



بررسی ویژگی‌های ساختاری و توان آلرژی‌زایی دانه‌های گرده بلوط ایرانی (*Quercus brantii* L.)

زهرا تردست^{۱*}، احمد مجد^۲، افرا خسروی^۳، طاهر نژاد ستاری^۱

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.
^۳ گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.

E-mail: Zahratardest@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۰

چکیده

مطالعات گرده‌شناختی جایگاه ویژه‌ای در علم گیاه‌شناسی دارد. از آنجایی که دانه‌های گرده به عنوان یک عامل حساسیت‌زا برای انسان‌ها مطرح هستند و بررسی آنها در زمینه آلرژی‌زایی اهمیت ویژه‌ای دارد. در مطالعات مربوط به آلرژی دانه‌های گرده، درختان، علف هرز و چمن‌ها به عنوان عامل موثر در افزایش حساسیت‌زایی فصلی مطرح هستند. از جمله درختانی که دارای گرده‌های باد دوست بوده و بسیار مورد توجه متخصصان آلرژی است، درخت بلوط است که در نقاط مختلف کشور به صورت خودرو می‌روید. کسب آگاهی‌های علمی در مورد مراحل تکوینی دانه گرده گیاه بلوط و آلرژی‌زایی آن هدف پژوهش حاضر است. دانه‌های گرده از نقاط مختلف استان ایلام جمع‌آوری شدند و بررسی‌های سلول-بافت‌شناسی برای آنها انجام شد. به منظور مشاهده آگزین دانه گرده از روش استولیز استفاده شد. آزمون‌های سنجش ابتدایی برای تشخیص آلرژی روی رت‌های نر با وزن متوسط ۲۰۰ گرم انجام گرفت. عصاره گرده‌ای پنج درصد با استفاده از بافر فسفات نمکی در pH: 7/4 تهیه شد. از رت‌های مورد آزمایش پس از ۲، ۸ و ۲۴ ساعت و یک هفته از آخرین تزریق میزان IgE تام خون انجام شد. تشکیل ویل و فلر به وسیله آزمون‌های پوستی نتایج مثبت را در حد منحنی $P \leq 0.05$ نسبت به نمونه کنترل نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره گرده‌ای بلوط آلرژی‌زایی از نوع تیپ یک آلرژی را نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: آلرژی، دانه‌های گرده، *Quercus brantii* L., IgE

مقدمه

تیره و ده جنس است که بلوط با ۳۰۰ [۱۸] تا ۶۰۰ [۲۰] گونه بزرگترین جنس این خانواده را تشکیل می‌دهد [۱۶]. بلوط ایرانی با نام علمی *Quercus brantii* گیاهی پایا با گل‌آذین دم‌گربه ای نر، پرچم‌ها ۵-۷ تایی، گل‌های ماده منفرد یا دوتایی

تیره راش (*Fagaceae*) با داشتن حدود ۹۰۰ گونه درختی و درختچه‌ای خزان‌کننده و همیشه سبز یکی از تیره‌های متنوع گیاهی محسوب می‌شود و پراکنش وسیعی در نیمکره شمالی دارد. این تیره دارای سه زیر

بافت- سلول شناختی تثبیت کننده (Formalin Acetic acid Ethanol) FAA70% قرار داده شدند. سپس ذخیره‌سازی در الکل ۷۰ درصد انجام شد. پس از جاسازی، برش‌گیری نمونه‌ها در قالب‌های پارافین با میکروتوم در اندازه ۱۰ میکرو متر صورت گرفت [۲۱] و از روش رنگ‌آمیزی مضاعف هسته و سیتوپلاسم به‌وسیله هماتوکسیلین و ائوزین استفاده شد. نمونه‌های مورد مطالعه با میکروسکوپیوری مشاهده شدند. به منظور مشاهده اگزین دانه‌گرده از روش استولیز استفاده شد.

عصاره‌گیری از دانه‌های گرده

به منظور بررسی اثرات آلرژی‌زایی دانه‌های گرده ابتدا عصاره‌گیری از گرده‌ها انجام شد. برای تهیه عصاره گرده‌ای از بافر فسفات نمکی (PBS) 0.1 M (pH: 7.2) استفاده شد. هر گرم از گرده‌ها در ۲۰ میلی لیتر بافر حل شد (۱:۲۰). مخلوط گرده‌ای حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C روی شیکر به هم زده و در 10000g به مدت ۴۰ دقیقه در 4°C سانتریفوژ شد. محلول شناور حاصل را یک شبانه روز دیالیز نموده و سپس تا زمان استفاده در دمای 20°C -ذخیره گردید [۱۷].

حیوانات آزمایشگاهی

در این پژوهش از حیوانات آزمایشگاهی به عنوان شاخص ارزشیابی تظاهرات آلرژی‌زایی استفاده شد. حیوانات مورد آزمایش ۲۵ سر رت نر با وزن ۱۹۰ تا ۳۴۰ گرم و سن ۴ تا ۵ هفته بودند که از دانشگاه علومپزشکی ایلام خریداری و در ۵ گروه ۵ تایی دسته بندی شدند. به حیوانات به منظور حساس سازی عصاره گرده‌ای تزریق و حیوانات گروه شاهد با همان مقدار PBS تیمار شدند. تزریق با سرنگ توبرکولینی یک میلی لیتر به میزان ۷۵ میکرو لیتر در هر مرتبه بود [۱۹]. پس از حساس‌سازی، به منظور ایمن‌سازی آنها هریک از عصاره‌های گرده‌ای در دو تکرار، هر هفته یکبار به طریق درون صفاقی تزریق شد.

می‌باشد و گرده افشانی آن به وسیله باد است [۱۱]. بلوط از جمله درختان خودروی قسمت‌های مختلف ایران و بخصوص مناطق زاگرس به ویژه استان‌های غرب کشور می‌باشد. در استان ایلام جنگل‌های بلوط به دلیل موقعیت، عملکرد و تنوع زیستی حاکم بر آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گذشته از نقش حیاتی، این درخت بسیار زیبا در حفظ استحکام منطقه از نظر سیلاب در پاکیزگی هوا و در تشکیل پوشش جنگلی منطقه مورد توجه می‌باشد [۳]. گزارش‌های متعددی در زمینه‌های اکولوژیکی گیاه در مناطق مختلف ایران توسط احمد حسینی و همکاران انجام شده است [۱۰]. همچنین مطالعاتی در زمینه ضد میکروبی میوه آن [۴] و پژوهش‌های هم در زمینه تاثیرات فیزیولوژیکی [۲] و محیطی [۱] توسط شیوا صفربور و همکاران انجام شده، اما تاکنون بررسی‌های آلرژی‌زایی دانه‌های گرده گیاه بلوط در کشور ما نتایجی ارائه نشده است. گزارش‌ها در ارتباط با بیماری‌های رینیت و آسم آلرژیک در ارتباط با قرار گرفتن در معرض دانه‌های گرده حال افزایش است [۸ و ۷]. در پژوهش حاضر سعی شده، پس از بررسی‌های میکروسکوپی دانه‌های گرده گیاه و سنجش ابتدایی تشخیص آلرژی‌های گرده به کمک آزمون‌های پوستی میزان تام IgE به طور تجربی بررسی شود.

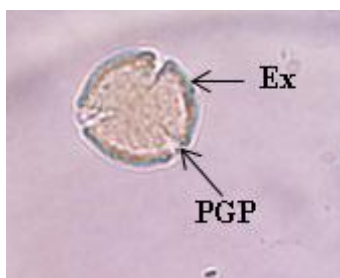
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گرده‌ها

گل آذین‌های نر درخت *Q.brantii* در اوایل فروردین ماه سال ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از نقاط مختلف استان ایلام جمع‌آوری و بساک‌های رسیده آن از گل‌ها جدا و دانه‌های گرده با خرد کردن بساک و غربال نمودن به کمک غربال ۷۰ میکرون جداسازی و در 20°C -نگهداری شدند [۹ و ۵].

بررسی میکروسکوپی بساک و دانه‌های گرده

گل‌ها در مراحل مختلف نمو جهت مطالعات



تصویر ۱. دانه‌های گرده استولیز شده، Ex: اگزین، Pollen (Grain Pore) PGP: منفذ دانه گرده (بزرگنمایی $\times 1000$)

تکوین دانه گرده

بررسی تکوینی گل‌های نری بلوط نشان می‌دهد که بساک از نوع تتراسپورانژ یا چهار کیسه گرده‌ای است. یاخته‌های توده هاگزا به طور معمول یک تقسیم را گذرانیده، اندازه آن افزایش یافته و یاخته‌های مادر گرده چندوجهی با رنگ پذیری زیاد و هسته‌های حجیم را در هر کیسه گرده ایجاد کرده‌اند (تصویر ۲ الف و ب). هر یک از یاخته‌های مادر گرده تقسیم با کاهش کروموزومی (میوز) را پشت سر گذاشته (تصویر ۲ ج) و چهار سلول n کروموزومی (هاپلوئید) را به نام تتراسپور به وجود می‌آورد. همزمان با ورود یاخته‌های مادر گرده به میوز، دیوار ویژه‌ای توسط همین یاخته‌های در اطراف یاخته ترشح می‌شود و آن را احاطه می‌کند. تیپ تترادی در بلوط از نوع تتراهدرال است. لایه تاپی نیز که داخل ترین لایه بساک و مجاور تتراسپورها قرار دارد، نقش تغذیه‌ای را دارد و از نوع ترش‌حی است (تصویر ۳ الف و ب). پس از میوز دیواره ویژه اطراف تتراسپورها فرو رفته و چهار یاخته‌های جوان میکروسپور را به وجود می‌آورد. ضمن این مراحل عده‌ای از یاخته‌های لایه مغذی ترش‌حی در کنار بساک باقی مانده‌اند و عده‌ای دیگر حالت آمیبی از دیواره جدا شده‌اند و در فضای درونی کیسه بساک در مجاورت دانه‌های گرده قرار گرفته‌اند (تصویر ۳ ج). در مرحله بعدی نمو میکروسپورها، اطراف هر میکروسپور را دیواره مستقل اگزینی می‌پوشاند و سپس دیواره درونی در مجاورت پرتوپلاسم به وجود می‌آید، در این حالت هنوز هسته هر میکروسپور مرکزی است (تصویر

خون‌گیری از حیوانات

۲ ساعت، ۸ ساعت، ۲۴ ساعت و یک هفته بعد از آخرین تزریق به ترتیب برای شمارش سلول‌های خونی و اندازه‌گیری IgE تام، خون‌گیری از حیوانات صورت گرفت [۱۴]. بلافاصله بعد از خون‌گیری مقدار ۰.۵-۱ میلی‌لیتر از خون در لوله آغشته به EDTA (برای جلوگیری از انعقاد خون) ریخته شد و از آن برای شمارش سلول‌های خونی استفاده گردید [۶]. برای اندازه‌گیری IgE یک میلی‌لیتر از خون هر حیوان سانتریفوژ و سرم آن تفکیک شد. نمونه‌های خون و سرم برای بررسی‌های لازم به آزمایشگاه طبی ابن سینا برده شد.

آزمون پوستی

در آزمون پوستی به روش خراش پوستی (Prick test) در آخرین مرتبه تزریق ایمن‌سازی به صورت زیر پوستی در محل پوست شکم و کشاله ران انجام شد، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمون سطح پوست موش‌های مورد آزمایش را با تیغ استریل تراشیده و محل تزریق را با الکل تمیز کرده، سپس دو قطره از عصاره گرده بر روی پوست گذاشته شد. در محل قطره یک خراش کوچک در پوست ایجاد کرده و واکنش‌های پوستی بین ۰.۵ تا ۲ ساعت با فاصله زمانی نیم ساعت بررسی شدند. بعد از یک هفته تکرار، به منظور بررسی سلول‌های خونی، خون‌گیری انجام گرفت. در این روش خون‌گیری از قلب انجام شد [۱۵].

نتایج

نتایج ریخت شناسی دانه گرده بلوط

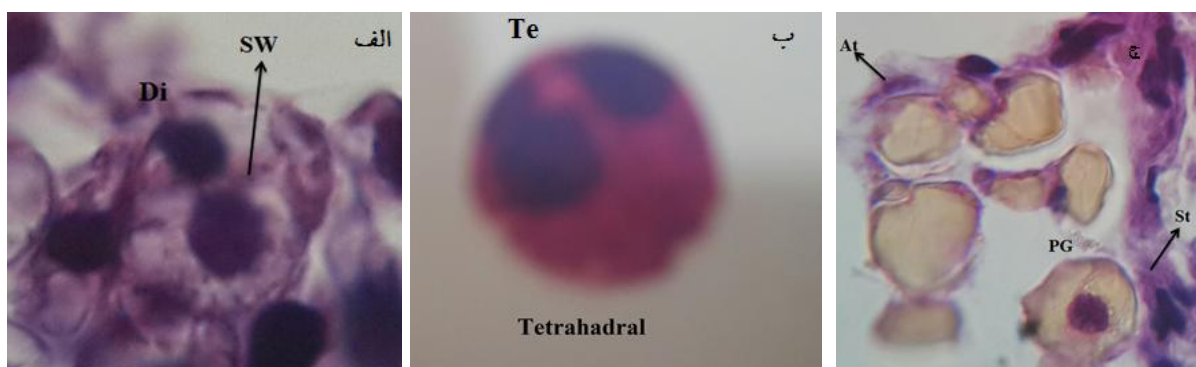
در بررسی مورفولوژی دانه گرده به روش استولیز، دانه گرده بلوط با سه مندمشاهده شد (تصویر ۱).

طوری که هسته به مرکز آمده و میتوز اتفاق می‌افتد، این تقسیم نامتقارن است و موجب تشکیل یک هسته حجیم و درشت و یک هسته متراکم و کوچک می‌شود. هسته حجیم زیر بنای تشکیل یافته‌های رویشی و هسته متراکم زیر بنای تشکیل هسته زایشی است. در این مرحله هنوز سلول‌های تاپی پلاسمدی یا آمیبی در لایه لای دانه‌های گرده مشاهده می‌شوند (تصویر ۵ ب). در مرحله بعدی لایه مکانیکی به سمت بساک تحلیل رفته و لایه مکانیکی به سمت خارج بساک آرام به هم می‌پیوندند. لایه مکانیکی به سمت خارج شکستگی پیدا کرده و در نهایت شکستن بساک و آزاد شدن گرده‌های بالغ را مشاهده می‌شوند (تصویر ۵ ج).

۴ الف). آرام آرام عده‌ای از یاخته‌های تاپی محو شده، در میکروسپورها حجم واکوئل افزایش می‌یابد و میکروسپورهای بالغ تشکیل می‌شوند. در مراحل پایانی تکوین میکروسپورها سلول‌های لایه مغذی از محل اولیه خود جدا شده، در لایه لای میکروسپورهای در حال نمو قرار می‌گیرند (لایه مغذی پلاسمدی یا آمیبی) و مواد حاصل از تجزیه آنها در فضای کیسه گرده رها شده و مورد استفاده دانه‌های گرده قرار می‌گیرند. سلول‌های لایه میانی هم تحلیل می‌روند (تصویر ۴ ب و ج). سپس دانه گرده با سه منفذ تشکیل می‌شود (تصویر ۵ الف). در مرحله بعدی، دانه‌های گرده بالغ برای تقسیم میتوزی آماده می‌شوند، به



تصویر ۲. الف: برش عرضی بساک، E: اپیدرم، En: لایه مکانیکی، MI: لایه میانی، Ta: لایه مغذی (تاپتوم)، PMC: یاخته مادر گرده (بزرگنمایی ×۴۰۰). ب-یاخته مادر گرده (PMC) (بزرگنمایی ×۴۰۰). ج- شروع دوره گامتوفیتی (بزرگنمایی ×۴۰۰)



تصویر ۳ الف- Di: سلول دیاد، SW: دیواره ویژه (بزرگنمایی ×۴۰۰) ب: Te: سلول تتراد (بزرگنمایی ×۴۰۰) ج- میکروسپور جوان ST: تاپی ترشچی، AT: تاپی آمیبی، PG: دانه گرده (بزرگنمایی ×۴۰۰).

جدول ۱. مقایسه قطر ویل و فلر در پنج گروه مورد آزمایش

قطر فلر بر حسب میلی متر							قطر ویل یا هاله بر حسب میلی متر						
حیوان تیمار شده با عصاره ۰,۵ دانه‌های گرده بلوط			حیوان شاهد			گروه	حیوان تیمار شده با عصاره ۰,۵ دانه‌های گرده بلوط			حیوان شاهد			گروه
۲ ساعت	۱ ساعت	۳۰ دقیقه	۲ ساعت	۱ ساعت	۳۰ دقیقه		۲ ساعت	۱ ساعت	۳۰ دقیقه	۲ ساعت	۱ ساعت	۳۰ دقیقه	
۲۰	۱۹	۵	۵	۲,۵	۲,۵	۱	۲	۱	-	۱	۱	-	۱
۳۲	۸	۵	۵	۲,۵	۱,۵	۲	۳	۲	۱	۱	-	-	۲
۲۰	۱۳	۷,۵	۶,۵	۵	۵	۳	۲	۲	۱	-	-	-	۳
۳۰	۱۷	۱۰	۴,۵	۱,۵	-	۴	۲	۱	-	-	-	-	۴
۲۵	۱۷	۱۲,۵	۱۲	۷	۵	۵	۳	۲	۲	۱	۱	-	۵

بررسی میزان IgE تام

میزان IgE سرمی در خون یکی از بهترین شاخص‌های واکنش آلرژیک است. بررسی میزان IgE نشان داد که بیشترین مقدار IgE با ۱۶,۱۶ ng/ml در نمونه سرولولژی و ۸,۶ ng/ml در نمونه کنترل تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($P \leq 0.05$).

جدول ۲. مقایسه میانگین گروه‌ها برای صفات ارزیابی شده به روش

آزمون t-test

گروه	نمونه کنترل	نمونه تحت تیمار با عصاره ۰,۵٪ گرده
IgE _{ng/ml}	۱۶,۱۶	۸,۶۰

بحث

گیاه بلوط، به عنوان یک گونه گیاهی با ارزش در جهان مطرح است. این گیاه در اقلیم‌های مختلف از نواحی زاگرس یکی از مهم‌ترین درختان فضای سبز است. در اروپا و آمریکا، گزارش‌های متعددی در ارتباط با حساسیت‌زایی دانه‌های گرده این گیاه گزارش شده است. از طرفی مطالعات سلول- بافت شناختی بساک و دانه‌های گرده، می‌توانند یک کمک موثر بر تشخیص دقیق‌تر آلرژن‌های گرده گیاه بلوط داشته

باشد. مطالعات نمو بساک در بلوط نشان داد که در این گیاه لایه میانی، یک لایه موقت یا ناپایدار است و در مرحله جدا شدن تتراسپورها از یکدیگر تجزیه می‌شوند، که نتایج مشاهدات ما با اکثر دانه‌های گرده گیاهان نهان‌دانه دولپه‌ای هم‌سویی دارد. آرایش میکروسپورهای داخل دیواره در گیاه *Q. brantii* از نوع تتراهدرا (چهار وجهی) است. در گزارش‌های چهرگانی راد و همکاران در سال ۱۳۸۹ اعلام شده است که آرایش تتراسپورها در گیاه *Centaurealberica L.* از نوع تتراهدرا است و Gotelli et al. 2008 و Coleman 2005 گزارش کردند که در گیاه *Eupatorium laevigatum L.* آرایش میکروسپور از نوع تتراهدرا است، که با نتایج ما هم‌سویی دارد [۱۲ و ۱۳]. دانه‌گرده بلوط دو هسته‌ای است این مدل دانه گرده را در اغلب دولپه‌ای‌ها گزارش کرده‌اند و همین طور سه منفذی است شبیه به دانه‌های گرده خانواده *Asteraceae* است که با گزارش‌های امجد- مجد برای گرده‌های بومادران و شریف شوشتری- مجد در ارتباط با گرده‌های گیاه مارگریت هم‌سویی دارد.

گروه‌های بوم‌شناختی در ناحیه رویشی کردو - زاگرس. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۴.

[۵] رضانزاد، ف. ۱۳۸۲. بررسی نمو دیواره بساک، میکروسپورزایی، ساختار، پروتئین‌ها و آلرژی‌زایی دانه‌های گرده برخی گیاهان پارک‌های شهر تهران. پایان نامه دکتری. دانشگاه تربیت معلم، ۱۱۷-۱۱۲.

[۶] شریف‌شوشتری، م. مجلد، ا. پورپارک، ز. معین، م. ۱۳۸۶. بررسی ویژگی‌های ساختاری و توان آلرژی‌زایی گرده‌های بالغ گیاه مارگریت (*Chrysanthemum maximum* L)

[۷] صفروپور کپورچالی، ش. عزیزاده‌علی‌آبادی، ع. قاسمی، ا. صادقی، ا. ۱۳۹۲. مقایسه اثرات ضدباکتریایی عصاره گال بلوط ایرانی روی چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زای گیاهی. مهار زیستی در گیاه‌پزشکی، جلد ۱، شماره ۲.

[۸] علیجان‌پور، ا. شفیع، ع. اسحاقی‌زاد، ج. ۱۳۸۹. بررسی وضعیت تجدید حیات طبیعی جنگل‌های بلوط غرب در رابطه با عوام ظل رویشگاهی (مطالعه موردی: منطقه پیردانه پیرانشهر). مجله جنگل ایران، انجمن جنگل بانی ایران، سال دوم، شماره ۳، صفحه ۲۱۹-۲۰۹.

[۹] قناتی، ف. ۱۳۸۴. زیست‌شناسی دانه‌های گرده. انتشارات آرموس ۷۵-۷۳.

[۱۰] نجفی‌فر، ع. ۱۳۹۰. بررسی فراوانی زادآوری جنسی گونه‌های جنگلی در ارتباط با برخی عوامل اکولوژیکی در جنگل‌های بلوط غرب استان ایلام. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. جلد ۱۹ شماره ۲، صفحه ۲۹۰-۲۷۹.

[11] Chengjiu Huang, Yongtian Zhang & Bruce Bartholomew. 1987. "Fagaceae". in Flora of China Vol. 4 Page 314. Published by Science Press (Beijing) and Missouri Botanical Garden Press.

[12] Coleman, J. R. 2005. Embryology ancytogenetic of *Eupatorium laevigatum* (Asteraceae). Genetics and Biology 28: 123-128.

بررسی‌های نتایج پوستی و IgE تام نشان می‌دهد، که دانه‌های گرده بالغ گیاه بلوط آلرژی‌زایی قابل توجهی دارند، اما باید روند مطالعات در آینده ادامه داشته باشد با بررسی کمی و کیفی پروتئین‌های دانه‌گرده با انجام آزمون سنجش پروتئین برادفورد و الکتروفورز SDS-PAGE و انجام آزمون‌های تکمیلی از جمله وسترن ایمونوبلاتینگ و توالی‌یابی اسیدهای آمینه و تشخیص نوع آلرژن‌های اصلی دانه‌های گرده این گیاه به جزئیات دقیق‌تری پرداخته و گزارش‌های مفصلی به متخصصان آسم و آلرژی داده شود، تا با شناخت هر چه دقیق‌تر، بتوان برای بیماران مبتلا به حساسیت فصلی در استان ایلام با توجه توری بودن بلوط در پوشش گیاهی اقدامات لازم را به عمل آورد.

منابع

- [۱] [پناهی، پ پورمجیدیان، م. جم زاده، ز فلاح، ا ۱۳۹۰. ارزش ریز ریخت شناسی صفات برگ و دانه گرده برای تفکیک گونه‌های جنس بلوط در جمگ‌های ایران. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. جلد ۱۹، شماره ۱، صفحه ۱۷۹-۱۶۳]
- [۲] پناهی، پ. پورهاشم، م. حسینی‌نژاد، م. ۱۳۹۳. آلومتری‌زیتوده و ذخیره کربن برگ بلوط‌های باغ گیاه‌شناسی ملی ایران. مجله زیست‌شناسی ایران (مجله پژوهش‌های گیاهی). جلد ۲۷، شماره ۱.
- [۳] حسینی، ا. حسینی، م. رحمانی، ا. آذرفر، د. ۱۳۹۱. تأثیر مرگ و میر درختی بر ساختار جنگل‌های بلوط ایرانی در استان ایلام. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، جلد ۲۰ شماره ۴، صفحه ۵۷۷-۵۶۵.
- [۴] حیدری، م. پوربابایی، ح. عطار روشن، س. ۱۳۸۹. وضعیت زادآوری طبیعی بلوط ایرانی در بین

- [13] Gotelli, M. M., Galati, B. G. and Medan, D. 2008. Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *AnnalesBotaniciFennici* 45:81-96
- [14] Gronelberg D A, Bielory L, Fischer S, Bonini, Wahn U. (2003) Animal models of allergic and inflammatory. *Conjunctivitis Allergy*. 58:1101-1113.
- [15] Hiyoshi K, Takano H, Tomura S, Kumagais y. (2005) Effects of phenanthraquinone on allergic airway inflammation in mice. *ClinExp Allergy*. 35:1243-1248.
- [16] Jones, J.H., 1986. Evolution of the Fagaceae: the implications of foliar features. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73: 228-275.
- [17] Kuldeeps Jaggi, and sharad V. Ganga. (1987) Isolation and identification of pollen allergens of *Artemisia*. *Scoparia J. Allergy clinImmunol*. 80:562-72.
- [18] Lawrence, G.H.M., 1951. *Taxonomy of vascular* MacMillan co., New York, 823 P
- [19] Majd A, Ghanati F. (1995) The effect of airpollution on the allergenicity of pinuselderica (pinaceae) pollen. *Grana*.34: 208-211.
- [20] Soepadmo, E., 1972. Fagaceae. *Flora Malesiana, Series I*, 7 (2): 265-403.
- [21] Xue, C. Y., Li, D. Z. (2005) Embryology of *Megacodonstylophorus* and *Veratrillabaillonii* (Gentianaceae): description and systematic implication. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 317-331.

