba* seedlings to sulfuric-rich and nitric-rich simulated acid rain. *Plant Physiology and Biochemistry* 64: 41-51.
- Chen, S., Hawighorst, P., Sun, J. and Polle, A. (2014) Salt tolerance in *Populus*: Significance of stress signaling networks, mycorrhization, and soil amendments for cellular and whole-plant nutrition. *Environmental and Experimental Botany* 107: 113-124.
- Christou, A., Manganaris, G. A., and Fotopoulos V. (2014) Systemic mitigation of salt stress by hydrogen peroxide and sodium nitroprusside in strawberry plant via transcriptional regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Environmental and Experimental Botany* 107: 46-54.
- Davis, D. G. and Swanson, H. R. (2001) Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and Experimental Botany* 46: 95-108.
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Eneas-Filho, J., De Abreu, C. E. B. and Gomes-Filho, E. (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56: 87-94.
- Del Río, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gómez, M. and Barroso, J. B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1255-1272.
- Dionisio-Sese, M.L. and Tobita, S. (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.
- Gabarà, B., Skłodowska, M., Wyrwicka, A., Glińska, S. and Gapińska, M. (2003) Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain. *Plant Science* 164: 507-516.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Guan, Q., Wang, Z., Wang, X., Takano, T. and Liu, S. (2015) A peroxisomal APX from *Puccinellia tenuiflora* improves the abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* through decreasing of H_2O_2 accumulation. *Plant Physiology* 175: 183-191.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Kavitha, K., Venkataraman, G. and Parida, A. (2008) An oxidative and salinity stress induced peroxisomal

- ultrastructure in soybean seedlings. *Chemosphere* 84: 601-608.
- Wiersema, J. H. and Blanca, L. (1999) World Economic plants: A standard Reference. CRC press. New York P. 792.
- Wu, Q. and Han, G. (2015) Sulfur isotope and chemical composition of the rainwater at the Three Gorges Reservoir. *Atmospheric Research* 155: 130-140.
- Wyrwicka, A. and Skłodowska, M. (2006) Influence of repeated acid rain treatment on antioxidative enzyme activities and on lipid peroxidation in cucumber leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 198-204.
- Zhang, J. E., Ouyang, Y. and Ling, D. J. (2007) Impact of simulated acid rain on cation leaching from the Latosol in south China. *Chemospher* 67: 2131-2137.
- growth and anatomy of five Brazilian tree species. *Australian Journal of Botany* 53: 1-8.
- Singh, J., Upadhyay, A.K., Prasad, K., Bahadur, A. and Rai, M. (2007) Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 106-112.
- Velikova, V., Yordanow, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Protective role of exogenous polyamines. Plant Science* 151: 59–66.
- Wang, L., Wang, W., Zhou, Q. and Huang, X. (2014) Combined effects of lanthanum (III) chloride and acid rain on photosynthetic parameters in rice. *Chemosphere* 112: 355-361.
- Wen, K., Liang, C., Wang, L., Hu, G. and Zhou, Q. (2011) Combined effects of lanthanumion and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast