

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

وهب جعفریان<sup>۱\*</sup>، مهدی صالحی<sup>۲</sup> و رضا فتوحی قزوینی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، <sup>۲</sup>گروه علوم باغبانی، 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 تأثیری که بر گیاهان دارد بطور موردی، رفتار درخت زیتنی-صنعتی افرای پلت در برابر این آلاینده هوا مورد مطالعه قرار گرفت. از این‌رو، نهال‌های این درخت در معرض باران اسیدی شبیه‌سازی‌شده در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار سطح pH: ۳، ۴، ۵، و ۶ به‌عنوان شاهد، و در سه تکرار به‌مدت 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 فتوسنتز بود. بنابر نتایج به‌دست‌آمده، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) تحت تأثیر باران اسیدی قرار نگرفت، در حالی‌که میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) در گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی دارای pH = ۳ به‌طور چشمگیری کاهش یافت. کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مصادف با بروز آسیب بود. به عبارت دیگر افرای پلت در برابر باران اسیدی تا pH = ۴ بدلیل افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها مقاوم بوده ولی در برابر باران اسیدی دارای pH = ۳ و بی‌تردید pH‌های پایین‌تر، به دلیل افزایش رادیکال‌ها، کاهش فتوسنتز و پراکسیده شدن غشاء آسیب مشهود شد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی هوا، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، 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 دی‌اکسید گوگرد (SO<sub>2</sub>) و اکسیدهای نیتروژن (NOX) با بخار آب موجود در اتمسفر است (Kumar et al., 2001; Kita et al., 2004). 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 بادهای 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).

\*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: v.jafarian@znu.ac.ir

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 درباره‌ی 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 پهن‌برگ 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 اندازه‌گیری 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 به‌صورت هم اندازه به گلدان‌های پلاستیکی بزرگ (۷۰ سانتی‌متر درازا، ۴۰ سانتی‌متر پهنا، 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 هوگلند هر سه روز یکبار و سپس به‌طور 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 به‌طور مستقیم در مواجهه با برگ‌های گیاهان بر آنان اثر گذاشته و سبب کاهش سرعت رشد (Silva et al., 2005) و در pH های پایین‌تر حتی منجر به ریزش نابهنگام، پیری و مرگ گیاه می‌شود. مقدار زی‌توده بخش بالای سطح زمین و بخش زیرزمینی گندم تحت باران اسیدی کاهش یافتند (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 دانه‌گرده سبب مشاهده شد که باران اسیدی به‌طور چشمگیری باعث کاهش زیوایی و جوانه-زنی دانه‌گرده می‌گردد. همچنین مشخص شده است که باران اسیدی بر فراساختارهای کلروپلاست اثر می‌گذارد و میزان فتوسنتز 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). ROS ها 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	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KHCO <sub>3</sub>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
مقدار (گرم در لیتر)	۱/۳	۳/۱	۲/۵	۱/۳	۳/۱

مولار  $\text{pH} = 7/8$ ، EDTA ۰/۱ mM، متیونین ۱۳ mM، نیتروبلوترازولیوم (NBT) ۷۵  $\mu\text{M}$ ، ریوفلاوین ۲  $\mu\text{M}$  و ۵۰ میکرولیتر عصاره خام آنزیمی انجام گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام گردید. یک واحد (IU) از SOD به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که سبب ۵۰٪ مهار احیای NBT به فرمازان تحت شرایط یاد شده شود. تفاوت بین جذب هر عصاره در مدت زمان روشنایی ۱۶ 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:

$$\text{Units / mg} = \frac{\text{OD560 Control} - \text{OD560 Sample}}{\frac{1}{2} \text{OD560 Control}} \times \frac{\text{mg Protein / ml Reaction Mix}}{1}$$

**روش سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:** برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، EDTA یک میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار و پراکسید هیدروژن یک میلی مولار تهیه شد. سپس سنجش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در کووت‌های کوارتز در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام شد (Nakano and Asada, 1981). اگر تغییرهای جذب علیه زمان (OD/min) به ثابت  $2/\lambda \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  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 ۲۵ 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 ۳، ۴، ۵، و ۶ به‌عنوان شاهد) که طبق روش Seufert و همکاران (۱۹۹۰) فراهم شده بود (جدول ۱)، قرار گرفتند. باران اسیدی به‌صورت محلول‌پاشی روزانه و به مدت ۱۰ روز انجام گرفت. در این تیمار از توپین ۸۰ به‌عنوان سورفکتانت استفاده گردید. نمونه‌های برگ ۲۴ ساعت پس از آخرین محلول‌پاشی، 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 سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، میزان پراکسیداسیون لیپید، کلروفیل کل و نشت یونی در آن‌ها اندازه‌گیری شوند.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی:** به منظور استخراج و اندازه‌گیری آنزیم، برگ‌های تازه از گیاه جدا و در هاون چینی با نیتروژن مایع کاملاً هموژنیزه شدند. میزان ۰/۱ گرم از برگ منجمد شده با نیتروژن مایع با یک میلی‌لیتر از بافر استخراج (بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با  $\text{pH} = 7$  که حاوی EDTA mM ۰/۱ و ۲٪ w/v PVPP) به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفوژ شدند. از بخش رویی (سوپرناتانت) 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 سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت کل آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با اندازه‌گیری توانایی‌اش در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوترازولیوم (NBT) تعیین شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در مخلوط واکنش به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر و دارای بافر فسفات (۵۰ میلی

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

روش سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت پراکسیداز به روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. محلول بافری واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH = ۷)، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱ میلی‌مولار  $\text{H}_2\text{O}_2$  و ۱۰ میلی‌مولار گایاکول بود. واکنش با افزودن محلول نمونه‌ها به محلول بافری واکنش، آغاز شد. فعالیت آنزیم با تغییر جذب دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه و ضریب خاموشی ۲۶/۶ میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه گردید، و بر حسب U/mg protein بیان شد. یک واحد فعالیت این آنزیم معادل تشکیل یک میکرومول تترایاکول 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 پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار به آن اضافه گردید. نمونه حاصله در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول سانتریفوژ شده ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد (W/V) اسید تیوباربیتوریک که حاوی اسید تری کلرواستیک 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 محتوی مخلوط حرارت داده شده به سرعت درون حمام یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مخلوط سرد شده با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و سایر آلدئیدهای تولیدشده توسط واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA) که سبب تشکیل کمپلکس قرمز (MDA-TBA) در طول موج ۵۳۲ نانومتر می‌شود توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد، سپس جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ۱۵۵ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدهید که

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

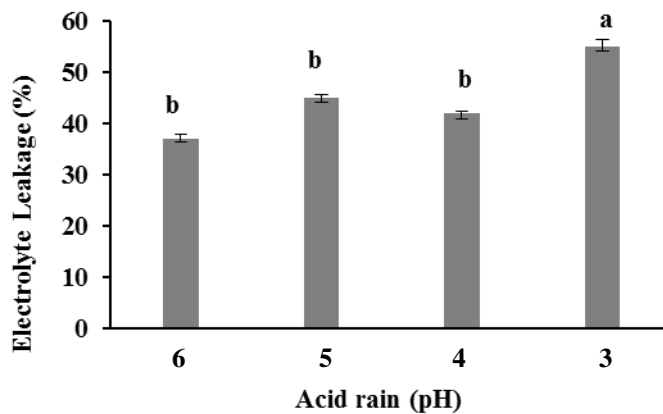
اندازه‌گیری نشت یونی و تعیین کلروفیل کل: برای اندازه‌گیری نشت یونی (EL)، برگ‌های هر نمونه را به طول ۲ میلی‌متر قطعه قطعه و در لوله‌های آزمایشگاهی قرار داده شدند و سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۱۲ ساعت، هدایت الکتریکی اولیه محیط ( $\text{EC}_1$ ) 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 همی‌الکترولیت‌های موجود در بافت‌ها آزاد شوند. بعد از آن نمونه‌ها تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خنک شدند و هدایت الکتریکی ثانویه ( $\text{EC}_2$ ) اندازه‌گیری شد و میزان EL با استفاده فرمول  $100 \text{ EL} = (\text{EC}_1 / \text{EC}_2)$  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 سانتریفوژ 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 اسپکتروفتومتر 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).

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

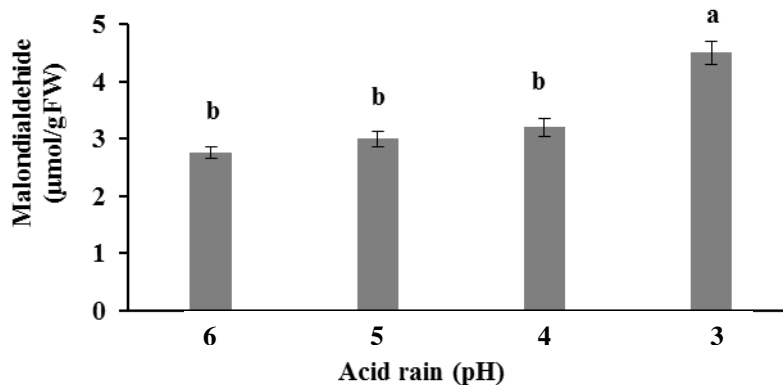
**تجزیه آماری:** این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمار باران اسیدی در چهار سطح و سه تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS (9.1) و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

### 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



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



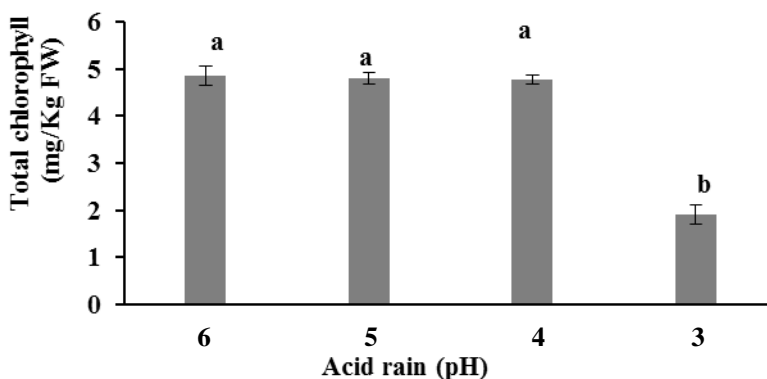
شکل ۲- اثر باران اسیدی در pHهای مختلف بر میزان مالون‌دی‌آلدئید برگ‌های افراى پلت، میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد غیر معنی‌دار هستند.

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

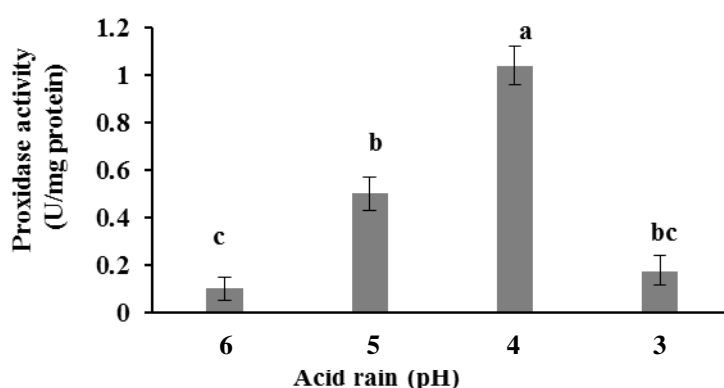
**میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز:** مقایسه میانگین اثر باران اسیدی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از روش توکی معنی‌دار نبود ولی بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات-پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با کاهش میزان اسیدیته در باران اسیدی تا  $\text{pH} = 4$  میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز نسبت به گیاه شاهد

گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی دارای  $\text{pH} = 3$  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.

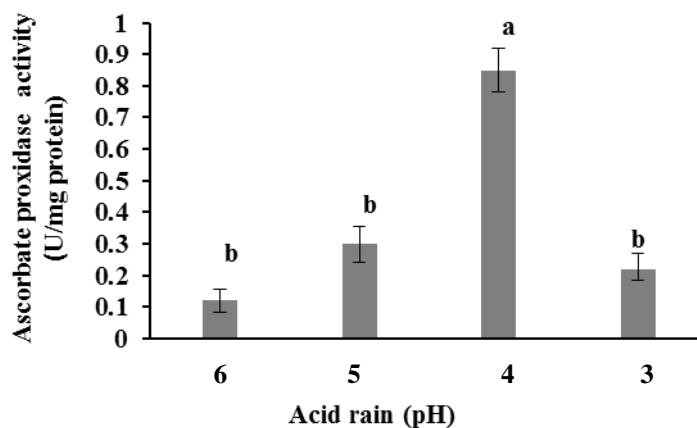
کاهش  $\text{pH}$  باران اسیدی تا ۴، تأثیری بر میزان پراکسیداسیون لیپید غشا نداشت و آن را در سطح تقریباً یکسانی با گیاهان شاهد نگه داشت. تنها گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی  $\text{pH} = 3$  افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپید نشان دادند، به‌طوری‌که افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد قابل ملاحظه بود (شکل ۲). میزان مالون‌دی‌آلدئید 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 آسکوربات 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 آسکوربات 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 پلت شاهد (تیمارشده با باران pH = ۶)، سمت چپ: برگ‌های افرای پلت مواجه شده با باران اسیدی pH = ۳.

2003). سطوح بالای ROS برای یاخته‌های گیاهی بسیار خطرناک بوده و به غشاها، پروتئین‌ها و DNA آسیب وارد می‌کند. ROSها در گیاهان برنج مواجه‌شده با باران اسیدی نیز باعث نکروزه شدن برگ‌ها شده است (Wang et al., 2014). همچنین ROSها اصلی‌ترین عامل برای مرگ بسیاری از گیاهان مواجه‌شده 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 افرا پس از مواجه‌شدن با باران اسیدی نشان دهنده‌ی میزان آسیب دیدن گیاه است. Chen و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که در درختان سپیدار مواجه‌شده با تنش شوری، افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید ناشی از افزایش تولید ROSها است. همچنین Christou و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که تنش‌های محیطی در توت‌فرنگی به واسطه‌ی تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در سلول‌ها باعث آسیب به بخش‌های مختلف از جمله لیپیدهای غشایی می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که آسیب واردآمده به غشای یاخته‌ها در برگ‌های افرای پلت در نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از باران اسیدی باشد. افرای پلت توانست تا pH= ۴ باران مقاومت نشان دهد و هیچ‌گونه رنگ‌پریدگی در برگ‌ها ظاهر نشود، اما در pH= ۳ تخریب کلروفیل به‌طور چشمگیری صورت گرفته است. کاهش میزان کلروفیل در گیاهان آبتیلون (Mersie and Foy, 1986) (*Abutilon theophrasti* Medik.) و

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

#### بحث:

در این پژوهش، بروز لکه‌های نکروزه بر روی برگ‌های درخت افرای پلت (*A. velutinum* Boiss) تنها در گیاهان مواجه‌شده با باران اسیدی pH= ۳ مشاهده شد. بنابر مطالعات میکرومورفولوژی برگ‌ی انجام‌گرفته توسط Bruno و همکاران (۲۰۰۶)، منافذ روزنه‌ای در درخت گرمسیری جنیپا (*Genipa americana* L.) پس از مواجه‌شدن با باران اسیدی شبیه‌سازی 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 توسط Chen و همکاران (2013) و در خیار توسط Wyrwicka و Skłodowska (۲۰۰۶) گزارش شده است. خمیدگی حاشیه برگ‌ها و نکروزه شدن در گیاهان آبتیلون (*Abutilon theophrasti* Medik.) در pH= ۲/۵ نیز گزارش گردیده است (Mersie and Foy, 1986). وجود لکه‌های نکروزه در پژوهش حاضر را می‌توان به پاره شدن غشا و از بین رفتن یاخته‌ها به‌خاطر آسیب واردآمده به آن‌ها توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) برانگیخته‌شده توسط تنش باران اسیدی، نسبت داد. در حقیقت، باران اسیدی به‌عنوان یک تنش غیرزیستی سطوح ROS را در بافت‌های گیاهی بالا می‌برد (Kong et al., 2000; Velikova et al., 2000; Gabara et al., )

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 آپوپلاست می باشد (Chameides, 1989). اخیراً نقش آسکوربات پراکسیداز پروکسی زومی در ایجاد مقاومت به تنش-های محیطی از طریق کاهش تجمع  $H_2O_2$  در گیاه آراییدوپسیس تراریخته شده به اثبات رسیده است (Guan et al., 2015). بنابر نتایج به دست آمده از این پژوهش، احتمال می رود آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز نقش مهمی در محافظت گیاه در برابر باران اسیدی داشته باشد.

### نتیجه گیری کلی:

طبق این پژوهش میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در pH آسیب زنده بسیار کاهش یافت و آسیب های ظاهری بروز پیدا کرد. درخت افرای پلت به خوبی توانست در برابر پایین آوردن شدت اسیدیته باران اسیدی تا pH= ۴ مقاومت کند و ظاهر خود را حفظ نماید اما در برابر باران اسیدی با pH= ۳ حساسیت نشان داد و آسیب دید. طبق نتایج این تحقیق، درخت افرای پلت را می توان در مناطقی که میزان اسیدیته باران اسیدی تا pH= ۴ هم می رسد پرورش داد. روی هم رفته، پژوهش های گسترده ای لازم است تا مکانیسم دقیق اثر باران اسیدی و سیستم های مقاومت گیاهان را در برابر باران های اسیدی مشخص نماید.

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

فعالیت آنزیم سوپراکسیدیس موتاز در برگ های افرا به طور معنی داری تحت تأثیر باران اسیدی قرار نگرفت. برعکس، فعالیت پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش اسیدیته باران افزایش یافتند. ولی ضمن مواجهه با باران اسیدی pH= ۳ بسیار کاهش یافتند. میزان آسکوربات پراکسیداز بالا را می توان یکی دیگر از علت های اصلی سالم ماندن برگ ها در مقابل باران اسیدی با pH پایین ذکر کرد. بنابر گزارش Kavitha و همکاران (۲۰۰۸) تنش اکسیداتیو موجب افزایش در نسخه برداری آسکوربات پراکسیداز در برگ های *Avicennia marina* می شود. آن ها همچنین بیان نمودند که فعالیت آسکوربات پراکسیداز در برگ های *A. marina* نقشی در کاستن اثرات زیان بار تنش اکسیداتیو دارد. گذشته از این ها، بیان ژن های 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 یاخته های تنباکو در برابر  $H_2O_2$  تحت شرایط تنش زا محافظت می کند. نقش آسکوربات پراکسیداز در حذف ROS از یاخته های *Euphorbia esula* L. در پاسخ به تنش های محیطی از جمله شوری، خشکی و سمیت عناصر نیز

### منابع:

- 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, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.
- Gabara, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. *Chemosphere* 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 lanthanum and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast