فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال اول، شماره ۳، تابستان۱۳۸۸

بررسی مقایسه ای ویژگی های ساختاری و پروتئین های محلول در گرده های نابالغ و بالغ گیاه بومادران(*Achillea wilhelmsii C.koch*)

لیلا امجد[۱]، صدیقه مهرابیان[۲]

۱ – استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

نویسنده مسئول :(e-mail:Amjadsadra@yahoo.com)

۲ – استاد گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

تیره مرکبان یکی از بزرگترین تیره های گیاهی است که تقریباً در تمام سطح کره زمین پراکنده اند.گیاه بومادران یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که در مناطق مختلف کشور می روید. در تحقیق حاضر، بررسی ویژگی های ساختاری و پروتئین های محلول در گرده های این گیاه انجام گرفته است. در مطالعه تجربی حاضر ابتدا دانه های گرده گیاه بومادران از مناطق اطراف شهر اصفهان جمع آوری شدند.بررسی مقایسه ای ویژگیهای گرده شناختی دانه های گرده به کمک میکروسکوپهای نوری والکترونی و با استفاده از روشهای سلول – بافت شناسی انجام شد. عصاره های گرده ای با استفاده از بافر فسفات نمکی در PH : ۷/۴ تهیه شدند و الکترو فورز پروتئین ها بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد صورت گرفت. یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که در ابتدای نمو بساک ،سلولهای لایه مغذی از نوع ترشحی بودند و سپس به نوع پلاسمدی تبدیل شدند و به درون حفرات بساک و بین میکروسپورهای در حال نمو قرار گرفتند. دانه گرده بالغ نیز بیضی – کروی با سه منفذ و سه شیار(Tricolporate)و آراستار خاردار قابل مشاهده بود. نیمرخ الکتروفورزی عصاره های گرده ای و میزان پروتئین کل در گرده های بالغ نسبت به گرده های نا بالغ نیز افزایش معنی داری را نشان داد.

داده های تحقیق حاضر تغییرات ریخت شناسی گرده ی نابالغ از حالت بیضی به حالت کروی در گرده های بالغ، افزایش نسبی تراکم و بلندی خارهای سطح اگزین، تغییرات کمی و کیفی پروتئینهای محلول دانه های گرده نابالغ و بالغ را نشان داد.

واژه های کلیدی: بومادران، دانه های گرده، پروتئین، ساختار .

مقدمه

تیره مرکبان (*Asteraceae*) یکی از بزرگترین تیره های گیاهی است که حدود ۱۰۰۰ جنس با ۲۰۰۰۰ گونه تقریباً در تمام سطح کره زمین پراکنده اند [۱] . گرده های گیاهان این تیره از نوع خاردار و جابه جایی آنها اغلب بوسیله حشرات است [۲] . بومادران یا بومادران نوع کوتاه دشتی با نام علمی *Achillea wilhelmsii* از قبیله *Anthemidea* و تیره *Asteraceae* می باشد. این گیاه چند ساله، دارای ریزوم سخت، ضخیم و چوبی و گل آذین دیهیم – کپه ای است [۳] .گل های بومادران حالت مجتمع دارند،گلچه های فوقانی نر –ماده (هرمافرودیت) می باشند[۴]. گلچه های کناری نهنج از نوع زبانه ای (شعاعی)و گلچه های میانی از نوع لوله ای (طبقی) می باشند که اغلب دارای برس (موهای)

Archive of SID

www.SID.ir

جمع آوری کننده دانه های گرده از کیسه بساک می باشند[۳]. بساک هر پرچم تقریباً کروی شکل، پرچم ها پنج تایی و بساک پرچم های هر گل به هم پیوسته و میله ها جدا هستند[۳]. دانه های گرده درون بساک، 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. اغلب گیاهان این تیره مصرف دارویی دارند و دانه های گرده رها شده از آنها از عوامل عمده حساسیت های پوستی و آسم آلرژیک می باشند[۶و۵]. حال با توجه به پراکندگی بسیار زیاد گیاه بومادران در نقاط مختلف ایران و همچنین چرخه گلدهی آن که به طور معمول از اواسط بهار شروع شده و تا اواسط تابستان ادامه دارد، پژوهش حاضر با هدف بررسی مراحل تکوینی دانه های گرده، آگاهی از وضعیت پروتئین کل در دانه های گرده نابالغ و بالغ و هم چنین مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز گرده ها تدوین و انجام شده است تا ضمن کسب آگاهیهای علمی پایه ای بتوان با رعایت های علمی به استفاده بهینه از این گیاه دست یافت.

مواد و روش ها

جمع آوری گل ها و گرده ها

گل های بومادران در مراحل مختلف تکوین از مناطق اطراف شهر اصفهان (در ۱۰۰ کیلومتری اصفهان – شهرکرد)در خرداد ۱۳۸۶ جمع آوری شده و در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان از نظر تاکسونومیک شناسایی گردید. سپس دانه های گرده گیاه توسط غربال ۳۰ میکرونی جداسازی شده و تا زمان آزمایش در فریزرc°۲۰- نگهداری گردید[۲].

بررسی مراحل تکوین گرده ها با میکروسکوپ نوری

به منظور بررسی مراحل تکوین گرده های گیاه بومادران، پس از تثبیت نمونه ها با فیکساتور فرمالدئید-اسیداستیک-اتانول(FAA)و اعمال روش های متداول سلول بافت شناختی از نمونه های قالب گیری شده در پارافین، برشهای سری به ضخامت ۸ تا ۱۰ میکرومتر تهیه و پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین –ائوزین، توسط میکروسکوپ نوری زایس مطالعه و عکس برداری شدند.

بررسی مراحل تکوین گرده ها با میکروسکوپ S.E.M

برای مطالعه ساختار گرده های گیاه بومادران، تعدادی از گرده ها را بر روی پایه های آلومینیومی آغشته به چسب مایع ویژه مستقر کرده، و پس از پوشش دهی توسط طلا با میکروسکوپ الکترونی S.E.M مجهز به کامپیوتر Philips – x130 مشاهده نموده و از آنها عکسبرداری شد.

عصاره گیری از گرده ها

به منظور بررس میزان پروتئین کل و بررسی باند های پروتئینی دانه های گرده ابتدا عصاره گیری از گرده ها انجام شد. برای تهیه عصاره گرده ای از بافرفسفات نمکی (PBS) ۰,۱ m با PH : ۷/۴ استفاده شد. هرگرم از گرده ها در ۲۰ میلی لیتر بافر حل شد(۱:۲۰). مخلوط گرده ای حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4° C روی شیکر به هم زده و در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه در 4° C سانتریفوژ شد. روشناور حاصل تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید [۷].

بررسی میزان پروتئین گرده

برای بررسی میزان پروتئین کل از روش Bradford , 1976 استفاده شد [۸]. آنالیز باندهای پروتئینی توسط الکتروفورز SDS – PAGE انجام گرفت. در این روش از ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد و دستگاه الکترو فورز عمودی BioRAD مدل مینی ژل استفاده گردید[۹] .در این تحقیق برای مقایسه کمیت ها از آزمون آنالیز واریانس یک عاملی و آزمون دانکن استفاده شده است.

نتایج

بررسی مراحل تکوین بساک و دانه های گرده توسط میکروسکوپ نوری

در مراحل آغازی نمو بساک، یک لایه پیرامونی و یک توده هاگزای داخلی در زیر اپیدرم بوجود می آید که در ضمن ادامه تمایز، لایه های دیواره ای بساک شامل لایه مکانیکی، لایه موقت، لایه مغذی می شود (شکل 1A). اندازه سلولهای لایه مغذی نسبت به سایر لایه ها کمی افزایش می یابد که در این مرحله سلولهای هاگزا بطور معمول یک تقسیم را گذرانده و اندازه سلولهای آنها افزایش یافته و سلولهای مادر گرده (Pmc)را ایجاد می کند.

Archive of SID

www.SID.ir

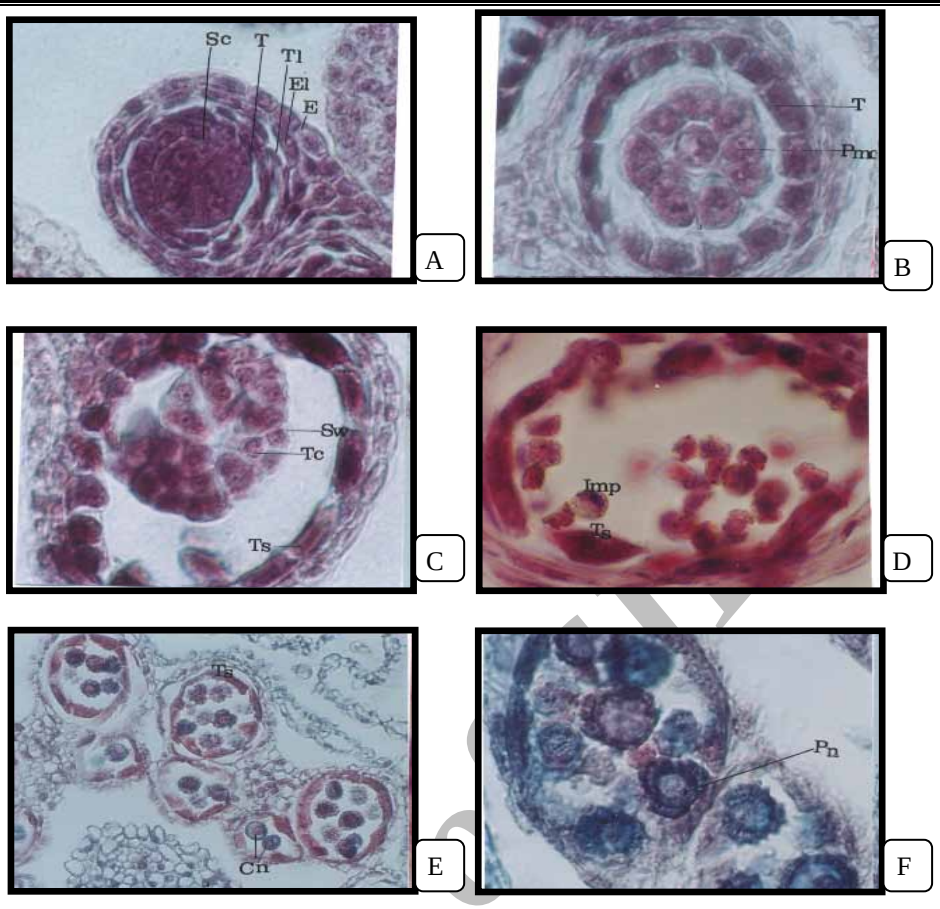
اغلب ۴-۲ سلول چند وجهی با رنگ پذیری بالا در هر کیسه گرده دیده می شود(شکل ۱B).اندازه سلولهای لایه مغذی افزایش یافته و سلولهای مادر گرده پس از میوز IوII تشکیل تتراسپور را می دهند که این تتراسپورها توسط دیواره کالوزی احاطه شده اند(شکل ۱C).دیواره کالوزی اطراف تتراسپورها تجزیه شده و میکروسپورهای جوان دارای هسته مرکزی از یکدیگر جدا می شوند. میکروسپورهای جوان در حال نمو شکل کم و بیش نامنظم دارند،در ضمن این مراحل سلولهای لایه مغذی ترشحی باقی مانده و حتی برخی از میکروسپورهای جوان در تماس مستقیم با این سلولها هستند(شکل ۱D).در مراحل بعدی نمو میکروسپورها ،هنوز سلولهای مغذی ترشحی هستند و اطراف هر میکرو سپور را دیواره مستقل اگزین که اسپوروپولنینی است می پوشاند و سپس دیواره دومی که بخش عمده آن پکتو سلولزی است (انتین)در مجاورت پروتوپلاسم بوجود می آید ،در این حالت هنوز هسته هر میکروسپور مرکزی است(شکل ۱E).آرام آرام عده ای از سلولهای تاپی محو شده و در میکروسپورها حجم واکوئل ها افزایش می یابد و جابجایی هسته ها از مرکز به کنار میکروسپور صورت می گیرد و میکروسپورهای بالغ تشکیل می شوند(شکل ۱F). در مراحل پایانی تکوین میکروسپورها،سلولهای لایه مغذی از محل اولیه خود جدا شده و در لابه لای میکروسپورهای در حال تکوین قرار می گیرند(لایه مغذی پلاسمدی یا آمیبی)و در تشکیل اسپورودرم(اگزین و انتین)و نیز پوشش سطحی گرده ها (تریفین و پولن کیت)دخالت می نمایند.در این مرحله سلولهای پارانشیمی حد فاصل بین دو کیسه گرده از بین رفته و خانه گرده تشکیل می شود (شکل ۲A). در مرحله بعدی میکروسپورها برای یک تقسیم میتوزی نامتقارن آماده می شوند و سلولهای تاپی پلاسمدی درلابه لای گرده ها دیده می شوند (شکل ۲B).سرانجام پس از بلوغ گرده ها که تزئینات گرده ای به صورت خارمانند در سطح انها تشکیل می شوند، لایه مکانیکی شکافتگی پیدا کرده و در نهایت شکفتن بساک و آزاد شدن گرده های بالغ را خواهیم داشت (شکل ۲C). در گرده های بالغ اگزین ضخیم و پوشیده از خارهای فراوان اسپوروپولنینی با سه منفذ دانه گرده قابل مشاهده می باشد(شکل ۲D).

بررسی مراحل تکوین فراساختار دانه های گرده توسط میکروسکوپ الکترونی S.E.M

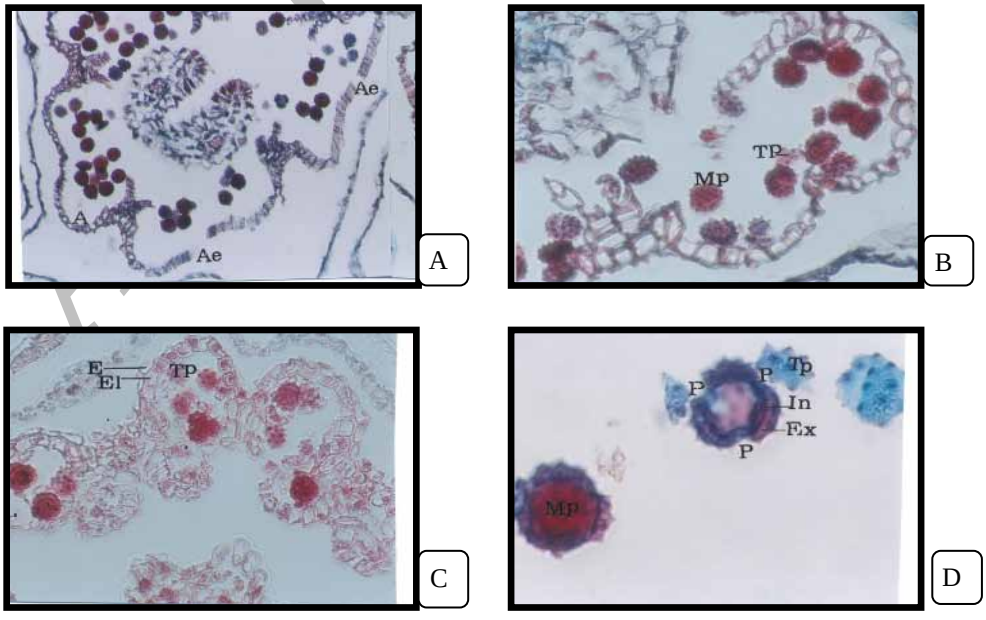
در ابتدای مرحله تکوین دانه گرده دو شیار به خوبی قابل مشاهده است و درست در وسط دو شیار منفذ دیده می شود (شکل ۳A). آراستار کلی اگزین در ابتدای مراحل تکاملی است به طوری که مکانهایی از ظهور آراستاری نوک تیز قابل مشاهده است(شکل۳B).گرده نابالغ به شکل بیضی به همراه آراستار خارمانند ابتدایی بر سطح اگزین آن و دو شیار از سه شیار شکل گرفته در سطح اگزین مشاهده می شود(شکل۳C). شکل گیری آراستار نوک تیز و خارمانند اگزین در مراحل ابتدایی نمو گرده قابل رویت است(شکل ۳D).آرام آرام حجم دانه گرده افزایش می یابد و آراستار سطح اگزین نیز مراحل نموی خود را طی می کند اما دانه گرده هنوز بیضی شکل است (شکل ۳E)،سپس با افزایش حجم ،دانه گرده کروی می شود (شکل ۳F).در دانه گرده بالغ خارهای سطح اگزین با بلندی بیش از یک میکرومتر دیده می شوند که در این دانه گرده سه منفذ قابل مشاهده است که بر روی منفذ پایینی آن نیز شیار دانه گرده به چشم می خورد(شکل ۳G).دانه های گرده به واسطه پوشش پولن کیت به هم می چسبند به طوری که آراستار خاردار در گرده های بالغ اتصال دانه های گرده به بدن حشرات را آسان تر می کند (شکل ۳H). مقایسه تصاویر گرفته شده نشان می دهد که قطر گرده های نابالغ در حدود ۱۰ تا ۲۰ میکرومتر و قطر گرده های بالغ در حدود ۲۰ تا ۲۵ میکرومتر می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- میکروگراف نوری از برش عرضی بساک در مراحل مختلف نمو بساک و مراحل نمو میکروسپورها.A:دیواره بساک شامل اپیدرم(E)،لایه مکانیکی(El)،لایه موقت (Tl)،لایه مغذی(T)و توده سلولی هاگزا(Sc).B:سلولهای مادر گرده(Pmc)بزرگ با لایه مغذی رشد یافته.C:تشکیل سلولهای تترادی(Tc)به همراه دیواره کالوزی(Sw)و لایه تاپی ترشحی(Ts).D:میکروسپورهای در حال تکوین(Imp).E:سلولهای تاپی ترشحی و میکروسپورها با هسته مرکزی.F:میکروسپورهای بالغ و محو شدن سلولهای تاپی ترشحی.



شکل ۲- مراحل نمو میکروسپورها و تشکیل گرده بالغ .A:قرار گیری تاپی پلاسمدی (Tp)در بین گرده های در حال نمو و تشکیل خانه گرده. B:گرده های بالغ (MP).C:شکاف در لایه های مکانیکی بساک .D:دانه گرده بالغ به همراه تزئینات اگزین(Ex)،انتین (In)و سه منفذ(P).

www.SID.ir

بررسی پروتئین کل

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 نا بالغ افزایش معنی داری در سطح $P<0/01$ دارد (جدول۱).

جدو ل ۱. حجم پروتئین کل در عصاره های گرده ای

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

مطالعه نیمرخ الکتروفورزی دانه های گرده

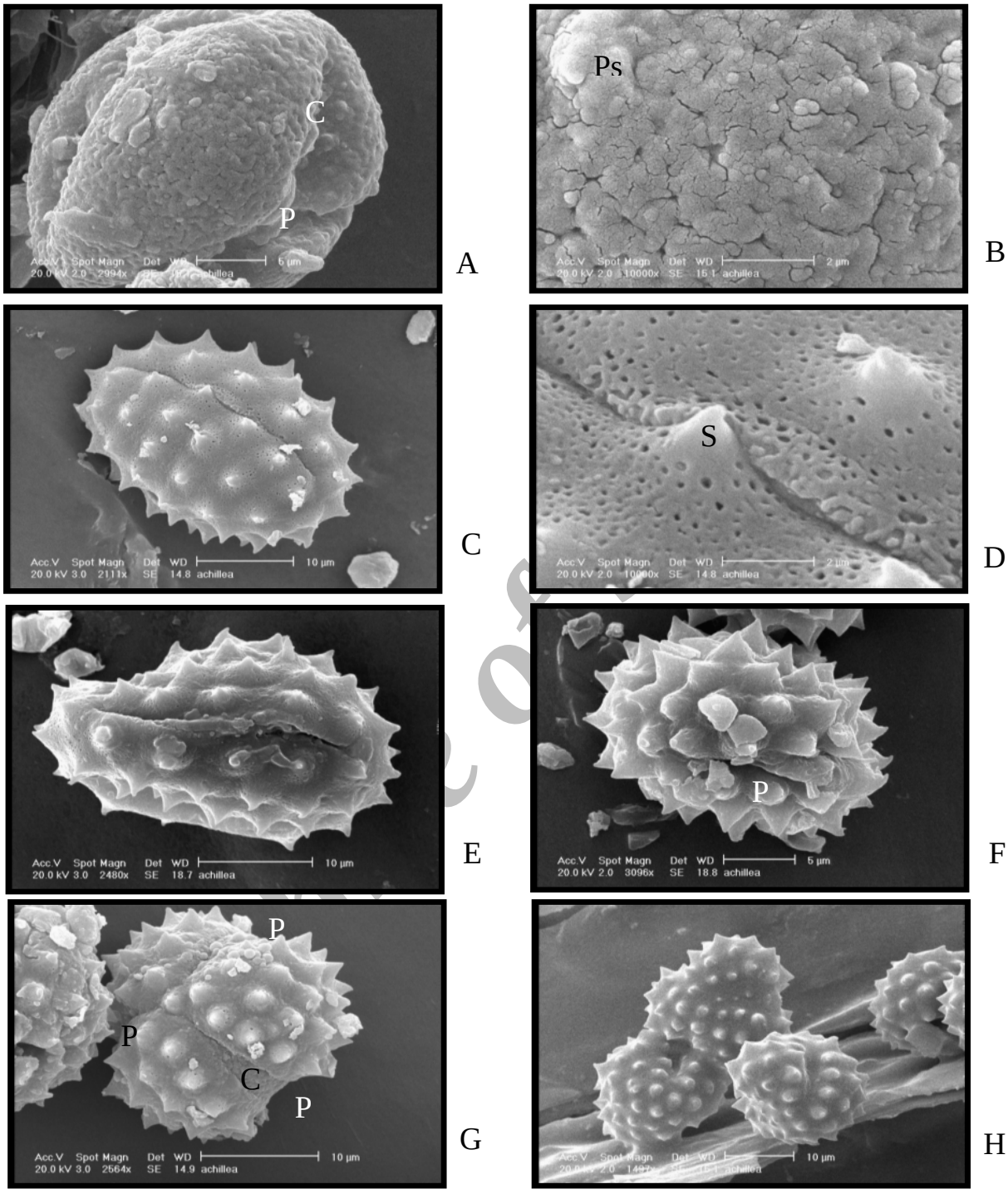
مطالعات نیمرخ الکتروفورزی عصاره های گرده ای نشان داد که، تعدادباندهای پروتئینی در گرده های بالغ نسبت به گرده های نابالغ افزایش قابل ملاحظه ای دارد (شکل۴). به طوریکه نیمرخ باندهای پروتئینی محلول در گرده های بالغ در محدوده۱۴ تا۶۶ کیلو دالتون(۱۴/۴، ۱۷، ۲۵/۵ ، ۳۵، ۴۵/۵، ۶۶کیلودالتون) و در گرده های نابالغ در محدوده ۱۴تا۴۵ کیلودالتون (۱۴/۴ ، ۱۶/۵ ، ۲۳ ،۳۶ ، ۴۶ کیلودالتون)مشاهده شد. بنابراین باندهای پروتئینی در گرده های نابالغ به تعداد کمتر و کم رنگتر از باندهای پروتئینی درگرده های بالغ وجود دارند،همچنین تراکم هر باند نشانه از غلظت و به عبارتی مقدار هر پروتئین دارد که در گرده های بالغ بیشتر است.باندی در محدوده ۶۶ کیلودالتونی، در گرده های نابالغ و بالغ بیشترین تفاوت را نشان می دهد(شکل ۴).

بحث

نتایج بررسی ها در گیاه بومادران نشان می دهد که ضمن تکوین بساک ، لایه بساک زود از میان می رود اما لایه مغذی که در ابتدا به فرم ترشحی است تا مراحل پیشرفته ای از تکوین میکروسپورها در حاشیه کیسه گرده می ماند و سرانجام به صورت پلاسمدی (آمیبی)در می آیند.در مراحل پایانی تکوین گرده آثار باقیمانده ای از این سلولها در لا به 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 سوئی دارد[۱۰،۱۱،۱۲و۸]. بررسی تکوین سلولهای لایه مغذی در گیاه بومادران تحول آنها را از حالت ترشحی پس از مرحله تتراد و درمراحل ابتدایی نمو میکروسپور، به حالت پلاسمدی در مراحل بعدی تکوین گرده ها نشان می دهد. Pacini و همکاران گزارش کردند که این مرحله گذر در گیاهان مختلف در زمان های متفاوتی انجام میشود و اهمیت این لایه مغذی در تغذیه و تکوین گرده های در حال نمو، تشکیل اگزین و پوشش گرده ای و همچنین نر عقیمی در گیاهان می باشد[۱۳و۱۴] . اپیدرم در بساک گیاه بومادران یک لایه سلولی ساده است که در مرحله شکفتگی بساک به صورت یک لایه نازک روی لایه مکانیکی دیده می شود [۱۵]. این لایه در گل توری از مرحله اولیه نمو بساک تا مرحله شکافتگی آن دارای رشد قابل توجهی می باشد[۱۶]. نتایج بررسی های آراستار اگزین در دانه های گرده بالغ به صورت بسیار متراکمی خاردار است در حالیکه تراکم خارهای سطح اگزین در دانه های گرده نابالغ کم است، همچنین دانه های گرده بالغ کروی و دارای ۳ منفذ و ۳ شیار و یا به عبارتی Tricolporate هستند در حالیکه دانه های گرده نابالغ بیضی شکل و فقط دارای ۳ شیار می باشند. رشد خارهای سطح اگزین با تکوین میکروسپورها به دانه های گرده، آماده شدن گرده ها را برای گرده افشانی توسط حشرات مشخص می سازد.

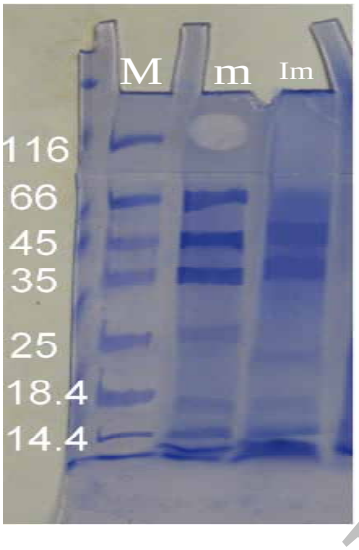
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- میکرو گراف های الکترونی (گرفته شده با S.E.M) از مراحل تکوین دانه های گرده گیاه بومادران.A:دانه گرده نابالغ با دو شیار(C)و دو منفذ(P) B:آراستارابتدایی اگزین با ظهور خارهای ابتدایی(Ps).C:دانه گرده نابالغ بیضی شکل به همراه دو شیار D:شکل گیری آراستار خارمانند(S) به همراه شیار آن E:دانه گرده بیضی شکل به همراه یک شیار F:افزایش حجم دانه گرده به سمت کروی شدن به همراه یک منفذ و نمو آراستار اگزین G:دانه گرده بالغ H:چسبیدن دانه های گرده بالغ به یکدیگر توسط پولن کیت

www.SID.ir



شکل ۴ . الگوی SDS-PAGE از پروتئینهای محلول عصاره‌های گرده ای. به ترتیب : M(مارکر یا نشانگر)، m (گرده های بالغ)، Im(گرده های نابالغ)

در بررسی میزان پروتئین کل در دانه های گرده به نظر می رسد نازک بودن دیواره گرده ای در گرده های نابالغ، با توجه به اینکه برخی از پروتئینها در پوشش گرده ای در منافذ بسیار ریز بین ستونکها و در محل منافذ یا شکافها قرار دارند، یکی از دلایل کاهش پروتئین کل در دانه های گرده نابالغ نسبت به پروتئین کل در دانه های گرده بالغ باشد.دلیل دیگر آن است که بنا به گزارشهای محققان از جمله مجد۱۳۸۶، رضا نژاد و همکاران ۲۰۰۳ و چهرگانی و همکاران ۲۰۰۳ تشکیل ذخایر گرده ای از جمله پروتئینهای ضد تنشی که گرده ها را هنگام آزاد شدن از بساک در برابر عوامل نامناسب محیطی مقاوم می کنند در مراحل پایانی تکوین دانه های گرده انجام می شود. بررسی نیمرخ الکتروفورزی پروتئینهای محلول گرده ها نشان داد که تعداد و شدت رنگ پذیری باندهای پروتئینی گرده های نابالغ و بالغ تفاوت آشکاری دارند، به طوریکه در گرده های بالغ این باندها متراکم تر، پر رنگ تر و در گرده های نابالغ کم رنگ تر بودند که نشان دهنده ادامه سنتز و تجمع پروتئینها تا مراحل پایانی بلوغ گرده ها و هم چنین اثر اندازه گرده و ساختار اسپورودرم در میزان پروتئینهای گرده می باشد. این نتایج با گزارشهای سینگ در ۱۹۹۳، رضانژاد و همکاران در ۲۰۰۳ و چهرگانی و همکاران در ۲۰۰۳و۲۰۰۴ هم سویی دارد [۱۹و۱۵و۱۸و۱۷]. آنچه از مطالعات حاضر به دست آمد بیان گر این مطلب است که پروتئینهای گرده ای ارتباط کلی با مراحل تکوین گرده دارند به طوری که افزایش نوع و مقدار پروتئین ها با بلوغ گرده ای همراه است.

منابع:

۱- مظفریان ولی الله (۱۳۷۹). رده بندی گیاهی، انتشارات امیر کبیر تهران، کتاب دوم، ۱۳۷۹.

۲- قناتی فائزه. زیست شناسی دانه گرده . انتشارات آرموس، صفحات ۸۵-۸۲ ، ۱۳۸۴ .

۳- قهرمان احمد . کروموفیتهای ایران. جلد سوم. چاپ اول. مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳۷۳.

۴- مجد احمد، رضا نژاد فرخنده، معین مصطفی، امین زاده مسعود. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم تهران، زمستان ۱۳۸۰ ؛ جلد ۱، شماره ۳و۴ : صفحات ۱۹۲-۱۷۹، زمستان ۱۳۸۰.

۵- شریف شوشتری مریم، مجد احمد، پورپاک زهرا، معین مصطفی . فصلنامه تخصصی علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، سال اول، پیش شماره ۲ : صفحات ۱ تا ۱۰. زمستان ۱۳۸۶.

6- Singh An, Dahiya P. Ann Agric. Environ.;9 :147-151(2002).

7- Parakashkum P,Mathew PM.Grana;37:185-188(1998).

8- Ahmed F.E,Hall A.E, Demason D.A. American J of Bot , 79(7):784-791(1992).

9- Laemmli UK. Nature.; 227:680-685 (1970) .

Archive of SID

www.SID.ir

10- Majd A and Kiabi Sh.Aerobiology 407-417 (1997) .

11- Rowley J. R. Plant Syst. Evol . suppl.; 5 : 13-26(1990).

12- Suzuki M, Itoh H, et al . Allergy. 50: 23-27(1995).

13- Pacini E and Keijzer C.J. Plant Systematics and Evolution .; 167: 149-169 (1989).

14- Pacini E and Franchi G.G. Plant Systematics and Evolution . Suppl.; 7:1-11(1993).

15- Rezanejad F, Majd A,Shariatzadeh M,Moein M, Aminzadeh M,Mirzaeian M. Acta biologica creacoviensia;45(1) :129-132(2003) .

1-

16- Rezanejad F. Turk jBot; 31:183-191(2007).

17- Chehregani A, Majd A, Moin M, Gholami M, SHariatzadeh M,Nassiri H. Ectoxicology and environmental safety ;58(2) :267-272(2003) .

18- Chehregani A, Majd A, Moin M, Golami M, Shariatzadeh S.M ,Mohsenzae F. Pakistan Jourual of Biological sciences;7(1) : 118-122 (2004) .

19- Singh AB, Malik P.Identification Grana .;31 :376-380(1993).

20- Bradford M..Analytical Biochemistry; 72:248-254 (1979).

Archive of SID

www.SID.ir