

Introdução

O grão de pólen por suas características especiais, presta-se de maneira muito adequada para numerosas investigações. Sendo naturalmente isolado de outras células, comporta-se como um microrganismo que pode ser cultivado "in vitro". Deste modo, as condições ambientais para seu desenvolvimento e para seu metabolismo podem ser controladas com bastante exatidão. A formação e o crescimento do tubo polínico são tão rápidos que os grãos de pólen quase se equiparam aos fungos, protozoários e bactérias em suas vantagens experimentais para estudos fisiológicos. Sua parede externa, quimicamente muito estável e morfológicamente muito variada, permite uma grande diversidade de estudos taxonômicos, morfológicos e paleobotânicos.

1 — ONTOGÊNESE DO GRÃO DE POLEM

Pode-se identificar na diferenciação da antera jovem, produzindo o "tapetum", o endotécio e o tecido esporígeno, a primeira etapa de um processo de desenvolvimento que culmina na formação do grão de pólen.

Embora os grãos de pólen provenham do tecido esporígeno, é indispensável considerar o "tapetum" também, pois cada vez mais se evidencia sua participação no conjunto de acontecimentos de que resulta a formação dos grãos de pólen. O "tapetum" é constituído por células com características secretoras nítidas: citoplasma abundante, núcleo em estágio endopoliplóidico, ou mais de um núcleo por célula (*in* Linskens 1964a). Por envolver o tecido esporígeno, o "tapetum" constitui o ambiente imediato e a via obrigatória de translocações de material para o micrósporo. A presença de cordões citoplasmáticos (Rowley 1962) unindo o "tapetum" e o tecido esporígeno mostram o

caminho destas translocações na fase jovem do micrósporo. O metabolismo intenso do tapetum durante a esporogênese é verificado pelas modificações internas de suas células: mudanças de pH, aumento de conteúdo de auxinas, transporte de carboidratos, de proteínas e de material de ácido nucleico (*in* Linskens 1964a). Isto não dá ainda uma visão precisa mas tudo indica que o "tapetum" é mais do que uma simples fronteira ou "tecido de reserva". Ele deve ter um papel ativo na esporogênese, tanto mais que nesta fase "todo o tecido de cada lóculo da antera se constitui num sincício" (Heslop-Harrison 1968).

O tecido esporogênico envolvido pelo "tapetum" é constituído por células que são potencialmente capazes de dar origem a micrósporos. Entretanto, freqüentemente algumas delas "degeneram" e são absorvidas pelas outras. As restantes se tornam as células-mães dos grãos de pólen (Maheshwari 1950).

Os grãos de pólen se formam a partir de células-mães por divisão reducional, sincrônica, em toda a antera, originando tétrades de células haplóides. A disposição das células na tétrade pode ser variada. A maioria das Dicotiledôneas apresenta tétrades em arranjo de simetria tetraédrica e a maioria das Monocotiledôneas mostra disposição com simetria bilateral. Há, entretanto, em ambas as classes de plantas, muitas exceções em relação a estes dois padrões prevaletentes (Maheshwari 1949). Geralmente os micrósporos se separam em seguida formando os grãos de pólen isolados. Mas em muitos casos os grãos se conservam unidos. Raramente formam grupos de dois (*Scheuchzeria*, *in* Faegri & Iversen 1950), mais comumente conservam-se agrupados de quatro em quatro (*Mimosa*, *Kyelmeyera*, etc.) ou em grupos maiores, de 8, 12, 16 e 32 (numerosos tipos foram descritos, por exemplo, em Erdtman 1952, Campos & Guinet 1961, Sorsa 1969). Os micrósporos também podem formar massas com forma definida, que se denominam políneas (em gêneros de *Asclepiadaceae*, de *Orchidaceae*, de *Annonaceae* *in* Erdtman 1952, Ikuse 1956).

O grão de pólen recém-formado apresenta citoplasma denso e começa a aumentar de volume. Inicia-se a deposição da exina, de que trataremos mais adiante. No citoplasma forma-se um vacúolo e o núcleo é deslocado da posição central para junto da parede. Em seguida a um período de pouca atividade aparente, variável segundo a espécie, o núcleo se divide dando origem a dois, respectivamente designados, núcleo vegetativo e núcleo generativo. Este último pode se conservar assim e só se dividir após penetrar no tubo polínico, daí a denominação destes tipos de pólen como 2-nucleados, ou então o núcleo generativo pode se dividir em dois ainda dentro do grão de pólen, antes da formação do tubo polínico (pólen 3-nucleado). Durante muito tempo não se viu paredes dividindo o protoplasma do grão (*in* Maheshwari 1949) mas hoje, pelos estudos da ultra-estrutura em microscópio eletrônico sabe-se que há plasmalema separando o núcleo vegetativo do generativo (Hoefert 1969). Deste modo, o gametófito masculino das Angiospermas é constituído de uma célula vegetativa e de uma ou duas células generativas.

Um aspecto particularmente interessante na ontogênese do grão de pólen é o processo de formação de suas paredes. Durante as divisões pré-meióticas as células do tecido esporogênico estão envolvidas por paredes pécticas. Após a última divisão pré-meiótica deposita-se sobre essa membrana uma parede especial de calose (Waterkeyn 1964). Os cordões citoplasmáticos são rompidos, resultando que cada célula do tecido esporogênico fica isolada tanto de suas irmãs como do "tapetum" (Heslop-Harrison 1964, Waterkeyn 1964). Cada célula-mãe assim formada inicia a divisão meiótica dando quatro micrósporos. Como as divisões não atingem a parede os quatro micrósporos ficam unidos e envolvidos pela parede da célula-mãe. Segundo Heslop-Harrison (1964) esta membrana especial de calose da célula-mãe agiria como peneira molecular: sua presença barraria a entrada de macromoléculas portadoras de informação genética e oriundas da antera. Cada micrósporo forma então a sua membrana individual de celulose (Heslop-Harrison 1964, Waterkeyn 1964). Esta membrana foi denominada "primexine" por Heslop-Harrison e é considerada por ele como sendo a matriz sobre a qual se depositará a exina, segundo o padrão específico determinado pelo próprio grão de pólen.

Terminada a divisão meiótica, a parede especial de calose da célula-mãe se dissolve libertando os micrósporos e somente então se inicia a deposição de esporopolenina (Heslop-Harrison 1964, Waterkeyn 1964) que constituirá a parede externa definitiva do pólen (exina).

A origem da exina ainda é controversa. Segundo uns, a esporopolenina se forma por atividade direta do protoplasma do micrósporo (Larson & Lewis 1962, Linskens 1964a). Segundo outros, seria o resultado de transferência de substrato do "tapetum" ou do suco locular para o gametófito (Rowley 1964). Heslop-Harrison (1962, 1964) defende um ponto de vista novo. Sua concepção parte de observações feitas com microscópio óptico e eletrônico, de considerações de afinidades corantes, de dados sobre a resistência à acetólise e de numerosos microtestes que estabeleceram a formação de esporopolenina no "tapetum", antes do aparecimento de exina nos grãos de pólen (Maheshwari 1950, Heslop-Harrison 1962). Isto foi sempre considerado como uma homologia entre as células do "tapetum" e os micrósporos. Em 1962, Heslop-Harrison mostrou que dentro das células do "tapetum" formam-se placas de esporopolenina a partir de mitocôndrios. Em seguida, os mitocôndrios desaparecem e os pequenos blocos de esporopolenina migram para a superfície das células do "tapetum". Daí, por mecanismo ainda desconhecido, estes blocos se iriam depositando sobre a membrana de celulose do micrósporo, formando o padrão pré-estabelecido por esta membrana. Somente no lugar das aberturas, onde o plasmalema está em contacto direto com a primexine, não há deposição de esporopolenina (Heslop-Harrison 1964). O exame do pólen estéril de *Silene pendula* no qual o protoplasma degenera muito cedo mas a deposição e o padrão da exina são normais, indicaria que a deposição seria externa ao micrósporo (Heslop-Harrison 1962). Dados recentes de marcação isotópica de células do "tapetum" mostram que a maior acumulação de radioatividade é encontra-

da posteriormente, na exina e não no interior do micrósporo (Linskens 1964a). Estes resultados corroboram a teoria da origem externa da exina.

Em suma, segundo a concepção de Heslop-Harrison, o padrão característico de deposição de exina seria o resultado da interação de dois processos diferentes e complementares: a biossíntese da esporopolenina no "tapetum" (processo inespecífico no que diz respeito ao arranjo especial do depósito na superfície do micrósporo) e a organização específica da deposição segundo o código genético característico do micrósporo.

Durante a deposição de esporopolenina os grãos de pólen crescem. Em *Poa* o volume aumenta 32 vezes (Rowley 1964). Quando, por fim, a exina está inteiramente formada, rompe-se a membrana de celulose do micrósporo que se foi esticando (Heslop-Harrison 1964). Começa então a formação da segunda membrana do grão de pólen, a intina. Inicia-se nas regiões aperturais (Rowley 1964, Heslop-Harrison 1964) e estende-se em círculos sob a exina, até envolver todo o grão. A intina fica em contacto direto com o citoplasma e formará também a parede externa do tubo polínico.

2 — ALGUNS ASPECTOS QUÍMICOS DO GRÃO DE POLEM

A membrana externa do grão de pólen é constituída de uma substância peculiar cujas propriedades são bem distintas das de todas as outras membranas das células vegetais. A primeira caracterização dessa substância data do trabalho de Fritzsche em 1837 (*in* Wodehouse 1935), tendo sido depois estudada por Zetzsche (1932). Até 1964 nada mais foi estudado a este respeito (*in* Treiber 1955, *in* Linskens 1964a). Sabe-se que esta membrana é extremamente resistente a ácidos (exceto ácido crômico que a dissolve rapidamente), que é mais dificilmente saponificável que a cutina e a suberina (*in* Treiber 1955) e que é elástica. Sua extraordinária resistência à degradação e irregular insolubilidade tem dificultado seu estudo químico. Os trabalhos de Zetzsche (l.c.) e seus colaboradores estabeleceram que a exina era provavelmente de natureza politerpênica, de fórmula bruta $C_{90}H_{144}O_x$, com muitas hidroxilas livres e numerosas ligações etilênicas (Zetzsche 1932). Este material foi denominado "esporopolenina" por constituir não só a exina do pólen (Angiospermae e Gymnospermae), mas também dos esporos de Pteridófitas (*in* Wetzel 1938). A proporção O/H da esporopolenina varia entre as muitas espécies estudadas, o que parece indicar que se trata não de uma substância única, mas de um grupo de substâncias afins. De fato, observa-se que, mesmo quando a morfologia de grãos de diferentes espécies é semelhante, o comportamento desses grãos em face da acetólise pode apresentar muitas diferenças quanto à cor e quanto à deformabilidade plástica.

Estudos recentes de Shaw & Yeadon (1964, 1966) divergem inteiramente das conclusões de Zetzsche. Examinaram material de duas espécies já estudadas por Zetzsche, esporos de *Lycopodium clavatum* (o pó de licopódio natural da farmacopéia) e o pólen de *Pinus silvestris*. Suas análises mostraram que as

membranas destes seriam constituídas de 10 a 15% de celulose, cerca de 10% de hemicelulose (xilana ainda mal caracterizada), 50 a 65% de uma "fração lipídica" e 10 a 15% de uma fração que apresenta semelhanças com uma lignina. Os polissacarídeos seriam os componentes da intina. A exina seria então constituída de duas frações, uma lipídica e outra do tipo lignina. Como as membranas do pólen não reagem à maioria dos microtestes de lignina, pressupõe-se que a fração lipídica mascare de alguma maneira a fração aromática. Parece que nas primeiras etapas do desenvolvimento do pólen a exina responde melhor aos testes de lignina (Heslop-Harrison 1968). Os dados obtidos até agora quanto à estrutura química da exina e do exospório só autorizam a afirmar que a exina não é de celulose e que os produtos de sua degradação oxidativa são ácidos alifáticos, sem cadeia ramificada (o que exclui a estrutura isoprenóide). A presença de anéis aromáticos na exina é confirmada por fusão alcalina; produzem-se ácidos fenólicos bastante característicos (Shaw & Yeadon 1964, 1966). Porém, até agora, essa é uma semelhança muito vaga com a lignina. A semelhança dos esqueletos alifáticos com lípidos é também muito vaga, uma vez que está excluída a possibilidade de que se trate de ésteres, por causa da ausência de carboxilas na esporopolenina (pelo que revela a absorção no infravermelho).

As reentrâncias e canais da exina freqüentemente contêm pigmentos que conferem ao pólen diversas colorações (Linskens 1967). São pigmentos pertencentes a variadas classes de estruturas, antocianinas, antoxantinas e carotenóides (*in* Johri & Vasil 1961, *in* Linskens 1964, 1967). Em geral, os carotenóides do pólen são ésteres de anteroxantina e de luteína, com traços de carotenos (*in* Goodwin 1965). Foi observado que o pólen carregado por insetos geralmente contém carotenóides, ao passo que o pólen anemófilo raramente contém estes pigmentos (*in* Johri & Vasil 1961, e Linskens 1967).

A intina do pólen é de natureza complexa mas sua composição e sua formação são semelhantes às das membranas primárias das células somáticas (Zetzsche 1932). Em *Pinus*, por exemplo, a camada externa é incompleta e de natureza calósica; internamente ela é constituída de uma camada contínua pecto-celulósica (Waterkeyn 1964).

As proteínas do pólen foram muito estudadas devido a seu interesse em apicultura e para investigações sobre alergia (*in* Linskens, 1964a).

Ultimamente tem sido dada grande atenção às enzimas não só para o estudo de metabolismo e de exigências de crescimento do pólen como também para a procura das causas de relações de incompatibilidade entre pólen e gineceu, de grande interesse para geneticistas e melhoristas (Linskens 1964a e Rosen 1968). Encontram-se no pólen quase todos os aminoácidos protéicos com valores sempre altos (pelo menos 35% do nitrogênio total) (*in* Johri & Vasil 1961).

O pólen das Gymnospermae é pobre em vitaminas mas o de Angiospermae é muito rico (vitaminas A, D, E, K, complexo B e ácido ascórbico) (*in* Johri & Vasil 1961).

3 — FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO

Os estudos de germinação de pólem iniciaram-se em 1824 quando Amici descreveu pela primeira vez este fenômeno. A partir de 1834, depois que von Mohl conseguiu pela primeira vez germinação de pólem "in vitro", tornaram-se possíveis estudos realizados em condições controladas (Wodehouse, 1935). Os estudos de germinação tiveram um grande impulso ultimamente. Basta dizer que nesta última década apareceram muitas revisões sobre fisiologia, principalmente da germinação de pólem (Johri & Vasil 1961, Linskens 1964 e 1967, Nitsch 1965, Rosen 1968, entre outras) e, mesmo, um simpósio (Linskens 1964b).

Mostrou-se que os substratos para a germinação são específicos e variados (Linskens 1964a). Independentemente das exigências de substrato, diversas substâncias aceleram a germinação, sendo que o papel predominante cabe aos açúcares, principalmente sacarose (Nitsch 1965, Linskens 1964a). Vários outros compostos orgânicos aceleram, como ácido ascórbico, riboflavina, giberelinas, ao passo que o ácido indolil-acético, não afeta a germinação. Vários carotenóides estimulam, enquanto que outros inibem (Nitsch 1965).

Diversos autores, usando técnicas e grãos de pólem diferentes, observaram a existência de variados efeitos de interação que afetam a germinação do grão de pólem. Estes efeitos se manifestam tanto entre grãos em disposição densa como entre grãos de pólem e tecidos florais diversos.

A germinação se inicia pelo aparecimento de uma protuberância da intina que emerge através de uma das zonas aperturais do grão e vai se distendendo para fora como um tubo. Qualquer que seja o número de aberturas que possua, cada grão só forma um único tubo polínico. Nos grãos com grande número de aberturas, como nas Malváceas, aparecem inicialmente muitas protuberâncias, mas somente uma se desenvolve em tubo polínico (Maheshwari 1949). "In vivo", a germinação é precedida por uma exudação conjunta do pólem e do estigma, que fixa o grão na superfície do estigma (*in* Nitsch 1965).

Uma vez formado o tubo, nele penetram os núcleos generativos, seguidos do núcleo vegetativo, que logo em seguida desaparece (Maheshwari 1949). À medida que o tubo cresce, os núcleos avançam aparecendo atrás deles rolhas de calose, de modo que só se encontra citoplasma vivo na parte distal do tubo; as partes posteriores ficam vazias (Maheshwari 1949, Waterkeyn 1964).

O tubo polínico, formado na superfície do estigma, cresce para dentro do estilete em direção ao ovário. Para que o crescimento do tubo polínico se processe normalmente e que o saco embrionário seja eventualmente atingido, é preciso haver uma complementação de fatores, de um lado pertencentes ao tubo, do outro, ao tecido do pistilo. Quando esta complementação não se dá, há uma falha em algum ponto do caminho. Esta falha pode se dar por diferentes mecanismos (Linskens 1964a) resultando barreiras de incompatibilidade.

Recentemente mostrou-se por uma série de experiências imunológicas (Hagman 1964) existirem incompatibilidades de proteínas entre palem e tecido estigmóide. As conseqüências e interpretações destas experiências têm levado a uma série de considerações de interesse genético.

Sabe-se que o palem germinado na superfície do estigma orienta-se para dentro do estilete. Esta orientação parece ser principalmente por hidrotropismo, seguida de um escorregamento mecânico (Linskens 1964a). No caso de estiletos maciços a dissolução da lamela média das células resultando na formação de um canal de passagem seria efetuada por enzimas (Maheshwari, 1949, Johri & Vasil 1961, Linskens 1964a). Recentemente, numa série de descobertas, foi demonstrado que para muitas espécies existe quimiotropismo. Fatias de pistilo ou extratos do mesmo induzem tropismo positivo, "in vitro", em palem de muitas espécies (Mascarenhas & Machlis 1962, Rosen 1964b, Miki-Hirosige 1964). O material que induz tropismo positivo é solúvel em água e em etanol, insolúvel em éter e em acetona, termolábil, dializável em agar e celofane e aparentemente catiônico. Também foi descoberto um material que induz tropismo negativo (Miki-Hirosige 1964) que é solúvel em água, etanol e éter, estável ao calor em álcali, e em ácido e não dializável. Isto leva a crer que se trate de duas substâncias diferentes que causariam os diferentes quimiotropismos. Se palem e pistilo pertencerem a gênero, família ou classe diferente, em geral não aparece tropismo, mas há exceções (Miki-Hirosige 1964). Assim, parece que não há um agente universal e único para o quimiotropismo. Segundo Rosen (1964) e Rosen *et al.* (1964) os agentes quimiotrópicos agiriam na plasticidade da parede da zona de crescimento do tubo. Examinando esta região no tubo polínico de *Lilium* ele verificou que esta zona contém dois tipos diferentes de vesículas, das quais uma desempenharia uma função importante na síntese da parede e a outra seria constituída principalmente de RNA.

Sabe-se que quase não há aumento de citoplasma durante o crescimento do tubo, pois a contínua vacuolização e formação de rolhas de calose mantém o citoplasma junto à ponta. Pensava-se antes que o crescimento do tubo polínico se dava principalmente pela grande capacidade de distensão da parede do tubo (Maheshwari 1949). Trabalhos recentes mostraram que sua imensa capacidade de crescimento é devida a constante acréscimo de material metabolizado, retirado das reservas do próprio palem e também do tecido condutor do pistilo (Linskens 1964a). A parede do tubo seria continuamente sintetizada a partir destes substratos pela produção de celulose, calose, substâncias pécticas e proteínas (Brewbaker & Kwack 1964). Isto explicaria o fato, já há muito conhecido, de que não se consegue "in vitro" nem o mesmo crescimento, nem a mesma velocidade de crescimento que o tubo apresenta "in vivo"

Como se dá a síntese do material da parede do tubo e quais os substratos e mecanismos de ação envolvidos, é o que se está tentando atualmente investigar. Observou-se que alguns íons como Cálcio (Brewbaker & Kwack 1964, Mascarenhas & Machlis 1962) e Boro (Vasil 1964) estimulam marcadamente o

crescimento do tubo. Também os açúcares (Hrabětová & Tupý 1964), e as giberelinas (Linskens 1964, 1967; Nitsch 1965) têm efeito no crescimento.

Já existem diversos testes para o estudo do desenvolvimento: "Surface Test" (Rosen 1964, Miki-Hiroşige 1964), "Depression Test" (Mascarenhas & Machlis 1962), "Angle Test" de Schildknecht & Benoni (*in* Rosen 1964b). Entretanto, nem um deles é realmente quantitativo porque não há discriminação entre estímulos para germinação, para crescimento e para tropismo. Assim, muito resultado contraditório que se encontra na literatura é devido à distinção pouco clara entre estas três etapas do desenvolvimento do tubo.

Na maioria das plantas o tubo leva horas (geralmente 12 a 48) para atingir o saco embrionário. Mas às vezes leva semanas e mesmo meses (Maheshwari 1949). A penetração do tubo no saco embrionário não está bem esclarecida. Se ele se bifurca ou não, se os gametas penetram com seus núcleos nus ou se são envolvidos por uma capa de citoplasma, constituem ainda problemas abertos. Após a entrada no saco embrionário, um gameta se funde com a oosfera e o outro com os núcleos polares, resultando a formação do embrião e do endosperma respectivamente (Maheshwari 1949, 1950).

4 — FUNDAMENTOS E PERSPECTIVAS DA PALINOLOGIA

A palavra Palinologia ("Palynology") foi criada por Hyde & Williams para designar o estudo morfológico do pólen e dos esporos, bem como de sua dispersão e aplicações (Hyde & Williams 1945). Sugeriram o termo baseando-se no Grego "paluno" (παλνυω) que significa espalhar, difundir farinha (cf. παλη= farinha, pó; cognato do Latim *pollen, inis* e *pollis, inis*, "flor de farinha, farinha fina", *in* Saraiva 1910). Seus criadores esperaram que "a seqüência de consoantes p-l-n (sugerindo pólen mas com uma diferença) e a eufonia geral da nova palavra a recomendariam". Realmente o termo ficou e em 1952 Erdtman definiu como ". . . Pollen and spore science. It deals chiefly with the walls of pollen grains and spores, not with their live interior." (Erdtman 1952, p. 3) (. . . a ciência do pólen e do esporo. Trata principalmente das paredes dos grãos de pólen e esporos e não de seu interior vivo). Este é o conceito hoje correntemente adotado para *Palinologia*.

Quando no século XVII começou o desenvolvimento da microscopia, iniciaram-se as observações sobre os grãos de pólen (*in* Wodehouse, 1935). Percebeu-se que os grãos apresentavam variados aspectos quando examinados em aumento. À medida que progredia o aperfeiçoamento da óptica acumularam-se dados que tornaram possíveis as primeiras generalizações morfológicas. Sprengel estabeleceu que o pólen da maioria das dicotiledôneas apresenta 3 sulcos, e Malpighi que o das monocotiledôneas mostra geralmente um; Purkinge, que os acidentes morfológicos tais como forma, sulcos, poros, etc, eram o resultado do desenvolvimento dos grãos em contacto uns com os outros no saco polínico. Amici descreveu a formação do tubo polínico. Von Mohl observou o aparecimento de células especiais, células-

mães dos esporos, que por divisão davam origem aos grãos de pólen (*in* Wodehouse 1935).

A idéia predominante no início do século XIX era a de que o grão de pólen seria um órgão, constituído de numerosas células, contendo muitas vezes glândulas secretoras. Estas glândulas nada mais eram que os espinhos encontrados em muitos grãos.

Um novo impulso foi dado ao conhecimento da morfologia do grão de pólen quando se começou a introduzir reações químicas na técnica das observações morfológicas (Fritzsche, *in* Wodehouse 1935). Mostrou-se que o grão de pólen era uma única célula cujo protoplasma continha inclusões de amido, de óleo, e outras; que era envolvido por duas membranas; que sua membrana interna à semelhança das outras células vegetais era constituída principalmente de celulose; que a membrana externa era resistente aos ácidos e à digestão gástrica; e que era esta membrana externa que continha os caracteres morfológicos que distinguiam um pólen do outro. Fritzsche denominou a membrana interna de *intina* e a externa de *exina*. Introduziu a técnica de destruir o conteúdo protoplasmático e a intina usando principalmente ácido sulfúrico para que a exina pudesse ser estudada com maior clareza.

No fim do século XIX Fischer reuniu todos os conhecimentos adquiridos até então, dando-lhes uma forma moderna (*in* Wodehouse 1935).

No século XX iniciou-se uma nova fase nos estudos da morfologia polínica. O pólen até então era usado somente como um caráter acessório na Sistemática de algumas famílias de plantas. A descoberta da aplicação de seu estudo em paleontologia, em medicina, em arqueologia e na prospecção de petróleo incentivou o conhecimento mais preciso e a criação de métodos melhores de preparação (Salgado-Labouriau 1961b). A necessidade de discriminação de "taxa" cada vez mais restritos por meio de caracteres polínicos exigiu preparações melhores, tornando possíveis estudos morfológicos mais pormenorizados.

Alguns tratados merecem citação especial, em virtude da grande importância que tiveram ao resumirem os conhecimentos da Palinologia e principalmente ao divulgarem os métodos de preparação e suas aplicações, influenciando decisivamente sobre o progresso destes estudos:

1 — Em 1935 Wodehouse publicou "Pollen grains", obra em que fez cuidadosa revisão histórica dos estudos de pólen; estudou as famílias de plantas anemófilas mais importantes para o reconhecimento do pólen suspenso na atmosfera. Seu livro encara o estudo do pólen principalmente do ponto de vista de aplicação em medicina mas, pelas descrições pormenorizadas, pelas ilustrações primorosas e pela apresentação minuciosa dos métodos de captura e preparação de pólen, tornaram estes conhecimentos acessíveis a todos os interessados.

2 — Em 1943 surgiu o primeiro livro de Erdtman "An Introduction to Pollen Analysis", com ênfase na morfologia polínica, trabalho em que divulgou a sua técnica de preparação dos grãos por acetilação da exina (Acetólise).

3 — Em 1950 Faegri & Iversen publicaram "Textbook of Modern Pollen Analysis" encarando o estudo do pólen do ponto de vista da análise de sedimentos. Neste livro encontra-se a descrição detalhada dos tratamentos a que devem ser sujeitas as amostras de sedimentos de diferentes tipos para obtenção de pólen em forma apropriada para o estudo.

4 — Em 1952 Erdtman publicou "Pollen Morphology and Plant Taxonomy" no qual caracteriza e descreve o pólen de todas as famílias de Angiospermas. A sistematização das descrições, o uso de terminologia bem definida, a ilustração abundante, o levantamento bibliográfico exaustivo, tornaram este livro fundamental para o estudo palinológico. O grande acúmulo de dados morfológicos do pólen de plantas européias e norte-americanas foi contrabalançado pelo levantamento de dados de espécies da zona temperada austral, bem como das regiões tropicais. Ainda que as informações não possam ser exaustivas para toda a flora mundial elas representam mais do que exemplos, pois dão um panorama geral da distribuição dos tipos polínicos nas Angiospermas e mostram onde estão as lacunas de conhecimento.

As obras citadas representam fases pioneiras das diversas linhas em que se diversificou a pesquisa palinológica. Em decorrência destes estímulos à literatura especializada desse assunto se enriqueceu de tal maneira que se pode seguramente afirmar que ela está presentemente em plena expansão de uma fase analítica e monográfica.

Pesquisas de pólen contido em sedimentos (Análise Polínica) tornaram possíveis a detecção de mudanças florísticas através do tempo (Cain 1944, Godwin 1956) e a inferência de outras mudanças a elas mais ou menos correlacionadas. Entre essas podemos citar, ocupando lugar de destaque, as alterações climáticas. Um exemplo desta aplicação encontra-se nos trabalhos de van der Hammen sobre o norte da América do Sul. Através da análise polínica de sedimentos e de datação de C_{14} este autor mostrou que houve períodos glaciários e interglaciários nos Andes colombianos e que estes correspondem cronologicamente aos de outras partes do mundo, especialmente da Europa; que, no final da última glaciação, na costa da Guiana, houve uma regressão do mar, seguida de importante transgressão e que a restinga e a floresta foram aí substituídas por savanas de gramíneas (Hammen 1961, 1963). A análise polínica fornece ainda dados sobre rotas migratórias humanas (Colinvaux 1965), evolução de "taxa" vegetais (Erdtman 1960b) e prospecção de petróleo. Esta última aplicação vem sendo posta em uso no Brasil, nos seis laboratórios palinológicos da Petrobrás.

A identificação de pólen presente na atmosfera tem conduzido a dados muito úteis nos estudos de alergia a pólen (polinose) (Wodehouse 1935). No, Brasil, o levantamento do pólen da atmosfera por Oliveira Lima, Greco e colaboradores, em várias cidades, cita uma única estação polínica anual, que vai de maio a junho, com predominância exclusiva de gramíneas (Oliveira Lima &

Greco 1943, Greco 1944, 1945). Estas análises e as de Mendes (Mendes & Lacaz 1965) citam vários casos de polinose no Brasil. Ao que tudo indica trata-se de uma afecção alérgica que, em comparação com o que se observa nas zonas temperadas boreais, é relativamente rara no nosso meio.

A determinação de plantas pelo seu pólen reconhecível em amostras de mel (Maurizio 1960; Maurizio *et al.* 1964; Santos 1961; Barth 1969) permite detectar adulterações desse alimento (Erdtman 1943) e abre perspectivas de estudos úteis ao progresso da biologia das abelhas. Há aqui uma possibilidade interessante a explorar no que diz respeito a mel tóxico, como recurso potencial de identificação das plantas tóxicas correspondentes.

Estudos palinológicos em locais arqueológicos têm tido interessantes aplicações para esclarecer o contexto biológico de certos artefatos; estabelecer correlações entre culturas humanas (Godwin 1933, Clarck & Zinderen Bakker 1964) e modificações da vegetação causadas pelo homem (Iversen 1941 e 1956).

Nos "taxa" atuais, semelhanças e diferenças de seu pólen constituem uma técnica taxonômica que se tornou básica para diversas famílias botânicas (no Brasil, citam-se os trabalhos de Rizzini 1947 e de Gomes 1955).

Estudos de amostras polínicas de plantas vivas constituem uma maneira de abordar problemas genéticos tanto na evolução de "taxa" endêmicos (Carlquist 1964), como na da filogenia de famílias (Erdtman 1960b; Campo 1966; Brewbaker 1967).

Parece-nos importante assinalar que toda essa variada gama de aplicações, que fazem da Palinologia uma especialidade de utilidade incontestável, repousa na possibilidade de se reconhecerem "taxa" vegetais pelo seu pólen. O desejo de desenvolver no Brasil, esse campo de pesquisas, tão fértil em conexões interdisciplinares, foi o estímulo que nos conduziu à iniciativa de começar a desenvolver, a partir de 1959, a palinologia dos Cerrados.

5 — INFORMAÇÕES FLORÍSTICAS SOBRE OS CERRADOS DE INTERESSE PALINOLÓGICO

A flora dos Cerrados foi estudada por diversos autores do ponto de vista florístico, mas todos eles, com exceção de Rizzini, limitaram-se a uma região pequena na qual fizeram um levantamento mais ou menos exaustivo. Rizzini (1963), por outro lado, limitou-se à flora arbórea. Como se vê, falta ainda um trabalho florístico de conjunto, sem limitações regionais, nem de formas biológicas.

A primeira lista florística saiu da magistral obra de Warming, já muito conhecida, que contém o primeiro e único estudo ecológico amplo do Cerrado. Iniciada pelas observações em Lagoa Santa, Minas Gerais, no período de 1863 a 1866, só foi publicada anos depois de concluída, devido às dificuldades

de determinação das plantas, conforme é pitorescamente narrado pelo autor no prefácio. Em português existe uma ótima tradução feita por Loefgren (Warming 1909). Limita-se, porém, à área de Lagoa Santa e arredores, em Minas Gerais.

Seguiram-se os estudos de Loefgren (1890, 1898), o primeiro sobre a flora campestre e o segundo sobre os diversos grupos florísticos, ambos restritos ao Estado de São Paulo. Ao se referir à vegetação campestre ele dá a frequência das principais famílias em três regiões, mostrando diferenças e semelhanças entre locais distantes e com o mesmo aspecto fito-fisionômico (Loefgren 1890). Além destes, existem, para Cerrados localizados em São Paulo, as listas de Ferri (1955) e de Eiten (1963), a primeira sobre a região de Emas e a outra sobre Campininha.

Sobre a flora do Cerrado de Mato Grosso temos os trabalhos de Lindman (1914) e de Malme (1924, 1932, 1937) cujas listas, comparadas às de Lagoa Santa e de São Paulo, supracitadas, mostram concordância de poucas espécies, pois, em geral, as plantas não são as mesmas mas sim espécies afins.

Para Minas Gerais, existem as listas de Mello Barreto (1942) e Mendes Magalhães (1955 e 1966), para Pernambuco, a de Lima (1957), estando em elaboração um trabalho de Eiten sobre os Cerrados do Maranhão (comunicação pessoal). Recentemente Heringer & Barroso (1968) apresentaram a lista das espécies que ocorrem numa área delimitada de 10.000 m², em Brasília.

Existem obras que não se referem diretamente à florística, mas que consultamos, por conterem relações de plantas ocorrentes em regiões de Cerrado que as listas acima não abrangem. Como se referem a outros problemas, tais como balanço d'água, germinação em condições naturais, fixação noturna de CO₂, Sistemática de um "taxon", mapeamento de vegetação etc., são, do ponto de vista florístico, contribuições incidentais. Porém, na falta de dados mais completos, elas fornecem informações que também devem ser incorporadas. São os seguintes trabalhos: Território do Amapá (Azevedo 1967); gênero *Diospyros* (Cavalcante 1963); Campo Mourão, Paraná (Coutinho & Ferri 1960); Paraopeba, Minas Gerais e Brasília, DF (Labouriau *et al.* 1964a); Norte de São Paulo, Goiás, Minas Gerais (Labouriau *et al.* 1964b); *Ocimum nudicaule* (Morhy, Gomes & Labouriau 1970); Paraopeba, Minas Gerais, e Brasil Central (Válio & Moraes 1966a, b).

Baseando-nos nestas listas todas e em plantas ainda não citadas nas listas precedentes, mas coletadas em Cerrados por biólogos do Laboratório de Fisiologia e Ecologia do Instituto de Botânica da Secretaria da Agricultura de São Paulo, fizemos uma relação da qual retiramos as espécies que estudamos quanto ao polem. Como para muitas espécies não nos foi possível encontrar espécimens em condições para o estudo (cf. material e métodos), nem todas as espécies das listas disponíveis foram estudadas. No final deste trabalho se encontra o índice alfabético das espécies estudadas.

As famílias *Annonaceae*, *Asclepiadaceae* e *Lauraceae*, não foram estudadas por apresentarem a membrana do polem muito frágil. Das famílias *Rubia-*

ceae, *Verbenaceae* e *Myrtaceae*, somente foram estudadas as espécies mais freqüentemente citadas; um estudo exaustivo deverá ser feito futuramente.

Uma das dificuldades com que se defrontou a iniciativa de levantamento palinológico dos Cerrados está no número elevadíssimo de entidades taxonômicas a estudar. Esse número poderia ser drasticamente reduzido se se dispusesse de estudos fitossociológicos, pelos quais já tivesse sido feita a triagem das espécies mais relevantes do ponto de vista da ocupação vegetal de espaço nos Cerrados. Como tais estudos não existem, qualquer iniciativa de catálogo tem que adotar uma base indutiva, constituída por toda a lista florística dos Cerrados. Se a riqueza dessa flora é uma vantagem para os botânicos tropicais, por outro lado cria uma considerável demora no levantamento de informações básicas. Este problema não aparece só para a palinologia dos Cerrados, mas para todo um grupo de iniciativas que envolvem a elaboração de catálogos, tais como padrões de nervação foliar e formas de corpos silicosos de gramíneas nos Cerrados (Sondahl & Labouriau 1970). Por outro lado, um estudo o mais possível exaustivo revela problemas que ficam ocultos quando um número pequeno de espécies é estudado.

6 — PALINOLOGIA DOS CERRADOS

O estudo sistematizado da morfologia polínica de plantas dos Cerrados foi iniciado pela autora com a publicação de uma série de trabalhos com o título geral de "Pollen grains of Plants of the Cerrado", tendo ao todo 17 colaboradores. Até o presente foram estudadas 239 espécies, pertencentes a 130 gêneros, distribuídos entre 43 famílias.

Com estes resultados já se pode ter uma visão geral, ainda que não exaustiva, dos tipos de pólen dos Cerrados. O presente trabalho visa preliminarmente homogenizar e refundir os dados existentes, bem como acrescentar outros, cuja falta foi revelada somente após o estudo em conjunto. A descrição do pólen das diferentes espécies foi substituída pela de tipos palinológicos que representam, em muitos casos, diversas espécies botânicas com pólen semelhante. Na revisão das descrições já publicadas foram preenchidas lacunas de informações que permitiram aumentar as discriminações analíticas. Em seguida os tipos palinológicos foram testados de diferentes maneiras para constatação de lacunas de descrição e para verificação da aplicabilidade da chave correspondente.

Isto posto, iniciou-se, no presente trabalho, nova fase da palinologia dos Cerrados, mediante o estudo de amostras mensais da precipitação polínica, recolhida em Goiás ao longo de um ciclo anual.