

بررسی اثر آلاینده‌های اتمسفری بر پرولین، پروتئین و برخی از عناصر گیاهان یونجه و لوبیا (مطالعه موردی: پالایشگاه شازند اراک)

فریبا امینی*، سعید حسین آبادی و مهری عسکری

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۶/۱۶)

چکیده:

گیاهان در اثر آلودگی هوا تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک برگشت پذیر و غیربرگشت پذیری را نشان می‌دهند. بنابراین پارامترهای بیوشیمیایی می‌توانند اطلاعات ارزشمندی در مورد وضعیت فیزیولوژیک گیاهان در معرض آلودگی هوا مهیا کنند. این آزمایش به بررسی اثرات آلاینده‌های هوا بر میزان پرولین، پروتئین، کلسیم و فسفر ریشه و برگ گیاهان یونجه و لوبیا با هدف بررسی مقاومت این گیاهان نسبت به آلودگی هوا در منطقه پالایشگاه شازند اراک پرداخته است. گیاهان از دو منطقه آلوده و پاک برداشت و میزان پرولین، پروتئین، کلسیم و فسفر ریشه و برگ اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد که آلودگی هوا باعث افزایش معنی دار پرولین برگ و ریشه یونجه و لوبیا شد. همچنین آلودگی هوا باعث افزایش معنی دار غلظت پروتئین برگ و ریشه یونجه و کاهش معنی دار غلظت پروتئین برگ و ریشه گیاه لوبیا گردید. تجمع کلسیم در برگ و ریشه گیاه یونجه تحت تأثیر آلودگی هوا افزایش معنی دار نشان داد در حالی که آلودگی باعث کاهش معنی دار کلسیم برگ لوبیا شد و بر میزان کلسیم ریشه این گیاه تأثیر معنی داری نداشت. همچنین آلودگی هوا میزان فسفر ریشه یونجه را به طور معنی دار افزایش داد در صورتی که بر میزان فسفر برگ این گیاه تأثیر معنی داری نداشت و میزان فسفر برگ و ریشه گیاه لوبیا نیز تحت تأثیر آلودگی هوا به میزان معنی داری افزایش یافت. در این مطالعه افزایش پروتئین و کلسیم گیاه یونجه را می‌توان به مقاومت احتمالی این گیاه نسبت به آلودگی هوا نسبت داد و تغییرات بیوشیمیایی گیاه لوبیا حساسیت این گیاه به آلودگی هوا را در منطقه مورد مطالعه نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: آلاینده هوا، پروتئین، پرولین، عناصر، لوبیا، یونجه

مقدمه:

دی‌اکسیدسولفور (SO_2)، اکسیدهای نیتروژن (NO_x)، CO، اوزون (O_3) و فلزات سنگین به علاوه ذرات معلق می‌باشد (Assadi et al., 2011). آلاینده‌های هوا به طور منفی فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند و توان پاسخ آنها را نسبت به دیگر تنش‌ها نیز کاهش می‌دهند. گیاهان مختلف نسبت به آلودگی هوا حساسیت های متفاوتی را نشان می‌دهند (Breusgem et al., 2001).

در طول چند دهه اخیر در نتیجه‌ی افزایش صنعتی شدن و شهرنشینی، آلودگی هوا به یک تنش محیطی جدی برای محصولات کشاورزی تبدیل شده است (Rajput and Agrawal, 2004). آلاینده‌های صنعتی از صنایعی مانند نیروگاه‌ها، پالایشگاه‌ها و پتروشیمی‌ها متصاعد می‌شوند و بیشتر آلاینده‌های خطرناک منتشر شده در مناطق صنعتی شامل:

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: F-Amini@araku.ac.ir

در این گیاهان هدف این تحقیق بوده است.

مواد و روش‌ها:

در این تحقیق برای مطالعه اثر آلودگی هوا بر گیاهان زراعی یونجه (*Medicago sativa*) و لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، دو منطقه یکی به عنوان منطقه آلوده و دیگری منطقه پاک یا کنترل انتخاب گردید. زمین‌های زراعی روستای کزاز در مجاورت منطقه صنعتی پالایشگاه نفت شازند اراک واقع در ۲۵ کیلومتری غرب اراک با موقعیت جغرافیایی ۴۹ درجه و ۲۷ دقیقه طول شرقی و ۳۳ درجه و ۵۹ دقیقه عرض شمالی و با ارتفاع ۱۸۹۰ متر از سطح دریا به عنوان منطقه آلوده و منطقه حفاظت شده هفتاد قله واقع در ۳۵ کیلومتری شرق شهر اراک با توجه به اطلاعات موجود در سازمان حفاظت محیط زیست استان مرکزی به عنوان منطقه پاک در نظر گرفته شدند. برگ و ریشه هر دو گیاه یونجه و لوبیا از دو منطقه پاک و آلوده به صورت همزمان در شهریور ماه سال ۱۳۹۱ نمونه‌گیری شد. بدین ترتیب که برای هر گیاه ۳-۵ تکرار از هر اندام (ریشه و برگ‌های بالغ و میانی گیاه) به صورت کاملاً تصادفی نمونه‌برداری شد و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل گردیدند و پس از شستشوی برگ و ریشه نمونه‌های گیاهی اندازه‌گیری‌های مورد نظر انجام گرفت. اسیدآمین پرولین به روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. به منظور استخراج پروتئین محلول کل، ۰/۵ گرم از برگ و ریشه گیاهان به طور جداگانه وزن و پس از افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (Tris- HCl, 50 mM; (*Phenylmethylsulphonyl fluoride*) PMSF, 1mM; EDTA, 2mM; Mercaptoethanol, 1mM; pH 7.2) روی یخ ساییده شدند و با سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس محلول رویی به اپندروف‌های جدید انتقال یافته و یکبار دیگر به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از این محلول به منظور اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول کل به روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری کلسیم از روش Bao (۱۹۸۱) استفاده گردید. ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی در ارلن با حجم ۲۵ میلی‌لیتر ریخته و ۵

وقتی آلاینده‌ها به وسیله گیاهان جذب می‌شوند باعث تغییراتی در محتوای ترکیبات بیوشیمیایی از جمله پروتئین‌ها، پرولین و همچنین عناصر گیاه می‌شوند. بنابراین محتوای پروتئین و دیگر شاخص‌های بیوشیمیایی می‌توانند اطلاعات ارزشمندی در مورد وضعیت فیزیولوژیک گیاهان در معرض آلودگی هوا را مهیا کنند (Assadi et al., 2011). بعضی تنش‌های محیطی مانند دمای بالا و پایین، خشکی، آلودگی خاک، آب و آلودگی هوا می‌توانند باعث افزایش انواع اکسیژن واکنشگر (ROS) در سلول‌های گیاهان شوند. که نهایتاً واکنش‌هایی را ایجاد می‌کنند که برای همه موجودات و به خصوص گیاهان، سمی هستند (Pukacka and Pukacki, 2000). گزارش شده که پرولین به عنوان یک جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد برای حفاظت گیاهان از آسیب‌های تنش اکسیداتیو عمل می‌کند (Wang et al., 2009). تجمع پرولین در انواع مختلفی از گیاهان در حضور تنش‌های مختلف اتفاق می‌افتد مثلاً "تجمع پرولین در برگ‌های گیاهانی که در تنش‌های گاز SO₂ و فلزات سنگین بوده‌اند گزارش شده است (Tankha and Gupta, 1992). همچنین تنش‌های اکسیداتیو مختلف از قبیل آلودگی هوا ممکن است میزان ROS را در گیاهان بالا ببرند که باعث ایجاد آسیب جدی در ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها می‌شود (Mecord, 2000). در اثر آلاینده‌هایی چون O₃ و SO₂ اکسیداسیون پروتئین‌ها در گیاه ایجاد می‌شود. از زمانی که O₃ و SO₂ شروع به اکسیداسیون ترکیبات سلول می‌کنند یک سری تغییرات در سطح پروتئین‌ها ایجاد می‌شود که می‌تواند به طور ویژه نشان‌دهنده‌ی عملکرد پراکسیداتیو آلاینده‌های هوا باشد (Mehlhorn et al., 1986). آلودگی هوا با توجه به انواع آلاینده‌ها باعث تغییر در محتوای عناصر برگ و ریشه گیاه نیز می‌شود. معمولاً در گیاهان مقاوم نسبت به آلودگی هوا میزان بعضی از عناصر از جمله کلسیم افزایش می‌یابد. مقدار کمتر عناصر مغذی در گیاهان حساس نسبت به آلودگی هوا یکی از دلایل اصلی آسیب‌های فیزیولوژیکی به گیاهان است (Guderian, 1977). بررسی میزان مقاومت گیاهان زراعی یونجه و لوبیا نسبت به آلودگی هوا در منطقه پالایشگاه شازند اراک با تکیه بر میزان پرولین، پروتئین و عناصر کلسیم و فسفر

معنی دار بود (شکل ۱ a و b).

آلودگی هوا باعث افزایش معنی‌دار غلظت پروتئین برگ و ریشه یونجه به ترتیب به میزان ۲۳/۴٪ و ۲۶/۷٪ ولی کاهش معنی‌دار غلظت پروتئین برگ و ریشه گیاه لوبیا به ترتیب به مقدار ۳۴/۲٪ و ۲۹/۵٪ شد (شکل ۱ c و d).

تجمع کلسیم در برگ و ریشه گیاه یونجه تحت تأثیر آلودگی هوا به ترتیب ۷۰/۵٪ و ۶٪ افزایش معنی‌دار نشان داد در حالی که آلودگی هوا باعث کاهش معنی‌دار (در سطح ۰/۵٪) کلسیم برگ لوبیا به میزان ۲۸/۳٪ شد و بر میزان کلسیم ریشه لوبیا تأثیر معنی‌داری نداشت (شکل ۲ a و b).

همچنین آلودگی هوا میزان فسفر ریشه یونجه را به طور معنی‌دار (در سطح احتمال ۰/۵٪) به مقدار ۴۴/۶٪ افزایش داد در صورتی که بر میزان فسفر برگ این گیاه تأثیر معنی‌داری نداشت. میزان فسفر برگ و ریشه لوبیا نیز تحت تأثیر آلودگی هوا به ترتیب ۶/۱٪ و ۵۷/۴٪ افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۲ c و d).

بحث:

وقتی که گیاهان در معرض آلاینده‌های هوا قرار می‌گیرند قبل از نشان دادن آسیب‌های قابل رؤیت در برگ‌ها، تغییرات فیزیولوژیکی را متحمل می‌شوند که می‌توانند به عنوان شاخص‌های اولیه برای بررسی اثرات زیان‌آور آلودگی هوا بر گیاهان استفاده شود (Liu and Ding, 2008). تحقیقات زیادی افزایش اسیدآمینو پرولین را تحت تنش آلودگی هوا نشان داده است که موافق با نتایج بدست آمده در این مطالعه است. در مطالعه ای که بر روی گیاه *Eucalyptus camaldulensis* رشد یافته در منطقه آلوده صورت گرفت پرولین برگ‌های این گیاه در منطقه آلوده به‌طور معنی‌دار ($P < 0.01$) افزایش یافت که این افزایش در گیاهان منطقه آلوده نسبت به منطقه پاک ۳۵۵/۶۲ درصد افزایش داشت (Seyyednejad and Koochak, 2011). افزایش میزان پرولین در دو گونه *Populus robusta* و *Populus hybrida* نیز تحت تأثیر آلاینده‌های هوا مشاهده شده است. بررسی‌ها نشان داده است که علت افزایش پرولین، آزاد شدن مقادیر زیادی از یونهای سمی از جمله آمونیوم می‌باشد و واکنش آمونیوم با آلفاکتوگلو تارات و تشکیل حدواسط گلو تانات

میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. سپس ۲/۴ میلی‌لیتر NaOH ۲/۵ نرمال و ۰/۰۶ گرم پودر مورکسید به آن افزوده و با EDTA (اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید) ۰/۰۲ نرمال تیترا گردید تا رنگ قرمز ارغوانی ثابتی به دست آمد. در پایان میزان کلسیم براساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$X = V_2 * 0.4 * 21 / A * B$$

X میزان کلسیم موجود در برگ و ریشه گیاهان شاهد و آلوده (mg/gDw)، V_2 حجم مصرفی EDTA ۰/۰۲ نرمال، A حجم کل مواد قبل از اضافه کردن EDTA و B میزان ماده خشک مصرفی بر حسب گرم می‌باشد.

اندازه‌گیری فسفر با کمک روش Kohler و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت. ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با آمونیاک ۱ به ۱ خنثی گردید. سپس ۰/۲۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۱ به ۲ و ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف وانادات مولیبدات اضافه گردید و حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول‌ها و نمونه‌های استاندارد در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و مقدار فسفر بر حسب میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ و ریشه محاسبه شد. آزمایشات انجام شده برای هر گیاه در سه تا پنج تکرار براساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS16 و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون T تست استفاده گردید. محاسبه احتمال معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح ۵ درصد انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج:

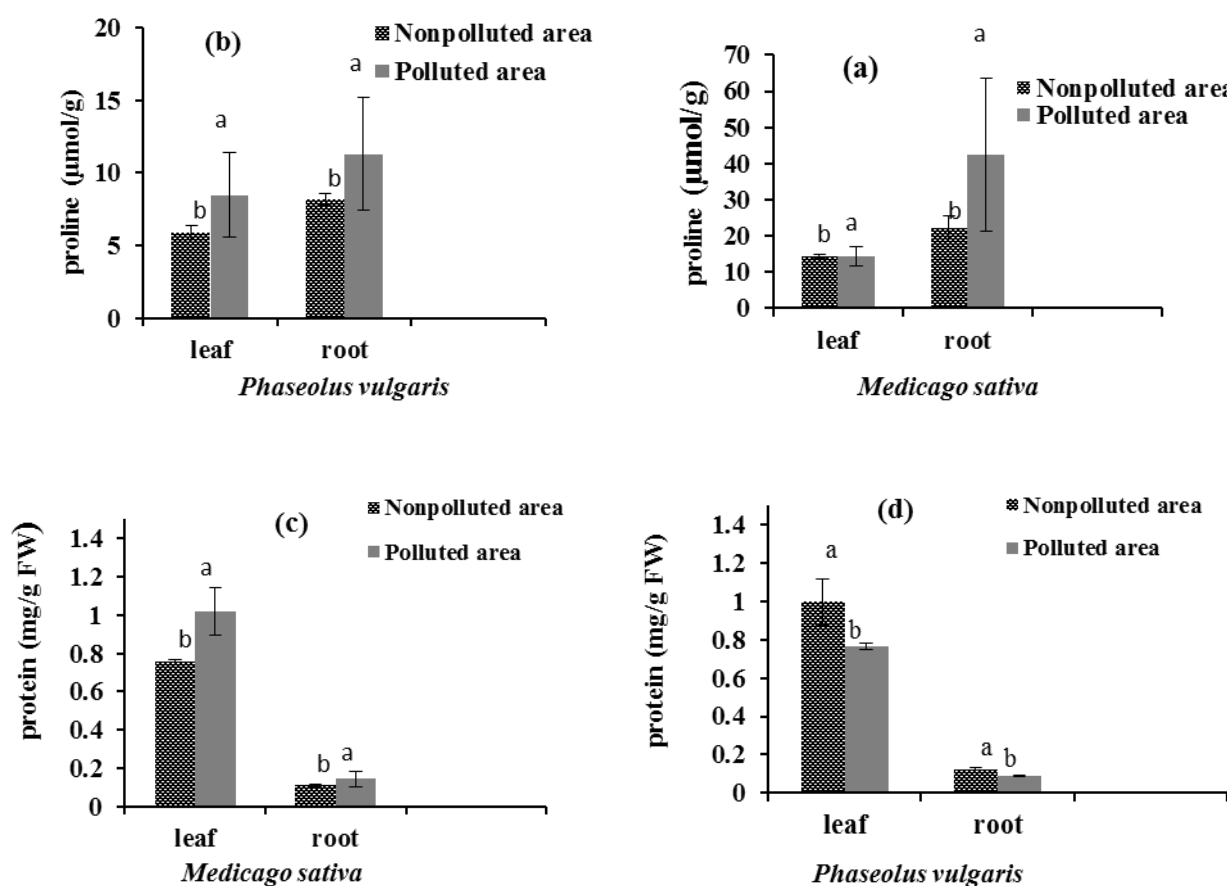
آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که آلودگی هوا بر تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده برگ و ریشه یونجه به جز فسفر برگ در سطح ۰/۵٪ معنی‌دار بود. در گیاه لوبیا نیز تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده به جز کلسیم ریشه تحت تأثیر آلودگی هوا تغییر معنی‌داری داشتند (جدول ۱).

غلظت پرولین برگ و ریشه یونجه در منطقه آلوده به طور معنی‌دار (در سطح احتمال ۰/۵٪) نسبت به منطقه پاک افزایش یافت. پرولین برگ و ریشه گیاه لوبیا نیز تحت تأثیر آلودگی هوا به ترتیب ۴۴/۲٪ و ۳۷/۹٪ افزایش یافت که این افزایش نیز

جدول ۱- نتایج آنالیز واریانس تأثیر آلودگی هوا بر میزان پرولین، پروتئین و عناصر کلسیم و فسفر ریشه و برگ گیاهان یونجه و لوبیا با آنالیز T تست

واریانس	پرولین برگ	پرولین ریشه	پروتئین برگ	پروتئین ریشه	کلسیم برگ	کلسیم ریشه	فسفر برگ	فسفر ریشه
F(یونجه)	۱۰/۶۸۱*	۹/۷۳۶*	۱۳/۶۹۲*	۸/۸۱۱*	۷/۸۱۸*	۱۱/۶۳۳*	۱/۳۷۵ ^{ns}	۱۱/۰۰۹*
F(لوبیا)	۱۱/۰۰۶*	۱۲/۵۳۰*	۱۲/۰۶۹*	۱۰/۲۸۶*	۹/۵۴۲*	۰/۰۱۳ ^{ns}	۱۱/۵۰۴*	۱۴/۹۰۱*

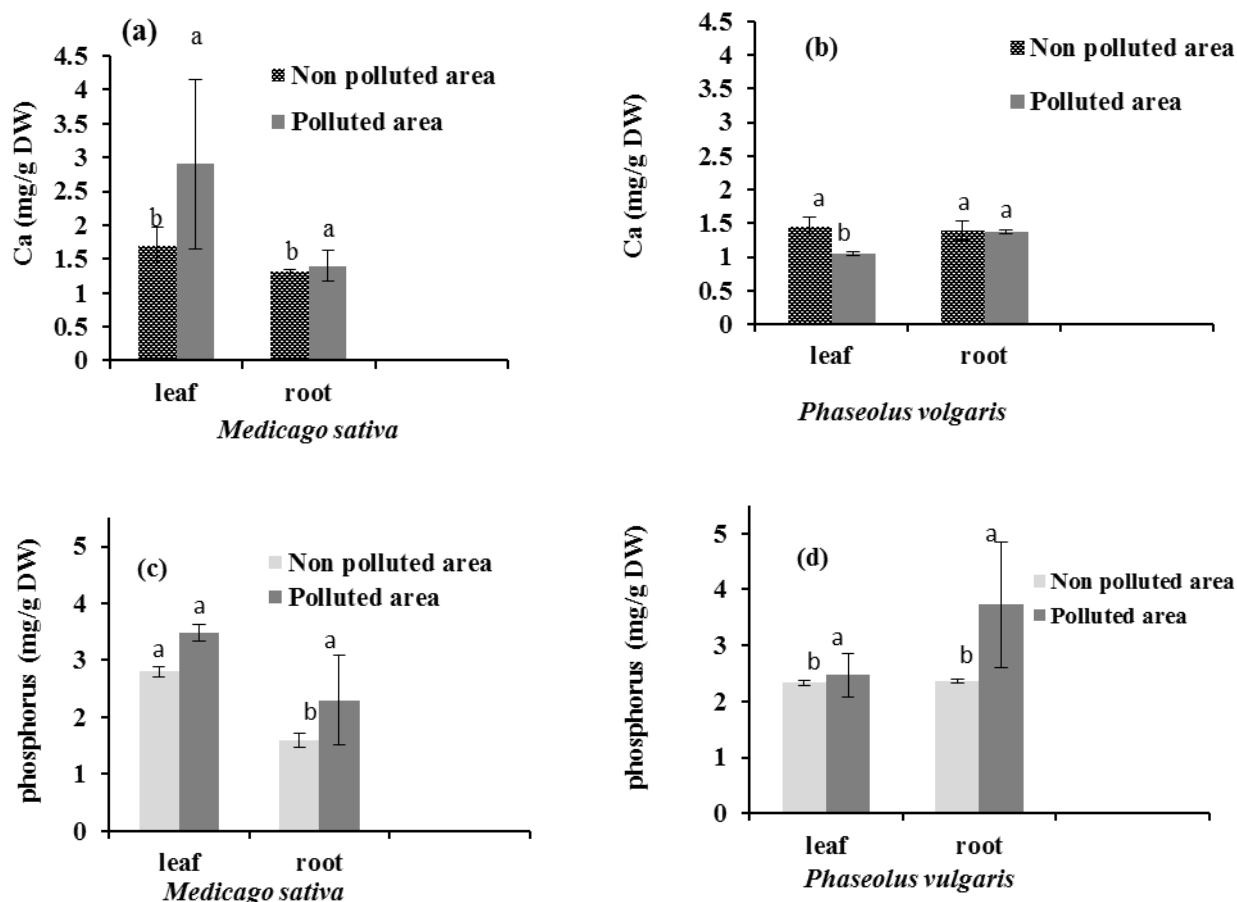
*: معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ^{ns} معنی دار نیست



شکل ۱- تغییرات پرولین (a) یونجه و (b) لوبیا و تغییرات پروتئین (c) یونجه و (d) لوبیا در منطقه آلوده و منطقه پاک. خطوط خطا نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی دار بودن در سطح احتمال ۵٪ براساس روش T تست می باشد و برای هر اندام جداگانه محاسبه شده است.

بخشی از مسیر سنتزی پرولین می باشد (Karolewski, 1989). همچنین گزارش شده است که پرولین به عنوان یک جمع کننده رادیکالهای آزاد برای حفاظت گیاهان از آسیب های تنش اکسیداتیوی مانند آلودگی هوا عمل می کند و یک اسمولیت عمومی تجمع یافته در پاسخ به تنش های متعدد است و ممکن است در واکنش های دفاعی گیاه نیز نقش داشته باشد (Khatab, 2007). تجمع پرولین در سلول ها ممکن است به دلیل کاهش تخریب پرولین، افزایش سنتز پرولین و یا هیدرولیز پروتئین ها اتفاق افتد (Assadi et al., 2011). در تحقیق حاضر مقدار پروتئین کل در هر دو اندام برگ و ریشه گیاه یونجه ی رشد کرده در منطقه آلوده افزایش معنی داری نسبت به گیاهان مشابه منطقه پاک داشت در حالی که در

در هر دو اندام برگ و ریشه گیاه لوبیا، افزایش معنی داری نسبت به گیاهان مشابه منطقه پاک داشت در حالی که در



شکل ۲ - تغییرات تجمع یون کلسیم (a) یونجه و (b) لوبیا و تجمع فسفر (c) یونجه و (d) لوبیا در منطقه آلوده و منطقه پاک. خطوط خطا نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی دار بودن در سطح احتمال ۵٪ براساس روش T تست می‌باشد و برای هراندام جداگانه محاسبه شده است.

(Mecord, 2000). تخریب و شکستن پروتئین‌های موجود در گیاه به اسیدآمین‌های سازنده‌شان به عنوان مهمترین علت کاهش میزان پروتئین در آلودگی هوا شناخته شده است (Tripathi and Gautam, 2007). همچنین گزارش شده است که افزایش میزان پروتئین در گیاهان مقاوم تحت تنش آلاینده‌ها به خصوص SO₂ نیز می‌تواند به واسطه تحریک سنتز آمینواسیدهای حاوی گوگرد توسط این گاز باشد (Sardi, 1981). مشخص شده است که گیاهانی که به آلودگی هوا مقاوم‌تر هستند مقادیر بیشتری از عنصر کلسیم را در بافت‌های خود انباشته می‌کنند (Akram and El-yemeni, 2010) در برگ‌های گیاهان *Quercus cerris* و *Tilia argentea* نیز تجمع یون کلسیم در مناطق آلوده گزارش شده است (Tzvetkova and Kolarov, 1996). برعکس کاهش میزان

لوبیا در هر دو اندام کاهش معنی داری در مقدار پروتئین گیاهان منطقه آلوده مشاهده گردید. در گیاه *Cassia fistula* میزان پروتئین در منطقه آلوده نسبت به منطقه شاهد ۳۳/۸ درصد کاهش یافت در صورتی که میزان پروتئین گیاهان *Heliotropium baceiferum* و *Tevetia neralfoia* در مناطق آلوده نسبت به منطقه شاهد افزایش داشت (Akram and El-Yemeni, 2010). بنابراین بسته به گونه گیاهی میزان پروتئین، تحت تنش آلودگی هوا تغییرات متفاوتی دارد. تنش‌های اکسیداتیو مختلف از قبیل آلودگی هوا ممکن است میزان ROS را بالا ببرند که باعث ایجاد آسیب جدی به ماکرومولکول‌های آلی مانند پروتئین‌ها می‌شود مثلاً تعدادی از آلاینده‌های هوا مانند دی‌اکسیدسولفور، دی‌اکسیدنیتروژن و ازون از طریق تولید ROS باعث کاهش پروتئین گیاه می‌شوند

میزان معنی‌داری بیشتر از منطقه پاک مشاهده گردید. اسیدیت به بالاتر خاک در منطقه آلوده و به ویژه در مناطق صنعتی برای در دسترس بودن فسفر مناسب است و این عنصر به خوبی قابل تبادل و انتقال است و غلظت برگی آن مرتبط با فعالیت فیزیولوژیک بالا در شروع دوره رشد است. انباشتگی فسفر در برگ‌های گیاهان آلوده با مصرف انرژی بیشتر برای فرایندهای سازگاری مرتبط است (Tzvetkova and Kolarov, 1996).

از آنجا که گیاهانی که به آلودگی هوا مقاوم‌تر هستند مقادیر بیشتری از عنصر کلسیم را در بافت‌های خود انباشته می‌کنند و با توجه به اینکه در این مطالعه مقدار عنصر کلسیم در گیاه لوبیا در اثر آلودگی هوا کاهش یافته است و گیاه یونجه کلسیم بیشتری را در منطقه آلوده در برگ و ریشه انباشته نموده است می‌توان گفت که احتمالاً لوبیا به آلودگی هوا حساس و یونجه نسبت به این نوع آلودگی مقاوم می‌باشد همچنین افزایش پروتئین گیاه یونجه را در منطقه آلوده می‌توان به مقاومت این گیاه نسبت به آلودگی هوا نسبت داد البته بررسی کیفی پروتئین‌های مقاوم نسبت به تنش آلودگی هوا و سایر بررسی‌های مولکولی دقیق‌تر می‌تواند موجب تایید این نتیجه‌گیری گردد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

کلسیم در برگ‌های گیاه *Q. Cerris* که در منطقه آلوده رشد کرده بود به‌وسیله دیگر محققان گزارش شده است (Konecna et al., 1989). در تحقیق حاضر نیز در گیاه یونجه رشد یافته در منطقه آلوده در هر دو اندام ریشه و برگ مقدار کلسیم افزایش معنی‌داری داشت در حالی که کلسیم برگ لوبیای منطقه آلوده کاهش معنی‌داری را نشان داد و مقدار کلسیم ریشه این گیاه در همان منطقه بدون تغییر باقی ماند. ثابت شده است که سازگاری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی مانند آلودگی هوا نیازمند تنظیم درون سلولی سطوح کلسیم است. اسیدیت به بالای خاک در مناطق صنعتی با شسته شدن شدید عناصری مانند کلسیم از برگ‌های گیاهان مرتبط است و مقدار کم این عنصر به‌عنوان یکی از دلایل صدمات فیزیولوژیک در گیاهان تحت تنش آلودگی هوا عنوان شده است (Hirschi, 2004).

اگرچه مقدار فسفر ریشه یونجه رشد یافته در منطقه آلوده مورد مطالعه در این تحقیق افزایش معنی‌داری نسبت به فسفر گیاهان منطقه پاک داشت، در برگ این گیاه تفاوت معنی‌داری بین میزان فسفر دو گیاه مناطق آلوده و پاک مشاهده نگردید. در بیشتر گونه‌های گیاهی مطالعه شده مانند *Carpinus betulus* و *Ailanthus glandulosa* برگ‌های گیاهان در منطقه با آلودگی هوا مقدار بالاتری از فسفر را در بافت‌های خود انباشته کردند. در حالی که در گیاهان *Tilia argentea* و *Quercus cerris* میزان فسفر بخش هوایی در منطقه آلوده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Tzvetkova and Kolarov, 1996). در گیاه لوبیا نیز در منطقه آلوده مقدار فسفر در هر دو اندام ریشه و برگ به

منابع:

- methods for soil and agriculture chemistry (ed. Bao S. D.) Pp. 150-160. China Agriculture Press, Beijing.
- Bradford, M. N. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Guderian, R. (1977) Air pollution. Phytotoxicity of acidic gases and its significance in air pollution control. *Ecol. Stu.*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 22: 150-257.
- Hirschi, D. (2004) The calcium conundrum, both versatile nutrient and specific signal, *Plant Physiology* 136: 2438-2442.
- Akram, A. and El-yemeni, M. (2010) Atmospheric air pollution effects on some exhibited plants at aljubail industrial city, Ksa. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4:1251-1263.
- Assadi, A., Ghasemi pirpaluti, A., Malekpoor, F. and Teimori, N. (2011) Impact of air pollution on physiological and morphological characteristics on *Eucalyptus camaldulensis* Den. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9: 676-679.
- Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Bao, S. D. (1981) Determination of cation. In: *Analytic*

- antioxidants in conifers. *Plant Physiology*. 82: 336-338.
- Rajput, M. and Agrawal, M. (2004) Physiological and yield responses of pea plants to ambient air pollution. *Indian journal of plant physiology* 9: 9-14.
- Sardi, K. (1981) Changes in the soluble protein content of soybean (*Glycine max* L.) and pean (*Pisum sativum* L.) under continuous SO₂ and soot pollution. *Environmental Pollution* 25: 181-186.
- Seyyednejad, S. M and Koochak, H. (2011) A studies on air pollution-induced biochemical alteration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Australian Journal of Basic and Sciences* 5: 601-606.
- Tankha, K. and Gupta, R. K. (1992) Effect of water deficit and SO₂ on total soluble protein, nitrate reductase activity and free proline content in sun flower leaf. *Biologia Plantarum* 34: 305-310.
- Tripathi, A. K. and Gautam, M. (2007) Biochemical parameters of plants as indicators of air pollution. *Journal of Environmental Biology* 28:127-133.
- Tzvetkova, N. and Kolarov, D. (1996) Effect of air pollution on carbohydrate and nutrient concentration in some deciduous tree spicies. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 22: 53-63.
- Wang, F., Zeng, B., Sun, Z. and Zhu, C. (2009) Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Arch. Environmental Contamination Toxicology* 56: 723-731.
- Karolewski, P. (1989) Free proline content and susceptibility of poplar (*Populus*) cuttings to the action of SO₂, NaCl and PEG at different temperatures. *Environmental Pollution* 57: 307-315.
- Khattab, H. (2007) The deffence mechanism of cabbage plant against phloem- stuching aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Australian Journal Basic Applied Sciences* 1: 56-62.
- Kohler, J., Caravaca, F. and Roldan, A. (2007) Interactions between a plant growth promoting *rhizobacterium*, an AM fungus and phosphate-solublising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology* 35: 480-487.
- Konecna, B., Fricand, F. and Masrovicova, E. (1989) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and protein content in pollution damaged leaves of three oak species. *Photosynthetica* 23; 566-574.
- Liu, Y.J. and Ding, H. (2008) Variation in air pollution tolerance index of plants near a steel factory: Implication for landscape-plant species selection for industrial areas. *Wseas Trans. Environmental Development* 4: 24-32.
- Mecord, J.M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 108: 652-659.
- Mehlhorn, H., Seufert, G., Schmidt, A. and Kunert, K. J. (1986) Effect of SO₂ and O₃ on production of