

II

Material e métodos

1 — ESCOLHA DO MATERIAL A SER ESTUDADO

O estudo das características morfológicas do palem de uma espécie pode ser feito em material retirado de plantas vivas ou de plantas herborizadas. Para um levantamento de centenas de espécies, como é o caso da flora dos Cerrados, torna-se impraticável o uso de plantas vivas, entre outros motivos, pela inacessibilidade a numerosas espécies e principalmente pela ausência de determinação taxonômica segura. Torna-se então necessário o uso quase exclusivo de material de herbário.

Como é de se prever, nem todas as exsicatas encontradas nos herbários podem ser estudadas. Algumas, por insuficiência ou ausência de flores. Outras, por determinação duvidosa ou ausente.

O trabalho de descrição morfológica dos grãos de palem de uma espécie é lento e por isso tivemos que decidir entre estudar poucas espécies, usando uma amostragem grande de indivíduos, ou levantar o maior número possível de espécies, descrevendo, em primeira aproximação, somente um indivíduo representativo de cada espécie. Optamos pela segunda alternativa para que pudéssemos ter, dentro de um período relativamente curto, um panorama geral dos tipos de grãos de palem encontrados em cada família e para podermos, então, decidir quais os que deverão ser estudados em maior detalhe.

Esta segunda opção tem o perigo de que o indivíduo escolhido seja mais tarde revelado como não representativo, seja por variabilidade dentro da espécie, seja por incorreção do nome específico. Por isto trabalhamos somente com palem de plantas que estejam registradas em um herbário. Para cada

exsicata estudada damos as indicações que a identificam: número e sigla de herbário onde o material está depositado, coletor, número e data de coleta, local de coleta (abreviado), determinador. A indicação exata do material estudado permitirá posteriores revisões taxonômicas ou palinológicas. Da mesma forma esse dado fornece acesso às mesmas plantas por outros especialistas.

Em um estudo especial de variação do tamanho dos grãos de pólen em duas espécies de *Cassia* que ocorrem no Cerrado (Salgado-Labouriau *et al.* 1965) foi demonstrado que existe variação significativa entre as flores de uma planta; mas quando comparamos uma planta com a outra de mesma espécie, as diferenças se compensam, e a amostra total de uma planta não é significativamente diferente da de outra planta na mesma espécie. Este trabalho nos sugeriu que, se usássemos três flores para cada planta estudada, teríamos uma amostra mais homogênea. Por isto escolhemos, para o catálogo de pólen dos Cerrados, exemplares de herbário dos quais pudéssemos tirar pelo menos três flores de cada exsicata. Se a amostra polínica obtida apresentar constância em forma, tamanho, número de aberturas, escultura, etc., consideramos este indivíduo representativo de espécie. Se houver qualquer variação, outros indivíduos são examinados. Da mesma forma, se o exemplar apresenta pólen muito diverso do grupo a que pertence, por exemplo *Sida macrodon* (entre as *Sida*) e *Elephantopus racemosus* (entre os *Elephantopus*), outras espécies são examinadas.

Na descrição dos tipos polínicos (parte III) obedecemos ao critério acima exposto. Entretanto, para o material já estudado na série "Pollen grains of plants of the Cerrado", não repetiremos aqui a citação completa do material usado, mesmo que este tenha sido totalmente redescrito ou completada a descrição. O espécimen por nós examinado é aqui citado somente nos casos em que está sendo descrito pela primeira vez, ou quando um novo material tenha sido examinado.

2 — MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS GRÃOS DE POLEM

Existem vários métodos de preparação de pólen para exame ao microscópio. Para o estudo palinológico necessitamos somente da membrana externa (exina). Esta membrana é elástica, modificando sua forma conforme o grau de hidratação a que está sujeita (Salgado-Labouriau 1966). Deste modo um estudo palinológico não pode ser baseado em grãos frescos, corados ou não, e montados em água.

Métodos de preparação que desidratam os grãos e os montam em bálsamo (Rizzini 1947, Gomes 1955), ou que mantêm os grãos túrgidos montando-os em seguida em gelatina glicerizada (Wodehouse 1935), também apresentam desvantagens. O citoplasma e as inclusões que normalmente se encontram dentro da célula, tais como grãos de amido, gotas de óleo, etc., não são eliminados e fazem sombra sobre a exina quando examinada em pequeno aumento. O grão neste tipo de preparação apresenta-se opaco ao microscópio

e não pode ser examinado em grandes aumentos. Além disto, este método só pode ser usado para pólen atual.

Existem outros métodos que tornam as membranas límpidas e mais ou menos transparentes, mas um pouco da elasticidade da membrana permanece. Quando os grãos de pólen preparados por diferentes métodos são comparados quanto ao tamanho, verifica-se que eles são maiores ou menores conforme o método usado (Faegri & Deuse 1960, Praglowsky 1959, Martin 1959, Aytug 1960). Diante disto torna-se necessário escolher um método e usar sempre o mesmo para que os resultados sejam comparáveis (cf. medidas).

Escolhemos o método de acetólise criado por Erdtman (1943, 1952 e 1960a) porque: a) pode ser usado indiferentemente para pólen fóssil ou atual (fresco ou de herbário); b) ao se processar a acetólise da esporopolenina, simultaneamente são destruídas a intina (membrana interna de celulose) e o conteúdo celular; o grão se torna transparente, tornando possível o exame dos detalhes em imersão; c) uma vez acetolisada, a membrana fica quimicamente estável.

Outro método muito usado pelos palinologistas é o tratamento do pólen (ou de material que contenha pólen) com potassa cáustica diluída a 10% (Faegri & Iversen 1950). Este método é usado para grãos fósseis e atuais. Mas o ataque por KOH diluído não elimina inteiramente a intina e o conteúdo celular, portanto o grão não fica inteiramente transparente e limpo, e isto dificulta a observação da morfologia fina. Entretanto este método não deve ser deixado de lado porque envolve uma reação menos violenta que a acetólise e assim essa preparação é indicada para pólen mais delicado, como é o caso, por exemplo, de algumas *Apocynaceae* (Marques & Melhem 1966) e de *Araucaria angustifolia*.

As descrições de pólen da parte III são baseadas em grãos acetolisados, a não ser que esteja dito especificamente no texto qual o método empregado.

ACETÓLISE

O método de acetólise criado por Erdtman consiste em reagir a esporopolenina (de que é constituída a membrana externa do grão) com anidrido acético em meio ácido. Por este processo a membrana externa (exina) fica transparente e a intina e o conteúdo celular do grão são destruídos; a membrana externa, que por suas características morfológicas, serve para a identificação do grão, pode então ser estudada em todos os detalhes.

Este método foi usado por nós durante doze anos e aos poucos acrescentamos pequenas modificações que não alteram substancialmente a acetilação mas que tornam mais eficiente o trabalho de preparação.

Material necessário para acetólise:

Capela com exaustão de ar, esgoto e torneira

Balança de sensibilidade de 1g

Banho-maria
Centrifugador que permita ir até 1.500 RPM
Placa aquecedora de Malassez
Estilete dobrado em L, para lutagem
Aguilhas de dissecação
Pinças
Quadrados de 4 cm de lado, de tela de latão (n. 50, 300 malhas por polegada quadrada)
Copos de bequer "Pyrex": 2 de 250 ml, 1 de 10 ml
Provetas graduadas de 100 ml, 50 ml e 10 ml
Tubos de centrifugação, cilíndricos, de fundo redondo, "Pyrex", de capacidade de 10 – 15 ml
Bastonetes de vidro de cerca de 5 mm de diâmetro
Frascos conta-gotas de cerca de 10 ml de capacidade
Lâminas lapidadas, *de boa qualidade*, para microscopia
Lamínulas de 22 x 22 mm, de boa qualidade (ou circulares)
Lamparina de álcool
Anidrido acético (p. a.)
Ácido sulfúrico (p. a. ou grau técnico)
Parafina (para lutagem), de ponto de fusão 52-56°C
Etanol absoluto (frasco conta-gotas de polietileno)
Água destilada (idem)
Gelatina glicerinada
Mistura glicerina-água (1:1, v/v)
Folhas de papel sulfite
Etiquetas
Material botânico

MÉTODO (seg. Erdtman, modificado):

a) Para material fresco:

1 – Retire as tecas, estames, ou, no caso de flores muito pequenas, os próprios botões já prontos para abrir. Coloque em tubos de vidro com 1 ml de ac. acético glacial. Pode assim ficar por dias, meses. Deixe no mínimo um dia no ácido acético.

2 – Passe para tubos de centrífuga numerados de 1 em diante, uma espécie em cada tubo; centrifugue com 1.000 rotações por minuto durante 5 minutos.

3 – Decante o sobrenadante.

4 – Ponha para aquecer o banho-maria.

5 – Prepare a mistura de acetólise:

Mistura de acetólise: 9 partes de anidrido acético e 1 parte de ácido sulfúrico. Ponha o volume de anidrido ac. num bequer e vá acrescentando o ácido

sulfúrico em *pequenos* jatos, agitando com um bastão de vidro. Só prepare a quantidade necessária para aquela acetólise.

Atenção: Só use vidraria absolutamente seca; qualquer amostra de porem que contenha água deve ser desidratada antes de usar a mistura de acetólise. Se à mistura fôr acrescentada água, há uma reação violenta podendo jogar o conteúdo do tubo para fora a mais de um metro de distância, quebrar o tubo e causar acidentes pessoais graves.

6 — Distribua 5 ml de mist. de acetólise para cada tubo com sedimento, ponha um bastão de vidro em cada tubo. Triture cada material de encontro as paredes do tubo por meio do bastão. Deixe o bastão dentro do tubo.

7 — Leve ao banho-maria, começando com a temperatura do banho próximo da fervura e aqueça o mais rápido possível até a água do banho começar a ferver. Mantenha o banho fervendo lentamente e agite cada tubo com seu bastão. Ferva por dois minutos (para algumas espécies é necessário reduzir o tempo de fervura para um minuto e meio, ou somente meio minuto, senão os grãos amassam muito). O banho deve ser colocado numa capela para evitar aspiração nasal dos vapores, sabidamente irritantes e tóxicos.

8 — Pare o aquecimento quando atingir o tempo necessário. Coloque os tubos com as preparações nas caçambas do centrifugador, tare usando o resto da mistura e centrifugue por 5 minutos com 1.000 rotações/min.

9 — Tire o sobrenadante para um recipiente a parte e jogue fora a mistura (na terra, nunca no esgoto da pia, para evitar a corrosão dos encanamentos).

10 — Acrescente água destilada ao sedimento até completar o volume de 10 ml. Ponha um bastão de vidro limpo em cada tubo.

11 — Agite cada tubo, acrescente 1 a 2 gotas de álcool etílico ou acetona, torne a agitar.

12 — Centrifugue e decante (1.000 rot/min por 5 min).

13 — Acrescente ao sedimento a mistura de água com glicerina em partes iguais. Deixe ficar por meia hora ou até o dia seguinte.

14 — Centrifugue e ao decantar conserve o tubo de boca para baixo.

15 — Ponha os tubos de boca para baixo num bequer com papel mata-borrão no fundo.

16 — Comece a montagem das lâminas.

b) Para material de herbário:

O material de herbário é passado numa tela e o pó é levado para dentro do tubo de centrifugação com a mistura de acetólise. A tela que usamos é de latão n.º 50 que cortamos em pedaços quadrados de 4 cm de lado e aplicamos diretamente na boca do tubo de centrifugação para tamisar o material seco.

Para cada tubo usamos um quadrado de tela diferente e, ao acabar, passamos as telas até ao rubro na chama de bico de Bunsen ou de uma lamparina de álcool a fim de poder usá-las em novas acetólises. A chama destrói inteiramente os grãos remanescentes.

Complete o volume da mistura de acetólise nos tubos para 5 ml e proceda daí por diante como nos grãos de material fresco.

Ao terminar a acetólise parte dos grãos é montada e o resto é suspenso em glicerina pura. Os grãos suspensos em glicerina são usados para outras montagens permanentes, quando necessárias. São também usados em montagem provisória na própria glicerina onde eles ficam livres para serem rolados permitindo o exame de toda a superfície (Salgado-Labouriau 1966).

c) Métodos de montagem permanente

Os grãos de porem podem ser montados em qualquer meio de índice de refração conveniente para contraste. Bálsamo do Canadá, gelatina glicerinada, meio Harleco ou outros produtos comerciais são os mais usados.

Através de inúmeros trabalhos sabemos que os grãos de porem apresentam grau de hidratação diferente conforme o meio de montagem (Erdtman & Praglowski 1959, Aytug 1960). Por isto escolhemos um meio de montagem e o usamos em todas as nossas preparações de rotina.

O meio de montagem usado por nós neste trabalho (e em todos que o precederam) foi a gelatina-glicerinada de Kisser (Salgado-Labouriau 1961b). Este meio é o mais empregado em trabalhos de palinologia, é de fácil preparação e pode ser usado imediatamente após a acetólise sem necessitar desidratação ou qualquer outra preparação prévia.

Meio de Montagem (Gelatina Glicerinada):

50 g gelatina
175 ml água destilada
150 ml glicerina (82%)
7 g de fenol

A gelatina glicerinada assim obtida é distribuída a quente em pequenos frascos de 10 ml com tampa de borracha. Após atingirem a temperatura ambiente são guardados na geladeira, por anos.

A vantagem dos pequenos frascos é que somente se deixa exposta uma pequena quantidade à contaminação de porem atmosférico ou mesmo qualquer imperícia na limpeza das agulhas de dissecação.

Montagem dos grãos de porem: Com estilete previamente aquecido ao rubro, retire um pedaço de gelatina glicerinada de mais ou menos 1 cm de diâmetro e coloque numa lâmina limpa. Tampe e guarde o frasco que contém a gelatina glicerinada. O meio de montagem que ficou na lâmina é que deve ser usado, jogue fora o que sobrar, após a montagem. Comece a montagem.

1 — Um pedaço de gelatina glicerizada de mais ou menos 3 mm de lado é retirado com um estilete limpo, isto é, previamente aquecido ao rubro.

2 — O tubo contendo o sedimento é apanhado do bequer, sempre de boca para baixo e nele é introduzido o estilete com gelatina glicerizada.

3 — Toca-se ou mergulha-se delicadamente no sedimento.

4 — A gel. glicerizada contendo o sedimento que reteve é posta numa lâmina e dividida em pequenos pedaços. Cada pedaço é colocado numa lâmina fina de microscópio, preparando-se um total de 8 lâminas.

5 — Aqueça ligeiramente na chama de uma lamparina de álcool para fundir a gel. glicerizada (não deixe ferver senão formam-se bolhas que são difíceis de remover). É preciso que o fragmento de gel. glicerizada seja muito pequeno, para que, depois de aplicada a lamínula, forme uma mancha circular que diste cerca de 5 mm da margem da lamínula.

6 — Com o estilete agite a mancha de gel. glicerizada contendo o sedimento polínico para espalhar os grãos uniformemente.

7 — Coloque uma lamínula em cima de cada lâmina preparada, ponha etiqueta de identificação da espécie.

8 — Leve o estilete à chama até ficar rubro, comece a montagem do segundo tubo.

d) Lutagem com parafina

(seg. J. Müller, modificado *in* Erdtman 1952)

1 — Ponha a parafina para fundir num cadinho.

2 — Mergulhe um estilete dobrado em L na parafina fundida e em seguida encoste a dois lados consecutivos da lamínula. Mantenha a lâmina ligeiramente quente numa placa de Malassé ou levando-a constantemente a chama de lamparina de álcool. A parafina se espalha rapidamente entre lâmina e lamínula.

3 — Vire a lâmina com a lamínula para baixo sobre uma folha de papel. Os grãos se depositarão na lamínula enquanto a gel. glicerizada e a parafina endurecem.

4 — Comece a lutar a segunda lâmina.

Terminada a lutagem remova o excesso da parafina com xilol. Do lado oposto à etiqueta grave com estilete de diamante referências que sirvam para identificar o material botânico usado. Esta precaução evita a perda das preparações no caso da etiqueta se soltar ou tornar-se ilegível. Guarde em posição horizontal num laminário.

e) Diafanização dos grãos

No caso de os grãos ficarem muito escuros, depois de feita a acetólise, diafaniza-se com cloro nascente. Usa-se um terço de sedimento total.

1 — Agite o tubo contendo sedimento + glicerina + água e transfira cerca de um terço do conteúdo para um tubo de centrifugação.

2 — Ao sedimento + glicerina + água, acrescente mais ou menos 5 ml de ácido acético glacial.

3 — Ponha 1 (ou 2) gotas de solução saturada de clorato de sódio, agite.

4 — Uma (ou duas) gotas de ácido clorídrico, agite. Aparece imediatamente cloro nascente. O material fica descorado em menos de meio minuto.

5 — Centrifugue e decante.

6 — Lave em água destilada, depois em glicerina + água, monte e lute com parafina.

f) Coloração

Notando que nos grãos corados fica mais fácil a observação das aberturas e da escultura da exina, modificamos o método de Faegri & Iversen (1950), procedendo da seguinte forma:

1 — Ferver em banho-maria por 15 segundos o sedimento + solução 5% KOH + 3 a 4 gotas do corante diluído em água.

2 — Centrifugue, lave e monte.

Uma outra maneira de corar os grãos consiste em colocar uma gota de corante em cima do pedaço de gel. glicerinada + sedimento, fundir na chama da lamparina de álcool (item 5 da montagem) e terminar a montagem.

Corantes: Diversos corantes podem ser usados (veja adiante, Método de Wodehouse) entretanto, o mais aconselhável é a fucsina básica em solução aquosa bem diluída que permite distinguir entre sexina e nexina (Faegri 1956).

Nota: Grãos que foram diafanizados ou corados não devem ser usados para medidas mas somente para ajudar na observação da estrutura e escultura fina da membrana, pois o processo de diafanização altera as medidas, segundo já foi verificado.

Uma vez preparada a lâmina, os grãos ficam fixos no meio de montagem nas mais diversas posições. Nas Malváceas, como os grãos são esféricos, a posição em que os grãos caem é indiferente. Nas *Bombacaceae* os grãos ficam sempre em vista polar ou próxima desta tornando-se necessário o exame em glicerina para observação do grão em vista equatorial (de lado).

g) Acetólise — Micrométodo
seg. Avertissian (*in* Brown, 1960) e Punt (1962)

1 — Ponha a antera numa lâmina de microscópio, ou lâmina escavada e cubra com mistura de acetólise.

2 — Disseque com estilete, espalhando o pólen e retirando os restos da antera.

3 — Coloque uma lamínula em cima da preparação e aqueça em placa de Malassé por meio de uma lamparina de álcool. Tenha o cuidado de conservar a lâmina longe da chama para que a mistura não pegue fogo. Observe a mudança progressiva de cor da preparação sob microscópio. Vá acrescentando a mistura toda a vez que a preparação for secando (em geral 3 a 4 vezes é suficiente). Quando o conteúdo protoplasmático tiver desaparecido dos grãos e a exina tiver adquirido uma cor castanha, de clara a escura, pare de aquecer.

4 — Esfrie rapidamente colocando a lâmina sobre uma superfície de pedra ou ferro.

5 — Lave a preparação com uma ou duas gotas de álcool (Avertissian) ou transfira os grãos por meio de um pincel umedecido em glicerina para uma lâmina contendo uma gota de glicerina (Punt).

6 — Junte gelatina glicerinada e termine a montagem.

Vantagens — Este micrométodo é mais rápido que a acetólise e exige pouco material de herbário. Nas flores com anteras grandes basta um pedaço de um estame. Além disto, como o processo de preparação é observado sob microscópio, pode-se parar no momento exato em que o conteúdo foi destruído e a exina está clara.

Desvantagens — O material não é lavado suficientemente após a acetólise. Nem é possível lavar mais porque os grãos são arrastados para fora da lâmina, e se perdem. O ácido permanece lá dentro e causa o descolorimento do grão. Esta exina montada em meio ácido terá medidas diferentes daquela que preparada pela acetólise seg. Erdtman.

Os vapores da mistura de acetólise esfumaçam e corroem rapidamente as lentes frontais das objetivas do microscópio. Colocando-se uma lamínula em cima da preparação, a quantidade de vapor que sai diminui mas não é eliminada inteiramente. Além disto, este vapor é tóxico ao observador.

Diante destes fatos achamos que este micro-método não é aconselhável para preparação de lâminas de referência, nem qualquer trabalho de rotina. Entretanto, ele pode ser usado para casos especiais como a preparação de grãos cujas exinas não resistem à acetólise. Nesses casos o contróle visual direto do processo permitirá que se cesse o aquecimento antes dos grãos amassarem. Mas é preciso ter sempre em mente que até o momento em que a lâmina esteja definitivamente montada em gelatina glicerinada *não* se deve usar um microscópio de boa qualidade.

MÉTODO DE WODEHOUSE, MODIFICADO

- 1 — Retire as anteras e coloque no centro de uma lâmina.
- 2 — Ponha uma gota de álcool e com um estilete abra as anteras, vá pingando o álcool e dissecando as anteras até tirar o pólen. Não deixe secar inteiramente.
- 3 — Com algodão na ponta de um estilete remova óleo ou resíduos que vão se depositando como um anel em volta da preparação.
- 4 — Leve a lâmina à chama de uma lamparina de álcool até secar o álcool.
- 5 — Acrescente uma gota de corante em solução aquosa bem diluída, leve à chama para começar a ferver.
- 6 — Ponha um pouco de gelatina-glicerinada numa lamínula, leve à chama para fundir, inverta e coloque em cima da preparação.
- 7 — Lute com parafina.

Corantes: Uma grande variedade de corantes pode ser usada: verde de metila, safranina, violeta de genciana, fucsina, azul de metileno, etc. Se se deseja mostrar um contraste entre exina e conteúdo celular, o pólen pode ser corado primeiro com uma solução fraca de eosina, e em seguida com verde metilá; a exina ficará corada de verde e a intina, de vermelho.

MÉTODO DE POTASSA

Este método é muito usado por palinologistas e foi o processo pelo qual von Post há cerca de 50 anos preparou suas lâminas de pólen de turfeiras:

Flores de herbário, vasas, etc., são fervidas em solução de KOH a 10% por algumas horas e depois montadas em gelatina glicerinada.

Atualmente usa-se este método como tratamento previo de turfas e vasas, que são tratadas em seguida por acetólise.

No caso de espécies cuja exina é muito frágil e que não resistem à acetólise (como a maior parte das Apocinaceas) pode-se dissecar o material fresco ou de herbário numa lâmina, pôr uma ou duas gotas de KOH a 10%; levar a ferver na chama da lamparina de álcool por muito pouco tempo; pôr uma gota de corante, levar novamente à chama e depois montar em gelatina-glicerinada.

3 — CARACTERIZAÇÃO DOS GRÃOS DE POLEM

A caracterização do pólen é feita por tipo polínico dentro de cada família. O nome que designa o tipo é o do gênero ou da espécie botânica que tenha

esta forma de pólen. Para caracterização de cada tipo obedecemos a seguinte seqüência:

1 — Enumeração das espécies botânicas nas quais foi observado o tipo de pólen;

2 — Caracterização morfológica do tipo: a) forma; b) abertura; c) exina e d) medidas;

3 — Autores que estudaram as espécies que foram incluídas por nós neste tipo.

a) FORMA

O grão de pólen tem, em geral, a forma de um elipsóide, freqüentemente de revolução. Quando a célula-mãe do grão de pólen se divide formando quatro células, estas se conservam unidas, em alguns casos mesmo depois de completado o seu desenvolvimento formando tétrades, díades ou políades. Em outros casos, os grãos se separam ficando livres. Quando os grãos ainda estão agrupados, denominou-se polo proximal à área de cada grão que está mais próxima, em direção ao centro da célula. Em oposição, a área mais afastada do centro da tétrade, denominou-se polo distal. O mesmo critério se aplicou para díades e políades (veja glossário).

O eixo que passa pelo centro do grão e atravessa o centro das duas áreas polares, foi denominado eixo polar (Erdtman, 1943). O diâmetro do círculo máximo perpendicular ao eixo polar foi denominado diâmetro equatorial. Em contraposição ao diâmetro equatorial nós denominamos (Salgado-Labouriau, 1966), diâmetro polar, à distância compreendida entre as duas interseções do eixo polar com as duas áreas polares. Baseando-se no grão de pólen ideal, que seria um elipsóide de revolução, Erdtman (1952) considerou o eixo polar como sendo o eixo de revolução do elipsóide. Fazendo a relação: diâmetro polar sobre diâmetro equatorial (P/E) ele criou um índice para forma do grão com oito classes. Esta proposta foi adotada universalmente pois quando os grãos de pólen caem de lado numa lâmina de microscopia, seja qual fôr a sua verdadeira forma em 3 dimensões, o seu perímetro máximo, nesta posição, olhado através do microscópio, é uma elipse. Os termos oblato, esférico e prolato e suas subdivisões podem então serem empregados, com a ressalva de que se referem a um grão ideal em posição lateral (vista equatorial). Entretanto, a tabela proposta por Erdtman apresenta o defeito de ter intervalos de classe abertos. Por este motivo, arbitrariamente, nós fechamos estes intervalos (Salgado-Labouriau 1966) para facilitar o seu uso e evitar ambigüidades (Tabela 1).

A relação P/E, usada para caracterizar a forma do grão em vista equatorial não pode ser usada graficamente por apresentar intervalos de classe de tamanho desigual. Por exemplo: a classe oblata vai seg. Erdtman de 0,50 a 0,75 (intervalo de 0,25) e a classe prolata vai de 1,33 a 2,00 (intervalo de 0,67). Para

podermos representar graficamente as classes de forma, fizemos a transformação de P/E no logarítmo decimal de P/E. Desta forma as classes que em escala de verdadeira grandeza são desiguais e assimétricas, passam a ser simétricas em relação à forma esférica, aumentando progressivamente seus intervalos à medida que se afastam do centro (esférico) (fig. 523).

TABELA 1

CLASSES DE POLEM QUANTO À FORMA	
INTERVALO DE P/E	DENOMINAÇÃO
0,50	Peroblato
0,50-0,74	Oblato
0,75-0,87	Suboblato
0,88-0,99	Oblato-esferoidal
1,00	Esférico
1,01-1,14	Prolato-esferoidal
1,15-1,33	Subprolato
1,34-2,00	Prolato
2,00	Perprolato

As classes de formas referidas acima representam um grão de polem ideal. Quando este grão é observado de outro ângulo, com um dos polos voltado para o observador (vista polar) nem sempre o seu perímetro equatorial (âmbito) é circular como deveria ser num elipsóide de revolução.

Pseudobombax marginatum, por exemplo, apresenta-se com perímetro máximo de forma triangular e aberturas nos lados deste triângulo. Realmente a sua forma se aproxima muito mais de uma bipirâmide trigonal do que de um elipsóide de revolução.

Uma mesma "forma" em vista equatorial pode representar grãos com forma inteiramente diferentes. Os grãos de polem de *Pseudobombax marginatum* e *Bauhinia bongardi* são oblatos mas, em vista polar, o primeiro é planoaperturado (fig. 65), e o outro é anguloaperturado (fig. 223). Os grãos de *Harpalyce brasiliensis*, em vista polar, têm a forma de folha de trevo (fig. 250), os de *Eriotheca pentaphylla* var. *wittrockiana* são triangulares planoaperturados (fig. 63), e os do gênero *Helicteres* são triangulares anguloaperturados (fig.

441), mas nos três casos a "forma" em vista equatorial é suboblata. Entre os grãos oblatos esferoidais, por exemplo, *Neea theifera* tem âmbito circular (fig. 364), *Solanum grandiflorum* tem âmbito triangular (fig. 433). Entre as Euforbiaceas, cujos grãos são subprolatos, *Tragia lagoensis* tem âmbito circular (fig. 185), *Euphorbia setosa* tem triangular, de lados planos (fig. 165), e *Sebastiania glandulosa* é fossaperturada (fig. 180). Muitos outros exemplos podem ser dados. A forma verdadeira de um grão de pólen poderia ser caracterizada pelo nome do corpo sólido a ela correspondente, entretanto como estamos mais familiarizados com as formas de geometria plana e, ao observarmos um grão no microscópio, teríamos que girá-lo em diversas direções para ver a forma, preferimos caracterizar a forma dos grãos de pólen pelo perímetro em duas posições perpendiculares (vista polar e vista equatorial) que é mais facilmente reconhecível no microscópio. Por estes motivos após descrever o perímetro em vista equatorial, damos o mesmo em vista polar.

O perímetro máximo em vista polar chama-se âmbito ("ambitus") abreviado amb (Erdtman 1952). Este contorno pode ter as formas: circular, triangular e elíptica. A forma triangular pode ser de lados retos, côncavos ou convexos.

b) ABERTURAS

As aberturas ficam situadas em zonas mais delgadas da exina: A camada externa (sexina) desaparece ou se afina perdendo os elementos de relevo. A nexina, nesta zona, passa a ser a camada principal, podendo ou não engrossar. Ultimamente têm surgido muitos estudos de ultra-microscopia das zonas aperturais e aos poucos o mecanismo apertural vai sendo esclarecido.

Sendo mais delgada, a zona apertural é mais elástica e portanto responsável pelas mudanças de volume do grão. Em grãos sem tratamento químico, quando desidratados forma-se uma dobra para dentro fechando a zona apertural; quando água é acrescentada, a dobra se distende à medida que o grão vai se hidratando e a zona delgada fica então exposta. Nos grãos acetolizados, as paredes ficam rijas e estas modificações ocorrem de maneira parcial e muito lenta. Muitas vezes a membrana apertural se rompe na preparação dos grãos.

O estudo da zona apertural pode ser encarado de vários ângulos. Ecologicamente mostra como o grão resiste ao dessecamento depois de sair da antera. Fisiologicamente mostra como pode dar passagem ao tubo polínico para a fecundação. Morfologicamente, pela enorme variedade de forma, tamanho e distribuição, ajuda na caracterização do tipo de pólen.

Existem duas formas fundamentais de aberturas: 1.^a — Aberturas mais ou menos circulares em que a relação entre os dois diâmetros é menor que 2:1 (Erdtman 1952). São denominados poros (porus, i); 2.^a — Aberturas alongadas em que a relação entre os dois diâmetros é maior que 2:1 (Erdtman 1952). São denominados colpos (colpus, i).

A combinação destas duas formas fundamentais resulta numa abertura composta. Esta tem uma zona mais delgada que é deprimida e alongada como um barco e em cujo centro fica localizada uma abertura. A abertura central, denominada ós (os, ora) pode ser isodiamétrica como um poro ou alongada como um colpo. Esta forma de abertura, denominada por Erdtman colporo (colporus, i), é encontrada entre a maioria das dicotiledôneas.

As aberturas podem estar distribuídas em volta do equador, em um dos polos (distal, monocotiledôneas; proximal, esporos) ou pode ser espalhada em toda a superfície do grão.

c) EXINA

A exina é observada em grande aumento com lente de imersão a óleo. Dois tipos de exames são feitos: o exame de superfície e o exame em corte óptico.

Para o exame de superfície lança-se mão das diferenças de índice de refração nos diferentes estratos da exina. A luz de iluminação do microscópio ao atravessar a exina refrata diferentemente, de acordo com a camada que está atravessando. Deste modo, ao focalizarmos num determinado nível o padrão da superfície apresenta "ilhas" de uma cor contornadas por "canais" de outra cor. Este exame, que foi denominado por Erdtman "análise de Luz e Obscuridade", detecta as mais delicadas saliências e reentrâncias. Ao examinarmos em focalização alta a superfície do grão, as saliências aparecem como ilhas claras, brilhantes (Luz) sobre um fundo escuro. Quando descemos lentamente a focalização a figura se inverte e as ilhas tornam-se escuras (Obscuridade) sobre um fundo claro. Neste caso a presença de saliências é detectada pela mudança nas "ilhas" de L para O, ou seja, o padrão é LO. Se na superfície existem pequenas reentrâncias então a análise mostrará um padrão OL.

Com o mesmo tipo de análise podemos verificar se a superfície é inteiramente lisa, ou se é constituída de um estrato externo liso sustentado internamente por uma série de colunas, etc. A análise de LO nos dá uma série de dados mas este exame não fica completo para interpretação se não fôr feito o exame das estratificações.

Para o exame das estratificações da exina usamos o corte óptico. Como o grão fica transparente e ôco após a acetólise, pode-se fazer cortes ópticos em diferentes partes do grão, no polo, junto às aberturas, entre as aberturas, etc.

As observações destes dois tipos de análise nos dão a interpretação correta da escultura e da estrutura da exina.

No caso da exina não ser lisa, muitos autores medem as malhas ou saliências de superfície. Nós observamos que em geral estes padrões são de forma irregular tornando-se difícil uma medida precisa. Para darmos então uma idéia do tamanho das malhas, rugosidades ou pequenas cavidades da exina lançamos mão da visibilidade destes relevos ao microscópio usando

como limites, a visibilidade ao microscópio com as objetivas de 10x, 20x, 40x e 90x e uma ocular fixa de 12x. No microscópio Leitz Ortholux os aumentos foram determinados com uma lâmina micrométrica de um milímetro dividida em cem partes. Esta escala foi projetada no mesmo plano da platina do microscópio por meio de uma câmara clara usando as diferentes objetivas. A projeção foi medida e o aumento real foi calculado como sendo de: 140x — 270x — 600x e 1.200x.

O relevo será muito grande quando fôr claramente visível a partir de 140x de aumento; grande a partir de 270x; médio, a partir de 600x e pequeno a partir de 1.200x. Na descrição dos tipos polínicos ou na chave, os números 140, 270, 600 e 1.200 seguidos do sinal "x" designam a partir de qual aumento o relevo é observado com nitidez.

d) MEDIDAS

No estudo detalhado do palem de cada espécie do Cerrado obedecemos sempre aos critérios de medidas abaixo expostos (Salgado-Labouriau, 1966).

Para cada planta retira-se o palem de pelo menos três flores a fim de homogenizar as diferenças de tamanho entre o palem das diferentes flores. Depois de acetolizado o palem é montado em diversas lâminas e as medidas são tomadas no intervalo máximo de uma semana após a acetólise.

A precaução de se manter constante e reduzir ao mínimo o intervalo entre a preparação e a medida do palem se torna necessária porque já é muito conhecida a tendência dos grãos de aumentar o seu tamanho após a acetólise (Faegri & Deuse 1960, Praglowski 1959, Martin 1959 e Aytug, 1960). Como a exina é constituída de partes mais ou menos rijas e partes elásticas, o grão, ao ser montado, leva algum tempo para estabilizar seu volume. Esta estabilização pode durar dias ou meses e varia de espécie para espécie (Aytug 1960). Como já ressaltamos (Salgado-Labouriau *et al.* 1965) uma estocagem longa, antes de serem tomadas as mensurações, sujeitaria os grãos às condições externas de umidade relativa do ar que certamente influiriam nas modificações de volume. A determinação do tempo necessário para estabilização do volume em cada espécie não se justifica no presente trabalho por torná-lo extremamente lento. Em vez disso, considerando os fatos acima, resolvemos que as medidas seriam tomadas logo após a acetólise tendo por limite máximo uma semana. Fixando e diminuindo o intervalo ao mínimo os resultados serão repetíveis e comparáveis.

As medidas são tomadas em diversas lâminas contendo o material polinífero, medindo-se o máximo de 9 grãos em cada lâmina perfazendo um total de 25 grãos para uniformizar a amostra. Usa-se uma ocular micrométrica Leitz de fio móvel com escala arbitrária de 12 divisões, cada uma dividida em 100 partes por meio de um vernier (nônio). A verdadeira grandeza foi calculada a partir da medida de uma distância de comprimento conhecido.

Cada grandeza é medida em somente um grão mesmo que seja possível, pela posição, tomar-se outras medidas desta grandeza. Este é o caso principalmente dos espinhos. Os diâmetros polar e equatorial são medidos no mesmo grão em vista equatorial e somente quando uma das aberturas se encontra exatamente no meio do grão (fig. 524).

A relação P/E é calculada a partir destes dois diâmetros para a determinação da forma em vista equatorial. No caso dos grãos esféricos pantoaberturados, como os da maioria das Malváceas, Amarantáceas, etc., em que não é possível pela posição das aberturas determinar quais os dois diâmetros, todos os grãos que apresentavam um poro no centro tiveram dois diâmetros em quadrante medidos, obedecendo ao critério de uniformização da amostra. Neste caso a relação P/E fica então substituída pela relação D_I / D_{II} , que é sempre igual a um.

Quando os grãos de uma espécie, por sua forma especial, caem sempre numa posição, é necessário montá-los também em glicerina pura, para que possam ser girados e medidos em outra posição. Este é o caso de *Bombax*, que cai sempre em vista polar, *Cuphea ingrata* e *C. thymoides* que caem em vista equatorial, e muitos outros.

No palem com distribuição de aberturas em torno do equador (zonoaberturados) mediu-se em vista polar o seu diâmetro máximo e o lado do apocolpio para o cálculo do índice da área polar (Faegri & Iversen, 1950). Este diâmetro máximo nos grãos elipsoidais corresponde ao diâmetro equatorial e nos grãos tetraédricos corresponde à mediana do triângulo máximo.

Os termos "diâmetro máximo" e "triângulo máximo" são obtidos por meio de focalização. Focaliza-se o grão na superfície voltada para o observador e vai-se descendo a focalização até atingir um tamanho máximo onde se observa com nitidez a estratificação de exina. A partir daí ao se descer a focalização o diâmetro vai diminuindo até que a superfície exatamente oposta ao observador é vista por transparência e ao avesso.

As mensurações das aberturas foram sempre tomadas quando elas se apresentavam no centro do grão e na superfície próxima ao observador.

Sempre que possível 25 medidas foram feitas de cada grandeza. Para cada medida é dada a faixa de variação (range) e são calculados, a média aritmética, o erro (desvio padrão da média), o desvio padrão da amostra e o coeficiente de variabilidade. Somente as grandezas com coeficiente de variabilidade abaixo de 15% são usadas para diferenciação das espécies. Quando uma determinada grandeza não puder ter 25 medidas, ou porque os grãos não param na posição mensurável, ou não são nitidamente visíveis ao microscópio óptico, dá-se somente a média aritmética.

As grandezas com coeficientes de variabilidade acima de 15% ou cuja mensuração de 25 grãos não foi possível, dá-se apenas a média aritmética que é usada somente para ter um grau de grandeza e evitar uma interpretação sub-

jetiva. Por exemplo, podemos afirmar que o polem das espécies do gênero *Sida* tem exina muito mais fina (3-5 μ) que o gênero *Pavonia* (9-18 μ).

Todos os critérios acima expostos foram os mesmos usados por nós anteriormente quando fizemos a descrição do polem de plantas do Cerrado (Salgado-Labouriau, 1966).

No presente trabalho estes dados foram usados para a caracterização dos tipos polínicos, porém as medidas de cada espécie, a não ser que se esteja descrevendo pela primeira vez, se encontram no trabalho original, nas referências bibliográficas de cada tipo.

e) DESENHOS

Todos os desenhos foram feitos em câmara clara. Casos especiais são assinalados na legenda da figura. A representação dos grãos é de acordo com a convenção amplamente aceita para ilustração de polem.

Para grãos zonoaperturados representa-se o grão em vista polar e vista equatorial (cf. glossário). Na vista polar sempre uma abertura está voltada para baixo na página (ex. figs. 58, 69, 104, 336, 438). Os desenhos da vista equatorial, em geral, são esquemáticos, baseados numa série de desenhos nesta posição e montados de maneira a mostrar a forma do grão, a posição e a forma das aberturas (ex. figs. 59, 105, 333, 437). Convencionalmente o grão deve ser representado na posição em que uma abertura fique exatamente no centro da mesma. As aberturas, em posição lateral, que estejam situadas na superfície voltada para o observador, são representadas em linha cheia ao passo que as que são vistas por transparência são feitas em linha tracejada. Para dar melhor a idéia do relevo, em alguns casos, a vista equatorial não é esquematizada (ex. figs. 71, 300, 303, 422).

Suplementa-se estas ilustrações com desenhos dos detalhes. A estratificação geralmente é destacada do grão e colocada na gravura contornando a posição do grão de onde foi desenhada (ex. figs. 60, 67, 337, 439). Somente nos casos em que a posição é irrelevante, coloca-se a parte (ex. figs. 106 a 111). Por fim, quando o grão é ornamentado, mostra-se através da análise de LO (ex. figs. 56, 68) ou de detalhe em grande aumento (ex. figs. 57, 70, 331) o tipo de ornamentação e/ou abertura.

Nos grãos pantoaperturados só se apresenta uma vista geral (ex. figs. 2, 4, 5, 131) juntamente com os desenhos de detalhes da exina.

Em todos os desenhos as escalas estão colocadas de forma tal que as linhas que as limitam estão sempre voltadas para o desenho correspondente. Assim na fig. 1 as linhas limites se acham voltadas para a direita onde se acha o desenho correspondente ao passo que na fig. 3 elas se acham voltadas para a esquerda pelo mesmo motivo. Nas figs. 2 e 4 as linhas limites estão para cima onde se acham as figuras correspondentes. Entre as figs. 20 e 26 as linhas limites da escala colocada entre elas são voltadas para cima e para baixo indicando pertencer a ambas estas figuras. O mesmo se dá com as figs. 29 e 30.

f) TERMINOLOGIA

Nossos trabalhos de descrição de grãos de pólen até agora, foram publicados em inglês. Neles usamos basicamente a terminologia de Erdtman, apresentada no glossário de seu livro "Pollen Morphology and Plant Taxonomy — Angiosperms" (1952). Como estes termos são em geral latinos, aportuguesamos a terminação para o uso no presente trabalho. Assim *colpus*, *i* será colpo, *exine* será exina, etc. Outros termos que poderiam ter tradução em português, adotamos o termo de uso mais freqüente no Brasil, procurando desta forma evitar um uso excessivo de termos técnicos que dificultam o uso das descrições por não especialistas. Existem muitos trabalhos de pólen publicados em português por diferentes autores, com diferentes terminologias (Salgado-Labouriau 1966). Deixaremos de lado estes termos ou definições e, de conformidade com nossos trabalhos anteriores usaremos a nomenclatura de Erdtman (1952). Um glossário dos termos empregados neste trabalho é apresentado em anexo.

A distinção gráfica entre o nome da espécie botânica (grifado) e o nome do tipo polínico (sem grifo) foi feita para que não haja dúvidas de que, quando se refere ao pólen existem, ou poderão existir, outras espécies botânicas cujo pólen cai, ou poderá cair, na descrição apresentada.

g) RELAÇÃO DOS HERBARIOS CONSULTADOS

- (BHMG) — Instituto Agronômico de Minas Gerais.
- (HB) — Herbarium Bradeanum.
- (R) — Museu Nacional.
- (RB) — Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- (SP) — Instituto de Botânica de São Paulo.
- (UB) — Universidade de Brasília.