

مقایسه آلرژی زایی گرده های بالغ و نابالغ گیاه بومادران در خوکچه هندی

لیلا امجد^{۱*}، دکتر احمد مجد^۲، دکتر فتح ... فلاحیان^۳، دکتر سارا سعادت مند^۴

۱- دانشجوی دکتری علوم گیاهی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

۲- استاد، گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۳- استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۴- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

تاریخ دریافت ۸۶/۱۰/۳، تاریخ پذیرش ۸۶/۱۱/۱۶

چکیده

مقدمه: دانه های گرده، گامتوفیت های نر گیاهان گلدار هستند که با دخالت خود در لقاح، نقش بنیادی در باروری گیاهان، ازدیاد محصول و بهبود کیفی آن دارند. گرده ها از عوامل مهم آلرژی زای گیاهی هستند و حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد از آلرژن های گیاهی خاستگاه گرده ای دارند. گیاه بومادران از گیاهان دارای کاربردهای دارویی است که در مناطق مختلف کشور می روید و مورد استفاده می باشد. پژوهش حاضر به منظور کسب آگاهی های علمی در مورد آلرژی زایی دانه های گرده این گیاه در مراحل تکوین گرده ها، و مقایسه آلرژی زایی دانه های گرده نا بالغ و بالغ آنها انجام شده است.

روش کار: در این پژوهش تجربی (آزمایشگاهی) ابتدا دانه های گرده گیاه بومادران در مراحل مختلف تکوین گل ها از مناطق اطراف شهر اصفهان جمع آوری شدند. بررسی مقایسه ای ویژگی های گرده شناختی دانه های گرده به کمک میکروسکوپ های نوری و الکترونی و با استفاده از روش های شفاف سازی و نیز استولیز گرده ها انجام شد. فراساختار اسپورودرم و ویژگی های ریختی تکمیلی گرده ها به کمک میکروسکوپ های الکترونی نگاره بررسی شد. عصاره های گرده ای با استفاده از بافر فسفات نمکی در PH: ۷/۴ تهیه شدند. آزمون های آلرژی زایی بر روی خوکچه های هندی نر نژاد هارتلی با وزن تقریبی ۵۰۰-۳۵۰ گرم و سن ۴ تا ۶ هفته انجام شد و الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد صورت گرفت. در تحلیل اطلاعات از آنالیز واریانس یک عاملی و آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج: تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ های نوری و الکترونی، گرده ها را از نوع بیضی -کروی، دو شیاری با اگزینی دارای آراستار خاردار نشان دادند. در آزمون های پوستی بر روی خوکچه های هندی تحت تیمار با عصاره های گرده ای، قطر تورم افزایش قابل ملاحظه ای را نسبت به نمونه های شاهد نشان داد. همچنین در آزمون های کلینیکی با بررسی تعداد ائوزینوفیل ها، نوتروفیل ها و میزان ایمونوگلوبولین E در خوکچه های هندی تحت تیمار با عصاره های گرده ای، تغییرات معنی داری نسبت به نمونه های شاهد وجود داشت. در نیمرخ های الکترو فورزی پروتئین ها، در گرده های نابالغ، حدود ۵ باند پروتئینی کم رنگ تر در محدوده ۱۴/۴ تا ۴۵ کیلو دالتون و در گرده های بالغ، حدود ۶ باند پروتئینی مشخص تر در محدوده ۱۴/۴ تا ۶۶ کیلو دالتون دیده شد.

نتیجه گیری: مجموعه نتایج این پژوهش، تغییرات ریخت شناسی گرده های نابالغ از حالت بیضی به حالت کروی در گرده های بالغ، افزایش نسبی تراکم و بلندی خارهای سطح اگزین، تغییرات کمی و کیفی پروتئین های محلول دانه های گرده نابالغ و بالغ و نیز تفاوت در شدت آلرژی زایی آنها را نشان می دهد.

واژگان کلیدی: بو مادران، دانه های گرده، آلرژی زایی، پروتئین

* نویسنده مسئول: اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی

Email: amjadsadra@yahoo.com

مقدمه

دانه های گرده، گامتوفیت های نر بوده و مواد ژنتیکی نر را در تولید مثل جنسی منتقل می کنند. برای انجام عمل لقاح اغلب به هوا رها شده و بخشی از فلور طبیعی هوا در همه فصول را تشکیل می دهند. اما به طور کلی فصول گرده ای بین مناطق مختلف به دلیل اختلاف در آب و هوا، توپوگرافی و روش ها متفاوت است. در زمستان و اوائل بهار گرده درختان، در بهار و اوائل تابستان گرده گندمیان و در پاییز گرده علف های هرز تیپ غالب گرده ای است. در آب و هوای معتدل در بهار و اوائل تابستان تراکم گرده ها بیشتر است. وقتی افراد حساس، هوای واجد گرده را تنفس می کنند علائم تب یونجه و آسم را به میزان بالایی نشان می دهند. این علائم به وسیله حضور ترکیبات متنوع از جمله برخی پروتئین ها و گلیکوپروتئین ها که به عنوان آلرژن عمل می کنند شروع می شوند. این ترکیبات با سیستم ایمنی انسان برهم کنش نموده و پاسخ آلرژیک را به صورت سرفه، عطسه، آبریزش و گرفتگی بینی، سرگیجه، تب و ... ایجاد می کنند (۱). دانه های گرده، مانند دیگر سلول های گیاهی دارای برخی انواع پروتئین ها هستند که فقط تعداد کمی از این پروتئین ها آلرژی زا (آلرژن) می باشند. این آلرژن ها وزن مولکولی مشابه آنزیم ها یعنی حدود ۷۰-۱۰ کیلو دالتون را دارند (۱). مطالعات پژوهش گران متعدد نشان داده است که آلرژن های گرده ای در بخش های متفاوت گرده ها از جمله: زمینه سیتو پلاسم، انتین، آگزین، ذرات نشاسته ای و... وجود دارند. مطالعات نشان می دهند که در گرده های نابالغ هیچ باند آلرژنی وجود ندارد و تفاوت پروتئین های محلول گرده، بین دانه های گرده بالغ و نابالغ تفاوتی وابسته به مقدار و تعداد باندهای پروتئینی است (۲-۴). حداقل سه محرک برای رهایی آلرژن های گرده ای وجود دارد:

۱- رطوبت نسبی زیاد هوا ۲- طوفان های تندی شدید و باران های سنگین ۳- آلایندگی هوا. در رطوبت زیاد، آلرژن های گرده ای در فرآیندی مشابه با شرایط فیزیولوژیک گرده افشانی رها می شوند (۵). دانه های گرده رها شده از گیاهان در طی فصل گل دهی و گرده افشانی از

عوامل عمده تب یونجه، آسم آلرژیک و درماتیت های آلرژیک هستند که این علایم در مناطق دارای آلایندگی های صنعتی و موتوری بیشتر است (۸-۶). در شرایط آلودگی هوا برهم کنش ذرات آلایندگی با دانه های گرده منجر به فعال شدن اولیه دانه های گرده شده که در شرایط رطوبت، آتروسول های آلرژیک را رها می کنند. این ذرات وارد مجاری تنفسی شده و می توانند به عنوان حامل ذرات آلایندگی نیز عمل نمایند. بنابراین در مناطق با آلودگی زیاد، مواد ذره ای نه فقط آلایندگی بلکه آلرژن های حاصل از گرده را نیز حمل می کنند. برعکس، دانه های گرده نه فقط آلرژن ها را حمل می کنند بلکه آلایندگی را نیز منتقل می نمایند (۱، ۹، ۱۰).

برخی پژوهش گران گزارش کرده اند که مواد آلایندگی دارای اثر وابسته یا همراه (ادجوان) تحریکی بر روی تولید آنتی بادی های E و G هستند (۱۱). بنابراین اهمیت رهایی مولکول های آلرژن به محیط آن است که این ذرات می توانند به مواد ذره ای آلایندگی متصل شوند و بدین شکل سبب تغلیظ آلرژن ها شوند. این مکانیزم یکی از علل افزایش آسم در شهرهای آلوده می باشد (۴-۲، ۶، ۷، ۱۲، ۱۳). دانه های گرده از عوامل مهم در شیوع بیماری های آلرژیک هستند و پراکندگی آنها در اوایل و اواخر فصل گل دهی حساسیت های متفاوتی را در افراد ایجاد می کند. با توجه به پراکندگی بسیار زیاد گیاه بومادران در نقاط مختلف ایران و هم چنین چرخه گل دهی آن که به طور معمول از اواسط بهار شروع شده و تا اواسط تابستان ادامه دارد، پژوهش حاضر با هدف بررسی های بیشتر در مورد مراحل تکوینی دانه های گرده، آگاهی از وضعیت پروتئین کل در دانه های گرده بالغ و نابالغ و هم چنین مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز گرده ها و تا حد امکان شناخت وابستگی آلرژنی زایی دانه های گرده با مراحل تکوین آنها تدوین و انجام شده است تا ضمن کسب آگاهی های علمی پایه ای بتوان بارعایت های علمی به استفاده بهینه از این گیاه دست یافت.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی (آزمایشگاهی) بوده و بر روی خوکیچه های هندی انجام گرفته است. به طوری که ابتدا، دانه های گرده از مناطق اطراف شهر اصفهان (در ۱۰۰ کیلومتری اصفهان - شهر کرد) جمع آوری شده و سپس توسط مش با منافذی به اندازه ۳۰ میکرومتر جدا سازی شدند. پس از تثبیت نمونه ها با فیکساتور فرمالدئید - اسید استیک - اتانول (FAA) و اعمال روش های متداول سلول - بافت شناختی، از نمونه های قالب گیری شده در پارافین، برش هایی به ضخامت ۸ تا ۱۰ میکرومتر تهیه و پس از رنگ آمیزی با سافرانین - سبز روشن^۱، به وسیله میکروسکوپ نوری زایس مطالعه و عکس برداری شدند. هم چنین دانه های گرده را بر روی پایه های آلومینیومی که قبلاً به چسب آغشته شده بودند پخش کرده و پس از پوشش دهی توسط طلا^۲، با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) متصل به کامپیوتر (مدل Philips-xl30) مطالعه و عکس برداری شد. عصاره های گرده ای با خیسانیدن گرده ها در محلول بافر فسفات نمکی با PH: ۷/۴ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد تهیه و در ۱۰۰۰۰ گرم به مدت ۴۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند (۱۴). روشناور حاصل تا زمان استفاده در ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای انجام آزمون های آلرژی زایی، ۲۴ سر خوکیچه هندی نر از نژاد هارتلی به وزن تقریبی ۵۰۰-۳۵۰ گرم و سن ۴ تا ۶ هفته از انستیتو پاستور تهران خریداری و در اتاقی با دمای ۲۵ ± ۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش در سه گروه (هر گروه، ۸ سر) قرار گرفتند و توسط ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گرده ای (مشمول بر ۵۰ میکرو گرم پروتئین در بافر فسفات نمکی) به مدت ۵ هفته (در هر هفته ۱ تزریق) حساس شدند (۲، ۱۵). کنترل منفی، تزریق بافر فسفات نمکی بود. عصاره ها به صورت درون صفاقی در ناحیه شکم به هر خوکیچه هندی تزریق شد. قطر تورم در نمونه های شاهد و تحت تیمار اندازه گیری شد. برای انجام

آزمون های کلینیکی و سرولوژی، خون مستقیماً از قلب خوکیچه های تحت تیمار و شاهد گرفته شد (۱۶). شمارش تعداد ائوزینوفیل ها و نوتروفیل های خون انجام شد و میزان Ige خون (تست Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) در سرم خون حیوانات اندازه گیری شد و آنالیز آماری داده ها انجام گرفت. در تمام طول آزمایش، کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل کنترل و نظارت بر روی حیوانات آزمایشگاهی و حداقل آزار به آنها انجام شد. برای بررسی پروتئین ها، ژل پلی آکریل امید ۱۲ درصد تهیه گردید (۱۷). پروتئین های محلول در بافر نمونه شامل: ۰/۱۲۵M Tris-HCl، PH-6.8، SDS، ۴ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد، β مرکاپتواتانول ۱۰ درصد و بروموفنل بلو ۰/۱ درصد ریخته شدند و به مدت ۳ تا ۴ دقیقه در حرارت ۱۰۰ سانتی گراد قرار گرفتند، در نهایت نمونه ها برای تزریق به درون ژل آماده شدند. غلظت پروتئینی عصاره گرده ها نیز توسط روش براد فورد اندازه گیری شد (۱۸).

در این تحقیق برای مقایسه کمیت های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک عاملی، و آزمون دانکن جهت اختلافات بین گروهی استفاده شده است.

نتایج

بررسی مراحل تکوینی دانه های گرده گیاه بومادران^۳ نشان داد که در بساک های نابالغ، میکروسپورهای جوان در حال نمو شکلی کم و بیش نامنظم و چروکیده دارند و سلول های لایه مغذی^۴ از نوع ترشخی در اطراف میکروسپورهای جوان دیده می شوند. برخی از میکروسپورهای جوان در تماس مستقیم با این سلول ها هستند (شکل ۱). در بساک های رسیده، سلول های لایه مغذی از محل اولیه خود جدا شده، در لابه لای میکروسپورهای در حال تکوین قرار می گیرند (لایه مغذی پلاسمدی یا آمیبی). مواد حاصل از تخریب و تجزیه این سلول ها در تشکیل اسپورودرم (اگزین وانتین) و نیز پوشش سطحی گرده ها

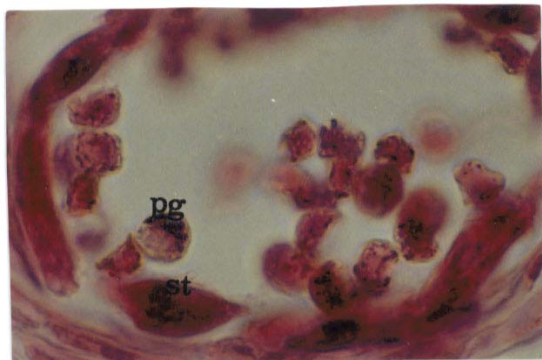
³ - Achillea wilhelmsii.

⁴ - Tapetum.

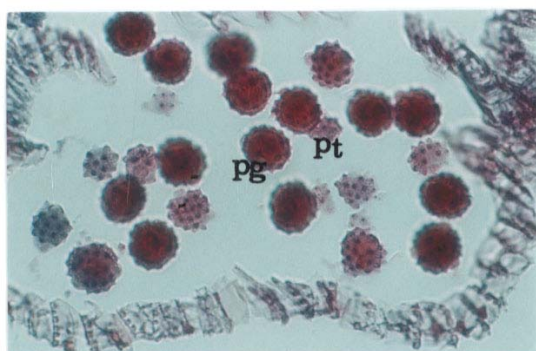
¹ - Light green.

² - Sputter coating.

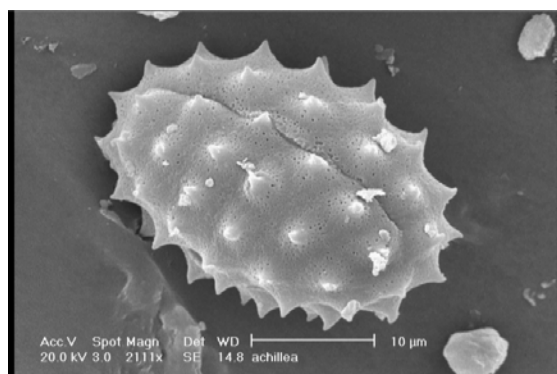
بالغ بیشتر بود. باند در محدوده ۶۶ کیلو دالتونی در گرده های نابالغ و بالغ بیشتر تفاوت را نشان داد.



شکل ۱. برش عرضی بساک نارس با میکروسپوره های جوان. pg: دانه گرده، درشت نمایی ۴۰۰



شکل ۲. برش عرضی بساک رسیده با دانه های گرده بالغ. با آراستار آگزینی خاردار. pg: دانه گرده و pt: لایه مغذی آمیبی، درشت نمایی ۴۰۰



شکل ۳. دانه گرده نابالغ

تریفین و پولن کیت) دخالت می نمایند. افزایش حجم گرده های بالغ، شکل کروی آنها و خارهای سطح آگزین به خوبی قابل مشاهده اند (شکل ۲). مقایسه تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره نیز تفاوت شکل و تراکم خارهای سطح آگزین دانه های گرده نابالغ و بالغ را نشان می دهند (شکل ۳ و ۴). هم چنین قطر گرده های نابالغ در حدود ۱۰ تا ۲۰ میکرومتر و قطر گرده های بالغ در حدود ۲۰ تا ۲۵ میکرومتر بود.

واکنش آلرژی زایی دانه های گرده گیاه بومادران توسط آزمون های مختلف شامل آزمون های پوستی، کلینیکی و سرولوژیکی بررسی شد. قطر متوسط تورم در گرده های نابالغ، گرده های بالغ و نمونه شاهد مقایسه شدند (جدول ۱). در واکنش های پوستی، قطر متوسط تورم برای دانه های گرده نابالغ حدود ۱/۵ سانتی متر و ماکزیم حساسیت آلرژی زایی برای دانه های گرده بالغ با متوسط تورم حدود ۳ سانتی متر محاسبه شد. در آزمون های کلینیکی نیز میزان IgE، تعداد ائوزینوفیل ها و نوتروفیل ها تغییرات محسوسی را نسبت به نمونه شاهد نشان دادند (جدول ۲). در آزمون های پوستی، کلینیکی و سرولوژیکی با بررسی قطر متوسط تورم در گرده های بالغ، نابالغ و نمونه شاهد (بافر فسفات) تغییرات معنی داری بین گرده های بالغ با نمونه شاهد وجود داشت ($p < 0/05$).

با بررسی میزان پروتئین کل در گرده های جمع آوری شده، دیده شد که غلظت پروتئین کل در گرده های بالغ نسبت به گرده های نابالغ افزایش معنی داری در سطح $p < 0/01$ داشت (جدول ۳). نیمرخ الکتروفورزی عصاره های گرده ای نشان داد که تعداد باندهای پروتئینی در گرده های بالغ نسبت به گرده های نابالغ افزایش دارد (شکل ۵). باندهای پروتئینی محلول در گرده های بالغ ۶ باند در محدوده ۱۴ تا ۶۶ کیلو دالتون (۱۴/۴، ۱۷، ۲۵/۵، ۳۵، ۴۵/۵ و ۶۶ کیلو دالتون) و در گرده های نابالغ ۵ باند در محدوده ۱۴ تا ۴۵ کیلو دالتون (۱۴/۴، ۱۶/۵، ۲۳، ۳۶ و ۴۶ کیلو دالتون) مشاهده شد، هم چنین تراکم هر باند که نشانه ای از غلظت و به عبارتی مقدار هر پروتئین است در گرده های

جدول ۲. نتایج بررسی های سرولوژیکی اعم از تعداد

اُنوزینوفیل ها، نوتروفیل ها و مقادیر IgE			
شاهد	گرده های نابالغ	گرده های بالغ	
اُنوزینوفیل *	۳/۲±۱/۵	۹/۵±۲/۳	۱۸/۶±۳/۹
نوتروفیل *	۳/۵ ±۱/۳	۵/۵±۱/۳	۹/۳±۳/۷
IgE **	۸/۵±۲/۲	۱۳/۲±۲/۲	۹۹±۱۷/۸

* (در میلی لیتر خون / ۱۰^۴ سلول)

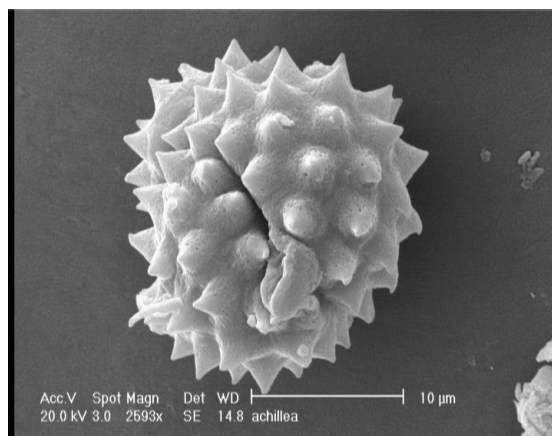
** (نانوگرم بر میلی لیتر)

جدول ۳. حجم پروتئین کل در عصاره های گرده ای

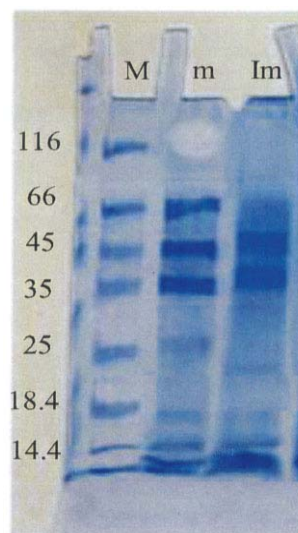
نمونه ها	حجم پروتئین (میلی گرم بر گرم گرده)
دانه های گرده نابالغ	۰/۹۵ ± ۰/۱۵
دانه های گرده بالغ	۴/۷۵ ± ۱/۸

بحث

در گیاه بومادران ضمن تکوین بساک، لایه سلولی میانی خیلی زود از میان می رود. اما سلول های لایه مغذی که ابتدا حالت ترشگی دارند تا مراحل تقریباً پیشرفته ای از تکوین میکروسپورها در حاشیه کیسه گرده ای به خوبی قابل تشخیص هستند و سرانجام به صورت پلاسمدی (آمیبی) در می آیند. در مراحل پایانی تکوین گرده آثار باقیمانده ای از این سلول ها در لایه لای گرده ها باقی می ماند. این تغییرات که نقش پشتیبانی (پرستاری) لایه مغذی از دانه های گرده و دخالت آنها در تکوین گرده ها را القاء می کنند با گزارش های پژوهشگران زیادی هم سویی دارد (۷، ۲۱-۱۹). بررسی تکوینی سلول های لایه مغذی در گیاه بومادران تحول آنها را از حالت ترشگی پس از مرحله تتراد و در مراحل ابتدایی نمو میکروسپور، به حالت پلاسمدی در مراحل تکوین بعدی گرده ها نشان می دهد. Pacini و همکاران گزارش کردند که این مرحله گذر در گیاهان مختلف در زمان های متفاوتی انجام می شود (۲۲، ۲۳). نتایج بررسی های آراستار آگرتین با میکروسکوپ های نوری



شکل ۴. دانه گرده بالغ



شکل ۵. الگوی SDS-PAGE از پروتئین های محلول عصاره های گرده ای.

به ترتیب: M (مارکر یا نشان گر)، m (گرده های بالغ)، Im (گرده های نابالغ)

جدول ۱. نتایج آزمون پوستی برای عصاره های گرده ای

مختلف	
نمونه	قطر تورم بر حسب سانتیمتر
شاهد	۱ ± ۰/۵
گرده های نابالغ	۱/۸ ± ۰/۷
گرده های بالغ	۲/۵ ± ۰/۹

در نظر گرفت. پاسخ دقیق به این موضوع که نیاز به جدا سازی و لکه گذاری ایمنی (ایمونوبلاستینگ) دارد، در دست انجام است.

نتیجه گیری

آنچه از مطالعه حاضر به دست آمد بیان گر این مطلب است که دانه های گرده بالغ گیاه بومادران آلرژی زا است. هم چنین پروتئین های گرده ای ارتباط کلی با مراحل تکوین گرده دارند به طوری که افزایش نوع و مقدار پروتئین ها با بلوغ گرده ای همراه است. در مقابل، درماتیت های پوستی ناشی از این گیاه نتیجه آلرژی زایی اندک دانه های گرده نابالغ آن است. به منظور ارتقای پژوهش در این زمینه انجام راهکارهایی نظیر: ۱- استخراج و خالص سازی آلرژن های این گیاه و بررسی ساختمان شیمیایی آنها ۲- حساس سازی حیوانات آزمایشگاهی با آلرژن خالص به منظور تولید آنتی بادی مونوکلونال و سپس تولید آنتی بادی ثانویه ۳- مطالعه محل استقرار و نقش آلرژن ها در دانه گرده؛ ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدر دانی

این پژوهش بخشی از رساله دوره دکتری تخصصی علوم سلولی-تکوینی گیاهی در گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی می باشد که با راهنمایی های استاد فرزانه جناب آقای دکتر احمد مجد و همکاری های صمیمانه دوست عزیزم سرکار خانم دکتر فرخنده رضا نژاد در دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفته است. بدین وسیله از همه افرادی که زمینه را برای این پژوهش فراهم کرده اند صمیمانه تشکر و قدر دانی به عمل می آید.

منابع

1. Knox RB, Suphioglu C. Pollen allergens: development and function. *SO Sex Plant Reprod* 1996; 9(6) : 318-323.
2. Chehregani A, Majd A, Moin M, Gholami M, Shariatzadeh M, Nassiri H. Increasing allergy potency of Zinnia pollen grains in polluted areas. *Ecotoxicology and Environmental safety* 2003;58(2):267-72.

و الکترونی نگاره نشان می دهد که سطح آگزمین به صورت بسیار متراکمی خاردار است. وجود چنین تزئیناتی در سایر گیاهان تیره مرکبان بوسیله پژوهش گران گزارش شده است (۲، ۳، ۱۶).

احتمال دارد در دانه های گرده نابالغ به دلیل این که دیواره های گرده ای هنوز مراحل نهایی تکامل را طی نکرده اند و ریز کانال های آگزینی و ضخامت های انتینی در زیر محل شیار رویشی که جایگاه بخشی از آلرژن های گرده ای هستند هنوز به تکامل نهایی خود نرسیده اند، مقدار پروتئین ها و توان آلرژی زایی گرده های نابالغ برای ایجاد عوارض آلرژیک کافی نیست و تنها در حد تولید درماتیت پوستی و رینیت آلرژیک است. گزارش های رضائزاد و همکاران در ۲۰۰۳ و چهرگانی و همکاران در ۲۰۰۳ نیز تشکیل ذخایر گرده ای از جمله پروتئین ها را در مراحل پایانی تکوین دانه های گرده نشان می دهد (۲، ۱۲). هم چنین با توجه به این که آلرژن های تماسی در تیره کاسنی سزکوئی ترین لاکتون ها گزارش شده اند (۲۶-۲۴) شاید بتوان یکی از دلایل ایجاد درماتیت پوستی توسط گرده های نابالغ را به آنها نسبت داد.

بررسی نیمرخ الکتروفورزی پروتئین های محلول گرده ها نشان داد که تعداد و شدت رنگ پذیری باندهای پروتئینی گرده های نابالغ و بالغ تفاوت آشکاری دارند، به طوری که در گرده های بالغ این باندها متراکم تر، پررنگ تر و در گرده های نابالغ کم رنگ تر بودند که نشان دهنده ادامه سنتز و تجمع پروتئین ها تا مراحل پایانی بلوغ گرده ها و هم چنین اثر اندازه گرده و ساختار اسپورودرم در میزان پروتئین های گرده می باشد. این نتایج با گزارش های سینگ در ۱۹۹۳، رضا نژاد و همکاران در ۲۰۰۳ و چهرگانی و همکاران در ۲۰۰۳ هم سویی دارد (۲، ۱۲، ۲۷). از آنجا که دانه های گرده بالغ بومادران توان آلرژی زایی بسیار مشخص تری را نسبت به گرده های نابالغ نشان دادند و بیشترین تفاوت در مورد باندهای پروتئینی مربوط به باند محدوده ۶۶ کیلو دالتونی است، می توان وجود این پروتئین در گرده های بالغ را یکی از عوامل موثر در آلرژی زایی آنها

3. Chehregani A, Majd A, Moin M, Gholami M, Shariatzadeh M, Mohsenzae F. Effect of air pollution on some cytogenetic characteristics, structure, viability and proteing of *Zinnia elegans* pollen grains. *Pakistan journal of biological sciences* 2004; 7(1): 118-122.
4. Rezanejad F, Majd A, Shariatzadeh M, Moein M, Aminzadeh M, Mirzaeian M. Effect of air pollution on soluble protein, structure and cellular material release in pollen of *Lagerstromia indica* (Lytraceae). *Acta biologica cracoviensia* 2003; 45(1): 129-132.
5. Behrendt H, Bhecker WM, Friedrichs KH, Darsow U, Tomingas R. Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter. *International Archives of Allergy Immunology* 1992; 99:425-428.
6. Ghanati F, Majd A. The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus eldarica* pollen. *Grana* 1995; 34: 208-211.
7. Majd A, Kiabi Sh. The effect of Tehran's pollution atmosphere on ultra structural changes and allergenicity of *Cupressus Arizoica* pollen grains. *Aerobiology* 1997; 407-417.
8. Hwang BF, Jaakkola JJ, Lee YL, Lin YC, Guo YL. Relation between air pollution and allergic rhinitis in Taiwanese school children. *Respir Res* 2006;7(1):23.
9. Behrendt H, Bhecker WM. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors current opinion in Immunology. *International Archives of Allergy Immunology* 2001; 13(6): 709-715.
10. Emberline J. The effects of air pollution on allergenic pollen. *European Respiratory Review* 1998; 8:164-167.
11. Granum B, Gaarder PI, Groeng E, Leikvold R, Namork E, Lovik M. Fine particles of widely different composition have an adjuvant effect of the production of allergen specific antibodies. *Toxicology letters* 2001; 118(3): 171-181.
12. Rezanejad F. The effect of air pollution on microsporogenesis, pollen development and soluble pollen proteins in *Spartium junceum* L(Fabaceae). *Turk j Bot* 2007; 31: 183-191.
13. Behrendt H, Becker WM, Friedrichs KH, Ring J. Air pollution and allergy. *International Archives of Allergy Immunology* 1997; 113:69-74.
14. Prakashkum, P Mathew PM. Studies on the allergenicity of nine tropical pollen allergenic. *Grana* 1998; 37:185-188.
15. Sheldon JM, Lovell RG, Matthews KP. A manual of clinical allergy. Philadelphia: Saunders; 2000.
16. Majd A, Reza-nejad F, Moin M, Aminzadeh M, Shariat-zadeh M. [Effect of air pollution on pollen grains development and their allergenicity in]. *Journal of Tarbiat Moalem University* 2001; 1(3,4):179-192.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
18. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of ug quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
19. Rowley JR. The fundamental structure of the pollen exine. In morphology, development and systematic relevance of pollen and spores. *Plant Syst Evol suppl* 1990; 5:13-26.
20. Ahmed FE, Hall AE, Demason DA. Heat injury during floral development in *Vigna unguiculata*. *American J of Bot* 1992; 79(7):784-791.
21. Suzuki M, Itoh H, Sugiyama K, Takagi I, Nishimura J, Kato K, Mamiya S, Baba S, Ohya Y, Itoh H, et al. Causative allergens of allergic rhinitis with special reference to silk worm moth allergene. *Allergy* 1995; 50(1): 23-27.
22. Pacini E, Keijzer CJ. Ontogeny of intruding non plasmidial tapetum in the wild chicory (*Cichorium intybus*). *Plant Systematics and Evolution* 1989; 167:149-169.
23. Pacini E, Franchi GG. Role of tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Systematics and Evolution Suppl* 1993; 7:1-11.
24. Gupta N, Martin BM, Metcalfe DD, Rao Pr. Identification of a novel hydroxyproline-rich glycoprotein as the major allergen in *Parthenium* pollen. *J- Allergy clin Immunol* 1996; 98: 93-912.
25. Jovanovic M, Poljacki M, Duran V, Vujanovic L, Sente R, Stojanovic S. Contact allergy to compositae plants in Patients with atopic dermatitis. *Med pregl* 2004;57:209-218.
26. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Mostafavi S, Vakili R.

Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs Exp Clin Res* 2000; 26:89-93.

27. Singh A B, Malik P, et al. Identification of specific IgE proteins in Castor bean Pollen obtained from different source materials. *Grana* 1993; 31: 376-380.

Comparative study of allergenicity of mature and immature pollen grains of *Achillea wilhelmsii*Amjad L^{1*}, Majd A², Fallahian F³, Saadatmand S⁴**Abstract**

Introduction: Pollen grains are male gametophytes of flowering plants that with self interference in fertilization have an important role in plant fertilization, increasing fertilization and improving quality of products. Pollen grains are of important allergenic plants and 80-90% of allergens have plant origin. *Achillea* plant has medical usage and grows in different regions of the country. This research is done in order to acquire scientific information pertaining to pollen grains allergenicity in their development stages and comparing mature and immature pollen grains allergenicity.

Materials and Methods: In this experimental study *Achillea* plant pollen grains in different developmental stages were collected around Isfahan city and samples were studied using light and electronic microscopy (SEM). Pollen extracts were prepared by incubating pollen grains in phosphate buffered saline, PH: 7.4. The allergenicity experiment was done on male Guinea pigs (Hartley strain, 350-500g weight, 4-6 week-old, Pausteur institute of Iran) and electrophoresis of proteins was done on 12% SDS- polyacrylamide gel. Data were analyzed using one way ANOVA and Duncan test.

Results: Images of light and electronic microscopy showed pollens from ellipsoidal type, with two colpi and echinate exine. The skin tests in Guinea pigs treated with pollen extracts indicated wheal with diameter larger than control group. In clinical tests, the numbers of eosinophils, neutrophils and IgE were increased in animals treated with pollen extract comparing control group. In SDS- PAGE protein profiles, 6 richly colored protein bands were seen in mature pollens in 14.4 to 66 KD and 5 slightly colored protein bands in immature pollens in 14.4 to 45 KD.

Conclusion: This research shows changes of immature pollens` ellipse morphology to spherical form in mature pollens, partial increasing in accumulation and height of exine surface echins, changes in quality and quantity of immature and mature pollen grains and difference in their allergenic severity.

Key words: *Achillea*, Pollen, grains, allergenic, protein

*Corresponding author;

Email: amjadsadra@yahoo.com

Address: Department of biology, Islamic Azad University, Falavarjan Unit, Isfahan, Iran.

1- Student of PhD of plant science, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
(scientific member of Islamic Azad University, Falavarjan unit).

2 - Professor, department of biology, North Tehran unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3 - Professor, department of biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4 - Assistant professor, department of biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.