مقایسه آلرژی زایی گرده‌های بالغ و نابالغ گیاه بومادران در خوکچه هندی

لیلا امجد[1*]، دکتراحمد مجد[2]،دکتر فتح ا... فلاحیان[3]، دکتر سارا سعادتمند[4]

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 وتحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

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

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

چکیده

مقدمه: دانه‌های گرده، گامتوفیت‌های نر گیاهان گلدار هستند که با دخالت خود در لقاح، نقش بنیادی در باروری گیاهان، ازدیاد محصول و بهبود کیفی آن دارند. گرده‌ها از عوامل مهم آلرژی زای گیاهی هستند و حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد از آلرژن‌های گیاهی خاستگاه گرده‌ای دارند. گیاه بومادران از گیاهان دارای کاربردهای دارویی است که در مناطق مختلف کشور می‌روید و مورد استفاده می‌باشد. پژوهش حاضر به منظور کسب آگاهی‌های علمی در مورد آلرژی زایی دانه‌های گرده این گیاه در مراحل تکوین گرده‌ها، و مقایسه آلرژی‌زایی دانه‌های گرده نا بالغ و بالغ آنها انجام شده است.

روش کار: در این پژوهش تجربی (آزمایشگاهی) ابتدا دانه‌های گرده گیاه بومادران در مراحل مختلف تکوین گل‌ها از مناطق اطراف شهر اصفهان جمع‌آوری شدند. بررسی مقایسه‌ای ویژگی‌های گرده شناختی دانه‌های گرده به کمک میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی و با استفاده از روش‌های شفاف سازی و نیز استولیز گرده‌ها انجام شد. فراساختار اسپورودرم و ویژگی‌های ریختی تکمیلی گرده‌ها به کمک میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره بررسی شد. عصاره‌های گرده‌ای با استفاده از بافر فسفات نمکی در PH: ۷/۴ تهیه شدند. آزمون‌های آلرژی‌زایی بر روی خوکچه‌های هندی نر نژاد هارتلی با وزن تقریبی ۵۰۰–۳۵۰ گرم و سن ۴ تا ۶ هفته انجام شد و الکتروفورز پروتئین‌ها 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 میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی، گرده‌ها را از نوع بیضی –کروی، دو شیاری با اگزینی دارای آراستار خاردار نشان دادند. در آزمون‌های پوستی برروی خوکچه‌های هندی تحت تیمار با عصاره‌های گرده‌ای، قطر تورم افزایش قابل ملاحظه‌ای را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. هم‌چنین درآزمون‌های کلینیکی با بررسی تعداد ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و میزان ایمونوگلوبولین E در خوکچه‌های هندی تحت تیمار با عصاره‌های گرده‌ای، تغییرات معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد وجود داشت. در نیمرخ‌های الکترو فورزی پروتئین‌ها، در گرده‌های نابالغ، حدود ۵ باند پروتئینی کم رنگ‌تر در محدودهٔ ۱۴/۴ تا ۴۵ کیلو دالتون و در گرده‌های بالغ، حدود ۶ باند پروتئینی مشخص‌تر در محدوده ۱۴/۴ تا ۶۶ کیلو دالتون دیده شد.

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

واژگان کلیدی: بو مادران، دانه‌های گرده، آلرژی زایی، پروتئین

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

Email:amjadsadra@yahoo.com

مقدمه

دانه‌های گرده، گامتوفیت‌های نر بوده و مواد ژنتیکی نر را در تولید مثل جنسی منتقل می‌کنند. برای انجام عمل لقاح اغلب به هوا رها شده و بخشی از فلور طبیعی هوا در همه فصول را تشکیل می‌دهند. اما به طور کلی فصول گرده‌ای بین مناطق مختلف به دلیل اختلاف در آب و هوا، توپوگرافی و روش‌ها متفاوت است. در زمستان و اوائل بهار گرده درختان، در بهار و اوائل تابستان گرده گندمیان و در پاییز گرده علف‌های هرز تیپ غالب گرده‌ای است. در آب و هوای معتدل در بهار و اوائل تابستان تراکم گرده‌ها بیشتر است. وقتی افراد حساس، هوای واجد گرده را تنفس می‌کنند علائم تب یونجه و آسم را به میزان بالایی نشان می‌دهند. این علائم به وسیله حضور ترکیبات متنوع از جمله برخی پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها که به عنوان آلرژن عمل می‌کنند شروع می‌شوند. 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 می‌کنند(۱). دانه‌های گرده، مانند دیگر سلول‌های گیاهی دارای برخی انواع پروتئین‌ها هستند که فقط تعداد کمی از این پروتئین‌ها آلرژی زا (آلرژن) می‌باشند. این آلرژن‌ها وزن مولکولی مشابه آنزیم‌ها یعنی حدود ۷۰-۱۰ کیلو دالتون را دارند(۱). مطالعات پژوهش‌گران متعدد نشان داده است که آلرژن‌های گرده‌ای در بخش‌های متفاوت گرده‌ها از جمله: زمینه سیتو پلاسم، انتین، اگزین، ذرات نشاسته‌ای و.... وجود دارند. مطالعات نشان می‌دهند که در گرده‌های نابالغ هیچ باند آلرژنی وجود ندارد و تفاوت پروتئین‌های محلول گرده، بین دانه‌های گرده بالغ و نابالغ تفاوتی وابسته به مقدار و تعداد باندهای پروتئینی است(۴-۲). حداقل سه محرک برای رهایی آلرژن‌های گرده‌ای وجود دارد:

۱-رطوبت نسبی زیاد هوا ۲-طوفان‌های تندری شدید و باران‌های سنگین ۳-آلاینده‌های هوا. در رطوبت زیاد، آلرژن‌های گرده‌ای در فرآیندی مشابه با شرایط فیزیولوژیک گرده افشانی رها می‌شوند(۵). دانه‌های گرده رها شده از گیاهان در طی فصل گل‌دهی و گرده‌افشانی از عوامل عمده تب یونجه، آسم آلرژیک و درماتیت‌های آلرژیک هستند که این علایم در مناطق دارای آلاینده‌های صنعتی و موتوری بیشتر است(۸-۶). در شرایط آلودگی هوا برهم کنش ذرات آلاینده با دانه‌های گرده منجر به فعال شدن اولیه دانه‌های گرده شده که در شرایط رطوبت، آئروسل‌های آلرژیک را رها می‌کنند. این ذرات وارد مجاری تنفسی شده و می‌توانند به عنوان حامل ذرات آلاینده نیز عمل نمایند. بنابراین در مناطق با آلودگی زیاد، مواد ذره‌ای نه فقط آلاینده‌ها بلکه آلرژن‌های حاصل از گرده را نیز حمل می‌کنند. برعکس، دانه‌های گرده نه فقط آلرژن‌ها را حمل می‌کنند بلکه آلاینده‌ها را نیز منتقل می‌نمایند(۱، ۹، ۱۰).

برخی پژوهش‌گران گزارش کرده‌اند که مواد آلاینده دارای اثر وابسته یا همراه (ادجوان) تحریکی بر روی تولیدآنتی بادی‌های E و G هستند(۱۱). بنابراین اهمیت رهایی مولکول‌های آلرژن به محیط آن است که این ذرات می‌توانند به مواد ذره‌ای آلاینده متصل شوند و بدین شکل سبب تغلیظ آلرژن‌ها شوند. این مکانیزم یکی از علل افزایش آسم در شهرهای آلوده می‌باشد(۴-۲، ۶، ۷، ۱۲، ۱۳). دانه‌های گرده از عوامل مهم در شیوع بیماری‌های آلرژیک هستند و پراکندگی آنها در اوایل و اواخر فصل گل‌دهی حساسیت‌های متفاوتی را در افراد ایجاد می‌کند. با توجه به پراکندگی بسیار زیاد گیاه بومادران در نقاط مختلف ایران و هم‌چنین چرخهٔ گل‌دهی آن که به طور معمول از اواسط بهار شروع شده و تا اواسط تابستان ادامه دارد، پژوهش حاضر با هدف بررسی‌های بیشتر در مورد مراحل تکوینی دانه‌های گرده، آگاهی از وضعیت پروتئین کل در دانه‌های گرده بالغ و نابالغ و هم‌چنین مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز گرده‌ها و تا حد امکان شناخت وابستگی آلرژی زایی دانه‌های گرده با مراحل تکوین آنها تدوین و انجام شده است تا ضمن کسب آگاهی‌های علمی پایه‌ای بتوان بارعایت‌های علمی به استفاده بهینه از این گیاه دست یافت.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی (آزمایشگاهی) بوده و بر روی خوکچه‌های هندی انجام گرفته است. به طوری که ابتدا، دانه‌های گرده از مناطق اطراف شهر اصفهان (در ۱۰۰ کیلومتری اصفهان – شهرکرد) جمع‌آوری شده و سپس توسط مش با منافذی به اندازه ۳۰ میکرومتر جدا سازی شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها با فیکساتور فرمالدئید – اسید استیک – اتانول (FAA)و اعمال روش‌های متداول سلول - بافت شناختی، از نمونه‌های قالب‌گیری شده در پارافین، برش‌هایی به ضخامت ۸ تا ۱۰ میکرومتر تهیه وپس از رنگ آمیزی با سافرانین – سبز روشن [1] ، به وسیله میکروسکوپ نوری زایس مطالعه و عکس برداری شدند. هم‌چنین دانه‌های گرده را بر روی پایه‌های آلومینیومی که قبلا به چسب آغشته شده بودند پخش کرده و پس از پوشش دهی توسط طلا[2] ، با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) متصل به کامپیوتر (مدل Philips-xl30) مطالعه و عکس‌برداری شد. عصاره‌های گرده ای با خیسانیدن گرده‌ها در محلول بافر فسفات نمکی باPH: ۷/۴ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تهیه و در ۱۰۰۰۰ گرم به مدت ۴۰ دقیقه در۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند(۱۴). روشناور حاصل تا زمان استفاده در ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای انجام آزمون‌های آلرژی‌زایی، ۲۴ سر خوکچه 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 ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش در سه گروه (هر گروه، ۸ سر) قرار گرفتند و توسط ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گرده‌ای (مشتمل بر ۵۰ میکرو گرم پروتئین در بافر فسفات نمکی) به مدت ۵ هفته (در هر هفته ۱تزریق) حساس شدند(۲، ۱۵).کنترل منفی، تزریق بافر فسفات نمکی بود. عصاره‌ها به صورت درون صفاقی در ناحیه شکم به هر خوکچه هندی تزریق شد. قطرتورم در نمونه‌های شاهدو تحت تیمار اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمون‌های کلینیکی و سرولوژی، خون مستقیماً از قلب خوکچه‌های تحت تیمار و شاهد گرفته شد(۱۶). شمارش تعداد ائوزینوفیل‌ها و نوتروفیل‌های خون انجام شد و میزان IgE خون (تست Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) در سرم خون حیوانات اندازه‌گیری شد و آنالیز آماری داده‌ها 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 پروتئین‌ها، ژل پلی آکریل امید ۱۲ درصد تهیه گردید(۱۷). پروتئین‌های محلول در بافر نمونه شامل: Tris-Hcl،۰/۱۲۵M با PH-6.8، SDS ۴ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد،ß مرکاپتواتانول ۱۰ درصد و برومونفل بلو۰/۱ درصد ریخته شدند و به مدت ۳ تا ۴ دقیقه در حرارت ۱۰۰ سانتی‌گراد قرار گرفتند، در نهایت نمونه‌ها برای تزریق به درون ژل آماده شدند. غلظت پروتئینی عصاره گرده‌ها نیز توسط روش براد فورد اندازه‌گیری شد(۱۸).

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

نتایج

بررسی مراحل تکوینی دانه‌های گردهٔ گیاه بومادران[3] نشان داد که در بساک‌های نابالغ، میکروسپورهای جوان در حال نمو شکلی کم و بیش نامنظم و چروکیده دارند و سلول‌های لایه مغذی[4] از نوع ترشحی در اطراف میکروسپورهای جوان دیده می‌شوند. برخی از میکروسپورهای جوان در تماس مستقیم با این سلول‌ها هستند(شکل۱). در بساک‌های رسیده، سلول‌های لایه مغذی از محل اولیه خود جدا شده، در لابه لای میکروسپورهای در حال تکوین قرار می‌گیرند (لایه مغذی پلاسمدی یا آمیبی). مواد حاصل از تخریب و تجزیه این سلول‌ها در تشکیل اسپرودرم (اگزین وانتین) و نیز پوشش سطحی گرده‌ها (

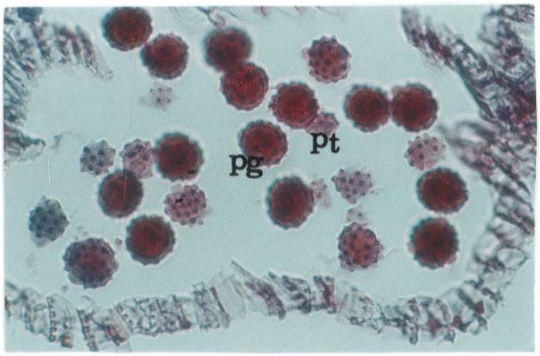
[1] - Light green.
[2] - Sputter coating.
[3] - Achillea wilhelmsii.
[4] - Tapetum.

تریفین و پولن کیت) دخالت می‌نمایند. افزایش حجم گرده‌های بالغ، شکل کروی آنهاو خارهای سطح اگزین به خوبی قابل مشاهده‌اند(شکل ۲). مقایسه تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره نیز تفاوت شکل و تراکم خارهای سطح اگزین دانه‌های گردهٔ نابالغ و بالغ را نشان می‌دهند(شکل۳ و ۴). هم‌چنین قطر گرده‌های نابالغ در حدود ۱۰ تا ۲۰ میکرومتر و قطر گرده‌های بالغ در حدود ۲۰ تا ۲۵ میکرومتر بود.

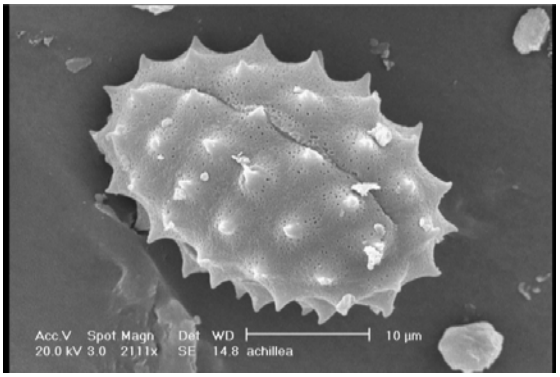
واکنش آلرژی‌زایی دانه‌های گرده گیاه بومادران توسط آزمون‌های مختلف شامل آزمون‌های پوستی، کلینیکی و سرولوژیکی بررسی شد. قطر متوسط تورم در گرده‌های نابالغ، گرده‌های بالغ و نمونهٔ شاهد مقایسه شدند(جدول۱). در واکنش‌های پوستی، قطر متوسط تورم برای دانه‌های گرده نابالغ حدود ۱/۵ سانتی متر و ماکزیمم حساسیت آلرژی زایی برای دانه‌های گرده بالغ با متوسط تورم حدود ۳ سانتی متر محاسبه شد. در آزمون‌های کلینیکی نیز میزان IgE، تعداد ائوزینوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها تغییرات محسوسی را نسبت به نمونه شاهد نشان دادند(جدول ۲). در آزمون‌های پوستی، کلینیکی و سرولوژیکی با بررسی قطر متوسط تورم در گرده‌های بالغ، نابالغ و نمونه شاهد (بافر فسفات) تغییرات معنی‌داری بین گرده‌های بالغ با نمونه شاهد وجود داشت($p<۰/۰۵$).

با بررسی میزان پروتئین کل در گرده‌های جمع‌آوری شده، دیده شد که غلظت پروتئین کل در گرده‌های بالغ نسبت به گرده‌های نابالغ افزایش معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۱$ داشت(جدول۳). نیمرخ الکتروفورزی عصاره‌های گرده‌ای نشان داد که تعداد باندهای پروتئینی در گرده‌های بالغ نسبت به گرده‌های نابالغ افزایش دارد(شکل۵). باندهای پروتئینی محلول در گرده‌های بالغ ۶ باند در محدوده۱۴ تا۶۶ کیلو دالتون (۱۴/۴، ۱۷، ۲۵/۵ ، ۳۵، ۴۵/۵ و۶۶ کیلو دالتون) و در گرده‌های نابالغ ۵ باند در محدوده ۱۴ تا ۴۵ کیلودالتون (۱۴/۴، ۱۶/۵، ۲۳، ۳۶ و ۴۶ کیلو دالتون) مشاهده شد، هم‌چنین تراکم هر باند که نشانه‌ای از غلظت و به عبارتی مقدار هر پروتئین است در گرده‌های بالغ بیشتر بود. باند در محدوده ۶۶ کیلو دالتونی در گرده‌های نابالغ و بالغ بیشترین تفاوت را نشان داد.

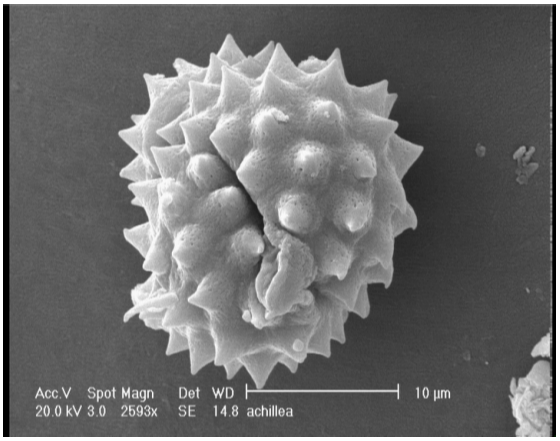
شکل ۱.برش عرضی بساک نارس با میکروسپورهای جوان.
st : لایه مغذی ترشح، pg : دانه گرده، درشت نمایی ۴۰۰



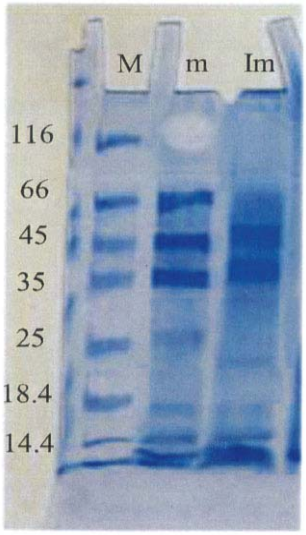
شکل ۲. برش عرضی بساک رسیده با دانه‌های گردهٔ بالغ. با آراستار اگزینی خاردار.
pg: دانه گرده وpt: لایهٔ مغذی آمیبی، درشت نمایی ۴۰۰



شکل ۳. دانه گرده نابالغ



شکل ۴. دانه گرده بالغ



شکل ۵. الگوی SDS-PAGE از پروتئین‌های محلول عصاره‌های گرده‌ای.
به ترتیب : M (مارکر یا نشان‌گر)، m (گرده‌های بالغ)، Im (گرده‌های نابالغ)

جدول ۱. نتایج آزمون پوستی برای عصاره‌های گرده‌ای 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

جدول ۲. نتایج بررسی‌های سرولوژیکی اعم از تعداد ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و مقادیر IgE

	شاهد	گرده های نابالغ	گرده های بالغ
ائوزینوفیل *	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 عصاره‌های گرده‌ای

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 می‌رود. اما سلول‌های لایه مغذی که ابتدا حالت ترشحی دارند تا مراحل تقریباً پیشرفته‌ای از تکوین میکروسپورها در حاشیه کیسه گرده‌ای به خوبی قابل تشخیص هستند و سرانجام به صورت پلاسمدی (آمیبی) در می‌آیند. در مراحل پایانی تکوین گرده آثار باقیمانده‌ای از این سلول‌ها در لابه لای گرده‌ها باقی می‌ماند. این تغییرات که نقش پشتیبانی (پرستاری) لایه مغذی از دانه‌های گرده و دخالت آنها در تکوین گرده‌ها را القاء می‌کنند با گزارش‌های پژوهش‌گران زیادی هم‌سویی دارد(۷، ۲۱-۱۹). بررسی تکوینی سلول‌های لایه مغذی در گیاه بومادران تحول آنهارا از حالت ترشحی پس از مرحله تتراد و در مراحل ابتدایی نمو میکروسپور، به حالت پلاسمدی در مراحل تکوین بعدی گرده‌ها نشان می‌دهد. Pacini و همکاران گزارش کردند که این مرحلهٔ گذر در گیاهان مختلف در زمان‌های متفاوتی انجام می‌شود(۲۲، ۲۳). نتایج بررسی‌های آراستار اگزین با میکروسکوپ‌های نوری

و الکترونی نگاره نشان می‌دهد که سطح اگزین به صورت بسیار متراکمی خاردار است. وجود چنین تزئیناتی در سایر گیاهان تیره مرکبان بوسیله پژوهش‌گران گزارش شده است(۲، ۳، ۱۶).

احتمال دارد در دانه‌های گردهٔ نابالغ به دلیل این که دیواره‌های گرده‌ای هنوز مراحل نهایی تکامل را طی نکرده‌اند و ریز کانال‌های اگزینی و ضخامت‌های انتینی در زیر محل شیار رویشی که جایگاه بخشی از آلرژن‌های گرده ای هستند هنوز به تکامل نهایی خود نرسیده‌اند، مقدار پروتئین‌ها و توان آلرژی زایی گرده‌های نابالغ برای ایجاد عوارض آلرژیک کافی نیست و تنها در حد تولید درماتیت پوستی و رینیت آلرژیک است. گزارش‌های رضانژاد و همکاران در ۲۰۰۳ و چهرگانی و همکاران در ۲۰۰۳ نیز تشکیل ذخایر گرده‌ای از جمله پروتئین‌ها را در مراحل پایانی تکوین دانه‌های گرده نشان می‌دهد(۲، ۱۲). هم‌چنین با توجه به این که آلرژن‌های تماسی در تیره کاسنی سزکوئی ترپن لاکتون‌ها گزارش شده‌اند(۲۶-۲۴) شاید بتوان یکی از دلایل ایجاد درماتیت پوستی توسط گرده‌های نابالغ را به آنها نسبت داد.

بررسی نیمرخ الکتروفورزی پروتئین‌های محلول گرده‌ها نشان داد که تعداد و شدت رنگ پذیری باندهای پروتئینی گرده‌های نابالغ و بالغ تفاوت آشکاری دارند، به طوری که در گرده‌های بالغ این باندها متراکم‌تر، پر رنگ‌تر و در گرده‌های نا بالغ کم رنگ‌تر بودند که نشان دهندهٔ ادامه ستنزو تجمع پروتئین‌ها تا مراحل پایانی بلوغ گرده‌ها و هم‌چنین اثر اندازه گرده و ساختار اسپورودرم در میزان پروتئین‌های گرده می‌باشد. این نتایج با گزارش‌های سینگ در ۱۹۹۳، رضا نژاد و همکاران در ۲۰۰۳ و چهرگانی و همکاران در ۲۰۰۳ هم‌سویی دارد(۲، ۱۲، ۲۷). از آنجا که دانه‌های گرده بالغ بومادران توان آلرژی زایی بسیار مشخص‌تری را نسبت به گرده‌های نابالغ نشان دادند و بیشترین تفاوت در مورد باندهای پروتئینی مربوط به باند محدوده ۶۶ کیلو دالتونی است، می‌توان وجود این پروتئین در گرده‌های بالغ را یکی از عوامل موثر در آلرژی‌زایی آنها در نظر گرفت. پاسخ دقیق به این موضوع که نیاز به جدا سازی و لکه گذاری ایمنی (ایمونوبلاتینگ) دارد، در دست انجام است.

نتیجه گیری

آنچه از مطالعه حاضر به دست آمد بیان‌گر این مطلب است که دانه‌های گردهٔ بالغ گیاه بومادران آلرژی زاست. هم‌چنین پروتئین‌های گرده‌ای ارتباط کلی با مراحل تکوین گرده دارند به طوری که افزایش نوع و مقدار پروتئین‌ها با بلوغ گرده‌ای همراه است. در مقابل، درماتیت‌های پوستی ناشی از این گیاه نتیجه آلرژی زایی اندک دانه‌های گرده نابالغ آن است. به منظور ارتقای پژوهش در این زمینه انجام راهکارهایی نظیر: ۱- استخراج و خالص سازی آلرژن‌های این گیاه و بررسی ساختمان شیمیایی آنها۲- حساس سازی حیوانات آزمایشگاهی با آلرژن خالص به منظور تولید آنتی‌بادی مونوکلونال و سپس تولید آنتی‌بادی ثانویه ۳ - مطالعه محل استقرار و نقش آلرژن‌ها در دانه گرده؛ ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدر دانی

این پژوهش بخشی از رساله دوره دکترای تخصصی علوم سلولی –تکوینی گیاهی در گروه زیست شناسی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد که با راهنمائی‌های استاد فرزانه جناب آقای دکتر احمد مجد و همکاری‌های 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 کرده‌اند صمیمانه تشکر و قدر دانی به عمل می‌آید.

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.

3. Chehregani A, Majd A, Moin M , Gholami M, Shariatzadeh M, Mohsenzae F. Effect of air pollution on some cytogentic 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 solube protein , structure and cellular material release in pollen of Lagerstromia indical . (Lytracee).Acta biologica cracoviensia 2003; 45(1) : 129-132.
5. Behrendt H, Bhecker WM, Friedrichs KH, Darsow U, Tomingas R. Interaction between aeroallergens and airborn 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 changed 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 allergenecity of nine tropical pollen allergic .Grana 1998; 37:185-188.
15. Sheldon JM, Lovell RG, Mattews KP. A manual of clinical allergy. Philadelphia: Saunders; 2000.
16. Majd A, Reza-nejad F, Moin M, Amin-zadeh M, Shariat-zadeh M. [Effect of air pollution on pollen grains development and their allergenecity 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 sikworm 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. Jovanovie M, Poljacki M, Duran V, Vujanovie L, Sente R, Stojanovie S. Contact allergy to compositae plants in Patients with atopic dermatitis. Med pregl 2004;57:209-218.
26. Asgary S, Naderi GH, Sarrafzadegan N, Mohammadif ard 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 A[2] , Fallahian F[3] , Saadatmand S [4]

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 ellipse-spherical type, with two colpate 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.