

研究報告

## 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下的效應

陳桂綿<sup>1</sup> 劉瓊霖<sup>2</sup>

【摘要】本研究探討相思樹 (*Acacia confusa*) 苗木在模擬酸雨逆境下的生長和生理活性表現，並比較外源添加鈣苗木抵抗酸雨之反應。相思樹苗木先預處理不同濃度 (0 mM、0.15 mM、10 mM) 的  $\text{CaCl}_2$ ，再噴灑以  $\text{SO}_4^{2-} : \text{NO}_3^-$  當量濃度比 2.5 : 1 混合後並用蒸餾水調至 pH 3.0 的模擬酸雨，且以蒸餾水 (pH 5.6) 作為對照組，於酸雨噴灑 2 週後進行取樣分析。經過酸雨處理後，苗木的過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性顯著上升，而抗壞血酸過氧化酵素 (ascorbate peroxidase, APx) 活性則顯著降低，使得膜脂質過氧化程度顯著提高，葉綠素螢光參數  $F_v / F_m$  值顯著降低，造成細胞膜滲漏率提高。經由 0.15 mM  $\text{CaCl}_2$  預處理則能幫助苗木抵抗酸雨逆境，苗木的 APx 活性相較於酸雨處理組顯著上升，使得膜脂質過氧化程度明顯降低，而葉綠素螢光參數  $F_v / F_m$  值顯著提高，導致細胞膜滲漏率降低。然而，處理高濃度的  $\text{CaCl}_2$  (10 mM)，反而使得苗木在酸雨逆境下，其細胞膜脂質過氧化程度和細胞膜滲漏率相對提高，而抗氧化酵素 APx 活性和葉綠素螢光參數  $F_v / F_m$  值顯著低於 0.15 mM  $\text{CaCl}_2$  處理者。

【關鍵詞】相思樹、模擬酸雨、鈣離子、抗氧化酵素

Research paperEffects of pretreating calcium on *Acacia confusa* seedlings under simulated acid rain stressKuei-Mien Chen<sup>1</sup> Chiung-Pin Liu<sup>2</sup>

【Abstract】The study was to examine the effects of simulated acid rain on growth and physiological performance of *Acacia confusa* seedlings, and to compare with the responses of seedling to exogenous calcium before simulated acid rain treatment. Seedlings were pretreated with different concentrations of  $\text{CaCl}_2$  (0 mM, 0.15 mM, 10 mM, respectively), and then were sprayed with simulated acid rain, which was a mixture solution of 2.5:1 equivalent concentration ratio of  $\text{SO}_4^{2-} : \text{NO}_3^-$  and was adjusted to pH 3 with distilled water, and distilled water (pH 5.6) as control treatment. After 2 weeks, The leaves of seedlings developed a distinct calcium deficiency symptoms under simulated acid rain treatment, peroxidase (POD) activity increased but ascorbate peroxidase (APx) activity decreased, resulted in membrane lipid

- 
1. 國立中興大學森林學系碩士班研究生，402臺中市國光路250號。  
Graduate Student of Master, Department of Forestry, NCHU.
  2. 國立中興大學森林學系教授，402臺中市國光路250號。  
Professor, Department of Forestry, NCHU.

peroxidation increased. Additionally, chlorophyll fluorescence parameter (Fv/Fm) decreased significantly under simulated acid rain treatment, resulted in membrane leakage increased. Application of 0.15 mM CaCl<sub>2</sub> solution to seedlings, APx activity increased but membrane lipid peroxidation decreased, resulted in membrane leakage decreased. The Fv/Fm of seedlings also increased. Furthermore, application of 10 mM CaCl<sub>2</sub> solution, resulted in APx activity decreased as well as membrane lipid peroxidation increased. Additionally, Fv/Fm reduced and membrane leakage increased compared to 0.15 mM CaCl<sub>2</sub> solution treatment under simulated acid rain stress.

【Key words】Acacia confusa, simulated acid rain, calcium, antioxidant enzyme

## 一、前言

近年來隨著酸雨危害面積逐漸擴大，酸雨對生態環境的影響日益受到全球重視，許多學者推論酸雨可能是造成森林衰退的原因之一，若酸雨確實會造成森林衰退，而處於高污染的臺灣之森林可能已遭受很大逆壓，因為臺灣雨水有嚴重的酸化記錄(金恆鏞等，2003)。雖然臺灣目前尚未有研究明確指出遭酸雨危害的森林，但由於臺灣大部分屬於酸性土壤，酸雨可能會加速土壤的酸化，進而影響林木的生長發育(白創文等，2005；Likens *et al.*, 1996)。

酸雨中的H<sup>+</sup>會造成植物葉片內Ca<sup>2+</sup>淋溶釋出或置換細胞膜表面的Ca<sup>2+</sup>，使細胞膜結構的完整性遭破壞，造成細胞質電解質滲漏等(Shigihara *et al.*, 2008a; 2008b)，且酸雨會導致土壤層鹽基陽離子(包括Ca<sup>2+</sup>)的淋溶流失及Al<sup>3+</sup>釋出，均會降低植物根部對Ca<sup>2+</sup>的吸收，使植株缺鈣(Huntington *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2001; Tomlinson, 2003; Jandl *et al.*, 2004; Courchesne *et al.*, 2005)。

Ca<sup>2+</sup>為植物在環境逆境下重要的訊號傳導物質，並調控植物體內許多生理代謝途徑(Hepler, 2005)。植物遭受酸雨危害時，可藉由Ca<sup>2+</sup>增強細胞膜和細胞壁結構的穩定性，並補償酸雨造成植物體及土壤養分的淋溶流失(Schaberg *et al.*, 2000; Halman *et al.*, 2008)，以及Ca<sup>2+</sup>的訊號傳導促使抗氧化酵素活性提升(周希琴，2005)，以減緩酸雨對植株造成的氧化傷害。

相思樹(*Acacia confusa*)為廣泛分佈於臺灣平地及丘陵地的本土樹種，現今台灣的酸雨發生頻率頗高，雖然林木外觀形態尚未發現受酸雨危害的病徵，除了與台灣地質年輕有關外(金恆鏞等，2003)，林木對酸雨的抗氧化防禦應該也扮演著重要的角色。因此，本試驗以相思樹苗木為材料，將苗木於酸雨處理前預處理不同濃度的CaCl<sub>2</sub>溶液於土壤，試驗外源添加鈣是否能補充植株根部Ca<sup>2+</sup>吸收，並且根據酸雨造成植株的生長和生理活性改變，以及Ca<sup>2+</sup>的添加對植株減緩酸雨危害所扮演的角色進行探討。

## 二、材料與方法

### (一) 試驗材料

選用臺灣原生樹種相思樹(*Acacia confusa*)作為試驗材料，種子發芽後移植至裝有混合介質(森林土：泥炭土：珍珠石 = 1：1：1)的塑膠盆中，待苗齡約4個月後進行試驗處理。

### (二) 試驗設計

#### 1. 鈣溶液配置與處理方法

參考周希琴(2005)和Schmitz-Eiberger等(2002)以氯化鈣(CaCl<sub>2</sub>)調配不同濃度的鈣溶液(0 mM、0.15 mM、10 mM)，預處理苗木連續澆灌3天於土壤中，每日200 ml，用以補充土壤中的鈣。

#### 2. 酸雨配置與處理方法

酸雨的配製依環保署酸雨監測網台北市2003 – 2008年雨水的監測結果，資料顯示雨水

中的 $\text{SO}_4^{2-} : \text{NO}_3^-$  當量濃度比平均約為2.5 : 1，依此先配製當量濃度比為2.5 : 1的高濃度貯備液，再以蒸餾水稀釋調整pH值至3.0，另以蒸餾水 (pH 5.6) 作為對照組。

每日下午5: 00 – 6: 30進行酸雨處理，酸雨處理前先澆定量水於土壤中，確保土壤水分充足，再將調配好的酸雨裝入加濕機的盛水皿中噴灑，噴灑時間約為30分鐘，噴灑量約1000 ml。

### 3. 取樣及分析步驟

苗木經酸雨處理2週後進行取樣分析，植株採樣前先測定葉綠素螢光參數 (Fv/Fm)，接著進行破壞性取樣，不同處理各5株苗木，視為5重複。以新鮮葉片測定苗木的抗氧化酵素活性、膜脂質過氧化物、細胞膜滲漏率。藉以評估預處理不同濃度的鈣溶液對相思樹受模擬酸雨處理後抗氧化酵素活性的影響，並評估鈣的施用對植株減緩酸雨逆境的效益。

### (三) 植體分析方法

#### 1. Fv/Fm測定

測定時間為上午9: 00 – 下午1: 00，每株苗木選取3片成熟葉，以鋁製夾葉器 (Leaf-Clip Holder 2030-B) 夾住選取的葉片，進行暗適應30 min，再以攜帶式葉綠素螢光分析儀 (Portable Chlorophyll Fluorometer, PAM-2000, WALZ, Germany) 進行分析。

#### 2. 細胞膜滲漏率

參考Halman等 (2008) 測定方法，經部分修改。以蒸餾水清洗葉片並拭乾後，不同處理各剪取葉面積 $0.75 \text{ cm} \times 0.75 \text{ cm}$  共10片，分別放入50 ml的三角錐形瓶中加入40 ml的蒸餾水，以保鮮膜封瓶口，振盪器振盪後，以電導度計 (Cond 720型) 測定其電導度值 $C_1$ ，並以蒸餾水為對照組測定其電導度值 $C$ ，再將保鮮膜封回瓶口後置於沸水中煮沸10 min，待其冷卻後測定電導度 $C_2$ ，並計算相對電導率 (Relative electrolyte leakage, REL)。

$$\text{REL} = (C_1 - C) / (C_2 - C) \times 100 \%$$

#### 3. 膜脂質過氧化物含量測定

參考Velikova等 (2000) 的方法測得。取植株上層葉加入0.1 % (w/v) 三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA) 去除蛋白質，取出上清液置於玻璃試管內，加入內含20 % (w/v) TCA和0.5 % (w/v) 硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric acid, TBA)，再加入4 % (w/v) 二丁基羥基甲苯 (Butylated hydroxytoluene, BHT)，混合後置於 $95^\circ\text{C}$  熱水浴槽中加熱，取出後置於冰上冷卻，取上清液以分光光度計測定波長532nm的吸光度，並扣除在600nm波長下的基本吸光度，並以丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 的消光係數 ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) 進行計算。

#### 4. 抗氧化酵素活性測定

##### (1) 酵素的萃取方法

參考Velikova等 (2000) 的萃取方法，經部分修正。稱取上層葉0.4 g於預冷研鉢中，加入少許液態氮磨成細粉末，隨後加入10 ml萃取液 (內含100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.8; 1 % Triton X-100; 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ )，取出上清液分析以下抗氧化酵素活性。

##### a. 過氧化酶 (Peroxidase, POD, EC 1.11.1.7) 活性測定

參考Velikova等 (2000) 的分析方法，經部分修正。測定步驟為在石英管內依序加入0.3 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (200 mM, pH 6.1)，0.1 ml EDTA- $\text{Na}_2$  (1 mM)，0.1 ml guaiacol (100 mM)，0.1 ml上清液，0.1 ml去離子水及0.3 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM)，迅速混和後置入分光光度計，讀取在470 nm波長下3 min內吸光值的增加速率，以tetraguaiacol的消光係數 ( $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )，求出POD活性。POD活性以每毫克蛋白質所具有之單位活性表示 ( $\mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ )。

##### b. 抗壞血酸過氧化酶 (Ascorbate peroxidase, APx, EC 1.11.1.11) 活性測定

參考Gabara等 (2003) 分析方法，經部分修正。測定步驟為在石英管內依序加入0.5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (250 mM, pH 7)，0.05 ml EDTA -  $\text{Na}_2$  (0.5 mM)，0.2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM)，0.2 ml 抗壞

血酸 (2.5 mM) 及 0.05 ml 上清液，迅速混和後置入分光光度計，讀取在 290 nm 波長 5 min 內吸光值的下降速率，以  $H_2O_2$  的消光係數 ( $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )，求出 APx 活性。APx 活性以每毫克蛋白質所具有之單位活性表示。

#### 5. 可溶性蛋白質含量測定

蛋白質含量測定採用 CBB (Coomassie brilliant blue G-250) 法 (Bradford, 1976)。測定蛋白質前，須先以小牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 製作標準曲線。測定方法為取 0.1 ml 萃取液，加入 5 ml CBB 迅速振盪後，等待 5 min 使溶液呈色後，以分光光度計測定波長 595 nm 的吸光度，以吸光值對照標準曲線求得每公克植體的蛋白質含量。

#### (四) 數據分析

數據以統計軟體 SAS 9.1.2，採  $2 \times 3$  最小

顯著差異法 (Least significant difference method, LSD) 分析各處理間是否具有顯著差異，顯著水準為 0.05。並將數據以 ANOVA (Analysis of variance) 進行雙因子變異數分析 ( $\alpha = 0.05$ )，檢定酸雨處理和不同鈣濃度處理是否具有交互作用。

### 三、結果

#### (一) 葉片外部形態和細胞膜滲漏率

酸雨處理 2 週後，相思樹苗木嫩葉開始出現黃化、萎縮，成熟葉則未出現肉眼可見病徵。由酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木相對電解質滲漏率之影響的統計分析結果得知，無論是單一酸雨因子或鈣濃度因子，抑或是酸雨和鈣濃度因子的交互作用，對於苗木細胞膜滲漏率均具有極顯著差異 (表 1 和圖 1)。

表 1. 酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木相對電解質滲漏率之影響

Table 1. Effects of simulated acid rain and Ca concentration on relative electrolyte leakage (REL) of *Acacia confusa* seedlings

Parameter	F value	P value
Acid rain	96.57	0.0001 *** <sup>1</sup>
Ca concentration	243.69	0.0001 ***
Acid rain $\times$ Ca concentration	92.19	0.0001 ***

<sup>1</sup> ANOVA 雙因子變異數分析 ( $\alpha = 0.05$ )，\*\*\*  $P < 0.001$ 。

pH 3.0 酸雨處理苗木的細胞膜滲漏率 ( $14.15 \pm 3.51\%$ ) 相較於對照組 ( $3.12 \pm 0.48\%$ ) 顯著提高，為對照組的 454% (圖 1A)，顯示酸雨處理下苗木葉片的細胞膜表面蠟質遭受酸雨侵蝕，而導致細胞膜內電解質外滲。

苗木若預先處理 0.15 mM  $CaCl_2$ ，再處理酸雨 2 週後，苗木之細胞膜滲漏率 ( $4.52 \pm 0.87\%$ ) 相較於酸雨處理組低，為酸雨處理組的 32% (圖 1B)，但仍高於對照組，為對照組的 102% (圖 1A)，顯示酸雨處理前添加鈣處理能強化葉面細胞膜系，減緩酸雨侵蝕其葉片細

胞膜表面的蠟質 (Borer *et al.*, 1997; Jiang and Jagels, 1999; Shigihara *et al.*, 2008a)。

然而，苗木預先處理 10 mM  $CaCl_2$ ，再處理酸雨 2 週後，苗木之細胞膜滲漏率 ( $31.59 \pm 1.71\%$ ) 相較於其他處理顯著提高，為酸雨處理組的 223% (圖 1B)，且為對照組的 705% (圖 1A)，顯示酸雨處理前添加高濃度鈣處理可能造成細胞內養分平衡機制不平衡，不但不能強化葉面細胞膜系，反使植株細胞膜系在酸雨逆境下更容易受損，導致細胞膜內電解質外滲。

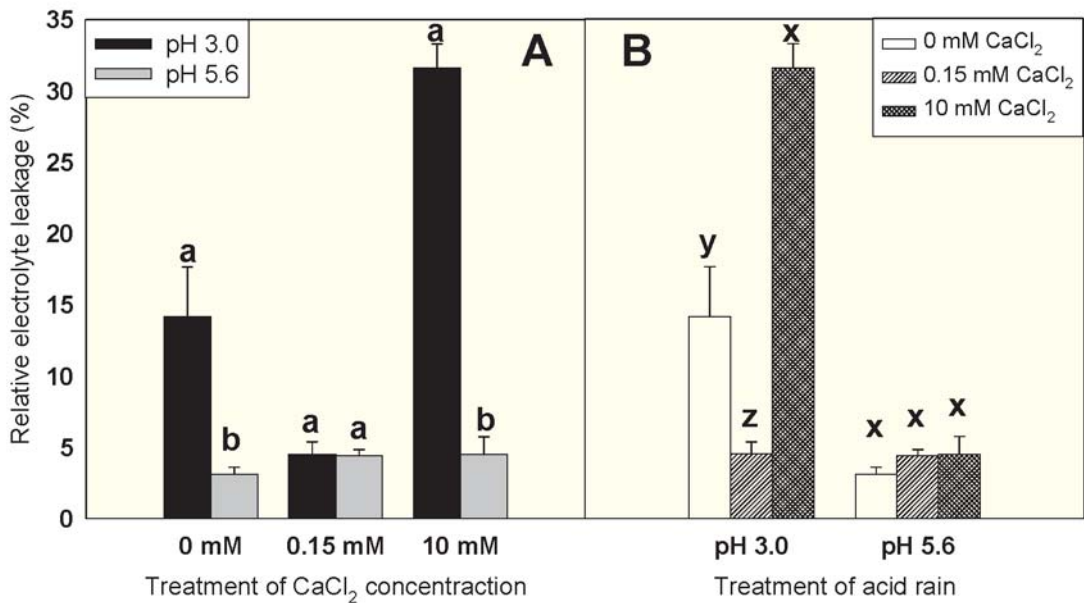


圖1. 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下相對電解質滲漏率的影響。A圖為相同濃度鈣處理下酸雨處理對苗木的影響，不同小寫英文字母 (a、b) 代表不同酸度雨水處理具顯著差異 (P<0.05)；B圖為相同酸度雨水處理下添加不同濃度鈣處理的影響，不同小寫英文字母 (x、y、z) 代表不同鈣濃度處理具顯著差異 (P<0.05)。

Fig 1. Effects of exogenous calcium on relative electrolyte leakage (REL) of *Acacia confusa* seedlings under acid rain stress. Values with different letters are significantly different at 5% level by the least significance difference test.

(二) 膜脂質過氧化物含量

酸雨對苗木膜脂質過氧化產物丙二醛含量具顯著差異，且酸雨和鈣濃度因子的交互作用對苗木丙二醛含量亦具顯著差異 (表2)。

酸雨處理的相思樹苗木之丙二醛含量 (42.58 ± 4.43 nmol g<sup>-1</sup> FW)，相較於對照組 (31.94 ± 1.88 nmol g<sup>-1</sup> FW) 顯著提高，為對照組的133 % (圖2A)，顯示酸雨處理會增加細胞中活性氧物質的產生，導致相思樹苗木膜脂質過氧化傷害程度加劇。

預先處理0.15 mM CaCl<sub>2</sub>再處理酸雨的苗木，其丙二醛相較於其他處理顯著降低，為酸雨處理組的67% (圖2B)，且為對照組的91% (圖2A)，顯示添加鈣處理能活化抗氧化酵素以抵抗活性氧物質，減緩相思樹苗木在酸雨逆境

下膜脂質過氧化傷害程度。

但預先處理10 mM CaCl<sub>2</sub>再處理酸雨的苗木，其MDA相較於酸雨處理組雖未達顯著差異，為酸雨處理組的91% (圖2B)，為對照組的105% (圖2A)。顯示添加高濃度鈣處理未能抑制活性氧物質的生成，使相思樹苗木在酸雨逆境下無法降低膜脂質過氧化傷害程度。

(三) 抗氧化酵素活性

1. APx活性

酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木抗壞血酸過氧化酵素活性和過氧化酵素活性之影響的統計分析結果，無論是單一酸雨因子或鈣濃度因子，抑或是酸雨和鈣濃度因子的交互作用，對於苗木APx活性均具有極顯著差異 (表3)。

表2. 酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木膜脂質過氧化產物丙二醛含量之影響

Table 2. Effects of simulated acid rain and Ca concentration on malondialdehyde, (MDA) of *Acacia confusa* seedlings

Parameter	F value	P value
Acid rain	10.31	0.003 **
Ca concentration	4.02	0.07
Acid rain × Ca concentration	6.00	0.02 *

<sup>1</sup> ANOVA 雙因子變異數分析 ( $\alpha = 0.05$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

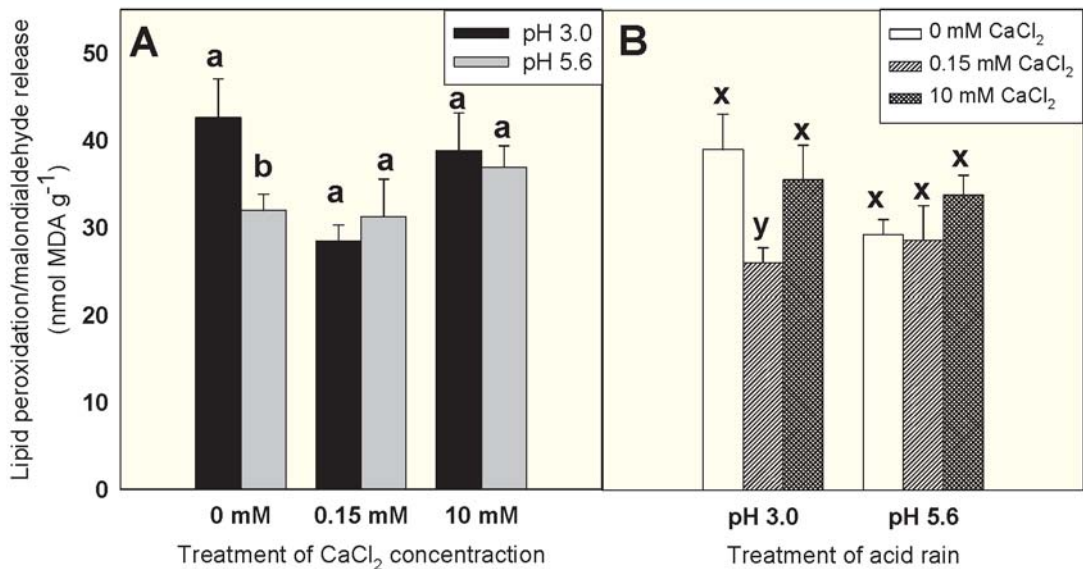


圖2. 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下膜脂質過氧化產物丙二醛含量 (nmol g<sup>-1</sup> FW) 的影響。A圖為相同濃度鈣處理下酸雨處理對苗木的影響，不同小寫英文字母 (a、b) 代表不同酸度雨水處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )；B圖為相同酸度雨水處理下添加不同濃度鈣處理的影響，不同小寫英文字母 (x、y、z) 代表不同鈣濃度處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Fig 2. Effects of exogenous calcium on malondialdehyde (MDA) of *Acacia confusa* seedlings under acid rain stress. Values with different letters are significantly different at 5% level by the least significance difference test.

苗木之APx活性 ( $0.17 \pm 0.03 \mu \text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) 在酸雨處理後，相較於對照組 ( $0.49 \pm 0.02 \mu \text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) 顯著降低，為對照組35% (圖3A)，顯示酸雨處理下，植株體內累積過多的活性氧物質，造成抗氧化酵素APx活性下降。

預先處理0.15 mM CaCl<sub>2</sub>再處理酸雨的苗木，其APx活性 ( $0.30 \pm 0.01 \mu \text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

protein) 顯著高於酸雨處理組，為酸雨處理組的176% (圖3B)，顯示酸雨處理使APx活性普遍下降，但添加鈣處理能提升相思樹苗木在酸雨逆境下抗氧化酵素APx活性以清除活性氧物質。

但預先處理10 mM CaCl<sub>2</sub>之苗木，經酸雨處理後之APx活性 ( $0.20 \pm 0.01 \mu \text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) 顯著高於酸雨處理組，為酸雨處

理組的118 %，但低於0.15 mM CaCl<sub>2</sub> 處理 (圖3B)，顯示添加高濃度鈣處理雖能提升相思樹苗木在酸雨逆境下抗氧化酵素APx活性以清除活性氧物質，但效果不如0.15 mM CaCl<sub>2</sub>處理者。

2. POD活性

酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木抗壞血酸過氧化酵素活性和過氧化酵素活性之影響的統計分析結果，無論是單一鈣濃度因子，抑或是酸雨和鈣濃度因子的交互作用，對於苗木POD活性具有顯著差異 (表3)。

表3. 酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木抗壞血酸過氧化酵素和過氧化酵素活性之影響

Table 3. Effects of simulated acid rain and Ca concentration on ascorbate peroxidase (APx) and peroxidase (POD) activity of *Acacia confusa* seedlings

	Parameter	F value	P value
APx	Acid rain	861.54	0.0001 *** <sup>1</sup>
	Ca concentration	26.95	0.0001 ***
	Acid rain × Ca concentration	52.92	0.0001 ***
POD	Acid rain	3.43	0.07
	Ca concentration	5.38	0.04 *
	Acid rain × Ca concentration	5.85	0.02 *

<sup>1</sup> ANOVA雙因子變異數分析 ( $\alpha = 0.05$ )，\* P<0.05，\*\*\* P<0.001。

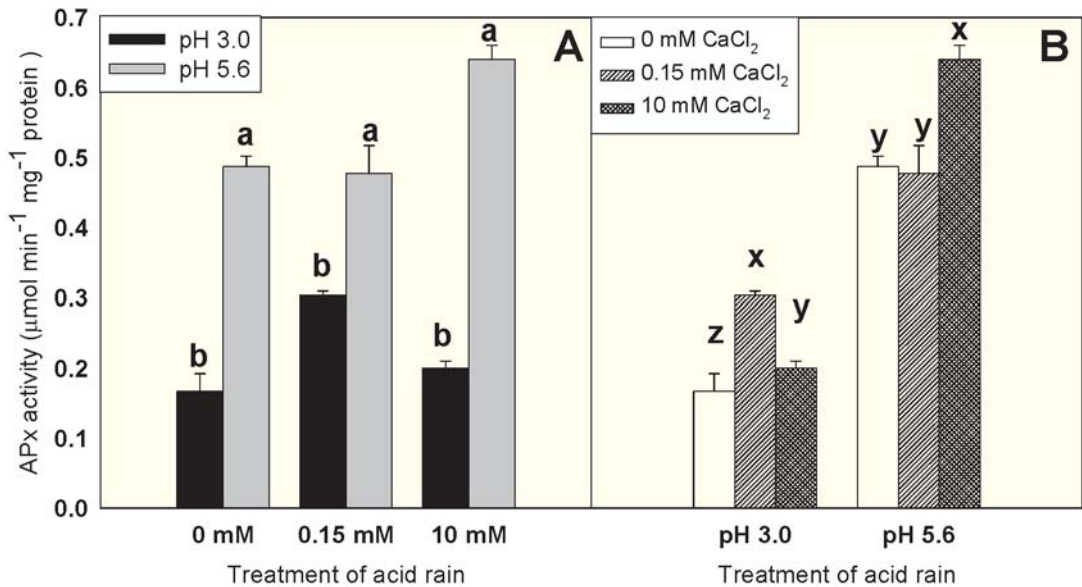


圖3. 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下抗壞血酸過氧化酵素活性 ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}\text{ protein}$ ) 的影響。A圖為相同濃度鈣處理下酸雨處理對苗木的影響不同小寫英文字母 (a、b) 代表不同酸度雨水處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )；B圖為相同酸度雨水處理下添加不同濃度鈣處理的影響，不同小寫英文字母 (x、y、z) 代表不同鈣濃度處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Fig 3. Effects of exogenous calcium on ascorbate peroxidase (APx) of *Acacia confusa* seedlings under acid rain stress. Values with different letters are significantly different at 5% level by the least significance difference test.

經酸雨處理後的相思樹苗木之POD活性 ( $1.24 \pm 0.09 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ )，相較於其他處理顯著提升，為對照組的143% (圖4A)，顯示酸雨處理下造成相思樹苗木POD活性提升，可能是因為細胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 等活性氧物質大量產生，使POD活性提高以清除活性氧物質。

預先處理0.15 mM或10 mM  $\text{CaCl}_2$ 再處理酸雨的苗木，其POD活性相較於酸雨處理組顯著降低，分別為酸雨處理組的75% 和72% (圖4B)，而與對照組無顯著差異 (圖4A)，顯示酸雨處理下添加鈣抑制細胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 等活性氧物質大量產生，而未使POD活性大幅提高。

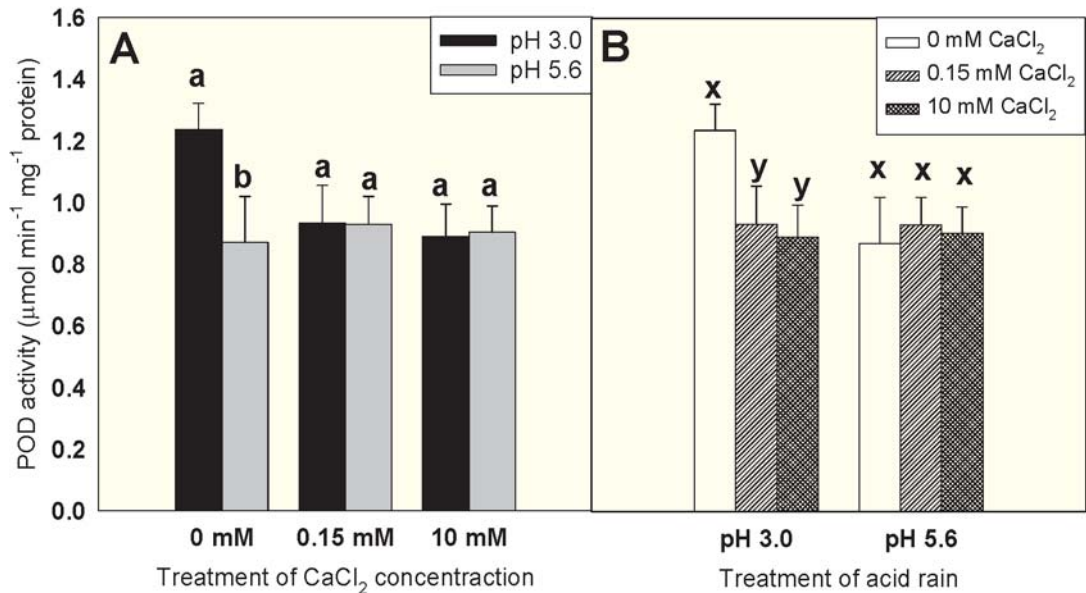


圖4. 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下過氧化酵素 (peroxidase, POD) 活性 ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) 的影響。A圖為相同濃度鈣處理下酸雨處理對苗木的影響不同小寫英文字母 (a、b) 代表不同酸度雨水處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )；B圖為相同酸度雨水處理下添加不同濃度鈣處理的影響，不同小寫英文字母 (x、y、z) 代表不同鈣濃度處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Fig 4. Effects of exogenous calcium on peroxidase (POD) of *Acacia confusa* seedlings under acid rain stress.

Values with different letters are significantly different at 5% level by the least significance difference test.

#### (四) 葉綠素螢光參數Fv/Fm

酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木葉綠素螢光參數Fv/Fm值之影響的統計分析結果，單一酸雨因子或鈣濃度因子對於苗木葉綠素螢光參數Fv/Fm值具顯著差異 (表4)。

酸雨處理後的相思樹苗木之Fv/Fm值顯著低於對照組，為對照組的96% (表5)，顯示噴灑酸雨處理會降低相思樹苗木PSII最初光能轉換效率。預先處理0.15 mM  $\text{CaCl}_2$ 再處理酸雨的苗

木，相較於酸雨處理組苗木Fv/Fm值顯著提升至 $0.81 \pm 0.01$ ，為酸雨處理組之103% (表5)，顯示噴灑酸雨處理前添加鈣能提升相思樹苗木PSII最初光能轉換效率。但預先處理10 mM  $\text{CaCl}_2$ 再處理酸雨的苗木，其Fv/Fm值，略高與酸雨處理組，而為對照組的95% (表5)，顯示噴灑酸雨處理前添加高濃度鈣對相思樹苗木PSII最初光能轉換效率無顯著提升的效用。



表4. 酸雨和鈣濃度因子對相思樹苗木在酸雨逆境下葉綠素螢光參數Fv/Fm值之影響

Table 4. Effects of simulated acid rain and Ca concentration on chlorophyll fluorescence parameter (Fv/Fm) of *Acacia confusa* seedlings

Parameter	F value	P value
Acid rain	3.93	0.05 *1
Ca concentration	59.76	0.0001 ***
Acid rain × Ca concentration	1.58	0.25

<sup>1</sup> ANOVA雙因子變異數分析 ( $\alpha = 0.05$ ), \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

表5. 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下葉綠素螢光參數Fv/Fm值的影響

Table 5. Effects of exogenous calcium on chlorophyll fluorescence parameter (Fv/Fm) of *Acacia confusa* seedlings

CaCl <sub>2</sub> concentration (mM)	pH	
	3.0	5.6
0	0.79 ± 0.00 B <sup>1</sup> y <sup>2</sup>	0.82 ± 0.01 A x
0.15	0.81 ± 0.01 A x	0.83 ± 0.01 A x
10	0.79 ± 0.01 Bxy	0.83 ± 0.00 A x

<sup>1</sup> 橫列平均值 ± 標準差, 不同大寫字母 (A、B) 代表不同酸度雨水處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

<sup>2</sup> 直行平均值 ± 標準差, 不同小寫字母 (x、y、z) 代表不同鈣濃度處理具顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

#### 四、討論

##### (一) 相思樹苗木對模擬酸雨的生理反應

本試驗經過酸雨處理2週後, 相思樹苗木的嫩葉產生褐化、萎縮, 而成熟葉則未出現肉眼可見病徵, 可能導因於苗木嫩葉之蠟質含量低於成熟葉, 因而加劇酸雨侵蝕嫩葉而褐化、萎縮的情形 (劉恩好, 2008); 另一個造成嫩葉受損的可能原因為酸雨淋洗致使植株養分缺乏所產生的病徵, 尤其以缺鈣的可能性較大, 因為鈣在植體中屬於大量元素, 又為不易移動性之養分, 且當植株缺鈣時, 最先產生病徵之部位為新葉或生長點 (柯勇, 2004; Schmitz-Eiberger *et al.*, 2002)。

相思樹苗木經過pH 3酸雨處理後, 其細胞膜滲漏率顯著高於對照組 (圖1), 顯示細胞膜結構已遭受破壞, 可能導因於酸雨侵蝕或破壞植物上表皮蠟質及角質層, 使植株葉片潤濕性提高, 致使酸雨對葉面的淋溶作用更為旺

盛 (Shigihara *et al.*, 2008a); 或活性氧物質對細胞膜造成之膜脂質過氧化反應, 導致細胞膜脂質過氧化傷害程度大幅提高, 此時會造成細胞膜系的破壞, 使細胞膜滲漏率提高; 抑或是細胞膜表面鍵結之鈣離子受酸雨淋洗而流失。Shigihara等 (2008b) 研究指出酸雨處理酸度提高, 植株葉之鹽基陽離子 ( $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ) 釋放量隨之增加, 尤其 $Ca^{2+}$  為穩定細胞壁結構和維持細胞膜功能之重要元素, 酸雨導致鍵結於細胞壁或細胞膜表面之 $Ca^{2+}$  淋失時, 會使得植物細胞膜結構不穩定, 增加細胞質滲漏等 (DeHayes *et al.*, 1999), 若酸雨持續造成細胞質大量外滲, 導致細胞質離子平衡失調, 嚴重時甚至造成細胞解體或死亡。另外Borer等 (1997)、Jiang和Jagels (1999) 和Schaberg等 (2000) 等學者以氫四環素 (螢光染劑) 將葉片染色, 發現經酸雨處理後之葉片其葉肉細胞膜上鍵結的鈣顯著減少。

酸雨對植物造成的傷害依程度可分為肉眼可見的傷害(宏觀)與無法以肉眼觀測的傷害(微觀)。微觀的細胞氧化傷害程度為檢定植物早期遭受逆境傷害的指標，且可以膜脂質過氧化產物丙二醛(malondialdehyde, MDA)作為判定細胞氧化傷害之程度(Velikova *et al.*, 2000; Wyrwicka and Skłodowska, 2006)。當植株體內的活性氧物質未能及時被清除，這些活性氧物質則會破壞細胞結構與組成，如膜脂質過氧化作用，當細胞膜上的不飽和脂肪酸受活性氧物質攻擊後，失去一個氫離子，轉變成脂質自由基，最終產物之一為MDA(Frankel, 1985)。本試驗苗木經酸雨處理2週後，植株葉片MDA含量顯著提高(圖2)，此導因於酸雨逆境促使細胞中活性氧物質大量聚積，進而使膜脂質過氧化程度提高。

相思樹苗木經酸雨處理2週後，APx活性顯著降低(圖3)，酸雨處理期間，初期植株能有效提升其抗氧化酵素APx活性，隨時間增長至第2週，APx活性隨之降低，可能原因為活性氧物質的累積量過多，因而使敏感性較高的APx活性下降，無法持續有效清除植物體內的活性氧物質(劉恩好，2008；Wyrwicka and Skłodowska, 2006)。然而苗木之POD活性在酸雨處理下仍顯著高於對照組(圖4)，此應導因於抗氧化酵素敏感性的不同，不同植株體內的抗氧化酵素，會因敏感性差異，造成維持活性的時間長短也不同。一般而言，當植物處於酸雨逆境時，植株膜脂質過氧化傷害提高，其POD活性會隨之提高，藉由POD活性提高以持續抵抗活性氧物質(周希琴，2005；劉恩好，2008；Velikova *et al.*, 2000)。當植物遭受氧化逆境時，植物會活化自身的抗氧化系統以提供生理防禦機制，包含催化氧化還原的抗氧化酵素與直接參與反應的抗氧化物，抗氧化系統與活性氧物質抗衡的結果，若抗氧化系統越強，則植株越不易顯現可見傷害(Gabara *et al.*, 2003; Wyrwicka and Skłodowska, 2006)。

光合作用的光反應是利用光能驅動

一連串氧化還原反應的過程，過程中產生ATP(Adenosine triphosphate)和NADPH(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)等高能量分子，以提供暗反應合成碳水化合物；植物吸收輻射能僅有一部分在光化學反應的過程中被運用，其餘則以螢光、磷光或熱能的形式散失，葉綠素從激發態衰退的過程可以上述形式被運用或散失，光合作用速率改變或熱能散失，會與放射螢光強度呈現互補關係(Maxwell and Johnson, 2000)。葉綠素可作為光合系統的基本螢光指標，而螢光放射量與光合作用密切相關，當所有反應中心呈活化、開啓狀態時，螢光量最小( $F_0$ )，當QA完全為還原態時，PSII處於激發狀態而產生最大螢光量( $F_m$ )，藉此可計算PSII最初光能轉換效率( $F_v / F_m$ )(Velikova *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002)。酸雨逆境下，導致植株葉綠素含量降低的原因包含其細胞中活性氧物質會大量產生，或酸雨的淋洗使植物葉綠體中心的 $Mg^{2+}$ 流失(周希琴，2005；Wyrwicka and Skłodowska, 2006)。Gabara等(2003)也指出噴灑模擬酸雨於蕃茄(*Lycopersicon esculentum*)葉片後，其葉片內葉綠體的顯微構造在噴灑酸雨4天後，有13%的葉綠體因細胞溶質增加而膨脹變形。植物處於酸雨逆境時，能量代謝需求提高，使電子傳遞鏈之電子傳遞速率改變，因而電子流失率提高，當電子被氧接收後即產生活性氧物質(Mittler, 2002)，活性氧物質會進行一連串的反應，導致細胞膜系的破壞，進而影響光合作用之進行，降低苗木PSII最初光能轉換效率( $F_v/F_m$ )(表5)(Velikova *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002)。

(二) 添加鈣對相思樹苗木在酸雨逆境下的效應

當植物遭受逆境危害時，可藉由 $Ca^{2+}$ 訊號傳遞活化抗氧化酵素活性，以避免或減輕活性氧物質對細胞膜的破壞；或者由於 $Ca^{2+}$ 會與細胞膜磷脂質的磷酸根及蛋白質的羧基鍵結，以穩定細胞膜的完整性，因此在逆境處理前，外源添加鈣溶液，或許能補償細胞膜上

流失的鈣，減輕細胞膜的破壞及降低膜滲漏率 (Gong *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 2001; Jiang and Huang, 2001; Halman *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2008)。本試驗預先處理0.15 mM CaCl<sub>2</sub>再處理酸雨2週後的苗木，其葉片細胞膜滲漏率相較於酸雨處理組低 (圖1)，證明鈣具有穩定細胞膜結構之功能，外源添加鈣可補充細胞膜系流失的鈣，提高膜的完整性 (Hepler, 2005)，同時外源添加Ca<sup>2+</sup> 能幫助植物在逆境下降低其膜脂質過氧化傷害程度 (圖2)，提升植物在逆境下的存活率 (Gong *et al.*, 1997; Jiang and Huang, 2001; Larkindale and Knight, 2002; Zhao and Tan, 2005)。

活性氧物質的信號傳導途徑是細胞內的活性氧物質會被活性氧接受體、對氧化還原敏感的轉錄因子或磷酸酶偵測到，若活性氧物質被偵測到，則會產生Ca<sup>2+</sup> 傳導訊號，進一步活化蛋白激酶，被活化的蛋白激酶進一步使抗氧化酵素的轉錄因子活化，因此當酸雨導致植株產生氧化逆境時，可藉由Ca<sup>2+</sup> 訊號啟動植物體內的抗氧化機制 (Jiang and Zhang, 2003)。本試驗預先處理0.15 mM CaCl<sub>2</sub>再處理酸雨2週後，苗木之MDA相較於其他處理顯著降低 (圖2)，顯示添加鈣使處於逆境下之植株有效活化抗氧化酵素以清除活性氧物質，或未形成大量活性氧物質的累積，進而降低細胞MDA含量，減緩苗木在酸雨逆境下膜脂質過氧化傷害程度。本試驗結果與許多逆境處理之研究結果相似，添加鈣能幫助植株在乾旱 (Jaleel *et al.*, 2007)、高溫 (Gong *et al.*, 1997; Jiang and Huang, 2001)、熱害 (Zhao and Tan, 2005; Larkindale and Knight, 2002) 等逆境下降低膜脂質過氧化程度，減緩細胞膜滲漏率，提升植物在逆境下的存活率。

抗氧化酵素的活化與鈣離子有關，預先處理0.15 mM再處理酸雨2週後，苗木之APx活性雖普遍低於對照組，但顯著高於酸雨處理組 (圖3)，由於APx合成與Ca<sup>2+</sup> 有關，適當補充鈣有助於植株提升APx活性以抵抗逆境 (Halman *et al.*, 2008)。Gong等 (1997) 研究亦證實預先處

理20 mM CaCl<sub>2</sub>於玉米 (*Zea mays*) 植株，能幫助植株提升APx活性，且使植株提高對高溫的耐受性，減緩植株在逆境下受害情形。但苗木之POD活性相較於酸雨處理組顯著降低，且與對照組無顯著差異 (圖4)，推論由於細胞中的活性氧物質被清除，或未形成活性氧物質的大量累積，因而POD活性則未被活化 (周希琴, 2005; Schmitz-Eiberger *et al.*, 2002)。

鈣為光合作用重要關鍵之一，預先處理0.15 mM CaCl<sub>2</sub>相思樹苗木之PSII最初光能轉換效率 (Fv/Fm) 相較於酸雨處理組顯著提升 (表5)，顯示Ca<sup>2+</sup> 能減緩植物在逆境下細胞受害和間接提升光合作用的功能 (Schmitz-Eiberger *et al.*, 2002; Zhao and Tan, 2005)。

酸雨處理前添加高濃鈣處理卻無法有效補充土壤可交換性鹽基陽離子，可能預處理時土壤交換位無法有效吸附鹽基陽離子，隨即隨水流失；另土壤中高濃度的鈣可能會與磷結合，形成難溶性的磷酸化合物，使植物無法吸收利用 (Azcón-Aguilar *et al.*, 1979)；或當細胞質游離的Ca<sup>2+</sup> 濃度過高，與磷酸根形成沉澱，反而干擾細胞中磷之代謝，阻礙細胞中正常訊號之傳遞 (Borer *et al.*, 2004)，因此即使葉片的鈣濃度高於酸雨處理或0.15 mM鈣處理，但可能多為不可溶的鈣沉澱，當植物遭受逆境時，Ca<sup>2+</sup> 仍無法有效提升酵素活性或其他生理代謝，因而使苗木在酸雨逆境下，其細胞膜脂質過氧化程度相對提高 (圖2)，而抗氧化酵素APx活性無法有效被活化 (圖3)，因而導致細胞膜滲漏率顯著提高 (圖1)，其PSII最初光能轉換效率 (Fv/Fm) 顯著降低 (表5)。由以上結果顯示不同苗木在不同的生長條件下所需Ca<sup>2+</sup> 濃度不同，添加過量的Ca<sup>2+</sup>，不但無法改善植物在逆境下細胞受害和光合作用效能，且可能適得其反，周希琴 (2005) 添加不同濃度的硝酸鈣於酸雨逆境下的木麻黃 (*Casuarina equisetifolia*) 植株，試驗結果發現添加高濃度鈣於的植株，其植體內O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 和MDA含量均顯著提高，而SOD (Superoxidase dismutase)和

CAT(Chloramphenicol Acetyltransferase)活性反而受到抑制。因此添加鈣處理之濃度仍需考量土壤性質與苗木需求而定。

酸雨和鈣濃度二因子彼此間的交互作用對苗木的細胞膜滲漏率(表1)、膜脂質過氧化物含量(表2)及抗氧化酵素活性(表3)均達顯著差異,顯示處於酸雨逆境下的相思樹苗木,添加鈣確實能降低苗木在酸雨逆境下受害情形,如降低苗木細胞膜滲漏率(圖1)和膜脂質過氧化程度(圖2),以及活化抗氧化酵素(圖3),以減緩酸雨對苗木的傷害。綜合以上結果得知,酸雨處理2週後可能因土壤或植體養分缺乏或嫩葉蠟質含量低,因而造成相思樹嫩葉出現黃化、萎縮等病徵,細胞膜完整性顯著下降,使抗氧化酵素APx活性無法有效被活化而顯著降低,而POD活性敏感性較低,能維持較久的時間,經過2週後仍持續上升,雖然取樣的葉片仍未出現病徵,但膜脂質過氧化程度已顯著提升,葉綠素螢光參數Fv/Fm顯著降低。添加鈣則能減緩植株受酸雨為害的情形,經由0.15 mM CaCl<sub>2</sub>處理後,相思樹葉片細胞膜完整性亦提高,進而抗氧化酵素APx活性能有效被活化而提升,使膜脂質過氧化程度顯著降低,而葉綠素螢光參數Fv/Fm也因為添加鈣而未受到酸雨逆境抑制。然而高濃度的CaCl<sub>2</sub>(10 mM)處理,反而使苗木在酸雨逆境下,細胞膜完整性相對提高,而抗氧化酵素APx活性無法有效被活化,因而導致細胞膜脂質過氧化程度相對提高,葉綠素螢光參數Fv/Fm值低於0.15 mM CaCl<sub>2</sub>處理者。

## 五、結論

酸雨處理會造成相思樹嫩葉出現病徵,細胞膜滲漏率提高,使抗氧化酵素APx活性無法有效被活化而顯著降低,而POD活性則顯著上升,導致膜脂質過氧化物大量產生,葉綠素螢光參數Fv/Fm顯著降低。添加鈣則能減緩植株受酸雨為害的情形,經由0.15 mM CaCl<sub>2</sub>處理後,相思樹葉片細胞膜滲漏率顯著降低,抗氧

化酵素APx活性有效被活化而提升,並使膜脂質過氧化物含量降低,而葉綠素螢光參數Fv/Fm也因為添加鈣而未受到酸雨逆境抑制。然而高濃度的CaCl<sub>2</sub>(10 mM)處理,反而使苗木在酸雨逆境下,其細胞膜滲漏率相對提高,而抗氧化酵素APx活性無法有效被活化,因而導致細胞膜脂質過氧化程度相對提高,葉綠素螢光參數Fv/Fm值低於0.15 mM CaCl<sub>2</sub>處理者。故添加適量鈣有助於相思樹苗木抵抗酸雨逆境。

## 六、參考文獻

- 白創文、邱志郁、王明光(2005) 酸化森林土壤中的鋁及其植物毒性。台灣林業 31(6): 22-28。
- 金恆鏞、劉瓊霖、夏禹九、黃正良(2003) 福山天然闊葉林生態系對降水化學的交互作用。台灣林業科學 18(4): 367-373。
- 周希琴(2005) 木麻黃幼苗對模擬酸雨的迫害和Ca<sup>2+</sup>的調節作用。植物生理通訊 41(3): 309-312。
- 柯勇(2004) 植物生理學。藝軒圖書出版社131-139頁。
- 劉恩好(2008) 酸雨對菲律賓樟樹抗氧化系統的影響。國立中興大學森林學系碩士論文。共58頁。
- Azcón-Aguilar, C., R. Azco'n and J. M. Barea (1979) Endomycorrhizal fungi and Rhizobium as biological fertilizers for *Medicago sativa* in normal cultivation. Nature 279: 325-327.
- Borer, C. H., D. H. DeHayes, P. Schaberg and J. R. Cumming (1997) Relative quantification of membrane-associated calcium in red spruce mesophyll cells. Trees 12: 21-26.
- Borer, C. H., P. G. Schaberg, D. H. DeHayes and G. J. Hawley (2004) Accretion, partitioning and sequestration of calcium and aluminum in red spruce foliage: implications for tree health. Tree Physiology 24: 929-939.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analysis Biochemistry* 72: 248-254.
- Courchesne F., B.Cote, J. W. Fyles, W. H. Hendershot, P. M. Biron, A. G. Roy and M. C. Turmel (2005) Recent changes in soil chemistry in a forest ecosystem of southern Quebec, Canada. *Soil Science Society of America* 69: 1298-1313.
- DeHayes, D. H., P. G. Schaberg, G. J. Hawley and G. R. Strimbeck (1999) Acid rain impacts on calcium nutrition and forest health. *Bioscience*. 49(10): 789-800.
- Frankel, E. N. (1985) Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in Lipid Research* 23: 197-221.
- Gabara, B., M. Sklodowska, A. Wyrwicka, S. Glinska and M. Gapinska (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.
- Gong, M., S. N. Chen, Y. Q. Song and Z. G. Li (1997) Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant in maize seedling. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 371-379.
- Halman, J. M., P. G. Schaberg, G. J. Hawley and C. Eagar (2008) Calcium addition at the Hubbard Brook Experimental Forest increases sugar storage, antioxidant activity and cold tolerance in native red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiology* 28: 855-862.
- Hepler, P. K. (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell* 17: 2142-2155.
- Huntington, T. G., R. P. Hooper, C. E. Johnson, B. T. Aulenbach, R. Cappellato and A.E. Blum (2000) Calcium depletion in a southeastern United States forest ecosystem. *Soil Science Society of America* 64: 1845-1858.
- Jaleel, C. A., P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Gopi, R. Somasundaram, R. Panneerselvam (2007) Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60: 110-116.
- Jandl, R., C. Alewell and J. Prietzel (2004) Calcium loss in central European forest soils. *Soil Science Society of America* 68: 588-595.
- Jiang, M. and J. Zhang (2003) Cross – talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant, Cell and Environment* 26: 929-939.
- Jiang, M. and R. Jagels (1999) Detection and quantification of changes in membrane-associated calcium in red spruce saplings exposed to acid fog. *Tree Physiology* (19): 909-916.
- Jiang, Y. and B. Huang (2001) Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *Journal of Experimental Botany* 52(355): 341-349.
- Koyama, H., T. Toda and T. Hara (2001) Brief exposure to low – pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *Journal of Experimental Botany*

- 52(355): 361-368.
- Larkindale, J. and M. R. Knight (2002) Protection against heat stressed – induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128: 682-695.
- Likens, G. E., C. T. Driscoll, D. C. Buso (1996) Long – term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science* 272: 244-246.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Schaberg, P. G., D. H. DeHayes, G. J. Hawley, G. R. Strimbeck, J. R. Cumming, P. F. Murakami and C. H. Borer (2000) Acid mist and soil Ca and Al alter the mineral nutrition and physiology of red spruce. *Tree Physiology* 20: 73-85.
- Schmitz-Eiberger, M., R. Haefs and G. Noga (2002) Calcium deficiency-Influence on the antioxidative defense system in tomato plants. *Plant Physiology* 159: 733-742.
- Shigihara, A., K. Matsumoto, N. Sakurai and M. Igawa (2008a) Growth and physiological responses of beech seedlings to long-term exposure of acid fog. *Science of the Total Environment* 391(1): 124-131.
- Shigihara, A., K. Matsumoto, N. Sakurai and M. Igawa (2008b) Leaching of cell wall components caused by acid deposition on fir needles and trees. *Science of the Total Environment* 398: 185-195.
- Tomlinson, G. H. (2003) Acidic deposition, nutrient leaching and forest growth. *Biogeochemistry* 65: 51-81.
- Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Velikova, V., T. Tsonev and I. Yordanov (1999) Light and CO<sub>2</sub> responses of photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in bean plants after simulated acid rain. *Physiologia Plantarum* 107: 77-83.
- Wyrwicka, A. and M. Skłodowska (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.
- Xue, Y. F., L. Liu, Z. P. Liu, S. K. Mehta and G. M. Zhao (2008) Protective role of Ca against NaCl toxicity in *Jerusalem artichoke* by up-regulation of antioxidant enzymes. *Soil Science Society of China* 18(6): 766-774.
- Yu, J. Q., S. F. Ye and L. F. Huang (2002) Effects of simulated acid precipitation on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzymes in *Cucumis sativus* L. *Photosynthetica* 40(3): 331-335.
- Zhao, H. J. and J. F. Tan (2005) Role of calcium ion in protection against heat and high irradiance stress-induced oxidative damage to photosynthesis of wheat leaves. *Photosynthetica* 43(3): 473-476.