فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰ ص. ۳۰-۱۹

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus* L.) و توان آلرژی‌زایی دانه‌های گرده آن در دو فصل بهار و پاییز در شهرستان اهواز

مرجان جاویدان[۱*]، احمد مجد[۱]، طاهر نژاد ستاری[۲]، صدیقه اربابیان[۱]

[۱] گروه زیست شناسی. دانشکده علوم زیستی.دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

[۲] گروه زیست شناسی. دانشکده علوم پایه. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): javidan_marjan56@yahoo.com

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۹

چکیده

گیاه کنوکارپوس *Conocarpus erectus* L. از درختان مانگروی زینتی و همیشه سبز مناطق استوایی و نیمه استوایی است که سازش زیادی با تنش‌های محیطی دارد. این گیاه در ۱۰ سال اخیر در استان‌های جنوبی ایران به ویژه در شهر اهواز، مورد استقبال و استفاده گسترده قرار گرفته است. ویژگی‌های تشریحی ریشه، ساقه و برگ این گیاه، با استفاده از برش‌های دستی و بررسی اندام‌های زایشی آن با استفاده از برش‌های میکروتومی و روش‌های سلول- بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات گل‌ها و مخروط‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و استریو میکروسکوپ تعداد بسیار زیاد دانه‌های گرده در بساک پرچم‌ها و کرک‌های فراوان را در سراسر سطح اندام‌های گیاه نشان داد. توان آلرژی‌زایی دانه‌های گرده گیاه کنوکارپوس با جداسازی گرده‌ها و سپس عصاره‌گیری آن‌ها با خیساندن به مدت ۲۴ ساعت در محلول PBS انجام شد. اندازه‌گیری میزان کمی پروتئین‌ها، با روش برادفورد و بررسی کیفی آنها با الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد. عصاره‌های ۵ درصد تهیه شده دو فصل بهار و پاییز، در سه نوبت به میزان ۷۵ میکرولیتر با فاصله زمانی ۱۰ روز به خوکچه‌های هندی تزریق شدند و سپس ۸ ساعت و یک هفته بعد از آخرین تزریق، خون‌گیری از خوکچه‌ها برای آزمون‌های سرولوژی (شمارش سلول‌های خونی و میزان قند خون) و سنجش IgE به روش الایزا انجام شد. آزمون‌های کلینیکی پوستی، چشمی، بینی نیز بر روی خوکچه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد، محتوای کمی پروتئین‌های گرده‌ای فصل پاییز، از فصل بهار بیشتر است. بررسی محتوای کیفی پروتئین‌های گرده‌ها در فصل پاییز، باندها را در محدوده ۱۰، ۱۵،۲۵ و ۳۰ کیلودالتون نشان داد. در ارزیابی توان آلرژی‌زایی دانه‌های گرده در دو فصل بهار و پاییز، آزمون‌های پوستی، IgE، میزان قندخون، تفاوت معنی‌داری را در فصل پاییز نسبت به بهار نشان دادند.

کلیدواژه‌ها: آلرژی، اهواز، کنوکارپوس، گرده.

مقدمه

گیاه کنوکارپوس درخت یا درختچه‌ای از خانواده Combretaceae، راسته موردسانان از گیاهان مانگروی زینتی و همیشه سبز است، که بومی قاره آمریکا، غرب هند، مکزیک و غرب آفریقا است. کنوکارپوس خاص مناطق استوایی و نیمه استوایی است و سازش پذیری زیادی با تنش‌های محیطی مانند

خاک‌های فقیر و فشرده و همچنین دمای هوای بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد را دارد [۱]. این گیاه معمولا به طول ۱ تا ۴ متر است اما ارتفاع آن به ۴۰ متر نیز می‌رسد. کنوکارپوس بعلت سرسبزی همیشگی، رشد سریع و قابلیت فرم گیری آسان در فضای سبز شهری در سراسر جهان مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرد [۲]. ریشه‌های این گیاه برای تثبیت مناطق ساحلی و چوب آن برای سوخت و ساختن قایق و سایر سازه‌های دریایی کاربرد دارند. برگ‌ها دارای تانن هستند و برای آن‌ها خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد میکروبی زیادی توسط محققین گزارش شده است [۵,۴,۳].

Conocarpus erectus گیاه همیشه سبز نیز نامیده می‌شود. برگ‌های آن همواره سبز و گیاه به اصطلاح خزان ندارد. رشد این گیاه در زمستان کمتر از تابستان است و اگر در تابستان از نظر کمبود آب مشکلی نداشته باشد، رشد چشمگیری خواهد داشت به طوری که ممکن است در طول شش ماه به اندازه دو متر رشد کند [۶]. گل‌های کوچک سبز رنگ ۵-۸ میلی متری با گل آذین پانیکول به صورت متراکم و به شکل مخروطی در کنار هم قرار می‌گیرند که اصطلاحا دکمه (button) نامیده می‌شوند و به همین دلیل این گیاهwood Button یاButton mangrove هم نامیده می‌شود. (۱-۲) به کنوکارپوس در ایران " مورد کویتی" می‌گویند. نام این گیاه در کشورهای عربی "damas " و در کشورهای آفریقایی "qalab" است.

کنوکارپوس از سال ۱۳۸۰ به استان‌های خوزستان، هرمزگان و بوشهر وارد شده و به دلیل سازگاری با محیط، سرسبز بودن، تکثیر سریع آن توسط قلمه‌ها برای کشت در فضای سبز مناطق جنوبی به ویژه در شهر اهواز در باغچه‌های منازل و معابر مورد استفاده قرار گرفته است. در مناطق جنوبی از کنوکارپوس به نام "معجزه سبز" یاد می‌شود. بزرگ‌ترین نهالستان‌های تکثیر این گیاه در استان خوزستان وجود دارند و سالیانه تا قبل از مصوبه کمیته سلامت استان خوزستان مبنی بر جلوگیری از تکثیر و کاشت این درخت، بیش از میلیون‌ها اصله نهال آن تکثیر و پخش می‌شدند.

آلرژی‌ها از بیماری‌ها یی هستند که از قدیم انسان‌ها با آن دست به گریبان بوده و همه ساله بهای زیادی برای تشخیص و درمان آن پرداخت می‌شده است. آلرژی پاسخ سیستم ایمنی بدن به تحریکی است که به وسیله عوامل محیطی گوناگونی با نام کلی "آلرژن‌ها " ایجاد می‌شود و نوعی هشدار برای اجتناب از آن عوامل می‌باشد. آلرژن‌های شاخص، شامل آئروآلرژن‌های گیاهی، گرد و غبار منزل، پوسته و موی حیوانات،ها گ باکتری‌ها و قارچ‌ها، قطعات ریسه قارچ‌ها، غذاها و مواد شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان و ... می‌باشند. دانه‌های گرده به عنوان گامتوفیت‌های نر گیاهان و ناقل مواد ژنتیکی نر در تولید مثل جنسی، به عنوان یکی از مواد آلرژی‌زای شایع فوری و زودرس در طبیعت شناخته می‌شوند. گرده‌ها برای انجام عمل لقاح اغلب به هوا رها شده و بخشی از فلور طبیعی هوا در همه فصول را تشکیل می‌دهند و موجب بروز التهاب مخاط بینی، چشم وتشدید آسم می‌شوند. گرده‌ها دارای ترکیباتی از قبیل گلیکوپروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، لیپوپلی ساکاریدها، ذرات کوچک نشاسته و یا حتی پپتیدی ویژه در دیواره یا سیتوپلاسم هستند که می‌توانند باعث آلرژی شوند [۷].

مخاط بینی و بخش فوقانی راه‌های تنفسی، ذرات بزرگ را نگه می‌دارند اما ذرات کمتر از ۵ میکرومتر به درون حفره‌های ششی نفوذ می‌کنند. امروزه امکان اتصال آلرژن‌های گرده‌ای به ذرات کوچکتر و حتی زیر ۱ میکرون را دلیل افزایش واکنش آسم به گرده‌ها می‌دانند. [۹,۷]

بطور کلی توجه به فصل گرده افشانی هر گیاه در هر منطقه به خصوص از نظر تشخیص بالینی بیماری‌های آلرژی تنفسی اهمیت دارد و آشنایی با فراوانی انواع گرده‌های آلرژی زای منطقه محل زندگی و کار افراد و فصل گرده افشانی گیاهان بسیار مهم است. زمان گرده افشانی گیاهان در مناطق مختلف یکسان نیست. تاثیر عواملی مانند رطوبت هوا، جریان باد، ساعات مختلف شبانه روز، آلودگی هوا و حتی شدت نور خورشید در پراکندگی و حضور گرده گیاهان در فضا اهمیت دارد [۱۰].

امروزه وجود ذراتی از آلرژن‌های گرده‌ای به صورت سوسپانسیون بسیار کوچک معلق در هوا به اثبات رسیده است. این ذرات می‌توانند قبل و بعد از دوره گرده افشانی گیاه در هوا موجود باشند و به دلیل اندازه بسیار کوچکی که دارند به اعماق راه‌های تنفس افراد نفوذ کنند. در نتیجه پراکنش آلرژن‌ها از طریق قطرات بسیار ریز آب، آن‌ها روی برگ‌ها و ساقه گیاهان نیز دیده شده‌اند. آلرژن‌ها همچنین می‌توانند از راه ذرات معلق در اتمسفر

یا DEP[1] به سیستم تنفسی انتقال یابند. این ذرات معلق حاصل از سوخت وسایل نقلیه و سایر آلودگی‌های صنعتی می‌باشند [۸،۴].

با بررسی‌های مرجع شناسی انجام شده متاسفانه در داخل کشور هیچ‌گونه پژوهشی برای شناخت دقیق ویژگی‌های فیزیولوژیکی تشریحی تکوینی و آلرژی‌زایی دانه‌های گرده گیاه کنوکارپوس انجام نشده و یا گزارشی در دست نیست. پژوهش حاضر تلاش دارد ضمن معرفی این گیاه شواهد عملی خود را که با بررسی این گیاه در شهر اهواز به عمل آمده است در دسترس محققین قرار دهد.

مواد و روش‌ها

بررسی ساختار اندام‌های رویشی با انتخاب نمونه‌هایی از برگ‌ها، سرشاخه‌ها و ریشه‌های جوان، شستشو و تثبیت آن‌ها در مخلوط اتانول-گلیسرین، تهیه برش‌های دستی، رنگ‌آمیزی سبزمتیل-کارمن زاجی و مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری انجام شد. مخروط‌های گیاه کنوکارپوس که دارای گل‌های فراوان و در مراحل مختلف تکوین بودند در دو فصل بهار و پائیز از درختان فضای سبز شهرستان اهواز جمع‌آوری شدند. قطعات کوچکی از مخروط‌ها در فیکساتور FAA به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت تثبیت شدند و پس از مراحل شستشو، آبگیری، اشباع‌سازی از تولوئن و سپس پارافین از آن‌ها برش‌های میکروتومی به ضخامت ۸ تا ۱۰ میکرومتر تهیه شد. رنگ‌آمیزی برش‌های تثبیت شده بر روی لام‌های شیشه‌ای با هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد و از نمونه‌های مناسب با میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد.

برای بررسی آلرژی‌زایی دانه‌های گرده از مخروط‌های در حال باز شدن و آماده گرده افشانی کنوکارپوس، دانه‌های گرده به میزان کافی جداسازی و الک شدند و در دمای آزمایشگاه خشک و سپس با خیساندن در محلول PBS به مدت ۲۴ ساعت از آنها عصاره ۵% تهیه شد. اندازه گیری میزان کمی پروتئین‌ها، با روش برادفورد (۱۹۷۶) و میزان کیفی با الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد. خوکچه‌های هندی نر نژادها رتلی از انستیتو پاستور تهیه و به سه گروه هفت تایی تقسیم شدند و با فاصله زمانی ۱۰ روز، در سه نوبت ۷۵ میلی لیتر عصاره‌های گرده‌ای تهیه شده از دو فصل بهار و پاییز به روش درون صفاقی به آن‌ها تزریق شد. ۸ ساعت و یک هفته بعد از آخرین تزریق، خون گیری از خوکچه‌ها انجام شد. آزمون‌های سرولوژی (شمارش سلول‌های خونی و میزان قند خون) و سنجش IgE به روش الایزا انجام شد. خوکچه‌ها بدون بیهوشی و تحت شرایط ماساژ و خواب آلودگی برای احساس درد کمتر خونگیری شدند. آزمون‌های کلینیکی پوستی (با تزریق ۱۵ میلی‌لیتر عصاره گرده به روش داخل پوستی) و چشمی، بینی (با چکاندن ۵ میکرولیتر عصاره) انجام شد. میزان ویل و فلر بعد از ۳۰ و ۹۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. خوکچه‌ها پس از اتمام آزمایش‌ها به باغ وحش پردیسان تحویل شدند. تجزیه و تحلیل نتایج و ارزشیابی صحت آن‌ها با روش‌های آماری محاسبه میانگین نتایج و نرم‌افزار ANOVA انجام گرفت و معنی‌دار بودن اثر تیمارها در بیشترین سطح احتمال بررسی شد.

نتایج

۱. ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندام‌های رویشی:

کنوکارپوس یک مانگروی همیشه (چهارفصل) سبز است. ریشه‌های این گیاه در زیر خاک یک شبکه منسجم و توری مانندی را برای تثبیت در خاک بوجود می‌آورند (تصویر ۱). با توجه به ماهیت مانگرو بودن، وابستگی کنوکارپوس به آب بسیار شدید است و در تابستان تحمل بیش از سه روز بی آبی را ندارد به همین دلیل این شبکه از ریشه‌ها تا فاصله زیادی از گیاه بدنبال آب، تاسیسات شهری و فاضلاب را مورد هجوم قرار می‌دهند و نیاز گیاه به آب و مواد غذایی را فراهم می‌کنند. بنابراین به ظاهر این گیاه احتیاجی به آب ندارد اما شبکه گسترده ریشه‌ها این نیاز را تامین می‌کند. ریشه‌های یک درخت مانگرو باید سیستم ریشه‌ای خود را برای جذب اکسیژن به محیط خارج از آب گسترش دهد. لذا به دلیل احتیاج ریشه کنوکارپوس به اکسیژن ریشه‌های هوایی قدرتمند این گیاه که از نوع عصایی می‌باشند، برای بدست آوردن اکسیژن مورد نیاز به راحتی سطح معابر شهری را خراب کرده و به سطح زمین می‌آیند. منظره‌ای که در سطح شهر اهواز دیده می‌شود (تصویر ۲). ساقه گیاه کنوکارپوس از نوع ساقه‌های راست مخروطی با انشعابات زیاد و سطح ساقه و شاخه‌ها پوشیده از کرک‌های بسیار زیاد است. طول ساقه اغلب حدود ۲ متر است که تا ۱۰ متر نیز می‌رسد. برگ‌های این گیاه سبز براق، ساده،

[1] Diesel exhaust particles

نیزه‌ای شکل و دارای دو غده ترشحی در ابتدای هر برگ هستند (تصویر ۴). غدد ترشحی متعددی نیز در امتداد رگبرگ اصلی و در لبه برگ‌ها وجود دارند که همواره قطرات چسبنده و شبنم مانندی از آن به خارج ترشح می‌شوند (تصویر ۳). کنوکارپوس در اهواز اواخر شهریورماه برگ‌های قدیمی خود را به زمین می‌ریزد.

۲. ساختارهای تشریحی گیاه کنوکارپوس

الف. ریشه: برش عرضی ریشه‌های بسیار باریک کنوکارپوس (شکل ۵) نشان داد که ریشه‌ها خیلی سریع به ساختار پسین می‌روند و در آنها از خارج به داخل بافت چوب پنبه (Su)، پارانشیم پوست (Cp)، بافت آبکش پسین (Sph)، ناحیه کامبیوم (Ca)، ناحیه وسیع چوب پسین (Sxy) و مغز ریشه و اشکال متفاوت قابل تشخیص هستند (فلش‌ها در شکل ۶).

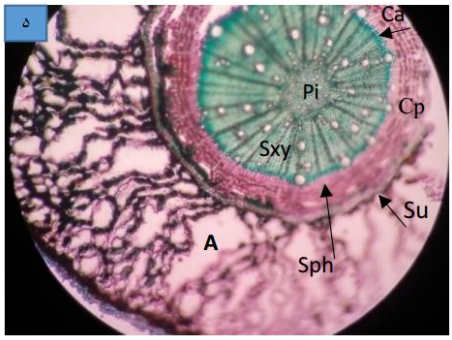
ب. ساقه: در برش عرضی ساقه جوان کنوکارپوس (شکل ۷) که به سرعت وارد ساختار پسین شده است از خارج به داخل اپیدرم (E)، پارانشیم پوست (Cp)، بافت آبکش پسین (Sph)، منطقه کامبیوم (Ca)، ناحیه چوب پسین (Sxy) و منطقه وسیع بافت مغز ساقه (Pi) با سلول‌های فشرده دیده می‌شود. در بزرگنمایی بیشتر (شکل ۸) در سلول‌های بخش درونی بافت آبکش پسین بلورها (به احتمال اکسالات کلسیم) به طور منظمی قرار گرفته‌اند. چنین بلورهایی در برخی از سلول‌های پارانشیمی مغز نیز دیده می‌شوند.

تصویر ۱. بخش کوچکی از شبکه ریشه‌ای کنوکارپوس.

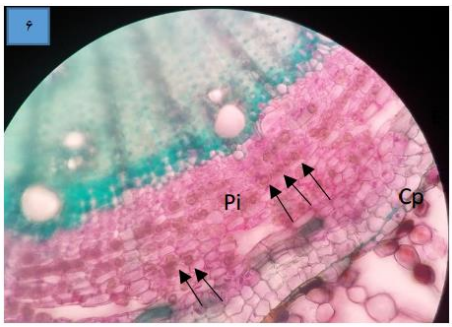
تصویر ۲. نفوذ ریشه‌ها به معابر شهری.

تصویر۳. ترشحات شبنم مانند را از کناره برگ‌های کنوکارپوس نشان می‌دهد.

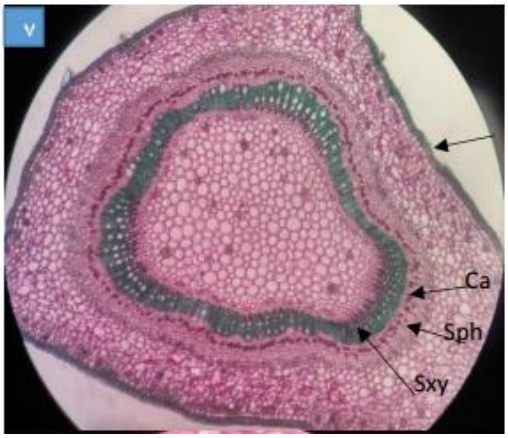
تصویر۴. دو غده ترشحی انتهای برگ

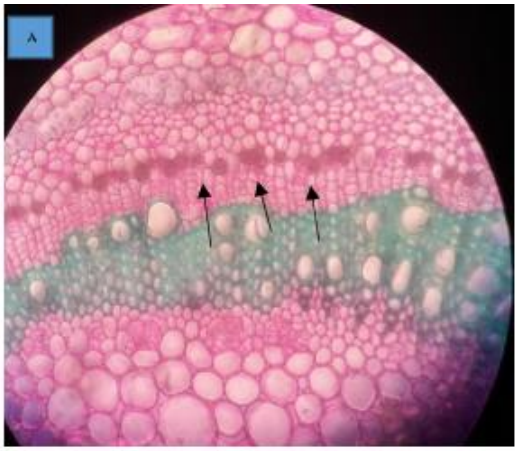


تصویر ۵. برش عرضی ریشه: در برش عرضی ریشه از خارج به داخل بافت چوب پنبه (Su)، پارانشیم پوست (Cp)، بافت آبکش پسین (Sph)، ناحیه کامبیوم (Ca)، ناحیه وسیع چوب پسین (Sxy)، مغز ریشه چوبی شده (Pi) و در بخش مورب آئرانشیم (A) با حفره‌های بزرگ هوا در بین سلول‌ها قابل تشخیص است. ابژکتیف ۱۰x.



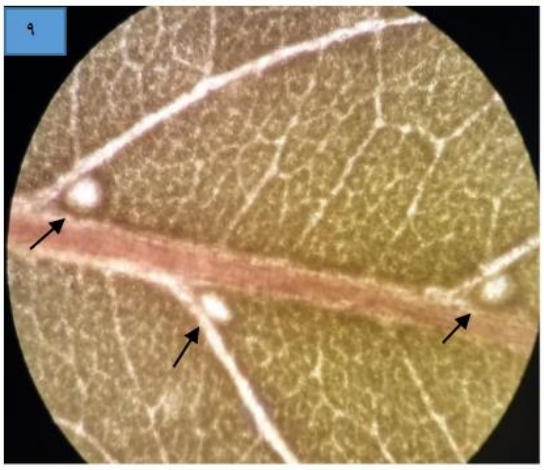
تصویر ۶. تجمع فراوان بلورهای اکسالات کلسیم در بافت آبکش ریشه در ناحیه درونی آبکش پسین قابل توجه است. ابژکتیف ۴۰ x.

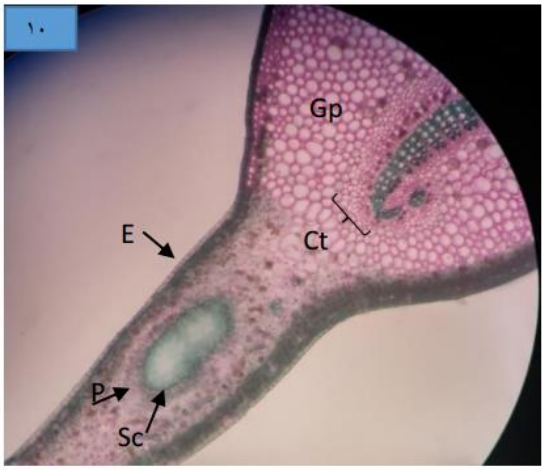




تصویر ۷ و ۸ . برش دستی ساقه جوان را به ترتیب با ابژکتیف ۴x و ۴۰x نشان می‌دهند. در تصویر ۷ از خارج به داخل اپیدرم (E)، پارانشیم پوست (Cp)،بافت آبکش پسین (Sph)،منطقه کامبیوم (Ca)، ناحیه چوب پسین (Sxy) و منطقه وسیع بافت مغز ساقه (Pi) مشاهده می‌شود. در تصویر ۸ تجمع منظم بلورهای اکسالات کلسیم(به احتمال) در ناحیه درونی آبکش پسین قابل توجه است.

ج. برگ: در برش طولی بخشی از دمبرگ و قسمت قاعده‌ای پهنک (شکل۱۰) ازخارج به داخل بافت‌های اپیدرمی(E)، پارانشیم زمینه (Gp) و بافت‌های آوندی (Ct) قابل مشاهده هستند. در ناحیه دمبرگ برش یکی از غدد ترشحی که در آن یک لایه سلول‌های ترشحی(Sc) و لایه هایی از سلول‌های پارانشیمی (P) در اطراف غده ترشحی مرکزی قرار دارند، قابل مشاهده است. برگ‌ها با پوشش کوتینی پوشیده می‌شوند (تصویر ۱۱). سراسر سطح این گیاه پوشیده از کرک می‌باشد که تعدادی از آن‌ها کرک‌های ترشحی و تعدادی کرک محافظ هستند. در تصویرهای ۱۱ و ۱۲ (بخشی ازساقه) و تصویر۱۳ و ۱۴ (برش‌های میکروتومی از گل‌ها) کرک‌ها به خوبی دیده می‌شوند.





تصویر ۹. غدد ترشحی مجاور رگبرگ اصلی در دید با میکروسکوپ نوری. ۱۰. برش دستی برگ از محل دارای غده ترشحی با ابژکتیف ۱۰x، از خارج به داخل بافت‌های اپیدرمی (E)، پارانشیم زمینه (Gp) و بافت‌های آوندی (Ct) لایه سلول‌های ترشحی(Sc) و لایه‌هایی از سلول‌های پارانشیمی (P) قابل مشاهده هستند.

تصویر ۱۱. بخشی از برش دستی برگ با ابژکتیف ۱۰۰x که فلش‌ها کرک‌های موجود در روی برگ را نشان می‌دهند. لایه کوتینی سطح برگ را مشخص می‌سازد. تصویر ۱۲. بخشی از ساقه در زیر استریومیکروسکوپ. کرک‌های فراوان سطح ساقه را فراگرفته‌اند. جوانه زایشی با فلش نشان داده شده است. تصویر ۱۳. برش میکروتومی بخشی از گل با ابژکتیف ۱۰x. تصویر ۱۴. کرک‌های موجود در سطح داخلی گل با ابژکتیف ۱۰۰x

تصویر۱۵. برش میکروتومی از یک مخروط نیمه رس. در دو طرف محور میانی مخروط تخمدان‌های زیرین قرار گرفته‌اند و بقیه قسمت‌های گل‌ها به سمت بیرون از مخروط به صورت فشرده قرار دارند. Ya: محور مخروط، Ov: تخمدان، O: اثری از تخمک، S: کاسبرگ، An: بساک پرچم. Br: برگه(براکته)

۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تشریحی اندام‌های زایشی

در اقلیم ایران در دو فصل بهار و پاییز گل دهی کنوکارپوس صورت می‌گیرد. در فصل گل دهی در انتهای هر شاخه انبوهی از مخروط‌های گل را می‌توان مشاهده نمود (تصویر ۱۶). ۴۰ تا ۵۶ گل کوچک بدون دمگل با آرایش خوشه - سنبله در کنار هم قرار می‌گیرند (تصویر ۱۷) و یک مخروط کوچک را تشکیل می‌دهند که با دمگل کوتاهی به شاخه متصل است. این مخروط در ابتدا کوچک و سبز رنگ است (A در تصویر ۱۶، تصویر ۱۷ و ۱۵) و به تدریج بزرگ (تصویر ۱۸ و ۱۹) و سپس قهوه‌ای رنگ (تصویر ۲۰) می‌شود. گل‌ها نرماده (دو جنسی) هستند و گلبرگ ندارند. هر گل ۵ پرچم و یک تخمدان دو برچه‌ای دارد. بعد از ریختن پرچم‌ها و کاسبرگ‌ها و انجام لقاح هر گل یک میوه را تشکیل می‌دهد و مخروط به مجموعه‌ای از میوه‌ها و دانه‌های فشرده کنار هم تبدیل می‌شود (تصویر ۲۰). در پایان فصل گرده افشانی و پس از تشکیل میوه انبوه مخروط‌های میوه را به صورت خوشه بر روی این درخت می‌توان مشاهده کرد. براساس مشاهدات صورت گرفته اوج گلدهی این درخت در شهر اهواز از اواخر مهرماه تا اوایل آذرماه می‌باشد و در صورت سرد نشدن هوا و پایداربودن هوا در دمای ۳۵-۲۰ سانتی‌گراد این مدت زمان تا اواخر آذرماه ادامه می‌یابد. حشرات به ویژه زنبور عسل یکی از

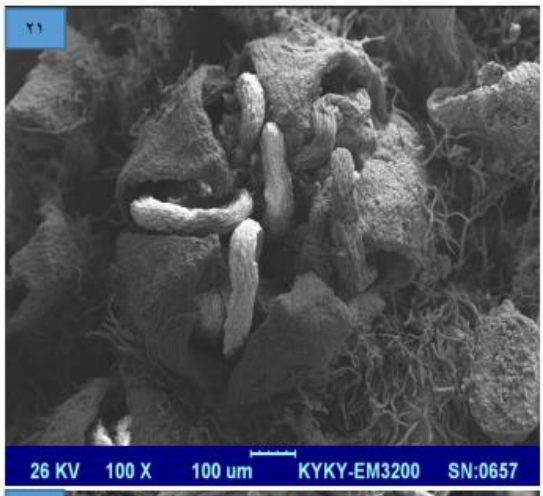
گرده افشان‌های اصلی این گیاه هستند. در کنوکارپوس مخروط‌های گل در ابتدا به صورت صورت متراکم در کنار هم قرار گرفته‌اند و به مرور زمان با رشد شاخه‌ها و بزرگ شدن مخروط‌ها از یکدیگر فاصله می‌گیرند. سراسر گل را از داخل و خارج کرک‌های بسیار ظریف و نازک پوشانده‌اند.

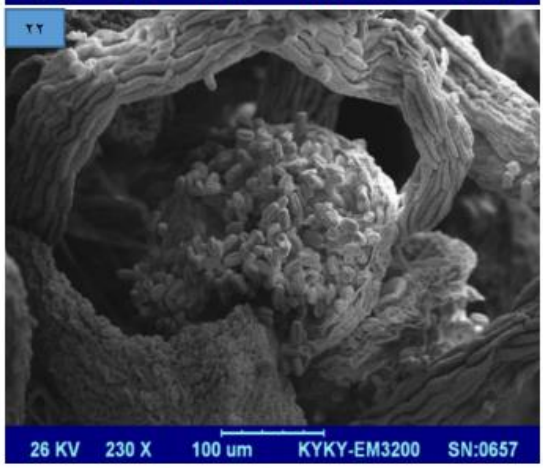
تصویر ۱۶. یک شاخه ازکنوکارپوس و مخروط‌های روی آن را نشان می‌دهد. A. مخروط نارس، B. مخروط نیمه رس، C. مخروط رسیده.

تصویر ۱۷. یک مخروط جوان دارای گل‌های کنوکارپوس که گل‌ها از پایین در حال بازشدن هستند. ۱۸. یک مخروط با گل‌های کاملا بازشده. ۱۹. یک مخروط مسن. اغلب گل‌ها ریخته‌اند و مخروط بزرگ‌تر شده است. ۲۰. مخروط‌های چوبی شده

۴- مشاهده بساک و گرده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM

در بررسی‌های به عمل آمده از گل‌های کنوکارپوس تعداد ۵ عدد پرچم با میله بلند و ساده در هر گل دیده شد (تصویر ۲۱). با توجه به تصاویر (تصویر ۲۲) به نظر می‌رسد بساک تعدادی از پرچم‌ها در صورت قرار گرفتن در هوای مرطوب قبل از بازشدن گل می‌شکفند و موجب بیرون ریختن گرده‌ها می‌شوند. بر روی هر بساک پس از شکافته شدن مقادیر بسیار زیادی از دانه‌های گرده دیده می‌شوند (تصویر ۲۳ و ۲۴). تصاویر مذکور از گل‌های جمع شده بلافاصله پس از اولین باران سال ۹۳ اهواز تهیه شده‌اند.

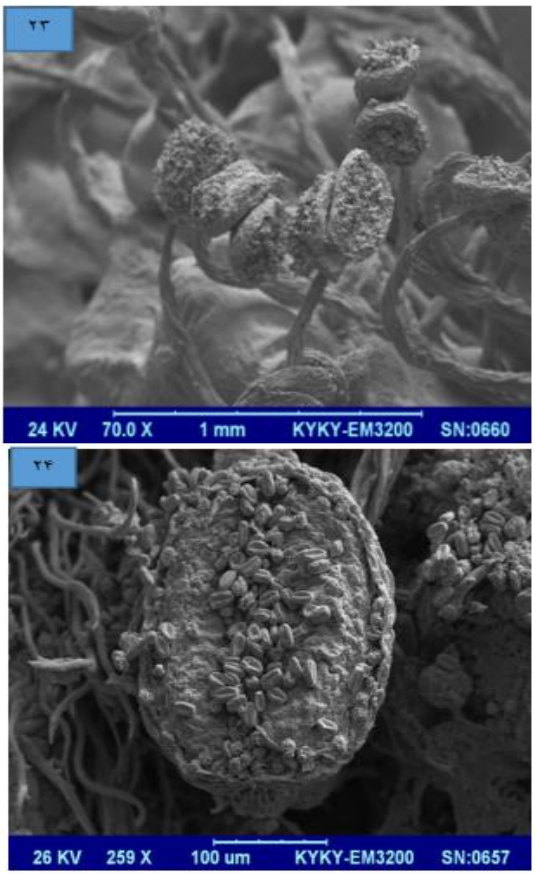




تصویر ۲۱. یک گل در حال بازشدن کنوکارپوس. ۲۲. گل در هنگام بازشدن از نمایی نزدیک‌تر دیده می‌شود.

دانه‌های گرده به روش وودهاوس (۱۹۳۵) واستولیز (ارتمن، ۱۹۶۰) در نمای قطبی و استوایی مشاهده شدند (تصاویر ۲۵ و

۲۶). دانه‌های گرده کنوکارپوس به دلیل وجود رنگدانه‌های فراوان در دیواره دانه گرده، زرد رنگ می‌باشد. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) دانه گرده کنوکارپوس به شکل بیضی کشیده در نمای روبرو و چند وجهی در نمای قطبی دیده می‌شود. طول گرده ۱۷/۶۲ $m\mu$ و عرض آن ۱۰/۷۸$m\mu$ است. در نمای قطبی نیز گرده‌ها به اندازه ۹/۷۵ میکرومتر دیده می‌شوند.

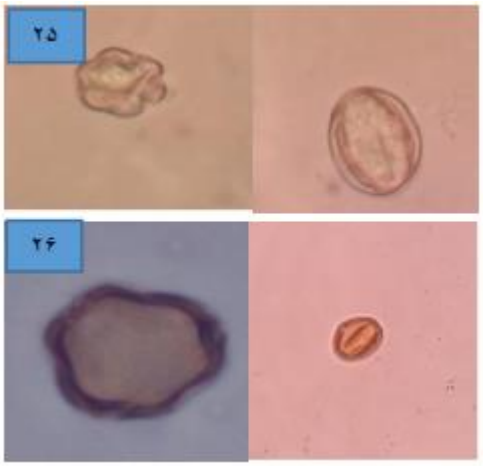


تصویر۲۳. پرچم‌های گل در کنوکارپوس به همراه انبوه گرده‌ها. ۲۴. گرده‌های روی بساک کنوکارپوس از نمایی نزدیک‌تر.

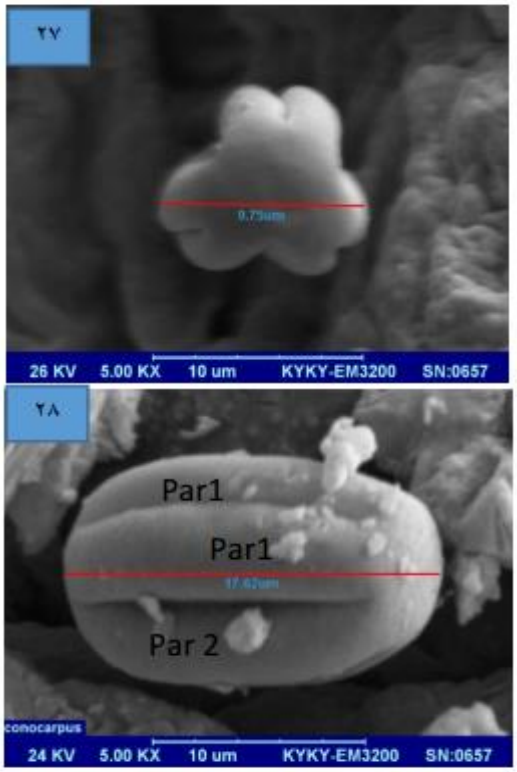
گرده‌ها ۶ شیاری و سه منفذی می‌باشند و اگزین صاف (کمی خشن) به نظر می‌رسد(تصویر ۲۸). در سطح دانه گرده جسمک‌هایی (پارتیکول‌هایی) دیده می‌شوند که می‌توانند از محتویات گرده‌ای رسیده به سطح (Par1) و یا برخی از آلاینده‌های محیطی(Par2) باشند.

۵ . بررسی الرژی زایی دانه‌های گرده کنوکارپوس

در اندازه گیری کمی با تست برادفورد میزان پروتئین گرده‌ها در فصل بهار ۲۰/۲۸۵ $\mu g/ml$ با میزان جذبOD) (۰/۷۰۶ و در فصل پاییز ۲۳/۹۷۱$\mu g/ml$ با میزان جذب (OD) ۰/۸۳۵ قرائت شد.

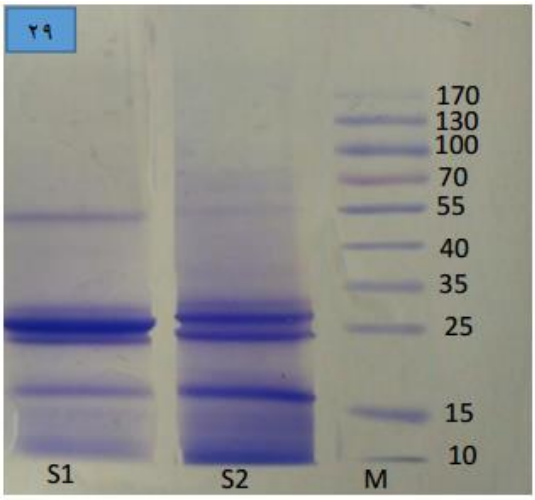


تصویر ۲۵. نمای یک دانه گرده به روش وودهاوس. تصویر ۲۶. یک دانه گرده استولیز شده.



تصویر ۲۷. نمای استوایی و تصویر ۲۸ نمای قطبی دانه گرده کنوکارپوس در مشاهده با میکروسکوپ الکترونی SEM

در بررسی کیفی پروتئین‌های گرده کنوکارپوس فصل پاییز با الکتروفورز باندها در محدوده ۵۵ و ۳۲ کیلو دالتون خفیف و در محدوده‌های۱۰، ۱۵، ۲۵، ۳۰ کیلودالتون باندهای اصلی مشاهده شدند.



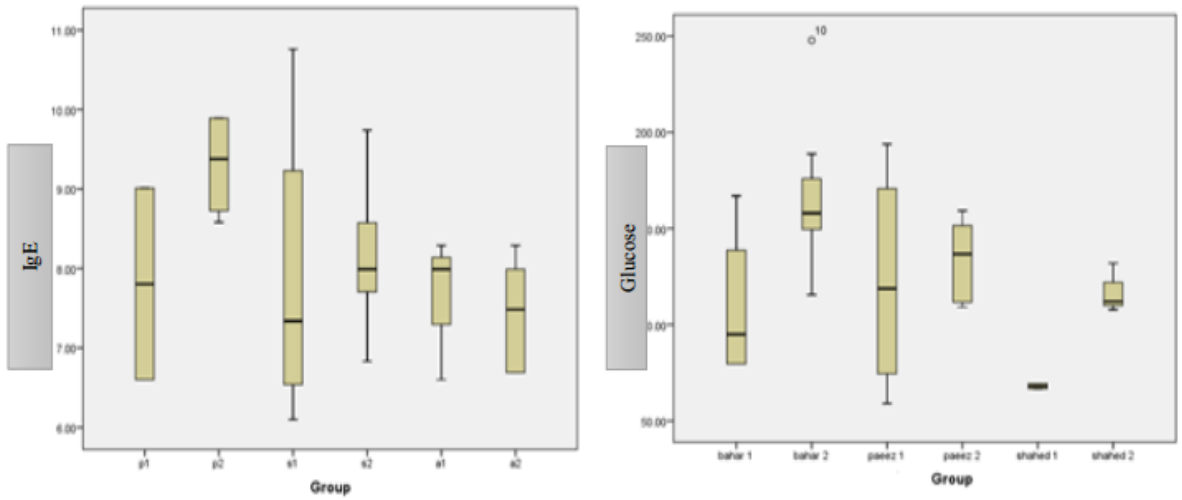
تصویر ۲۹. نیم رخ الکتروفورز SDS-PAGE که در آن M مارکر، S1, S2 باندهای پروتئین عصاره گرده(۵%) کنوکارپوس در فصل پاییز که با دو بار تکرار انجام شده است.

علایم کلنیکی حاصل از آزمون چشمی (OPT) در هیچ یک از دو فصل دیده نشد و علایم تحریک بینی (NPT) برای عصاره‌های گرده‌ای فصل بهار اندکی زودتر آغاز شد ولی شدت تحریک بینی خوکچه‌ها با عصاره گرده‌های فصل پاییز بیشتر دیده شد. در مقایسه و اندازه گیری میزان فلر دو فصل تفاوت معنی داری دیده نشد اما در آزمون ویل در گروه پاییز و بهار بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق تفاوت معنی داری دیده شد ($p=0.007<0.05$).

تغییرات ویل بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق عصاره گرده‌های بهار بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر و در نمونه‌های پاییز بین ۱۳ تا ۳۰ میلیمتر دیده شد. همچنین تغییرات ویل پس از ۹۰ دقیقه در نمونه‌های بهار بین ۱۷ تا ۳۰ و در نمونه‌های پاییز بین ۱۵ تا ۳۵ میلی‌متر مشاهده گردید.

جدول ۱. بررسی میانگین میزان گلوکز بعد از ۸ ساعت و یک هفته بعد از آخرین تزریق عصاره گرده‌ای ۵% کنوکارپوس در دو فصل بهار و پاییز

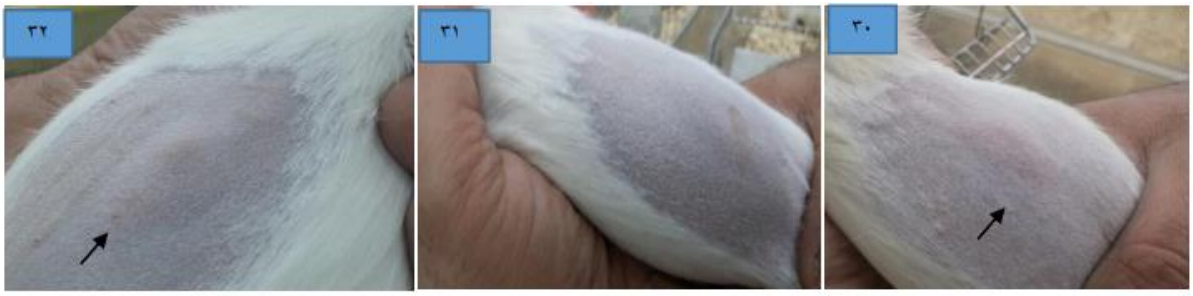
	control		spring		autumn	
Glucose X ± SE	8hr	1 week	8hr	1 week	8hr	1 week
	68+1.28	117+7.46	109+20.58	167+15.73	122.5+30	134+8.58



نمودار ۱. مقایسه میانگین و واریانس میزان IgE و گلوکز خوکچه‌های هندی تحت تیمار با عصاره گرده ۵% بین گروه‌های بهار، پاییز

جدول ۲. بررسی میانگین میزان IgE بعد از ۸ ساعت و یک هفته بعد از آخرین تزریق عصاره گرده‌ای ۵% کنوکارپوس در دو فصل بهار و پاییز

	control		spring		autumn	
IgE X ± SE	8hr	1 week	8hr	1 week	8hr	1 week
	7.80 ± 1.20	9.30 ± .34	7.88 ± 1.01	8.16 ± .34	7.71 ± .34	7.43 ± .27



تصویر۳۰. ویل نمونه بهار. ۳۱. ویل نمونه کنترل. ۳۲. ویل نمونه پاییز

اندازه‌گیری میزان قند خون در همه گروه‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p=0.046>0.05$) که که حاکی از تاثیر عصاره‌ها بر گروه‌ها می‌باشد. همچنین درهیچ یک از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری در هیچ یک از سلول‌های خونی دیده نشد.

در اندازه‌گیری میزان IgE در بین گروه‌ها، تفاوت معنی‌دار در گروه پاییز بعد ازگذشت یک هفته از تزریق و گروه کنترل دیده شد ($P=0.003<0.05$).

بحث و تفسیر

ساختار ریشه در اغلب گیاهان مانگرو سطحی وگسترده می‌باشد، اما ریشه‌های کنوکارپوس به صورت سطحی و عمقی دیده می‌شوند. به نظر می‌رسد، به احتمال با توجه به تغییرات محیطی در این درخت ساختار ریشه دچار تغییراتی شده باشد. وجود آئرانشیم گسترده می‌تواند نشانی از مانگرو بودن این گیاه باشد. کرمی و مجد نیز در سال ۱۳۹۰ وجود آئرانشیم گسترده در ریشه مانگروی *Avicennia marina* را گزارش کرده‌اند.

ساقه‌های جوان سبز رنگ و ساقه‌های مسن به رنگ قهوه‌ای مایل به سیاه و پوسته پوسته بودند که با گزارش‌های Francis [۲]، Kubtitzki [۱۱] وBrown [۱۲] مشابه است. ویژگی‌های ساختار تشریحی ساقه در گیاه کنوکارپوس با گزارش Brown [۱۲] و Kubtitzki [۱۱] همسویی دارد. همانند همه مانگروها بلورهای کریستالی (به احتمال اکسالات کلسیم)، در همه بخش‌های آن مشاهده می‌شود. تجمع این بلورها در ساقه به ویژه در اطراف آوندها بسیار بیشتر از سایر قسمت‌های گیاه می‌باشد. برگ‌های پوشیده با کوتین کنوکارپوس با اغلب برگ‌های گیاهان مانگرو مانند گزارش‌های کرمی و مجد درباره گیاه حراء مطابقت دارد. نمک جذب شده توسط ریشه‌های گیاهان مانگرو با تمرکز در شاخه‌ها و برگ‌ها قبل از افتادن آنها از درخت و یا ترشح نمک از منافذ متعدد روی برگ دفع می‌شود دفع نمک در برخی از گونه‌های مانگرو ممکن است به عنوان یک سپر دفاعی مهم در برابر حمله قارچ‌ها و کاهش آسیب پذیری درخت باشد [۱۳]. پژوهشگران از جمله کرمی و مجد وجود بلورهای اکسالات کلسیم در سلول‌های ریشه و ساقه گیاهان مانگرو را گزارش کرده‌اند در پژوهش حاضر نیز چنین بلورهایی در ریشه و به ویژه در سلول‌های ساقه فراوانند که با توجه به چندین مرحله شستشو با آب مقطر، آب ژاول و اسید در مرحله رنگ آمیزی و باقی مانده این بلورها در بافت گیاه، به احتمال بلورهای دیده شده در ساختار کنوکارپوس نیز اکسالات کلسیم می‌باشد.

طبق مشاهدات انجام شده ،گل آذین گیاه کنوکارپوس از نوع پانیکول است، که با گزارشKubtitzki [۱۱] و Brown در [۱۲] همسو می‌باشد. نبود گلبرگ‌ها در گل‌های فشرده به هم کنوکارپوس، با گزارش‌های کرمی و مجد در گیاه مانگرو *Avicennia marina* که حضور گلبرگ برای هر گل را گزارش کرده‌اند همسویی ندارد. در گزارش‌های ارائه شده توسط Francis [۲]، Kubtitzki [۱۱] و Brown [۱۲] زمان گل دهی در این گیاه را سراسر طول سال ذکر کرده اند که با مشاهدات ما در شهر اهواز همخوانی ندارد. با توجه به نوسانات بالای دما بین ۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد درشهر اهواز، کنوکارپوس فقط در دمای هوا ۲۵-۳۰ گل دهی را انجام می‌دهد. همچنین مشاهده دانه گرده با میکروسکوپ الکترونی نگاره و میکروسکوپ نوری، گرده‌ها را به شکل بیضی و در نمای قطبی چند وجهی نشان داد. گرده‌ها ۶ شیار و ۳ منفذ و اندازه‌ای در حدود ۱۸ میکرومتر دارند. سطح اگزین صاف به نظر می‌رسد،که با نتایج مشاهده گرده وگزارش شکل آن توسطBertrand [۱۴] وMachado [۱۵] مطابقت دارد.

حداقل چهار محرک برای رهایی آلرژن از دانه‌های گرده وجود دارد: رطوبت نسبی هوا، طوفان‌های تند و شدید، باران‌های سنگین و آلاینده‌های هوا [۷] در رطوبت زیاد آلرژن‌های گرده‌ای، در فرایندی مشابه با شرایط فیزیولوژیک گرده افشانی، رها می‌شوند. از طرفی آلاینده‌های هوا مانند دی اکسید گوگرد، غبار، دود، ذرات معلق و ... ، از میان آلاینده‌های مختلف محیط زیست بیشترین اثر را بر سلامت انسان و سایر جانداران دارند. و دانه‌های گرده که از عوامل اصلی تب یونجه، آسم آلرژیک و درماتیت‌های پوستی هستند، این علائم را در مناطق دارای آلاینده‌های صنعتی و موتوری بیشتر نشان می‌دهند [۱۶]. در شرایط آلودگی هوا رهایی مواد درونی گرده‌ها (آلرژن‌ها) و برهمکنش ذرات آلاینده با دانه‌های گرده منجر به فعال شدن دانه‌های گرده شده، که در شرایط رطوبت آئروسل‌های آلرژیک را رها می‌کنند. این ذرات وارد مجاری تنفسی شده و بعنوان حامل ذرات آلاینده نیز عمل می‌کنند. بنابراین در مناطق با آلودگی زیاد، مواد ذره‌ای نه فقط آلاینده‌ها بلکه آلرژن‌های حاصل از گرده را نیز حمل می‌کنند و دانه‌های گرده نه فقط آلرژن‌ها بلکه آلاینده‌ها را نیز منتقل می‌کنند. مطالعات نشان می‌دهد که ذرات معلق و سایر آلاینده‌ها بر ساختار گرده، رهایی آلرژن‌های گرده ای، میزان پروتئین کل و مقدار پروتئین‌های محلول گرده‌ها تاثیر می‌گذارند (۱۷). گزارش گرده‌های آلرژی زای درختان اکالیپتوس، که از نوع گرده‌های باد پسند هستند، توسط Verma در ۲۰۱۴ [۱۸] و Singh [۱۰] به عنوان یک الگوی مناسب از دانه‌های گرده آلرژی زا در خانواده مورد است، که می‌تواند مدل مناسبی برای مقایسه با کنوکارپوس باشد. دانه‌های گرده کنوکارپوس ذخایر پروتئینی زیادی ندارند. در دانه‌های گرده ممکن است، ذخایر پروتئینی زیاد باشد، اما پروتئین‌ها از توان بالایی برای ایجاد واکنش‌های آلرژی زا برخوردار نباشند. از سوی دیگر، در برخی دانه‌های گرده ذخایر پروتئینی کم است، اما همین مقدار کم می‌تواند موجب واکنش‌های شدید آسم و آلرژیک شود [۱۷]. کم بودن مقدار کل پروتئین دانه گرده را می‌توان با کم بودن مقدار کل پروتئین گرده سرو در پژوهش‌های کیابی و مجد [۱۹] و شاه علی و مجد [۲۰] همسو دانست.

نتایج الکتروفورز حاصل از عصاره بدست آمده از پروتئین‌های Major (اصلی) را در محدوده کیلودالتون ۲۵، ۱۵، ۳۰ نشان داد نتایج الکتروفورز به دست آمده، با گزارش مجد و صالحی بر روی گیاه مانگرو *Avicenna marina* [۱۲] همسویی ندارد. در بررسی اندازه گیری قند خون بین تمام گروه‌ها، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد، که حاکی از تاثیر عصاره‌ها بر گروه‌ها می‌باشد. این نتایج با گزارش ناصری و مجد [۲۲] بر روی ابریشم مصری همسو می‌باشد. شمارش سلول‌های خونی در بین دو گروه پاییز و بهار هیچ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد که این نتیجه با نتایج پژوهش مجد و ناصری [۲۲] و مجد و جزینی‌زاده [۲۳] همسو می‌باشد. در اندازه‌گیری میزان IgE در بین گروه ها، تفاوت معنی دار در گروه پاییز بعد از یک هفته تزریق و گروه کنترل دیده شد به عبارتی در گروه پاییز میزان IgE بعد از یک هفته از گذشت تزریق میزان IgE افزایش می‌یابد. آزمون چشمی در خوکچه ها، هیچ علامت محسوسی را در گروه‌ها نشان نداد، و نتایج ازمون بینی بدست آمده اختلاف اندک بین این دو گروه را نشان داد. نتایج بدست آمده، از آزمون پوستی حاکی از واکنش شدیدتر عصاره پاییز به خوکچه‌ها بود و بیشترین میزان ویل و فلر در این گروه به ویژه ۳۰ دقیقه بعد از تزریق، در این گروه مشاهده شد. همچنین مقایسه نتایج تزریق دو گروه بهار و پاییز بعد از نیم ساعت، حاکی از معنی دار بودن آزمون بین دو گروه بود. این نتیجه با گزارش مجد و شاه علی [۲۰]، مجد و جزینی‌زاده [۲۳] و مجد و کیابی [۱۹] مطابقت دارد. در این پژوهش با توجه به شواهد کلینیکی و سرولوژیکی گروه‌های خوکچه هندی تحت تیمار و مقایسه با نمونه کنترل، تا اندازه‌ای احتمال تفاوت بین آلرژی‌زایی دانه‌های گرده در این دو فصل را می‌توان اعلام نمود. بررسی‌های بیشتر این پژوهش به منظور ارائه دقیق‌تر، منوط به شمارش دانه‌های گرده در شهر اهواز است. Anjum [۲۴] با بررسی و شمارش دانه‌های گرده کراچی پاکستان، احتمال آلرژی زا بودن دانه‌های گرده کنوکارپوس در این شهر را تایید می‌کند. لذا با توجه به دوره دوم گرده افشانی کنوکارپوس در طول پاییز و همزمانی این فصل با باران‌های موسمی تند و رعد و برق، رطوبت بالای این فصل در شهر اهواز و مشاهده گل‌ها و بساک‌های پر از گرده بعد از باران و مقایسه با گل‌ها در روزهای آفتابی، افزایش مراجعات ناشی از حملات تنفسی به اورژانس و غالب بودن این گیاه در فضای شهری، فرضیه آلرژی زا بودن دانه‌های گرده گیاه کنوکارپوس تقویت می‌شود، که

این نظریه با گزارش شوک اسمزی گرده‌ها ناشی از باران و طوفان شدید سال ۱۹۸۵ در انگلستان، توسطPeak& Erse و گزارش "طوفان آسم" ناشی از گرده‌های چمن چاودار در باد و رطوبت بالای سال۲۰۱۶ استرالیا با حدود ۸۰۰۰ مراجعه کننده تنفسی و ۶ عدد قربانی شباهت دارد.

منابع:

[1] Stephen B. Joy H. Kim C. *Conocarpus erectus*. IFAS. 2011;1: 239- 533

[2] Francis J. Button Mangrove. USDA 1997; 343-352

[3] Abdulrahaman S, Nehad M. Antibacteri -al efficiency and impairment some bacteria strains treated with *conocarpus erectus* L. extract. IJABPT. 2013; 4:37-49

[4] Bashir M, Uzair M, Chaudhry B. A review of phytochemical and biological studies on Conocarpus erectus (Combretace -eae). PJPR. 2015;1:1-8

[5] Shohayeb M, Abdel-Hameed E, Bazaid S. antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of conocarpus erectus L. IJPBS.2013;3:544-553.

[6] Redha A, Al-Mansour A, Suleman P, Afzal M, Al-Hasan R. Leaf Traits and Histochemistry of Trichomes of Conocarpus lancifolius a Combretaceae in Semi-Arid Conditions. AJPS.2011; 4 :165-174

[7] Behrendt H, Bhecker WM.. Localizatio -on, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of enviromenttal factors current opinion in Immunology. IA AI.2001;13(6): 709-715.

[8] Rezanezhad F, Majd A. The Effect of Air Pollution on Pollen Allergenecity in *Spartium junceum* JSCI. 2009;18 (44) :973-982

[9] Rezanejad F. Majd A. Shariatzadeh M. Moin M. Aminzadeh M. Mirzaeian M. Effect of pollution on soluble proteins, structure and cellular matrterial release pollen of Lagerstroemia indica L.ABSB. 2003; 1:129-132

[10] Singh A, Mathur C. An aerobiological perspective in allergy and asthma. APACI. 2013;1: 2233-8276

[11] Kubitzki K .The Families and Genera of Vascular Plants , Flowering Plants .USA, Springer . 2007,164-175

[12] Brown S, Hazell J, Cooprider K. Conocarpus erectus.IFAS. 2011**;** (239) 533

[13] Vannucci M. Mangrove Managment and Conservation: Present and Future. 2004. digitallibrary.un.org

[14] Bertrand R . Pollen from four common new world mangroves in Jamaica .Grana. 2009 ;22: 147-151.

[15] Nadia T, Machado T. Interpopulation variation in the sexual and pollination systems of two Combretaceae species in Brazilian mangroves. AB.2014; 114: 35–41.

[16] Amjad L, Majd A, Fallahian F, Sadatmand S. Comparative study of allergenicity of mature and immature pollen grains of *Achillea wilhelmsii*. JAMS.2008; 11(2):1-8

[17] Sharifshoshtari M, Majd A, Porpak Z, Moein M. .The study of structural characteristics and Allergenicity potential of *Chrysanthemum maximum* L. pollen grains. . [Tehran]: Islamic Azad University Tehran North Branch: 2008.400p

[18] Verma K, Sonway N. Pollen allergy in India. GJSB. 2014; 3: 221-224

[19] Majd A. Kiabi Sh. The effect of Tehran's pollution atmosphere on ultrastrac -ctural changed and allergenicity of *Cupres -sus Arizoica* pollen grains. AJA. 1997**;** 407-417

[20] Shahali Y, Majd A, Arbabiya S.The study of structural characteristics and Allergenicity potential of *Cupressus arizonica* L. pollen grains. [Tehran]: Islamic Azad University Tehran North Branch :2008.170p

[21] Salehi M. Majd A. jonoubi P. karami L. Pourpak Z. Gholamali K. Effect of environmental pollution on the proteins, allergenic bands, ontogeny and structure of Avicennia marina (Forsk.) Vierh (Avicennia -ceae) pollen grains. Springer.2013;30: 59–69

[22] Zhanganeh Naseri M, Majd A .The study of Allergenicity potential of *Caesalpinia gilliesii* pollen grains. JNRM. 2009; 19:75-82

[23] Jazini rad A, Majd A, Porpak Z. The study of Allergenicity potential of **Phoenix dactylifera** pollen grains. [Tehran]: Islamic. Azad University Tehran North Branch: 1398. 159p

[24] Anjum P, Muhammad Q, Mian S. Airborne Pollen Survey of Karachi and Adjacent Areas in Relation to Allergy .DBUKPSJ. 2013; 2 (4): 289-298

The study of characters and allergenicity of pollen of *Conocarpus erectus* L. in spring and autumn in Ahwaz

Javidan M.[1]*, Majd A.[1], Nezhad Satari T.[2], Arbabian S.[1]

[1] Department of Biology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch
[2] Department of Biology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University,Tehran Science and Research Branch

* (Corresponding author): javidan_marjan56@yahoo.com

Received: March 2020 Accepted: December.2020

Abstract

Conocarpus erectus L. is an ornamental and evergreen mangrove tree in the tropics and subtropics, where it adapts well to environmental stresses. This tree has been extremely planted in the recent decade in the southern provinces of Iran, especially in the city of Ahwaz. Anatomical characteristics of roots, stems and leaves of this plant were examined using manual incisions and its reproductive organs were examined by using microtomy incisions and cell-histological methods. Observations of flowers and cones by SEM electron microscopy and stereo microscopy showed a large number of pollen grains in the anthers of flags and numerous hairs across the surface of the plant limbs. Allergenic potential of Conocarpus L. pollen was examined by collecting of pollen and then their extract was taken by soaking for 24 hours in PBS solution. Quantitative measurement of proteins was performed by Bradford method and their qualitative evaluation was performed by SDS-PAGE electrophoresis. 75 µl from 5% extracts Prepared from spring pollen and autumn pollen were injected into guinea pigs three times with an interval of 10 days. Then in two groups: 8 hours and one week after the last injection, blood samples were taken from pigs for serological tests (blood cell count and blood sugar level) and total IgE was measured by ELISA.Clinical tests including skin, eye and nose tests were performed on piglets. Results showed that the amount of proteins in autumn pollens are higher than in spring pollens. Qualitative analysis of pollen proteins showed that in autumn pollens, bands are formed in the range of 10, 15, 25 and 30 kDa. In a comparative evaluation of the allergenicity of pollen grains collected in spring and autumn, the results showed that skin tests, IgE and blood sugar levels were significantly different.

Keywords: Allergy, Conocarpus, Ahwaz, Pollen.