



دانشگاه گیلان، دانشکده علوم گیاهی

نشریه حفاظت و بهره‌برداری از منابع طبیعی

جلد دوم، شماره دوم، ۱۳۹۳

<http://ejang.gau.ac.ir>

روش‌های مشاهده لایه اپی کوتیکول برگ درختان

*فاطمه کاردل

استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۰۱

چکیده

سطح گیاهان پوشیده از یک لایه مومی به نام اپی کوتیکول می‌باشد. این لایه در حفاظت بخش‌های داخلی برگ در مقابل شرایط محیطی نقش مهمی ایفاء می‌کند. تخریب این لایه در اثر عوامل محیطی و یا آلاینده‌های اتمسفری سبب تغییر در میزان خیس‌پذیری برگ گیاهان می‌شود. لذا این تحقیق به بررسی روش‌های مشاهده لایه اپی کوتیکول برگ گیاهان از طریق میکروسکوپ الکترونی، اندازه‌گیری میزان خیس‌پذیری برگ، و اندازه‌گیری مقدار کمی موم لایه اپی کوتیکول پرداخته است. برای این منظور سه گونه درختی، آقطی سیاه، افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی انتخاب شدند. نتایج این تحقیق نشان دادند که مشاهده لایه اپی کوتیکول به‌طور مستقیم با میکروسکوپ الکترونی، هر چند دقیق است ولی بسیار پرهزینه، زمان‌بر و امکان تعیین کمی میزان اپی کوتیکول سطح برگ را در مقیاس وسیع نشان نمی‌دهد. حضور موم لایه اپی کوتیکول می‌تواند با اندازه‌گیری مقدار کمی موم لایه اپی کوتیکول تعیین شود، اما با این روش نمی‌توان تغییرات موم لایه اپی کوتیکول را تخمین زد. در صورتی که با اندازه‌گیری میزان خیس‌پذیری برگ از طریق زاویه تماس قطره با سطح برگ می‌توان تغییرات سطح لایه اپی کوتیکول را تخمین زد. همچنین این تحقیق نشان داده است، برگ‌هایی با ساختار اپی کوتیکول مشابه قابلیت خیس‌پذیری یکسانی دارند. در نهایت این تحقیق اندازه‌گیری

*نویسنده مسئول: f.kardel@umz.ac.ir

میزان خیس‌پذیری برگ را به‌عنوان روشی آسان، مطمئن، سریع و کم هزینه برای مشاهده لایه اپی کوتیکول پیشنهاد کرده است.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های درختی، لایه مومی اپی کوتیکول، میکروسکوپ الکترونی، خیس‌پذیری برگ، زاویه تماس قطره با سطح

مقدمه

سطوح خارجی گیاهان دائماً در معرض آلاینده‌های هوا به خصوص ته نشست تر و خشک اتمسفری قرار دارند. سطح برگ شامل لایه‌ای به نام کوتیکول بوده که این لایه تقریباً در تمامی گیاهان پوشیده از یک لایه نازک به نام اپی کوتیکول می‌باشد. اپی کوتیکول برای حفاظت قسمت‌های داخلی برگ از صدمات در دوران توسعه برگ شکل می‌گیرد. لایه مومی و صیقلی اپی کوتیکول در انجام مناسب فتوسنتز (بنزینگ و رنفرو، ۱۹۷۱ و هانبا و همکاران، ۲۰۰۴)، ممانعت از تبخیر و هدر رفت آب یا تعرق (اسمت و مک کلین، ۱۹۸۹)، فعالیت روزنه‌ها (برور و همکاران، ۱۹۹۱) و جلوگیری از آسیب‌پذیری برگ گیاهان به پاتوژن‌ها و قارچ‌ها (رینولدز و همکاران، ۱۹۸۹) نقش بسیار مهمی را ایفاء می‌کند (شفرد و گریفیتز، ۲۰۰۶). به عنوان مثال وقتی که سطح وسیعی از برگ گیاه پوشیده از یک لایه نازک آب باشد عمل فتوسنتز و تبادل گازی گیاه سریعاً کاهش می‌یابد زیرا نفوذ دی اکسیدکربن در آب ۱۰۰۰۰ بار کندتر از نفوذ آن در هوا می‌باشد (برور و همکاران، ۱۹۹۱). ساختار و ترکیبات شیمیایی موم لایه اپی کوتیکول در همه گیاهان یکسان نمی‌باشند. برگ گیاه بسته به شرایط اقلیمی ممکن است دارای سطح آبدوست^۱ و یا دارای سطح آبگریز^۲ باشد. اما ساختار و ترکیبات شیمیایی لایه مومی اپی کوتیکول می‌توانند در اثر آلاینده‌های اتمسفری (بارنز و بروان، ۱۹۹۰؛ هانثور و همکاران، ۲۰۰۹)، اقلیم و اصطکاک فیزیکی توسط باد تغییر کنند. در نتیجه خیس‌پذیری برگ^۳ را تحت تأثیر قرار دهند. علاوه بر فاکتورهای محیطی، ویژگی‌های اپیدرمی (نئین هس و بارتلوت، ۱۹۹۷؛ آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱)، شکل برگ (کیپ و همکاران، ۱۹۹۵؛ کاردل و همکاران، ۲۰۱۲)، تراکم و ارتفاع کرک برگ

-
- 1- Hydrophilic
 - 2- Hydrophobic
 - 3- Leaf wettability

(هاینز و همکاران، ۱۹۸۵؛ برور و همکاران، ۱۹۹۱؛ واگنر و همکاران، ۲۰۰۳)، زاویه اتصال برگ با شاخه (هولدر، ۲۰۱۲) می‌تواند بر میزان خیس‌پذیری برگ تأثیر بگذارند. لازم به ذکر است که برگ‌هایی با سطح آبگریز اجازه نمی‌دهند که قطرات آب روی سطح برگ باقی بمانند. در این گیاهان قطرات به راحتی از سطح برگ سر خورده و به سمت خاک هدایت می‌شوند. بدین طریق آب قابل دسترس ریشه گیاه افزایش می‌یابد. این ویژگی برای گیاهان مناطق خشک و نیمه خشک از اهمیت اکولوژیکی بالایی برخوردار است (هولدر، ۲۰۱۲). در نتیجه، آبگریز بودن سطح برگ سبب افزایش فعالیت فتوسنتزی و کاهش بیماری‌های قارچی و باکتریایی (هانبا و همکاران، ۲۰۰۴) در گیاه می‌شود. همچنین این ویژگی مانع از جذب باران اسیدی یا تجمع ذرات گردوغبار در سطح برگ (هاینز و همکاران، ۱۹۸۵؛ کوپسینزکاین و هوتونن، ۲۰۰۵) می‌شود. در اغلب موارد، برگ‌ها با سطح خیس‌پذیری بالا در مقایسه با برگ‌هایی با سطح خیس‌پذیری پایین بیشتر در معرض صدمات فیزیکی و شیمیایی حاصل از عوامل محیطی و آلاینده‌های اتمسفر قرار دارند (نشین هس و بارتلوت، ۱۹۹۸؛ آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱؛ کاردل و همکاران، ۲۰۱۲). به‌طور مثال مطالعات زیادی نشان دادند که ساختار مومی اپی کوتیکول سوزنی‌برگان در مناطق آلوده در مقایسه با مناطق نسبتاً پاک سریع‌تر تخریب شده بودند (پرسی و ردینگ، ۱۹۷۸؛ فولر و همکاران، ۱۹۸۰؛ کیپ، ۱۹۸۳ و آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱). هر نوع صدمه بر روی سطح برگ اعم از سائیدگی، ترک خوردگی، و تغییر ترکیبات شیمیایی موم لایه اپی کوتیکول می‌تواند مستقیماً توسط میکروسکوپ الکترونی^۱ مشاهده مشاهده و تعیین شود (کیپ، ۱۹۸۳؛ پال و همکاران، ۲۰۰۰؛ آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱ و کاردل و همکاران، ۲۰۱۲). برآورد صدمات سطح برگ از طریق میکروسکوپ الکترونی بسیار پرهزینه می‌باشد. روش دیگر این است که، صدمات سطح برگ با اندازه‌گیری زاویه تماس قطره روی سطح برگ تحت عنوان میزان خیس‌پذیری سطح برگ تخمین زده شود (پرسی و ردینگ، ۱۹۷۸؛ روسادو و همکاران، ۲۰۱۰ و کاردل و همکاران، ۲۰۱۲). میزان خیس‌پذیری یک سطح ماده جامد (در اینجا برگ گیاهان) می‌تواند توسط میزان معینی از یک مایع (قطره آب) بر روی سطح آن ماده جامد تعیین شود. این میزان می‌تواند با اندازه‌گیری زاویه تماس بین قطره و سطح ماده جامد محاسبه شود. درحالت کلی اگر زاویه تماس قطره با سطح ماده جامد مورد نظر کمتر از ۹۰ درجه باشد آن ماده را خیس‌پذیر و اگر بیشتر از

1- Scanning Electron Microscopy (SEM)

۹۰ درجه باشد آن ماده را خیس ناپذیر گویند (ادام، ۱۹۶۳؛ هالووی، ۱۹۶۶؛ کاردل و همکاران، ۲۰۱۲). در واقع با کاهش زاویه تماس قطره با سطح برگ، مقدار سطح تماس قطره با سطح برگ افزایش می‌یابد، و یا بالعکس با افزایش زاویه تماس قطره با سطح برگ مقدار سطح تماس قطره با سطح برگ کاهش می‌یابد. این روش فیزیکی کاربرد فراوانی در علوم مختلف بخصوص در پزشکی، کشاورزی، زیست‌شناسی و جنگلداری دارد. برای مثال اندازه‌گیری زاویه تماس قطره با سطح برگ در صنعت کشاورزی به خصوص برای مدیریت حشره‌کش‌ها و آبیاری گیاهان زراعی مورد توجه فراوان قرار گرفته است (گرمز و گامز، ۱۹۸۷). بنابراین تعیین میزان خسارت سطح برگ گیاهان در تحقیقات علمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا این تحقیق به مقایسه چند روش مهم برای مشاهده لایه اپی کوتیکول برگ گیاهان که در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفتند می‌پردازد، تا از بین این روش‌ها روشی آسان، مطمئن، سریع، و کم هزینه را به محققین و کارشناسان پیشنهاد کند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: به منظور مشاهده اپی کوتیکول برگ، سه گونه درختی آقطی سیاه (*Sambucus nigra* L.)، افرا شبه چناری (*Acer pseudoplatanus* L.)، و بلوط قرمز اروپایی (*Quercus robur* L.) انتخاب شدند. از هر گونه ۱۰ درخت و از هر درخت ۳ شاخه که در جهت تابش یکسان نور خورشید قرار داشتند انتخاب شده و از هر کدام ۴ یا ۵ برگ جمع‌آوری گشته و با شرایط محیطی یکسان سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور مشاهده اپی کوتیکول از سه روش استفاده شد.

الف) مشاهده سطح برگ با میکروسکوپ الکترونی (SEM)

برای مشاهده نمونه‌های بیولوژیکی توسط میکروسکوپ الکترونی، ابتدا نمونه‌ها نیاز به آماده‌سازی دارند، و این آماده‌سازی بسته به نوع بافت نمونه متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال روش آماده‌سازی نمونه برای بافت جانوری با گیاهی متفاوت می‌باشد، حتی بافت‌های نمونه‌های گیاهی از یکدیگر نیز متفاوت می‌باشند. در این مقاله فقط روش آماده‌سازی نمونه برگ گیاه مورد بررسی قرار گرفته شده است.

ابتدا دیسک‌هایی از برگ به قطر یک سانتی متر از بخش میانی (بخشی از برگ که شامل رگبرگ اصلی نباشد) پانچ شدند و سپس نمونه‌ها به محلول اتانول ۷۰ درصد منتقل شدند (آدرینسنز و

همکاران، ۲۰۱۱). نمونه‌ها بر قالب آلومینیومی توسط چسب دوطرفه ثابت شدند و فوراً در دستگاه^۱ (CPD) خشک شدند. سپس نمونه‌ها توسط لایه نازکی از طلا یا پالادیوم (ضخامت ۳۰-۴۰ nm) اندود شدند. این عمل سبب پایداری نمونه‌ها می‌شود، در غیر اینصورت نمونه‌ها ممکن است تغییر شکل دهند. بعد از باز کردن شیر انتقال با ولتاژ ۲۰ کیلو وات نمونه‌ها به مرحله سرد میکروسکوپ الکترونی^۲ توسط یک میله انتقال‌دهنده تحت مکش بالا انتقال داده شدند. در نهایت تصاویر سطح برگ بر روی صفحه نمایش میکروسکوپ الکترونی ظاهر شده و تصاویر در کامپیوتر ذخیره شدند.

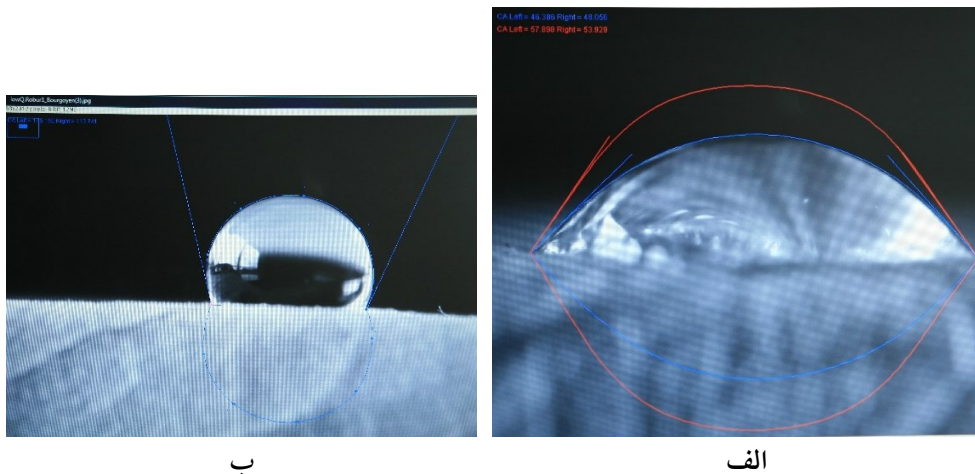
(ب) اندازه‌گیری میزان خیس‌پذیری برگ

میزان خیس‌پذیری برگ با اندازه‌گیری زوایای تماس بین قطره با سطح برگ^۳ تخمین زده می‌شود. برای این منظور ابتدا حدود یک سانتی‌متر مربع از قسمت‌های میانی دو طرف رگبرگ اصلی برگ را بریده و با چسب‌های نواری دو طرفه^۴ بر روی یک سطح افقی صاف (مانند یک تکه چوب) چسبانده شد. به میزان ۵ الی ۱۰ میکرو لیتر آب مقطر توسط میکروپیپت روی آن چکانده شد (آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱ و کاردل و همکاران، ۲۰۱۲). لازم به ذکر است در مراحل آزمایش دمای آزمایشگاه باید ثابت و معادل دمای اتاق ۲۱ درجه سانتی‌گراد باشد. سپس، با دوربین دیجیتالی (Canon EOS 5D DS) که به یک ماکرو لنز (sigma macro lens EX DG 105 mm, f 2/8) متصل است از قطرات نشانده شده روی سطح برگ عکس گرفته شد و تصاویر بدست آمده با نرم‌افزار 'Drop Snake Analysis' که یک نرم‌افزار تکمیلی نصب شده در نرم‌افزار Image J می‌باشد اندازه‌گیری شدند (استالدور و همکاران، ۲۰۰۶؛ استالدور و همکاران ۲۰۱۰). این نرم‌افزار به صورت رایگان قابل دسترسی است (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). توسط این نرم‌افزار ما دور قوس هر قطره حداقل ۵ تا ۷ گره^۵ ایجاد می‌کنیم، و با کمک این گره‌ها نرم‌افزار مناسب‌ترین خط خمیده را دور قطره رسم می‌کند. در نهایت نرم‌افزار زوایای تماس در حاشیه چپ و راست قطره‌ی نشانده شده بر روی سطح برگ را بطور اتوماتیک و نیمه اتوماتیک اندازه‌گیری می‌کند (شکل ۱).

- 1- Critical point dryer (Balzer CPD-010unit)
- 2- Philips 515 scanning electron microscope
- 3- Drop contact angle
- 4- Double side tape
- 5- Knot

در اینجا هنگام اندازه‌گیری زوایای تماس بین قطره با سطح برگ توسط نرم‌افزار 'Drop Snake Analysis'، باید توجه داشت که رنگ تصویر قطره کاملاً متضاد (۱۰۰ درصد متضاد) با رنگ زمینه پشت تصویر قطره باشد. در غیر اینصورت خط تشکیل شده دور قطره کاملاً منطبق بر قوس قطره نبوده و در نتیجه زوایای قطره در روش اتوماتیک به درستی محاسبه نخواهند شد (شکل ۱-ب). اما در روش نیمه‌اتوماتیک با این نرم‌افزار نیاز به تضاد صد درصدی تصویر قطره با رنگ زمینه نمی‌باشد (شکل ۱-الف).

برای حصول اطمینان بیشتر از دقت اندازه‌گیری زوایای تماس قطره با سطح برگ، ۱۰ الی ۲۰ تصویر از کل تصاویر بطور تصادفی انتخاب شد و سپس زوایای تماس هر قطره با سطح برگ دوبار اندازه‌گیری شدند.



شکل ۱- (a) اندازه‌گیری زاویه تماس قطره با سطح برگ به صورت نیمه اتوماتیک، (b) اتوماتیک توسط روش 'Drop Snake Analysis'

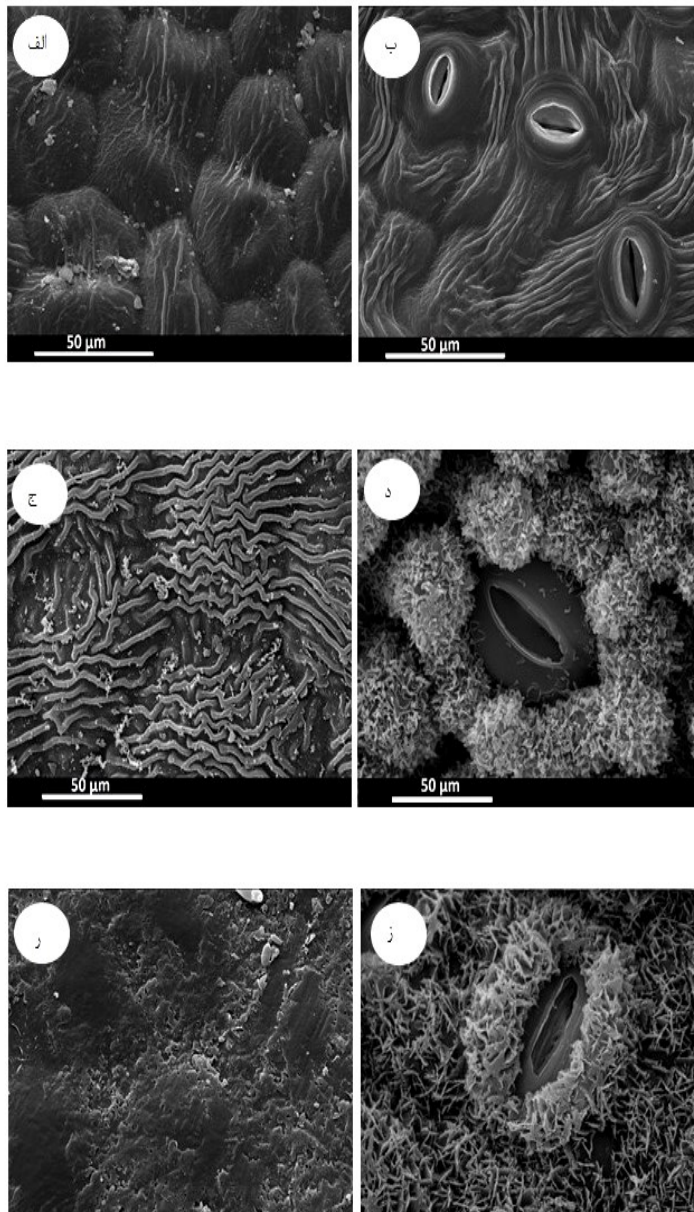
ج) اندازه‌گیری مقدار کمی موم لایه اپی کوتیکول برگ گیاهان در مراحل رشدشان تکمیل می‌شود. برای این منظور می‌توان برگ‌های بالغ شاخه که همسن می‌باشند را انتخاب نموده و نمونه برگ‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در محلول کلروفرم غوطه‌ور نموده تا لایه مومی از برگ جدا شود (بیاتی و مارسل، ۲۰۰۲). سپس موم حاوی کلروفرم را در ظرفی از جنس فویل آلومینیومی گذاشته و بر روی صفحات گرم (حدود ۴۸ درجه

سانتی‌گراد) گذاشته تا کلروفرم کاملاً تبخیر شود. سپس وزن موم‌ها از روی وزن فویل‌های بکار گرفته شده قبل از استفاده و بعد از تبخیر کامل کلروفرم بدست می‌آید.

نتایج

براساس مشاهدات ما از طریق میکروسکوپ الکترونی، سه گونه درختی (آقطی سیاه، افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی) بررسی شده در این مقاله، فقط در سطح زیرین برگ دارای روزنه می‌باشند (Hypostomatous) (شکل ۲). سلول‌های کوتیکول در هر دو سطح (رویی و زیرین) برگ درختان آقطی، افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی برجسته می‌باشند (شکل ۲). نوع و میزان برجستگی سلول کوتیکول در گونه‌های مختلف و در سطوح مختلف (رویی و زیرین) برگ متفاوت می‌باشند. به‌عنوان مثال از میان سه گونه بررسی شده در این تحقیق سلول‌های کوتیکول سطح زیرین برگ افرا شبه چناری دارای بیشترین برجستگی و سلول‌های کوتیکول سطح رویی برگ بلوط قرمز اروپایی دارای کمترین برجستگی می‌باشند (شکل ۲، د و ر). کوتیکول سطح رویی و زیرین برگ آقطی سیاه، و سطح رویی برگ افرا شبه چناری با یک ورقه نازک از موم کریستالی پوشانده شده است (شکل ۲ الف، ب و ج). اما کوتیکول سطح رویی برگ بلوط قرمز اروپایی نیز توسط یک لایه موم کریستالی با تراکم و ضخامتی بیشتر از سطح رویی دیگر گونه‌های بررسی شده در اینجا پوشیده شده است. کوتیکول سطح زیرین برگ افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی با خرده موم‌های ورقه‌ای شکل پوشیده شدند. این خرده موم‌ها بطور نامنظم روی سطح کوتیکول قرار گرفته‌اند. به‌طوری‌که سلول‌های محافظ روزنه‌ها و کرک‌ها را نیز پوشاندند (شکل ۲-ز).

تحلیل‌های آماری نشان دادند که زاویه تماس قطره با سطح زیرین برگ آقطی سیاه بطور معنی‌داری کمتر از زاویه تماس قطره با سطح زیرین برگ افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی بوده است (جدول ۱). در حالت کلی مشاهدات نشان دادند که گونه‌های افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی دارای بیشترین زاویه تماس قطره با برگ را داشتند (جدول ۱). علاوه بر این زاویه تماس قطره با سطح زیرین برگ افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی از نظر آماری بطور معنی‌داری بزرگ‌تر از سطح رویی برگ همان درختان بوده است. لازم به ذکر است که تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین زاویه تماس قطره با سطح زیرین برگ افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی مشاهده نشده است.



شکل ۲- تصویرهای گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی از سطح رویی اپی کوتیکول (adaxial، تصاویر سمت چپ) و سطح زیرین برگ با نمای متفاوتی از اپی کوتیکول (abaxial، تصاویر سمت راست) آقطی سیاه (الف و ب)، افرا شبه چناری (ج و د)، بلوط قرمز اروپایی (ر و ز)

جدول ۱- میانگین زاویه تماس قطره با سطح برگ و انحراف معیار در دو سطح رویی (adaxial) و زیرین (abaxial) برگ گونه‌های آقطی سیاه، افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی. حروف‌های مختلف بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار ($\alpha=0/01$) بین گونه‌های مورد بررسی می‌باشند.

گونه	زاویه تماس قطره با سطح رویی برگ	زاویه تماس قطره با سطح زیرین برگ
آقطی سیاه	70 ± 8^b	63 ± 12^b
افرا شبه چناری	68 ± 6^b	120 ± 7^a
بلوط قرمز اروپایی	75 ± 5^b	116 ± 6^a

بحث و نتیجه‌گیری

موم لایه اپی کوتیکول از گلیسریدها، لیپیدها و اسیدهای چرب تشکیل شده‌اند که این مواد در آب غیر محلول هستند (شفرد و گریفیتز، ۲۰۰۶). شکل، نوع و ضخامت موم‌ها در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشند. در برخی گیاهان موم‌ها کریستالی، میله‌ای، لوله‌ای، نواری و یا صفحه‌ای شکل هستند (نتین هس و بارتلوت، ۱۹۹۷). این تحقیق نشان داده است برگ‌هایی با خیس‌پذیری یکسان، ساختار و نوع موم مشابه داشتند. به‌عنوان مثال سطح زیرین برگ افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی خیس‌ناپذیر و برگ‌های رویی و زیرین آقطی، و رویی افرا شبه چناری و بلوط قرمز اروپایی خیس‌پذیر می‌باشند. مقادیر بدست آمده برای تخمین خیس‌پذیری برگ در این تحقیق با نتایج بدست آمده در دیگر تحقیقات (آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱ و کاردل و همکاران، ۲۰۱۲) مطابقت دارند. به‌طورکلی باید اذعان داشت، مقایسه داده‌های خیس‌پذیری این تحقیق با دیگر تحقیقات بدلیل بکارگیری روش‌ها، زیستگاه‌ها، شرایط محیطی و سن‌های مختلف، مشکل به‌نظر می‌رسد.

این مقاله روش‌های سنتی و نوین اندازه‌گیری میزان اپی کوتیکول برگ گیاه را با توجه به تجربیات نویسنده این مقاله مقایسه نموده است. همان‌طور که گفته شد همواره در این روش‌ها دقت، سرعت، آسانی انجام آزمایش، و بخصوص هزینه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است. گاهی اوقات هزینه انجام آزمایش حتی بر آسانی و سرعت انجام آن ارجحیت دارد.

یکی از روش‌های مطرح شده در این مقاله استفاده از میکروسکوپ الکترونی بوده است (روش الف). در صورتی که هدف مشاهده ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اپی کوتیکول و نوع صدمات بر روی سطح برگ باشد روش SEM پیشنهاد می‌شود. قابل ذکر است که با این روش نوع و شکل اپی

کوتیکول قابل مشاهده می‌باشند. اما این روش بسیار پرهزینه، زمان بر، و امکان تعیین کمی میزان اپی کوتیکول سطح برگ را در مقیاس وسیع نشان نمی‌دهد (نئین هس و بارتلوت، ۱۹۹۷؛ کاردل و همکاران، ۲۰۱۲). آخرین روش مطرح شده در این مقاله، برآورد کمی موم اپی کوتیکول بوده است (روش ج). این روش برای ارزیابی اثرات عوامل محیطی و یا آلودگی بر برگ گیاهان مفید بوده، و همچنین می‌تواند تکمیل کننده دیگر روش‌های ذکر شده در این مقاله باشد که به نوبه خود دارای نقاط ضعفی می‌باشد (کیپ و فولر، ۱۹۸۱). به‌عنوان مثال دو گونه و یا حتی دو سطح یک برگ (رویی و زیرین) ممکن است دارای ساختار، نوع، و جنس اپی کوتیکول مشابه نباشند ولی دارای ضخامت و یا میزان کمی اپی کوتیکول یکسان باشند (مانند دو سطح برگ افرا شبه چناری) و یا بالعکس (هالووی، ۱۹۶۹؛ پائولتی و همکاران، ۲۰۰۷) دریافتند، ازن (O_3) سبب افزایش خاصیت خیس پذیری گونه *Fagus sylvatica* L. شده، اما تغییری در مقدار کمی موم مشاهده نکردند. همچنین کیپ و همکاران (۱۹۹۵) مشاهده کردند آلاینده دی اکسید گوگرد (SO_2) بر خیس پذیری سوزنی برگان درخت کاج نوتل نروژی (Norway Spruce needles) اثر گذاشته در حالی که این آلاینده تأثیری در مقدار کمی موم اپی کوتیکول نسبت به وزن خشک سوزنی برگان نداشته است. در نتیجه آن محققان خاصیت خیس پذیری را بعنوان نشانگر مناسبی برای آلاینده (SO_2) معرفی کرده‌اند. علاوه بر این، لایه موم برگ ممکن است به طور یکنواخت در سطح برگ پخش نشده باشد، بنابراین نمی‌توان با این روش تغییرات سطح برگ را نمایان ساخت (کاردل و همکاران، ۲۰۱۲).

در میان روش‌های مقایسه شده روش برآورد اپی کوتیکول سطح برگ از طریق میزان خیس‌پذیری برگ آسان، بسیار کم هزینه و قابل اعتماد می‌باشد. دیگر مزیت این روش این است که از طریق اندازه‌گیری قابلیت خیس‌پذیری سطح برگ می‌توان مراحل تشکیل لایه مومی برگ را در طول دوره رشد گیاه پایش نمود. به‌عنوان مثال، (آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱) با اندازه‌گیری زاویه تماس قطره با سطح برگ درختان بلوط قرمز اروپایی، راش اروپایی و توس نقره ای در سه مرحله مختلف دوره رشد گیاه (در حال گسترش، گسترش یافته و پیری)، میزان خیس‌پذیری برگ این درختان را تخمین زده‌اند. در میان روش‌های مختلف اندازه‌گیری زاویه تماس قطره با سطح برگ، برنامه نرم‌افزار Drop Snake Analysis که یک برنامه جامع و نوین، برگرفته از روش ریاضی B-spline Snake می‌باشد (استالدر و همکاران، ۲۰۰۶؛ استالدر و همکاران ۲۰۱۰)، یک ابزار مناسب و دقیق می‌باشد. همچنین

این روش به علت ارزان و آسان بودن می‌تواند در سطح وسیع‌تری با حجم نمونه زیاد و با تکرار بالا توسط محققان بکار گرفته شود (آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱؛ کاردل و همکاران، ۲۰۱۲).

رهیافت ترویجی

با توجه به اینکه سطح برگ گیاهان البته بسته به نوع گونه در اثر آلاینده‌های اتمسفری، بیماری‌های قارچی و باکتریایی، و عوامل محیطی آسیب می‌بینند، برآورد صدمات برگ در راستای حفاظت و پایش سلامت جنگل‌ها و کاهش تنوع گونه‌های گیاهی و پیشگیری از پیامدهای حاصل از آن بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین بهتر است، برای شناسایی و اقدامات سریع و به موقع از روش‌های آسان، کم هزینه و قابل اعتماد استفاده نمود، تا بتوان به سرعت گیاهان مناطق آسیب دیده را از مناطق سالم تمیز داد. لذا در این تحقیق، اندازه‌گیری خیس‌پذیری برگ و به دنبال آن اندازه‌گیری زاویه تماس قطره با سطح برگ را برای حضور اپی کوتیکول سطح برگ در سطح وسیع به محققان پیشنهاد می‌گردد. قابل اطمینان بودن این روش در تحقیق قبلی (کاردل و همکاران، ۲۰۱۲) و دیگر تحقیقات (آدرینسنز و همکاران، ۲۰۱۱ و هولدر، ۲۰۱۲) ثابت شده است.

نکات تخصصی که باید در اندازه‌گیری دقیق زاویه تماس قطره با سطح برگ رعایت شوند عبارتند از:

- ۱- همه تصاویر باید در ساعات معینی از روز در اتاقی با درجه حرارت و رطوبت نسبی یکسان صورت گیرند.
- ۲- از آنجایی که ممکن است موم اپی کوتیکول بطور یکنواخت بر روی سطح برگ توزیع نشده باشد آزمون خیس‌پذیری بهتر است در چند نقطه از قسمت میانی سطح برگ (البته به جز رگبرگ اصلی) انجام گیرد.
- ۳- درجه حرارت آب مقطری که برای چکاندن بر سطح برگ جهت اندازه‌گیری بکار می‌رود باید ثابت باشد.
- ۴- خطای اندازه‌گیری پی‌پت باید قبل از استفاده آزمون شود.
- ۵- رنگ تصویر قطره باید کاملاً متضاد با رنگ زمینه پشت تصویر قطره باشد.
- ۶- برای برطرف کردن مشکل اندازه‌گیری ارتفاع و پهنای قطره از تصاویر، می‌بایست در کنار هر تصویر یک شی با طول معین قرار داده شود، سپس تصویر توسط دوربین دیجیتالی متصل به ماکرو لنز گرفته شود.

منابع

1. Adam, N.K. 1963 .Principles of water-repellency. In: waterproofing and water-repellency, (Ed, by J, L, Millie), Elsevier, 1-23.
2. Adriaenssens, S., Staelens, J., Wuyts, K., De Schrijver, A., Van Wittenberghe, S., Wuytack, T., Kardel, F., Verheyen, K., Samson, R., and Boeckx, P. 2011. Foliar nitrogen uptake from wet deposition and the relation with leaf wettability and water storage capacity. *Water Air Soil Pollution*, 219: 43–57.
3. Barnes, J.D., and Brown, K.A. 1990. The influence of ozone and acid mist on the amount and wettability of the surface waxes in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *New Phytologist*, 114: 531-535.
4. Beattie, G.A., and Marcell, L.M. 2002. Effect of alterations in circular wax biosynthesis on the physicochemical properties and topography of maize leaf surfaces. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1–16.
5. Benzing, D.H., and Renfrow, A. 1971. Significance of patterns of CO₂ exchange to the ecology and phylogeny of the Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 98: 322-327.
6. Brewer, C.A., Smith, W.K., and Vogelmann, T.C. 1991. Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Plant, Cell and Environment*, 14: 955-962.
7. Cape, J.N. 1983. Contact angles of water droplets on needles of Scots pine (*Pinus sylvestris*) growing in polluted atmospheres. *New Phytologist*, 93: 293-299.
8. Cape, J.N., and Fowler, D. 1981. Changes in epicuticular wax of *Pinus sylvestris* exposed to polluted air. *Silva Fennica*, 15: 457-458.
9. Cape, J.N., Sheppard, L.J. and Binnie, J. 1995. Leaf surface properties of Norway spruce needles exposed to sulphur dioxide and ozone in an open-air fumigation system at Liphook. *Plant, Cell and Environment*, 18: 285-289.
10. Fowler, D., Cape, J.N., Nicholson, I.A., Kinnaird, J.W., and Paterson, I.S. 1980. The influence of a polluted atmosphere on cuticle degradation in Scots pine. In: *Ecological impact of acid precipitation* (Ed. By D. Drables & R. Tollan). SNSF project, Oslo. 146p.
11. Guzman, O., and Gomez, L. 1987. Premanence of free water on coffee leaves. *Experimental Agriculture*, 23: 213-220.
12. Haines, B.L., Jernstedt, J.A., and Neufeld, H.S. 1985. Direct foliar effects of simulated acid rain II. Leaf surface characteristics. *New Phytologist*, 99:407-416.
13. Hanba, Y.T., Moriya, A., and Kimura, K. 2004. Effect of leaf surface wetness and wettability on photosynthesis in bean and pea. *Plant Cell and Environment*, 27: 413-421.
14. Holder, C.D. 2012. The relationship between leaf hydrophobicity, water droplet retention, and leaf angle of common species in a semi-arid region of the western United States. *Agricultural and Forest Meteorology*, 152: 11-16.
15. Holloway, P.J. 1969. Effects of superficial wax on leaf wettability. *The Annals of Applied Biology*, 63: 145–153.

16. Honour, S.L., Bell, J.N.B., Ashenden, T.W., Cape, J.N., and Power, S.A. 2009. Responses of herbaceous plants to urban air pollution: effects on growth, phenology and leaf surface characteristics. *Environmental Pollution*, 157: 1279-1286.
17. Kardel, F., Wuyts, K., Babanezhad, M., Wuytack, T., Adriaenssens, S., and Samson, R., 2012. Tree leaf wettability as passive bio-indicator of urban habitat quality. *Environmental and Experimental Botany*, 75: 277-285.
18. Kupcinskiene, E., and Huttunen, S. 2005. Long-term evaluation of the needle surface wax condition of *Pinus sylvestris* around different industries in Lithuania. *Environmental Pollution*, 137: 610-618.
19. Neinhuis, C., and Barthlott, W. 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany*, 79: 667-677.
20. Neinhuis, C., and Barthlott, W. 1998. Seasonal changes of leaf surface contamination in beech, oak, and ginkgo in relation to leaf micromorphology and wettability. *New Phytologist*, 138: 91-98.
21. Pal, A., Kulshreshtha, K., Ahmad, K.J., and Yunus, M. 2000. Changes in leaf surface structures of two avenue tree species caused by auto-exhaust pollution. *Journal of Environmental Biology*, 21: 15-21.
22. Paoletti, E., Nali, C., and Loreszini, G. 2007. Early responses to acute ozone exposure in two *Fagus sylvatica* clones differing in xeromorphic adaptations: photosynthetic and stomatal processes, membrane and epicuticular characteristics. *Environmental Monitoring and Assessment*, 128: 93-108.
23. Percy, K.E., and Riding, R.T. 1978. The epicuticular waxes of *Pinus strobus* subjected to air pollutants. *Canadian Journal of Forest Research*, 8: 474-477.
24. Reynolds, K.M., Madden, L.V., Richard, D.L., and Ellis, M.A. 1989. Splash dispersal of *Phytophthora cactorum* from infected strawberry fruit by simulated canopy drip. *Phytopathology*, 79: 425-432.
25. Rosado, B.H.P., Oliveira, R.S., and Aidar, M.P.M. 2010. Is leaf water repellency related to vapor pressure deficit and crown exposure in tropical forests? *Acta Oecol*, 36: 645-649.
26. Shepherd, T., and Griffiths, D.W. 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171: 469-499.
27. Smith, W.K., and McClean, T.M. 1989. Adaptive relationship between leaf water repellency, stomatal distribution and gas exchange. *American Journal of Botany*, 76: 465-469.
28. Stalder, A.F., Kulik, G., Sage, D., Barbieri, L., and Hoffmann, P. 2006. A Snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids and surfaces. Physicochemical and engineering aspects*, 286: 92-103.
29. Stalder, A.F., Melchior, T., Müller, M., Sage, D., Blu, T., and Unser, M. 2010. Low-bond axisymmetric sessile drops. *Colloids and surfaces. Physicochemical and engineering aspects*, 364: 72-81.
30. Wagner, P., Furstner, R., Barthlott, W., and Neinhuis, C. 2003. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *Journal Experimental Botany*, 54: 1295-1303.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Conservation and Utilization of Natural Resources, Vol. 2(2), 2014
<http://ejang.gau.ac.ir>

Methods to Observe Leaf Epicuticular Wax Layer of Trees

*F. Kardel

Assistant Professor in Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran
Received: 2014/01/31; Accepted 2014/09/23

Abstract

Leaf surface of almost all plants is covered by epicuticular wax layer. This layer protects the interior parts of leaves against environmental conditions. Destruction of this layer due to environmental factors or atmospheric pollutants will change the amount of wettability of plant leaves. Therefore, this research investigates methods for observing epicuticular wax layer of plant's leaves via scanning electron microscopy (SEM), measurement of leaf wettability, and measurement of epicuticular wax amount. Three species (*Sambucus nigra* L., *Acer Pseudoplatanus* L. and *Quercus robur* L.) were selected for this purpose. The results showed that observing epicuticular wax layer via SEM is precise but is very expensive, time-consuming and is practically difficult to do in large scale. The presence of epicuticular wax layer can be estimated by measuring the epicuticular wax amount, but this method is not able to estimate the changes of wax on leaf surface. While, by measuring the leaf wettability via measuring drop contact angle it is possible to estimate the changes on the leaf surface. Moreover, this research has shown that leaves with similar epicuticular wax structure have similar wettability. As a result of this research, among mentioned methods, measuring leaf wettability via drop contact angle is introduced as an easy, reliable, fast, and inexpensive method for observing epicuticular wax layer.

Keywords: Tree species, Epicuticular wax layer, Scanning electron microscop, Leaf wettability, drop contact angle

*Corresponding author; f.kardel@umz.ac.ir