

Efeito de poluentes atmosféricos (CO_2 e O_3) e temperatura na fertilidade, conteúdo proteico e morfologia do pólen

Guilherme Afonso Cardoso

Ciências e Tecnologia do Ambiente

Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território

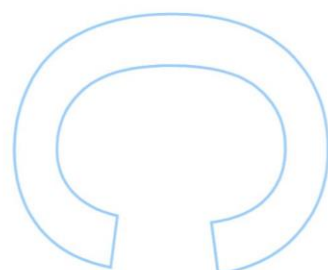
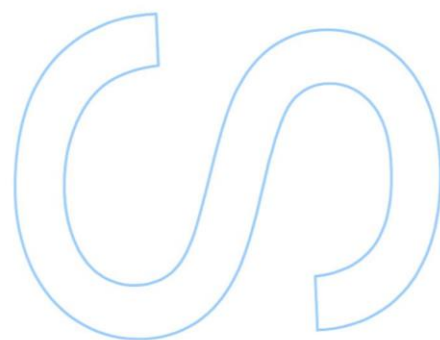
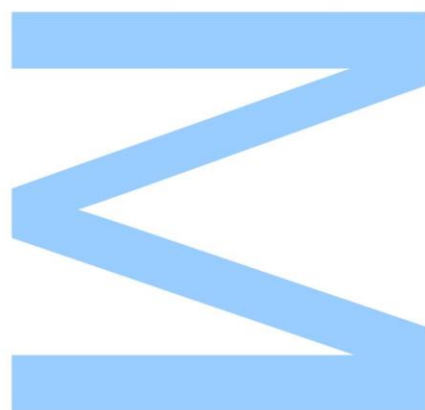
2021

Orientador

Helena Isabel da Costa Ribeiro, Doutora,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

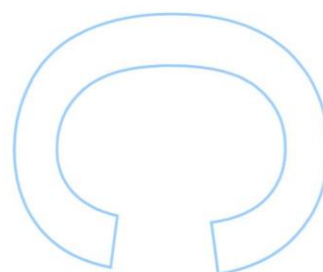
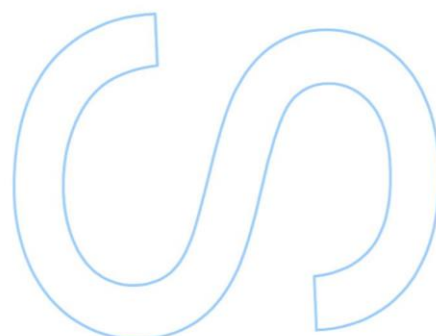
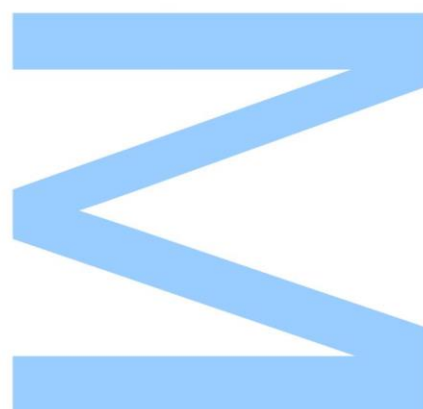
Ilda da Conceição Abreu de Noronha, prof. doutora,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Para todas as pessoas que me apoiaram durante esta época de estágio e tese, queria apresentar aqui os meus agradecimentos sinceros:

Para a minha orientadora, professora Helena Ribeiro, e igualmente para a professora Ilda Noronha por terem desempenhado tal função com dedicação, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo da realização do meu projeto de tese, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

As minhas colegas de laboratório, Sónia e Catarina, pelo apoio incondicional fornecido ao longo de todo o período em que me dediquei a este trabalho e desejos de um caminho profissional próspero.

Ao meu pai e irmã, que pelo incentivo e apoio durante a realização deste projeto.

Aos meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado, e pelo apoio demonstrado ao longo de toda a realização deste trabalho.

Índice

Resumo	1
Abstract	2
1.Introdução.....	3
1.1.Palinologia	3
1.2.Pólen	4
1.3.Polinização	5
1.4. Caracterização das espécies em estudo.....	6
1.4.1. <i>Olea europaea</i>	6
1.4.2. <i>Actinidia deliciosa</i>	7
1.5. Germinação do pólen in vitro	8
1.6.Efeito dos poluentes atmosféricos no pólen	9
1.7.Caracterização e toxicidade de CO ₂ e O ₃	12
1.7.1.Dióxido de carbono	12
1.7.2.Ozono	13
2. Objetivos.....	14
3.Material e métodos	15
3.1.Exposição do pólen a CO ₂ e O ₃	15
3.2. Exposição do pólen à temperatura.....	17
3.3. Fertilidade polínica.....	17
3.3.1.Viabilidade do pólen.....	17
3.3.2.Germinação do pólen.....	18
3.4.Quantificação de proteínas solúveis	18
3.5.Perfil proteico polínico por SDS-PAGE	19
3.6. Análise da morfologia polínica	20
3.6. Análise estatística.....	21
4. Resultados e discussão	22
4.1. Exposição do pólen a gases atmosféricos	22
4.1.1.Viabilidade polínica	22
4.1.2.Germinação	25
4.1.3. Quantificação de proteínas solúveis	27
4.1.4. Perfil proteico polínico por SDS-PAGE	29
4.2. Exposição do pólen a diferentes temperaturas	33
5. Conclusão.....	35
Referências bibliográficas	36

Índice de figuras

Figura 1 : Estratificação da parede do grão de pólen (adaptado e modificado de Punt et al., 2007).....	4
Figura 2 : Representação esquemática da câmara ambiental utilizada na exposição do pollen (<i>Olea europaea</i> e <i>Actinidia deliciosa</i>) a O ₃ e CO ₂ e as unidades de controlo....	15
Figura 3 : Viabilidade polínica das amostras de <i>Olea europaea</i> fumigadas com CO ₂ e O ₃	23
Figura 4 : Viabilidade polínica das amostras de <i>Actinidia deliciosa</i> fumigadas com CO ₂ e O ₃	24
Figura 5 : Germinação in vitro de pólen de <i>Olea europaea</i> fumigado com CO ₂ e O ₃ ...	25
Figura 6 : Germinação in vitro de pólen de <i>Actinidia deliciosa</i> fumigado com CO ₂ e O ₃	26
Figura 7 : Níveis de concentração de proteínas solúveis do pólen de <i>Olea europaea</i> fumigado com CO ₂ e O ₃	27
Figura 8 : Níveis de concentração de proteínas solúveis do pólen de <i>Actinidia deliciosa</i> fumigado com CO ₂ e O ₃	28
Figura 9 : eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das proteínas do pólen de <i>Olea europaea</i> e <i>Actinidia deliciosa</i> fumigados com CO ₂ e O ₃	30
Figura 10 : Grãos de pólen de <i>Olea europaea</i> e <i>Actinidia deliciosa</i> observados ao microscópio ótico.	31
Figura 11: Resultados obtidos da avaliação das propriedades do pólen de <i>Actinidia deliciosa</i> exposto a diferentes temperaturas, entre 25°C e 38°C.....	33

Índice de tabelas

- Tabela 1 – Média e desvio padrão da concentração de CO₂ e O₃, temperatura e humidade relativa registadas durante as 6 horas de fumigação. 16
- Tabela 2 - Média e desvio padrão da temperatura e humidade relativa registadas durante a exposição do pólen na estufa a diferentes níveis de temperatura. 17
- Tabela 3 - Média e desvio-padrão da área do pólen, perímetro, valores maiores e menores dos eixos e diâmetro de feret dos grãos de pólen de *Olea europaea* e *Actinidia deliciosa* fumigado com CO₂ e O₃. 31
- Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores da área, perímetro, valores maiores e menores dos eixos e diâmetro de feret dos grãos de pólen de *Actinidia deliciosa*. 34

Resumo

Neste trabalho estudou-se o efeito de poluentes como o CO₂ e O₃ e da temperatura no pólen de *Olea europaea* e *Actinidia deliciosa*. Foram analisados vários parâmetros relacionados com a fertilidade, conteúdo proteico e morfologia dos grãos de pólen. Cada amostra de pólen foi exposta a diferentes concentrações dos poluentes. A exposição foi realizada numa câmara de fumigação própria com luz do Sol simulada e com monitorização da temperatura e humidade relativa. As amostras de pólen foram expostas a CO₂ e O₃ em duas concentrações diferentes, sendo para o CO₂ aproximadamente 800 e 1500 ppm, e no caso do O₃ aproximadamente 0.06 ppm (o valor limite legal de acordo com a Directiva 2008/50/EC, qualidade do ar, do parlamento europeu) e o dobro deste valor, 0.12 ppm. Também se testou o efeito do aumento da temperatura no pólen de *Actinidia deliciosa*, entre 25°C a 38°C. Todas as experiências foram efetuadas durante intervalos de 6 horas, numa câmara própria ventilada e com simulação de luz solar. A fertilidade das amostras do pólen foi avaliada através de ensaios de viabilidade e germinação. Foi efetuada a quantificação das proteínas solúveis e seu perfil polipeptídico em gel de SDS-PAGE e análise da morfologia polínica ao microscópio óptico. O pólen de *O. europaea* e *A. deliciosa* quando expostos aos poluentes atmosféricos apresentaram alterações nomeadamente com uma diminuição do potencial de germinação e um aumento da concentração de proteínas solúveis, no entanto não se observaram diferenças nos perfis eletroforéticos. A nível da morfologia do pólen não se verificaram diferenças significativas após exposição aos poluentes. Relativamente aos ensaios de exposição do pólen de *A. deliciosa* a diferentes temperaturas observou-se uma tendência para a diminuição da sua fertilidade estatisticamente significativa em relação à amostra controlo, bem como um aumento de teor de proteínas solúveis totais. No entanto não se observou alteração na morfologia do pólen.

Palavras-chave: Poluentes atmosféricos (CO₂ e O₃), fertilidade polínica, *Olea europaea*, *Actinidia deliciosa*, eletroforese, SDS-PAGE, morfologia polínica.

Abstract

In this work, the effect of pollutants such as CO₂ and O₃ and temperature on the pollen of *Olea europaea* and *Actinidia deliciosa* was studied. Several parameters related to fertility, protein content and pollen grain morphology were analyzed. Each pollen sample was exposed to different concentrations of pollutants. The exposure was carried out in a fumigation chamber with simulated sunlight while the temperature and relative humidity was monitored. The pollen samples were exposed to CO₂ and O₃ at two different concentrations, about 800 and 1500 ppm for CO₂, and about 0.06 ppm (the legal limit value according to Directive 2008/50/EC, quality the European Parliament) and the double of this value, 0.12 ppm for O₃. The effects of increasing the temperature on the pollen of *Actinidia deliciosa*, between 25°C and 38°C, was also tested. All experiments were carried out in 6-hour intervals, in a separate ventilated chamber with simulated sunlight. Fertility of pollen samples was assessed through viability and germination tests. The quantification of soluble proteins and their polypeptide profile was carried out on an SDS-PAGE gel and analysis of pollen morphology under an optical microscope. The pollen of *O. europaea* and *A. deliciosa* when exposed to air pollutants exhibited various changes, with a decrease in germination potential and an increase in the concentration of soluble proteins, however, the electrophoretic profiles showed no differences. In terms of pollen morphology, there were no significant differences after exposure to pollutants. Regarding the exposure of *A. deliciosa* pollen to different temperatures, there was a noticeable trend towards a statistically significant decrease in fertility in relation to the control sample, as well as an increase in the content of total soluble proteins. However, no change in pollen morphology was observed.

Keywords: Atmospheric pollutants (CO₂ and O₃), pollen fertility, *Olea europaea*, *Actinidia deliciosa*, Electrophoresis, SDS-PAGE, Pollen morphology.

1.Introdução

A poluição do ar é uma alteração da qualidade do ar devido à emissão de substâncias físicas, químicas e biológicas. Ao longo do último século, verificou-se um aumento significativo da poluição atmosférica de origem antropogénica, que fez com que se atingisse os mais altos valores de concentração de poluentes já registados na atmosfera (EEA, “Air quality in Europe” – Relatório de 2019). Esta situação é um problema tanto ambiental como social muito importante, pois leva a inúmeros efeitos adversos não só na saúde humana mas também nos ecossistemas e no clima.

Sendo o grão de pólen um bioaerossol sazonalmente presente na atmosfera, a sua interação com os poluentes do ar pode comprometer a função e integridade polínica, com forte impacto na reprodução sexual das plantas.

1.1.Palinologia

Palinologia é o estudo do pólen, esporos e certos organismos microscópicos com parede orgânica ácido-resistente e dimensões compreendidas entre 5 e 500 µm denominados palinórmorfos.

Palinologia tem muitas aplicações, incluindo a monitorização de pólen atmosférico, produção e dispersão (aerobiologia), no estudo de alergias humanas, em estudos arqueológicos (e.x. análise detalhada de dietas), no estudo do pólen encontrado no corpo ou no intestino de insetos (Entomopalinologia) que é útil para determinar a alimentação de insetos e hábitos migratórios, especialmente porque envolve insetos economicamente importantes. A palinologia forense envolve o uso de análise de pólen na solução de crimes.

A indústria do petróleo tem o crédito de demonstrar a utilidade dos palinórmorfos no estudo de sequências estratigráficas de rochas e o potencial para exploração de petróleo e gás. Como os palinórmorfos são resistentes à decomposição e são produzidos em grande abundância, sua recuperação de rochas e sedimentos por meio de tratamentos químicos especiais e cuidadosos é possível e fornece aos cientistas as informações necessárias para descrever a vida vegetal de épocas passadas. Ao descrever a sequência de palinórmorfos selecionados através das camadas rochosas da Terra, os estratígrafos (cientistas que estudam as camadas rochosas da Terra) são capazes de correlacionar rochas da mesma idade e podem, portanto, localizar e correlacionar as camadas que contêm petróleo ou gás natural.

1.2.Pólen

Os grãos de pólen são estruturas biológicas produzidas pelas plantas superiores, responsáveis pela reprodução sexual, correspondendo aos gâmetas masculinos. Os grãos de pólen variam em tamanho, forma e características da parede dependendo da espécie. Em geral, os grãos de pólen têm uma parede dupla que consiste numa parede interna fina composta de celulose e pectina, denominada de intina, semelhante a uma parede celular e uma parede externa, a exina, composta por esporopolenina, uma substância resistente que o protege dos fatores externos, inclusive à ácidos fortes, altas temperaturas e agentes de decomposição de matéria orgânica, e evita a desidratação dos grãos. A forma e as características externas da exina são altamente variáveis e usadas para distinguir os grãos de pólen produzidos por diferentes espécies (Clarke, 1979).

A exina consiste em duas camadas: uma camada externa, a sexina, ornamentada com aberturas: poros e/ou colpos e uma camada interior, mais homogénea, a nexina que cobre a intina. Por último temos o plasmolema, membrana celular que envolve o protoplasma do grão de pólen.

A sexina, pode ser separada em 3 subcamadas: uma camada exterior, o tectum (teto), uma camada basal que termina na nexina e um segmento central composto por colunas (columelas), que separa as duas. A superfície da sexina pode conter um número de depressões e elevações á superfície, os elementos esculturais (Caeiro et al., 2014).

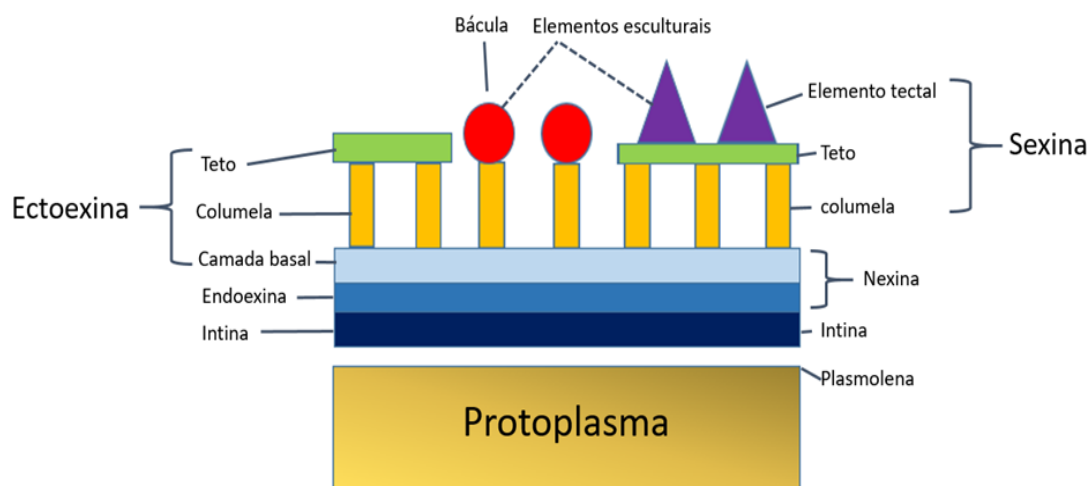


Figura 1 : Estratificação da parede do grão de pólen (adaptado e modificado de Punt et al., 2007)

A função da exina é proteger o material genético do meio ambiente (como a radiação UV, compressão e água) durante a polinização (transporte da antera para o estigma). A superfície do grão de pólen também contém várias ceras e proteínas que ajudam a repelir a humidade e interagir com o estigma. No entanto, essas estruturas proteicas na superfície do pólen são frequentemente as responsáveis pelas reações alérgicas ao pólen observadas em humanos (Clarke et al., 1979).

Para uma fertilização bem-sucedida a dispersão do pólen é essencial, dado que estas estruturas não apresentam mobilidade própria e necessitam de agentes polinizadores abióticos e/ou bióticos. O processo de dispersão dos grãos de pólen depende de vários fatores como o vento, água ou animais. A quantidade de pólen libertada também varia com vários fatores, como a espécie, estado fisiológico da planta, condições climáticas, e até mesmo a hora do dia. Os grãos de pólen também possuem alérgenos (principalmente proteínas e glicoproteínas) presentes na parede exterior, bem como no citoplasma (Cresti & Linskens, 2000).

1.3.Polinização

A polinização é o processo da transferência do pólen dos órgãos reprodutores masculinos para os órgãos reprodutores femininos das plantas sendo essencial para reprodução. O tipo de polinização pode ser dividido em duas classes: autogamia ou alogamia. Nas plantas autogâmicas a fecundação acontece com o pólen produzido na mesma planta. Enquanto as plantas alogâmicas a fertilização é apenas realizada com o pólen de outro indivíduo, denominada de polinização cruzada.

A polinização cruzada, pode ser realizada por diferentes agentes polinizadores, principalmente pelo vento e por certos animais, como insetos, aves e morcegos, e até mesmo a água em certas plantas aquáticas.

O tamanho do pólen é também um fator importante na polinização, pois as plantas anemófilas (polinizadas pelo vento), produzem pólen de menores dimensões, aerodinâmicos e em grandes quantidades enquanto que as plantas entomófilas (polinizadas por animais) produzem pólen em menor quantidade, mas de maiores dimensões, e ornamentado. A *Olea europaea* e a *Actinidia deliciosa* são plantas que podem ter polinização pelo vento como por animais.

1.4. Caracterização das espécies em estudo

1.4.1. *Olea europaea*

As oliveiras, são plantas angiospérmicas dicotiledóneas que pertencem à família botânica das Oleaceae, género *Olea*. Este género é constituído por várias espécies de árvores e arbustos que apresentam como característica comum a capacidade de se desenvolverem em condições ambientais adversas. *Olea europaea* inclui algumas sub-espécies entre elas a oliveira domesticada utilizada no cultivo, *Olea europaea* var. *europaea* sendo a única que possui frutos comestíveis, e a oliveira selvagem, *Olea europaea* var. *sylvestris* Bot, também conhecida como zambujeiro e reconhecida como a planta progenitora da atual oliveira cultivada na atualidade (Zohary, 1995).

As folhas são persistentes, possuem nervação reticulada, inserção oposta, divisão simples, forma inteira lanceolada a obovada e alongada e consistência coriácea. Apresentam uma cor verde intensa na página superior e verde acinzentada ou esbranquiçada na página inferior. Possuem poucos estomas e todos localizados na página inferior, dispostos em ligeiras depressões, não estando expostos à luz direta do sol, permitindo a existência de um microclima mais húmido que diminui a transpiração da planta (Zohary, 1995).

A produção de folhas novas inicia-se no início da Primavera, diminui no Verão e retoma no Outono até a planta entrar em dormência. As flores são numerosas, reunidas em inflorescências com a forma de panículas axilares ou panículas terminais, são pequenas de cor branca e aromáticas. O fruto é uma drupa suculenta, ovoide e subglobosa, constituído por um endocarpo (semente), mesocarpo (polpa) unido ao epicarpo (Zohary, 1995).

De acordo com a sua percentagem em óleo e características morfológicas podem destinar-se à indústria extrativa de azeite (20% de óleo) ou destinados à conserva (baixa percentagem de óleo) (Zohary, 1995).

Os grãos de pólen dos diferentes cultivares analisados apresentam na generalidade simetria radial, forma subprolada a esferoidal-prolada (Ribeiro, 2008).

1.4.2. *Actinidia deliciosa*

A *Actinidia deliciosa*, é nativa do sul da China, cujo fruto foi declarado fruto nacional do país. Outras espécies de *Actinidia* também são encontradas na China e variam do Leste para o Japão e do Norte para as áreas do sul do Extremo Oriente russo. Esta espécie cresce naturalmente em altitudes entre 600 e 2.000 m. (Morton, 1987)

A. *deliciosa* é uma planta dióica, possuindo flores femininas e masculinas em indivíduos separados. A planta é considerada uma trepadeira lenhosa de crescimento vigoroso e sinuoso, capaz de atingir 9 m, prefere ambientes com boa intensidade luminosa e de temperaturas médias suaves com elevada presença de água (Morton, 1987). Possui folhas caducas com pecíolo longo, ovais, cordadas na base, com 7,5 a 12,5 cm de comprimento. O fruto possui forma oval, ovóide ou oblongo, com tamanho até 6, 5 cm de comprimento, com pele castanho-avermelhada densamente coberta por pêlos castanhos curtos e rígidos. A polpa, firme até a completa maturação, é brilhante, succulenta e verde-claro, ou às vezes amarela, acastanhada ou esbranquiçada, exceto pelo centro branco (Morton, 1987).

O grão de pólen da A. *deliciosa*, variedade Tomuri é esférico, possui três sulcos pronunciados, com cerca de 16 µm (Oliveira, 2003).

1.5. Germinação do pólen *in vitro*

A germinação do pólen é um processo essencial à reprodução das plantas superiores que envolve a formação e o crescimento do tubo polínico. Este, transporta os gametas masculinos até ao saco embrionário ocorrendo aí a fecundação com a oosfera. Estes processos envolvem uma série de eventos de sinalização, incluindo interações célula-ambiente, comunicação intercelular e sinalização intracelular (Taylor & Hepler, 1997).

A germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico são significativamente regulados pelo transporte de iões inorgânicos, como o Ca²⁺ e o K⁺, através das membranas plasmáticas do pólen e dos tubos polínicos (Feijó et al., 1995).

O alongamento é realizado por uma forma de extensão celular comum a todos os eucariotas. Ao longo do tubo existem diferenças na distribuição dos organelos celulares, notando-se falta de vacuolização na região citoplasmática principal do tubo e a presença de uma zona distinta de mitocôndrias na zona apical com exclusão de dictiosomas e outros organelos (Soares et al., 2013).

Para o estudo do pólen é importante a sua conservação, sendo necessário ser armazenado a temperaturas baixas e humidade máxima de 10% de modo a manter a sua viabilidade. Uma alta humidade vai dar origem de cristais de gelo durante o processo de congelamento que pode romper a parede celular, destruindo o pólen. (Akihama, et al., 1978)

A fertilidade do pólen pode ser determinada por ensaios diretos de germinação do pólen, *in vitro* (Pio et al., 2007) e *in vivo* (Rossel et al., 1999) ou por métodos indiretos, avaliando a viabilidade polínica utilizando corantes como o azul tripano e o carmim acético (Colas & Mercier, 2000). A coloração é um processo simples e de baixo custo embora não é capaz de determinar eficientemente a capacidade de germinação do pólen viável com exina espessa resultando em valores de potencial de germinação estimados menores (Alexander, 1969).

A germinação *in vitro* é um método que visa simular as condições do estigma de modo a induzir a germinação do pólen. Embora como este é um meio mais controlado não temos a presença de outros fatores que possam ter impacto na germinação ao contrário da fertilização em campo, como a receptividade do estigma e a influência do próprio ambiente, sobrestimando os valores medidos (Barnabás et al. 1988).

1.6. Efeito dos poluentes atmosféricos no pólen

A poluição atmosférica é considerada hoje como uma das principais áreas de estudo nas zonas onde a densidade populacional humana é elevada. De meados do século XIX até agora, tem ocorrido um enorme aumento em alguns continentes. Heede (2014) afirmou que entre 1854 e 2010 a maior percentagem das emissões antropogénicas de dióxido de carbono e metano tiveram origem em menos de 100 entidades comerciais e estatais, em todo o mundo.

A poluição atmosférica por gases e matéria particulada afeta muitos locais rurais, industriais e urbanos (Akimoto, 2003). No último relatório da Agência Europeia do Ambiente, nota-se que até 98% da população urbana da União Europeia está atualmente exposta a concentrações de O₃, acima das recomendações pela Organização Mundial de Saúde (EEA, “Air quality in Europe” – Relatório de 2019). Podemos então admitir que a poluição atmosférica desempenha um papel importante na saúde de todos os grupos etários (Brunekreef & Holgate, 2002).

Além dos gases poluentes e das partículas emitidas resultantes das atividades antropogénicas, a atmosfera possui uma grande variedade de partículas biogénicas (de origem biológica). Entre as partículas biogénicas - o bioaerossol, podemos encontrar vírus, bactérias, esporos de fungos, fibras vegetais ou pólen com uma distribuição de tamanho entre nanómetros a algumas centenas de micrómetros. Sabe-se há muito tempo que essas partículas são indutoras de um enorme número de doenças (Douwes, 2003) como a asma e rinite. Entre eles, os grãos de pólen são uma preocupação real nas alergias da população. O pólen sendo um dos principais agentes do sistema de reprodução de milhares de espécies vegetais, é ao mesmo tempo um verdadeiro contribuinte da massa total do bioaerossol presente na atmosfera das cidades (Anses, 2014).

Com base na concentração de fosfolipídios, Womiloju et al. (2003) relataram que restos celulares de esporos de fungos e pólen podem contribuir com 4 –11% da massa do material particulado total <2,5 µm (PM_{2,5}) e 12–22% do carbono orgânico presente na mesma fração.

O pólen serve também como transporte direto de alergénios solúveis na água e não hidrossolúveis. Quando quebrados, os grãos de pólen das plantas anemófilas também são vetores dos fragmentos. Muitos desses fragmentos são capazes de difundir alergénios transportados pelo ar assim como as subpartículas de pólen (Anses, 2014). Já foi verificado que os aeroalergénios mais frequentes derivam do pólen (Behrendt, 2001).

A exposição das plantas aos poluentes como o O₃, CO₂, NO₂ e outras PMs causam efeitos adversos a longo prazo, particularmente nos grãos de pólen. Por essa razão o pólen é um modelo comum usado no estudo da relação da qualidade do ar e alergias respiratórias (Cresti & Linskens 2000).

A concentração de pólen nas áreas urbanas como o Porto é menor do que nas áreas rurais devido a uma menor quantidade de zonas verdes, embora as populações nas áreas urbanas tendem a ser mais afetadas pelas alergias causadas pelo pólen do que as populações das áreas rurais, por essa razão é importante o estudo dos efeitos dos poluentes no pólen (Cresti & Linskens 2000).

A interação entre os poluentes e o pólen é um tópico complexo. Estima-se que este contacto possa dar origem a uma maior produção de alergénios, ou alteração da alergenicidade. Uma das mais recentes teorias acerca da relação pólen-poluentes é a ocorrência da nitratação das proteínas do pólen, como observado num estudo com fumigação de NO₂ e O₃, que podem levar a um possível aumento ou diminuição da alergenicidade do pólen (Shiraiwa et al., 2012).

Os poluentes atmosféricos podem ter um efeito no pólen, desde a diminuição da viabilidade e capacidade de germinação (Chichiriccò & Picozzi, 2007), mudança de potencial alergénico, alteração das características físico-químicas da superfície do pólen, e um aumento do perigo potencial para a saúde da população (Emberlin, 1995).

Para se investigar esses efeitos, o pólen pode ser fumigado *in vitro* com produção artificial dos poluentes diretamente exposto à poluição atmosférica externa. Depende dos objetivos pretendidos e qual o método usado (Sousa et al., 2012).

A avaliação do pólen é realizada com recurso a dois métodos, por exposição passiva, diretamente sobre o pólen e partículas recolhidas deste, ou pelo método de transplantação, em que as amostras de pólen são expostas a diferentes zonas poluídas dentro de um período tempo específico (Sénéchal et al., 2015).

O método de exposição passiva tem a vantagem de proporcionar um padrão de poluição mais realista tendo em conta os efeitos a curto e longo prazo dos poluentes

nas plantas, embora esta avaliação seja muito difícil de ser realizada devido ao facto de outros fatores que também vão ter um impacto na saúde das plantas como a diferente exposição solar e a deposição seca ou húmida dos poluentes. O método de transplantação elimina esses fatores externos que podem interferir na avaliação do pólen presente (Sénéchal et al., 2015).

A germinação e viabilidade são os parâmetros biológicos mais simples para demonstrar o efeito de poluição no pólen. Por esta razão, um grande número de estudos relata a influência da poluição artificial na função reprodutiva do pólen para uma extensa variedade de espécies e uma gama de poluentes atmosféricos comuns e concentrações como por exemplo: o monóxido de carbono, nitrogénio e dióxido de enxofre, ozono, ácidos e metais pesados (Wolters & Martens, 1987).

Os ensaios de exposição *in vitro* a poluentes, embora seja um método mais simples de estudo com um ambiente mais controlado, podendo usufruir de uma forma de controlo da poluição experimental em condições de laboratório ou estufa. Podemos ter uma melhor avaliação dos diferentes gases, ou material particulado biogénico ou mineral, sozinho ou combinado. Desta maneira há a possibilidade de medir o tempo, a dose e a quantidade de poluentes usados na fumigação. Permite a repetição, para vários pólenes de diferentes espécies ou subpartículas de pólen, de vários cenários de poluição, em taxas de poluição baixas, realistas ou altas, de maneira a simular poluição de indústria ou condições de tráfego, condições de países desenvolvidos e não tão desenvolvidos (Wolters & Martens, 1987).

No entanto, poderá não corresponder ao verificado *in vivo* para o estudo da interação do pólen com os poluentes, devido aos diferentes componentes misturados na atmosfera atualmente. Além disso, ainda não existe um dispositivo experimental que permite observar e registar as diferentes interações entre pólen e poluentes (Wolters & Martens, 1987).

Os gases e a matéria particulada podem ter efeito na exina do pólen quando em contacto (Cerceanu-Larrival et al., 1991). Com o design e uso de reatores de leito fluidizado dedicados à poluição do pólen foi possível estudar as interações da poluição com o pólen em vários níveis e alta precisão na década 1990 pelo grupo de Behrendt et al. (1996).

Provou-se que há evidências morfológicas que o pólen é pré-ativado por extratos orgânicos de material particulado aéreo (Behrendt 1992). Além disso, Behrendt et al. (1996) mostraram que sob algumas condições, compostos aquosos podem então induzir a libertação local de alergénios, resultando numa geração de aerossóis alergénicos ou numa adsorção de proteínas derivadas do pólen em partículas transportadas pelo ar.

1.7. Caracterização e toxicidade de CO_2 e O_3

Com o agravamento do aquecimento global, observa-se o aumento de concentração de gases que possuam um efeito na flora, bem como a elevada queima de combustíveis fósseis. Assim, têm sido realizadas várias experiências para observação do efeito dos gases de estufa, como o CO_2 .

A camada de O_3 estratosférico protege a vida na Terra absorvendo a radiação ultravioleta (UV) prejudicial do Sol, com a sua distribuição determinada por processos químicos e dinâmicos. O ozono estratosférico superior aumentou desde 2000 em 1,3% por década fora das regiões polares (Langematz, 2019).

1.7.1. Dióxido de carbono

O dióxido de carbono (CO_2) é um gás incolor com uma densidade cerca de 53% maior que a do ar seco. As moléculas de CO_2 consistem num átomo de carbono com ligação dupla covalente a dois átomos de oxigénio. A concentração atual é de cerca de 0,04% (412 ppm) por volume presente na atmosfera, tendo subido dos níveis pré-industriais de 280 ppm, sofrendo um aumento em mais de 20% nos últimos de 40 anos de acordo com o Laboratório de Pesquisa do Sistema Terrestre (ESRL) (Eggleton, 2012). As fontes naturais deste gás incluem vulcões, fontes termais e geiseres, e é libertado de rochas carbonatadas por dissolução em água e ácidos. Como o dióxido de carbono é solúvel em água, ele está presente naturalmente em lençóis freáticos, rios e lagos, calotes polares e água do mar. Está presente em depósitos de petróleo e gás natural (Britannica, 2020).

O CO₂ é um gás asfixiante e não classificado como tóxico ou prejudicial de acordo com os padrões do Sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos da Comissão Económica das Nações Unidas (GHS), usando as Diretrizes da OCDE para o Teste de Produtos Químicos.

Em baixas concentrações, o dióxido de carbono gasoso parece ter pouca toxicidade. Em concentrações mais altas, leva a um aumento da frequência respiratória, taquicardia, arritmias cardíacas e comprometimento da consciência. Concentrações superiores a 10% podem causar convulsões, coma e até mesmo morte em certos casos (Langford, 2005).

O dióxido de carbono (CO₂) é um produto da combustão, fermentação da matéria orgânica e respiração dos seres vivos. É um gás incolor, inodoro e não inflamável que se acumula próximo ao solo (CO₂ é 1,5 vezes mais pesado que o ar). Essa razão por qual os ambientes fechados são vulneráveis à acumulação de CO₂, podendo ser um asfixiante em locais fechados (Žaba et al., 2011). O dióxido de carbono não só causa asfixia, mas também atua como um tóxico em altas concentrações, embora em concentrações pequenas não tem efeitos tóxicos, e as situações em que se pode ser considerado um perigo são excepcionais, por essa razão não há limites à sua concentração em ambiente exterior, apenas interior (Ikeda et al., 1989).

1.7.2.Ozono

O ozono (O₃) é um gás altamente reativo composto por 3 átomos de oxigénio. Tem origem natural ou antropogénica, presente na atmosfera, principalmente na estratosfera e na troposfera. Este tem um papel importante na vida na Terra, positivo ou negativo dependendo do local que se situa na atmosfera.

A estratosfera tem um papel de absorver os raios solares permitindo que o planeta mantenha a sua temperatura e absorve a quantidade de radiação ultravioleta prejudicial reduzindo a intensidade da sua exposição na superfície da Terra (Finlayson, et al., 1986).

Na troposfera é um caso oposto, uma camada mais perto da superfície, pois também funciona como um poluidor aéreo secundário devido à instabilidade química da própria molécula. Normalmente presente em maior quantidade nas zonas rurais do que nas zonas industriais (Ainsworth et al., 2012). O O₃ é um poluente ambiental devido à instabilidade da sua molécula reagindo com o material orgânico, funciona como um agente oxidativo fotoquímico e é responsável por 90% dos níveis totais de oxidantes nos centros urbanos (McConnell, et al., 2002).

2. Objetivos

O trabalho teve como objetivo principal, a avaliação dos efeitos da exposição *in vitro* de poluentes atmosféricos, como o ozono (O₃) e o dióxido de carbono (CO₂) no pólen de *Actinidia deliciosa* e *Olea europaea* durante aproximadamente 6 horas e a avaliação dos efeitos da exposição do pólen de *Actinidia deliciosa* a várias temperaturas (25, 30, 35 e 38°C) durante 6 horas.

Neste estudo foram realizadas as seguintes experiências:

- Avaliar os efeitos dos gases CO₂ e O₃ na germinação e viabilidade do pólen da *Olea europaea* e da *Actinidia deliciosa*
- Avaliar os efeitos dos gases CO₂ e O₃ no conteúdo de proteínas solúveis do pólen da *Olea europaea* e da *Actinidia deliciosa*.
- Avaliar os efeitos dos gases CO₂ e O₃ na morfologia do pólen da *Olea europaea* e da *Actinidia deliciosa*.
- Avaliar os efeitos da temperatura entre os 25°C e 38°C na germinação e viabilidade do pólen da *Actinidia deliciosa*
- Avaliar os efeitos da temperatura entre os 25°C e 38°C no conteúdo de proteínas solúveis do pólen da *Actinidia deliciosa*.
- Avaliar os efeitos da temperatura na morfologia do pólen da *Actinidia deliciosa*.

3. Material e métodos

A época de floração da *Actinidia deliciosa* e da *Olea europaea* ocorre entre abril e maio com a abertura dos gomos florais e da constituição da flor, podendo durar entre 2 a 3 semanas. Dependendo da variedade o tempo da floração pode variar sendo mais cedo ou tardia (Cacioppo et al., 1986).

A amostra do pólen de *A. deliciosa*, variedade Tomuri, foi adquirida a um produtor italiano através da empresa Greensun e o pólen da *Olea europaea*, variedade Cobrançosa, foi recolhido dos campos experimentais de estação de melhoramento de plantas de Elvas. O pólen de ambas espécies foi conservado a -20°C.

3.1. Exposição do pólen a CO₂ e O₃

As amostras de pólen foram expostas *in vitro* numa câmara própria com paredes de madeira e acrílico com dimensões de 50x70x50 cm (Sousa et al., 2012). Utilizando um Simulador Solar (Newport 67005 300 W) para simular luz solar diretamente em cima do tubo com a amostra do pólen. Um ventilador e duas ventoinhas de caixa foram usadas para homogeneizar o ar dentro da câmara. A temperatura do ar e a humidade relativa dentro da câmara foram monitorizadas continuamente usando um sensor EBRO EBI20 e quando este não se encontrava disponível foram monitorizadas manualmente com um intervalo de 15 em 15 minutos usando um sensor de temperatura e humidade (figura 2).

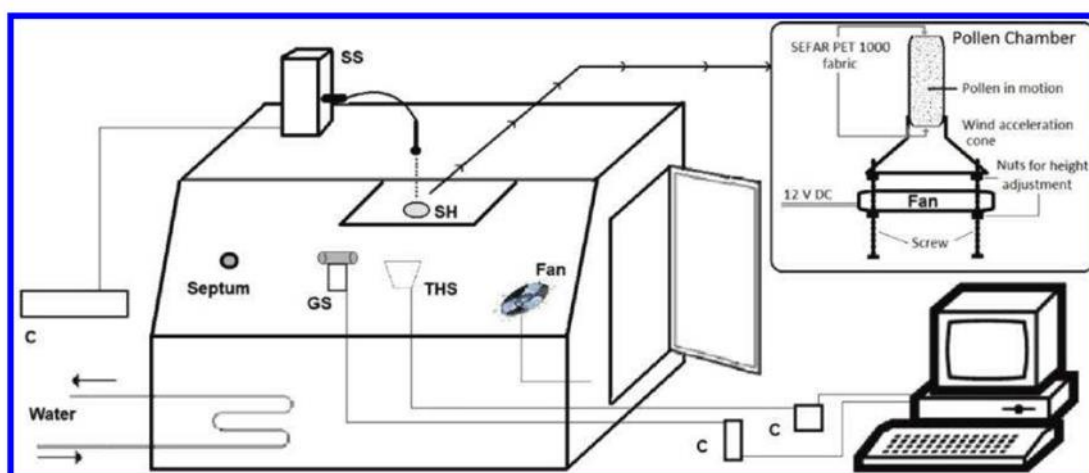


Figura 2 : Representação esquemática da câmara ambiental utilizada na exposição do pólen (*Olea europaea* e *Actinidia deliciosa*) a O₃ e CO₂ e as unidades de controlo; GS - sensor de gás; SH – suporte de amostra; SS - sensor solar; THS – sensor de humidade e temperatura (Sousa et al., 2012).

As amostras de pólen (0,075g) foram colocadas em tubo *Falcon* com a base cortada e uma malha de 23 micrómetros de abertura para permitir a circulação do ar e a re-suspensão do pólen. Os tubos foram expostos a CO₂ e O₃ em duas concentrações diferentes, sendo para o CO₂ aproximadamente 800 e 1500 ppm, e no caso de O₃ aproximadamente 0.06 ppm (o valor limite legal para a proteção da saúde humana de acordo com a Directiva 2008/50/EC, qualidade do ar, do parlamento europeu) e o dobro deste valor, 0.12 ppm, durante intervalos de 6 horas, que correspondem ao período de tempo em que existe maior exposição da luz solar bem como maior concentração de poluentes nas mais elevadas horas de trânsito numa cidade.

O O₃ foi produzido, usando um gerador de ozono (A2ZS-1GLAB) tendo em atenção a média de concentração pretendida nas 6 horas, ajustando a quantidade de O₃.

O CO₂ foi produzido colocando um recipiente dentro da câmara de exposição contendo uma mistura de HCl 20% e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) resultando na libertação de CO₂ para o interior da câmara.

As concentrações dos gases medidos no ensaio foram monitorizadas com um sensor AEROQUAL Series 500, registando os dados a cada minuto tendo em atenção a média pretendida ser usada na avaliação. As amostras controlo – branco foram sujeitas ao mesmo processo, mas sem a fumigação dos gases.

Registaram-se os valores médios e o desvio padrão das diferentes temperaturas, humidade relativa e concentração dos gases utilizados na fumigação (tabela 1).

Tabela 1 – Média e desvio padrão da concentração de CO₂ e O₃, temperatura e humidade relativa registadas durante as 6 horas de fumigação. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) com o branco como controlo.

Poluente		Concentração (ppm)	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)
<i>O. europaea</i>				
	Branco	-	23 ± 1	55 ± 3
CO ₂	N1	891±134	22 ± 1	51 ± 3
	N2	1523±100	22 ± 2	48 ± 1
O ₃	N1	0,06±0,04	22 ± 1	57 ± 2
	N2	0,12±0,04	21 ± 2	52 ± 2
<i>A. deliciosa</i>				
	Branco	-	18 ± 1	63 ± 1
CO ₂	N1	938± 26	25 ± 1	46 ± 2
	N2	1485±161	18 ± 1	56 ± 1
O ₃	N1	0,06± ,002	20 ± 3	62 ± 1
	N2	0,12± ,04	23 ± 1	61 ± 2

3.2. Exposição do pólen à temperatura

Paralelamente às experiências da fumigação *in vitro* do grão de pólen, também se observou o efeito do aumento da temperatura no pólen de *Actinidia deliciosa*, a 25°C, 30°C, 35°C e 38°C na estufa (Binder) durante 6 horas. Os resultados foram comparados com a situação controlo, correspondente a pólen não colocado na estufa.

Registaram-se os valores médios e o desvio padrão das diferentes temperaturas e humidade relativa a que o pólen esteve exposto (tabela 2).

Tabela 2 - Média e desvio padrão da temperatura e humidade relativa registadas durante a exposição do pólen na estufa a diferentes níveis de temperatura.

Condições	Temperatura Média (°C)	Humidade relativa (%)
25°C	24,9 ± 0,2	71,4 ± 11
30°C	29,6 ± 1,3	47,1 ± 33,6
35°C	35,1 ± 0,2	57 ± 27,8
38°C	37,9 ± 0,5	65 ± 12,9

3.3. Fertilidade polínica

3.3.1. Viabilidade do pólen

Para testar a viabilidade do pólen de *Actinidia deliciosa* e *Olea europaea* foi utilizado o corante azul de tripiano. Este corante foi selecionado pois é um corante negativo, marcando exclusivamente as células mortas. Para a realização da observação da viabilidade do pólen começou-se por retirar 0,2 mg de cada amostra de pólen para um eppendorf, e adicionar 500µl de azul tripiano, agitar e esperar 5 minutos. Após este tempo, os eppendorfs foram centrifugados durante 1 minuto, eliminado o sobrenadante e adicionou-se 500µl de PBS, para diluir a amostra. Repetiu-se este processo 2 vezes. No fim, foi retirado 20 µl de cada solução para uma lâmina. Com recurso a um microscópio em ampliação de 40x foram quantificados os grãos de pólen, separando os que apresentavam o núcleo azul, pois estes são considerados não viáveis. Contaram-se 100 grãos de pólen em 5 campos distintos do microscópio por cada amostra.

3.3.2. Germinação do pólen

Na avaliação da percentagem de germinação do pólen *Actinidia deliciosa* foi utilizado um meio de germinação líquido contendo 0,29 M de sacarose, 0,4 mM de ácido bórico e 1 mM de nitrato de cálcio. Transferiu-se 2,5 mL de meio de germinação para gobelés de vidro, adicionando-se a amostra de pólen, e colocou-se em estufa na obscuridade, durante 6 horas a 27°C com agitação. No final, foram retirados 20 µL de meio para uma lâmina de vidro e com recurso a um microscópio ótico, a uma ampliação de 40x, quantificaram-se os grãos de pólen, separando os germinados dos não germinados.

Para o pólen de *Olea europaea* foi utilizado um meio de germinação sólido contendo 100 ppm de ácido bórico, 60 ppm de tetraciclina, 10% de sacarose e 0,5% de agar. Nas caixas de petri com o meio já solidificado, o pólen foi disperso de modo a obter uma distribuição homogénea dos grãos, sem sobreposição. Colocaram-se as amostras em estufa na obscuridade, durante 24 e 48 horas a 27°C. No final, as placas individuais foram observadas ao microscópio ótico, a uma ampliação de 20x, quantificaram-se os grãos de pólen, separando os germinados dos não germinados.

Para ambas as espécies, contaram-se 100 grãos de pólen em 5 campos distintos do microscópio por cada amostra. O pólen é considerado germinado quando apresentam tubos polínicos com um tamanho superior à dimensão do pólen.

3.4. Quantificação de proteínas solúveis

Após fumigação e para cada ensaio, foram introduzidos para tubos de 2 mL, 0,025 g de pólen, 0,030 g de esferas de zircónia (0,1 mm) e 500 µL de tampão de extração PBS. O homogeneizado resultante sofreu maceração, recorrendo a um bead beater, por 2 ciclos de 20+10 segundos a 5000 rpm, com intervalos de pausa de 15 segundos cada. Posteriormente os tubos foram colocados a 4°C em agitação num agitador orbital durante 3 h. Finalizada a extração, procedeu-se a uma centrifugação a 45000 rpm, por um período de 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram seguidamente transferidos para tubos de eppendorf e sujeitos a nova centrifugação, em condições semelhantes. Os novos sobrenadantes resultantes da segunda centrifugação foram recolhidos e filtrados por um filtro de 0,45 µm (um filtro por amostra), e centrifugados.

Seguidamente procedeu-se a quantificação do conteúdo proteico solúvel, recorrendo ao Reagente de Coomassie, pelo método de Bradford (1976) que se baseia na adsorção do corante Coomassie à proteína. Realizou-se um teste 33:990 µL (amostra para corante), em tubos de Eppendorf, de modo a definir as diluições a utilizar em cada amostra. De acordo com as diluições escolhidas, pipetaram-se, para 3 Eppendorf por amostra, Coomassie Brilliant Blue G-250 e amostra na proporção 33:990 µL. Seguidamente, prepararam-se 2 Eppendorf correspondente à amostra de branco, neste caso contendo tampão de extração - PBS e Coomassie na mesma proporção referida anteriormente.

Por fim, recorrendo a cuvetes de 1 mL, calibrou-se o espectrofotómetro com ddH₂O e registou-se as absorvâncias obtidas dos brancos e das amostras a 595 nm. Com os valores obtidos, calculou-se os valores médios das absorvâncias e calculou-se a concentração em µg de proteína/mL para cada amostra.

3.5. Perfil proteico polínico por SDS-PAGE

Para uma melhor análise das proteínas solúveis totais do pólen realizamos eletroforese em gel de SDS-PAGE para cada amostra de pólen fumigada, exposta a diferentes temperaturas e controlo para estudo.

Como descrito por Laemmli (1970) primeiramente, realizou-se a preparação do sistema de suporte de géis e preparação do gel separador e gel concentrador. Introduziu-se, cuidadosamente, a solução do gel separador entre os dois vidros, adicionando-se de seguida água sobre o mesmo, de modo a reduzir o contacto do gel com O₂ uma vez que este pode inibir a polimerização – processo que na ausência de O₂ demora cerca de 20 minutos. Após o período de tempo, a água foi retirada, e colocou-se entre os vidros um suporte de pentes permitindo a criação de poços das amostras. Pipetou-se, rapidamente, o gel concentrador, que contrariamente ao anterior polimeriza na presença de O₂.

No dia seguinte, depois de colocar a película com desenho dos poços, retirou-se os pentes e encheu-se os lados externos e internos do suporte de eletroforese com tampão de eletroforese. Seguidamente, pipetou-se o marcador, o controlo e as amostras - 10 µg por poço. As amostras utilizadas foram previamente desnaturadas, por aquecimento a 100°C e adição do agente redutor mercaptoetanol, por um período de 5 minutos, seguindo-se uma centrifugação de 13000 rpm, por um período de 2 minutos e meio.

O processo de corrida do gel iniciou-se ligando a fonte de corrente. Terminada a migração, separou-se, cuidadosamente, os vidros do suporte e retirou-se os géis.

Para revelação dos mesmos, procedeu-se ao mergulho dos géis, em agitação, nas soluções de fixação (30 minutos), coloração (30 minutos) e descoloração (substituída de 20 em 20 minutos), incubado à temperatura ambiente, na obscuridade. Após descoloração total observou-se as bandas originadas, identificando o peso molecular de cada banda proteica correspondente a cada local com recurso ao programa "Image Lab" da BioRad, com os dados obtidos organizados no Excel.

3.6. Análise da morfologia polínica

Para o estudo da morfologia polínica, foram fotografados cerca de 100 grãos de pólen de cada amostra utilizando um microscópio com câmara fotográfica fixa (Leica ICC50 HD) a uma ampliação de 40X. As fotos foram adquiridas utilizando o software "Leica LAS EZ" e depois o processamento da imagem foi efetuado recorrendo à utilização do "Image J", um software open source para edição, análise e obtenção de dados a partir de fotografias.

No Image J, cada imagem foi processada para o formato tiff de modo a apresentar apenas os pixéis que ultrapassem o limiar de deteção dos grãos de pólen de que queremos medir. A partir desta imagem transformada, foi possível determinar automaticamente a área, perímetro, valores mínimos e máximos dos diâmetros de cada grão de pólen analisado, bem como o diâmetro de Feret (a média da maior distância entre dois pontos ao longo do limite de seleção na perpendicular).

Os resultados obtidos foram organizados no Excel, e registou-se a média dos valores previamente referidos de todos os grãos de pólen medidos.

3.6. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com recurso ao programa estatístico IBM SPSS statistics v. 27 e Microsoft Excel. Os dados recolhidos foram registados e geridos no Microsoft Excel, calcularam-se os valores médios e desvio-padrão e realizou-se uma análise de variâncias (ANOVA) para um nível de significância de 5% para determinar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de viabilidade e germinação do pólen, conteúdo de proteínas solúveis totais, sob diferentes exposições aos poluentes atmosféricos e temperaturas. Se o valor de p obtido for inferior a 0,05 rejeita-se a hipótese nula seguido de um teste de pos-hoc de Duncan para verificar os grupos homogéneos existentes de acordo com as diferenças médias dos valores registados nos diferentes ensaios.

4. Resultados e discussão

4.1. Exposição do pólen a gases atmosféricos

Devido ao aumento da poluição atmosférica nas últimas décadas (Heede et al., 2014) são vários os estudos que avaliam a interação entre os poluentes atmosféricos e o pólen. A exposição das plantas aos poluentes como o O₃ e CO₂, causam efeitos adversos a longo prazo nos grãos de pólen (Cresti & Linskens 2000).

Assim, realizou-se uma avaliação de alguns parâmetros do pólen para estudar o impacto dos poluentes. Entre as diversas propriedades do pólen avaliadas para quantificar este impacto, avaliou-se a fertilidade (viabilidade e germinação dos grãos de pólen), a composição bioquímica e a morfologia que são os parâmetros usualmente usados.

4.1.1. Viabilidade polínica

Viabilidade significa capacidade de viver e, neste caso, a viabilidade do pólen refere-se à capacidade do pólen de efetuar a fertilização, dando continuidade ao ciclo de vida.

A análise da viabilidade polínica foi efetuada recorrendo a um método de coloração negativa pelo azul de tripano. É baseado no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intatas e certos corantes, como azul de tripano, eosina ou propídio, não conseguem penetrar na membrana e entrar no citoplasma. Numa célula morta, o azul de tripano atravessa a membrana celular porosa e entra no citoplasma, atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos, que ficam corados de azul. Na análise de microscopia de luz, apenas as células mortas têm uma cor azul sendo consideradas não viáveis (Alexander et al., 1987).

Os valores de viabilidade de várias amostras do pólen de *O. europaea* e *A. deliciosa* fumigado e não fumigado podem ser observados na figura 3 e 4.

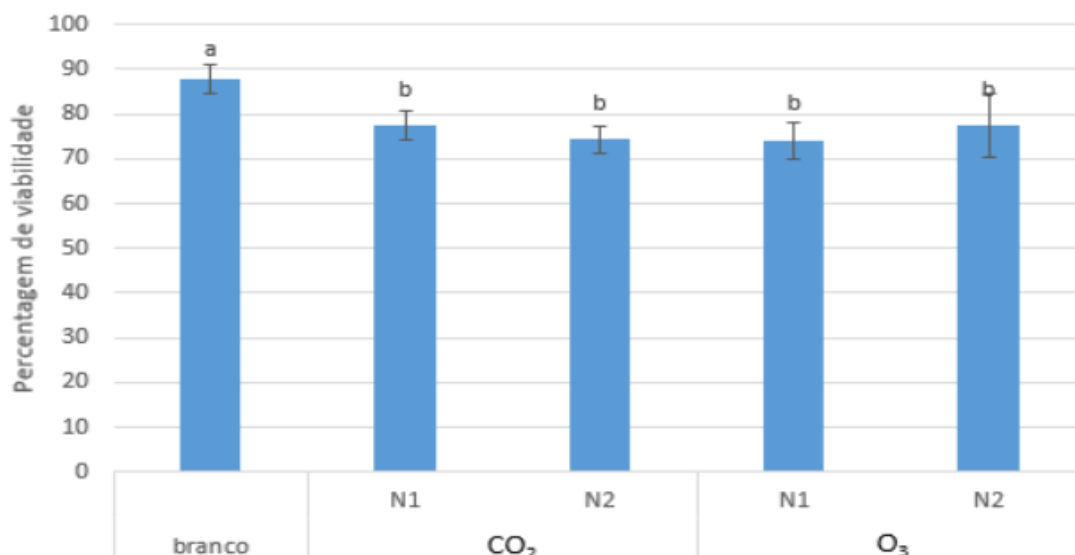


Figura 3 : Viabilidade polínica das amostras de *Olea europaea* fumigadas com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa. Letras diferentes correspondem a valores médios distintos estatisticamente significativos (ANOVA seguida de teste pos-hoc de Duncan p <0,05).

Observa-se na figura 3 que o pólen da *Olea europaea* não submetido à fumigação dos gases CO₂ e O₃ (branco) apresenta 88% de viabilidade, sendo um valor superior às amostras fumigadas estatisticamente significativo. No entanto, os valores médios de viabilidade polínica obtidos para as amostras submetidas a diferentes concentrações de poluentes, não são significativamente distintos. Estes resultados podem indicar que a exposição do pólen da *O. europaea* na atmosfera a concentrações superiores aos limites atuais de poluentes tem um impacto negativo na fertilidade polínica.

Outros autores também verificaram esta tendência como Pasqualini et al. (2011) para o pólen de *Ambrosia psilostachya* que foi exposto a ozono ou Leghari et al. (2018) com a exposição de grãos de pólen de *Prunus avium* a poluição de gases de escape junto a uma estrada, usando outra amostra longe do local de estudo poluído como controlo. A diminuição de viabilidade é um efeito comum em pólen exposto a poluentes atmosféricos independentemente da espécie, concentração do gás e condições de exposição.

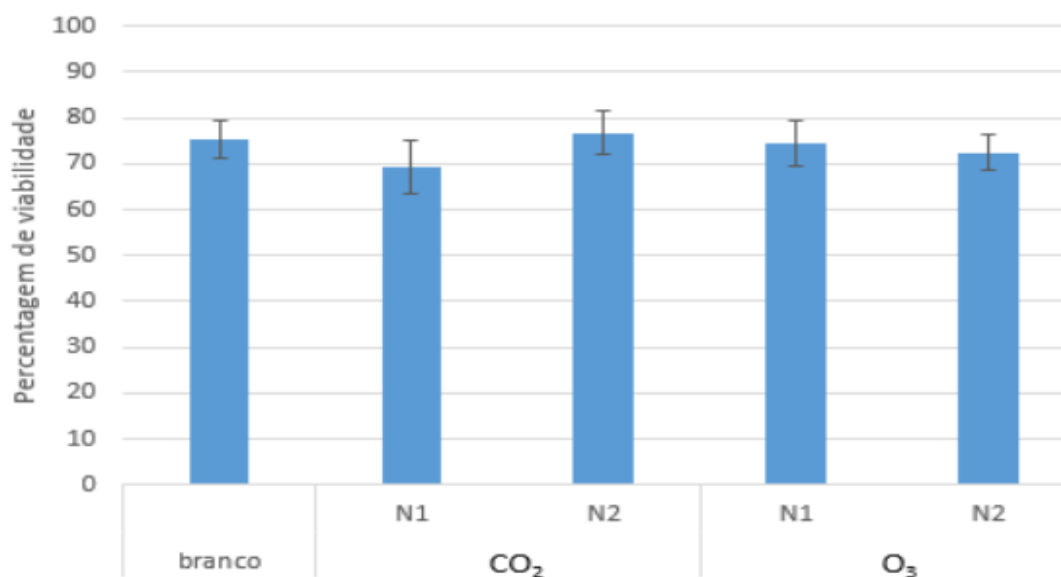


Figura 4 : Viabilidade polínica das amostras de *Actinidia deliciosa* fumigadas com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa.

Relativamente à viabilidade polínica da *Actinidia deliciosa*, a viabilidade polínica variou entre 77%, correspondente à amostra fumigada com CO₂ na concentração mais elevada (N2) e a amostra de controlo. No entanto, para esta espécie, as diferenças observadas entre amostras fumigadas e a não fumigadas não são estatisticamente significativas.

Comparando os resultados obtidos com o pólen das duas espécies, verificamos que o pólen de *Actinidia* apresenta maior tolerância aos poluentes atmosféricos ensaiados. Outros autores, também observaram diferenças a nível de tolerância aos poluentes atmosféricos NO₂ e O₃ entre pólen de distintas espécies arbóreas (Pereira et al., 2021).

4.1.2. Germinação

Com o intuito de estudar a fertilidade polínica além da viabilidade do pólen foi também avaliada a capacidade de germinação *in vitro*. Para isso foram utilizados meios de germinação contendo vários nutrientes essenciais de modo a simular as condições existentes *in vivo* no estigma. Foi utilizado boro (ácido bórico) e cálcio (nitrato de cálcio) para promover o crescimento do tubo polínico, açúcar (sacarose) como fonte de energia para o desenvolvimento da germinação do pólen e para o equilíbrio osmótico pólen-solução de germinação (Stanley & Linskens, 1974).

O boro forma um complexo ionizável açúcar-borato, potenciando a capacidade de germinação e o comprimento do tubo polínico (Thompson & Batjer, 1950). O cálcio adicionado proporciona uma menor permeabilidade e confere uma aparência mais rígida ao tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974).

Pode ainda ser adicionado ao meio de germinação um antibiótico (tetraciclina) para evitar o crescimento de microorganismos.

Na figura 5 estão representados os valores de germinação de várias amostras do pólen de *O. europaea* e *A. deliciosa* fumigado e não fumigado (branco) com CO₂ e O₃.

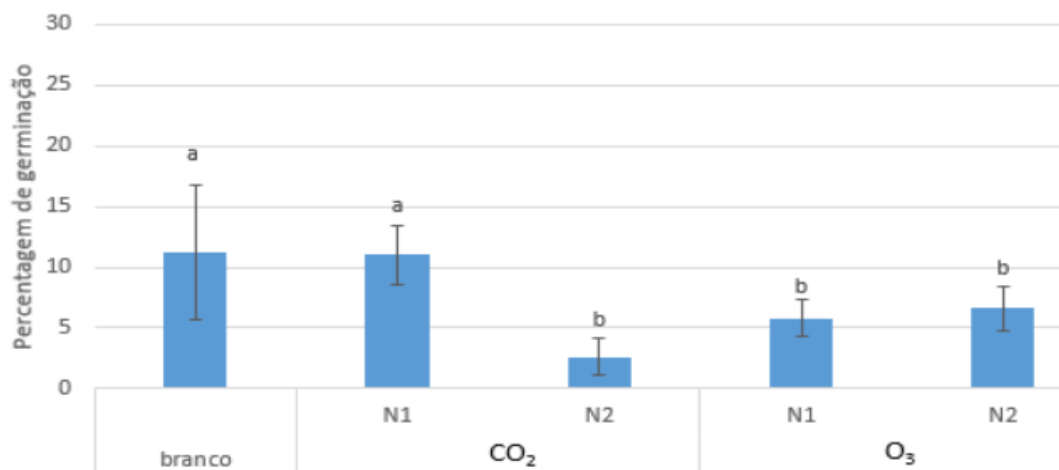


Figura 5 : Germinação *in vitro* de pólen de *Olea europaea* fumigado com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa. Letras diferentes correspondem a valores médios distintos estatisticamente significativos (ANOVA seguida de teste pos-hoc de Duncan p <0,05).

Como se pode observar na figura 5 a percentagem de germinação do pólen de *Olea europaea* sofreu uma redução significativa nas amostras submetidas a CO₂ na maior concentração (N2) e a O₃ em ambas as concentrações. Apesar de a percentagem de germinação na amostra fumigada com CO₂ na maior concentração ser a menor, não é significativamente diferente dos valores obtidos após fumigação com o O₃.

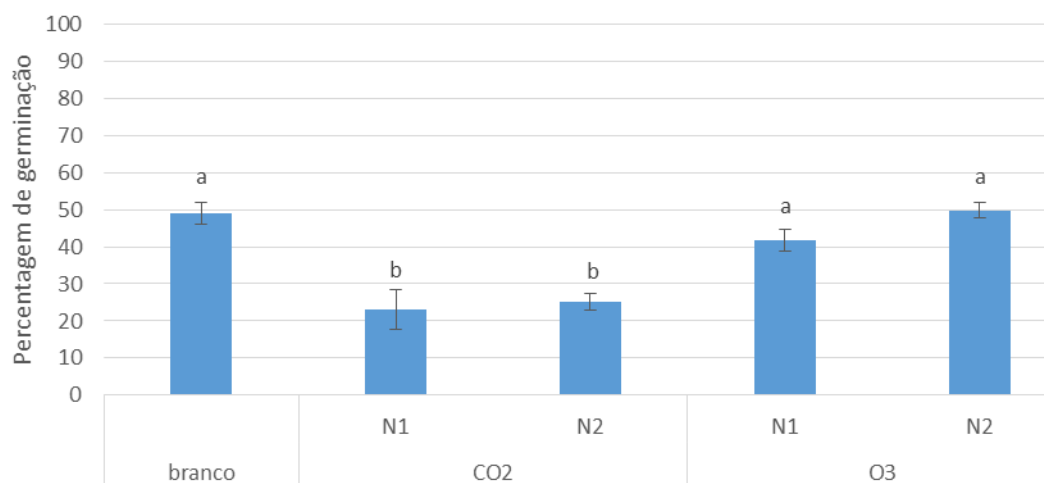


Figura 6 : Germinação in vitro de pólen de *Actinidia deliciosa* fumigado com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa. Letras diferentes correspondem a valores médios distintos estatisticamente significativos (ANOVA seguida de teste pos-hoc de Duncan p <0,05).

O pólen da *Actinidia deliciosa* (figura 6) respondeu melhor ao meio de germinação comparativamente com o pólen de *Olea europaea*, apresentando percentagem de germinação mais elevada.

Quando comparamos os valores de germinação entre o branco e o pólen fumigado de *A. deliciosa*, verificamos que apenas as amostras fumigadas com CO₂ apresentaram uma redução estatisticamente significativa. Com esta espécie observou-se uma maior tolerância ao O₃, o que não foi observado para a *O. europaea*.

No entanto não podemos deixar de referir que no caso da fertilidade do pólen também teremos de ter em atenção que as pequenas diferenças entre condições de exposição observadas na temperatura e humidade relativa podem influenciar.

4.1.3. Quantificação de proteínas solúveis

Análises anteriores da estrutura química do pólen mostraram que a concentração de proteína por massa no pólen pode variar entre 2,5% a 61% (Buchmann 1986). Esta ampla variação de concentração pode influenciar as interações pólen-animal uma vez que o pólen fornece a maior parte do azoto de muitos insetos como abelhas, coleópteros e ácaros (Roulston et al. 2000). Pode também influenciar o potencial alergénico do pólen. Assim, e face ao aumento da poluição atmosférica é importante avaliar a sua influência no conteúdo proteico do pólen de duas espécies com interesse na alimentação animal e alergenicidade, no caso da *Olea europaea*.

Na figura 7 e 8 estão representados os valores de concentração de proteínas solúveis totais presentes no pólen de *O. europaea* e *A. deliciosa* das amostras fumigadas com CO₂ e O₃ e não fumigada (branco).

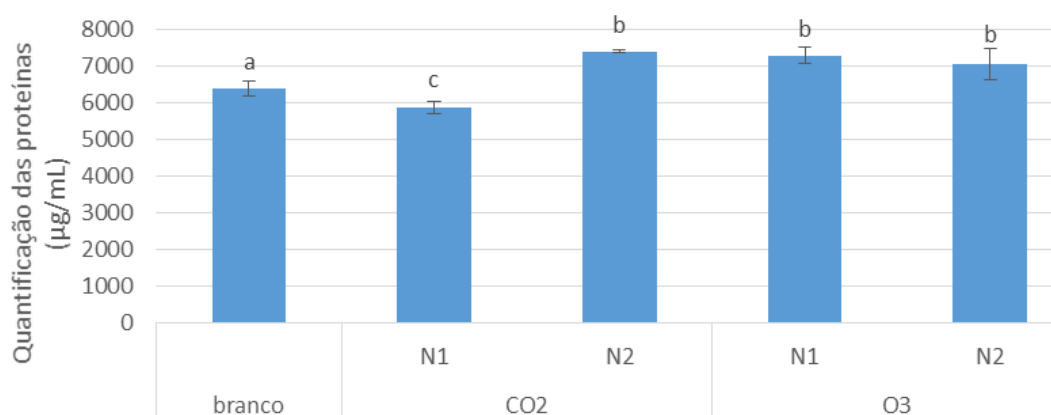


Figura 7 : Níveis de concentração de proteínas solúveis do pólen de *Olea europaea* fumigado com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa. Letras diferentes correspondem a valores médios distintos estatisticamente significativos (ANOVA seguida de teste pos-hoc de Duncan p <0,05).

No caso do pólen da *Olea europaea*, verifica-se que o valor médio superior de proteínas pertence ao pólen que foi fumigado com a concentração N2 de CO₂ com um valor registado de 7393 µg/mL de proteínas solúveis totais, 1000 µg/mL superior à amostra de polen branco que registou 6393 µg/mL. No caso do O₃ registou-se um valor médio superior com a concentração N1 (7282 µg/mL), limite legal, comparada com a concentração N2 (7052 µg/mL), mas não são estatisticamente diferentes.

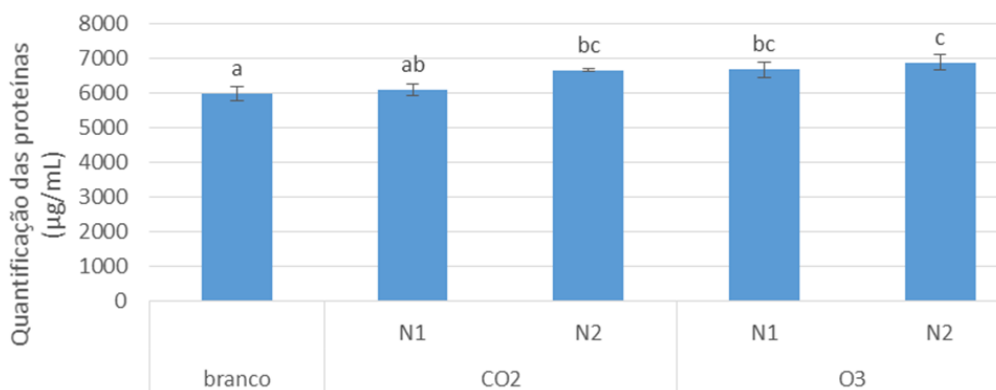


Figura 8 : Níveis de concentração de proteínas solúveis do pólen de *Actinidia deliciosa* fumigado com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa. Letras diferentes correspondem a valores médios distintos estatisticamente significativos (ANOVA seguida de teste pos-hoc de Duncan p <0,05).

A análise dos resultados obtidos para *A. deliciosa*, é algo consistente com o esperado, em que a amostra do branco apresenta o menor valor de proteína solúvel total comparado com os resultados do pólen fumigado. O aumento foi mais pronunciado no caso das amostras fumigadas com O₃, que apresentam valores de concentração das proteínas de 6673 µg/mL (N1) e 6879 µg/mL (N2). Isto pode ser explicado pelo facto do O₃ ser um gás com maior toxicidade para as plantas comparado com o CO₂ (Ainsworth et al., 2012).

Observou-se uma tendência para o aumento da concentração média de proteína solúvel no pólen após fumigação com os gases poluentes. Muitas moléculas proteicas são proteínas enzimáticas de stress, e a exposição aos poluentes geram situações de stress que podem levar ao aumento da sua concentração (Roulston et al., 2000, Sousa et al., 2012). No entanto, vários estudos têm observado uma tendência contrária como no caso de uma investigação efetuada com o pólen de *Cupressus arizonica* na região de Toledo em Espanha, numa área de elevada poluição devido ao elevado tráfego. Foi

observado que a quantidade de proteínas do pólen era menor comparada com o valor obtido para pólen com origem em áreas de pouca poluição (Cortegano et al., 2004).

Resultados semelhantes também foram observados em relação ao efeito do CO e SO₂ nas proteínas do pólen de *Lagerstroemia indica* do centro de Teerão (Irão) que também demonstraram uma diminuição de proteínas solúveis totais comparado com o pólen recolhido no jardim botânico nacional (Rezanejad et al., 2003).

4.1.4. Perfil proteico polínico por SDS-PAGE

A eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida ou SDS-PAGE, é uma técnica usada para separar proteínas e outras substâncias, como ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas, outros compostos orgânicos e até iões inorgânicos. Este sistema eletroforético separa as proteínas com base nas diferenças no seu peso molecular (Laemmli, 1970). O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfatante aniónico, que consegue quebrar as ligações de hidrogénio e hidrofóbicas das proteínas na presença de agentes redutores e combina-se com moléculas de proteína de uma determinada proporção para formar compostos curtos da mesma densidade. O gel de poliacrilamida é um gel poroso cujo tamanho do poro é semelhante ao tamanho das moléculas das proteínas, o que melhora a sua retenção. Outras características do gel que o tornam ideal para este método são uma boa estabilidade química, forte repetibilidade, estabilidade a mudanças de pH e temperatura e fácil observação de cores.

Neste estudo, efetuou-se o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (PAGE) dos extratos proteicos de *O. europaea* e *A. deliciosa*, permitindo a separação das proteínas em várias bandas de acordo com a diferente mobilidade devido às diferentes cargas e pesos moleculares das moléculas. Foram obtidas várias bandas polipeptídicas, após a coloração coomasie do gel, entre os 88 e 14 kDa (figura 9).

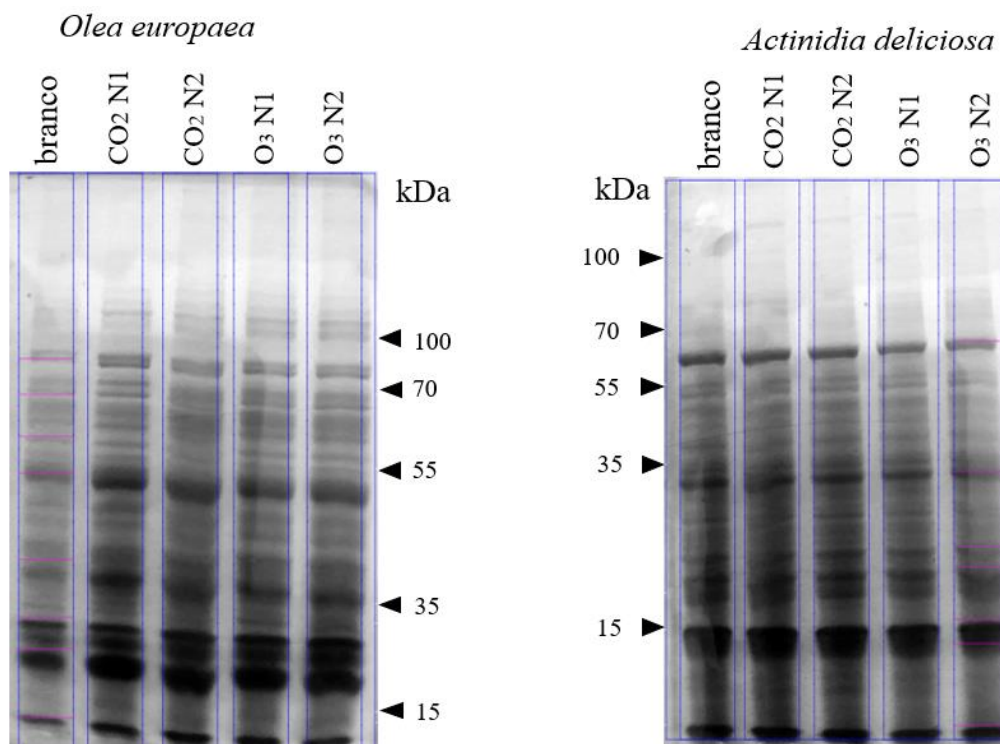


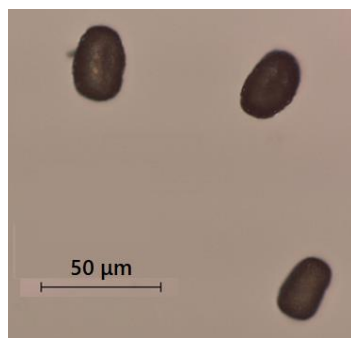
Figura 9 : Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das proteínas do pólen de *Olea europaea* e *Actinidia deliciosa* fumigados com CO₂ e O₃. O branco representa o pólen que não foi exposto a nenhum gás, as concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm).

SDS-PAGE das proteínas do pólen de *O. europaea* (figura 9), apresenta a banda do branco com uma coloração menos acentuada comparada com as bandas das amostras do pólen fumigado, embora para a *Actinidia deliciosa* a coloração seja mais homogénea entre as bandas das diferentes amostras. Apesar disso, observaram-se várias bandas, variando entre 100 e 14 kDa, presentes em todos os perfis, mostrando que a exposição do pólen aos contaminantes do ar não modificou significativamente as propriedades químicas dos extratos de pólen, ou seja, a solubilidade em água e o peso molecular das proteínas solúveis.

Estudos prévios com o pólen de *Acer negundo* (Sousa et al., 2012) e *Ostrya carpinifolia* (Cuinica et al., 2014) apresentaram um resultado semelhante do modo em que não há diferença nos perfis polipeptídicos entre as amostras de pólen expostas e não expostas a poluentes.

4.1.5. Morfologia polínica

A avaliação da morfologia polínica, particularmente características relacionadas com o tamanho do pólen podem ser realizadas unidimensionalmente ou bidimensionalmente, usando imagens ao microscópio ótico (Storme et al., 2013). No nosso estudo procedeu-se à observação do pólen ao microscópio ótico e respetiva medição da área, perímetro, eixo maior e menor e diâmetro de feret dos grãos de modo a verificar se a exposição a CO₂ ou O₃ podem induzir alterações.



Olea europaea



Actinidia deliciosa

Figura 10 : Grãos de pólen de *Olea europaea* e *Actinidia deliciosa* observados ao microscópio ótico.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão da área do pólen, perímetro, valores maiores e menores dos eixos e diâmetro de feret dos grãos de pólen de *Olea europaea* e *Actinidia deliciosa* fumigado com CO₂ e O₃. As concentrações N1 e N2 do CO₂ de 800 ppm e 1500 ppm respetivamente e as concentrações N1 e N2 de O₃ que correspondem ao limite legal (0,06 ppm de acordo com a Diretiva 2008/50/CE) e o dobro do limite legal (0,12 ppm) para a proteção da saúde humana na Europa. As letras diferentes correspondem a valores médios distintos estatisticamente significativos (ANOVA seguida de teste pos-hoc de Duncan p < 0,05).

Poluente		Área (μm ²)	Perímetro (μm)	Diâmetro (μm)		Feret (μm)
				Maior	Menor	
<i>O. europaea</i>						
	Branco	360 ± 48	75 ± 5	26 ± 2	18 ± 1	26 ± 2
CO ₂	N1	367 ± 69	75 ± 7	26 ± 2	18 ± 2	26 ± 3
	N2	381 ± 54	76 ± 4	27 ± 2	18 ± 1	26 ± 1
O ₃	N1	345 ± 60	73 ± 6	25 ± 3	17 ± 1	25 ± 2
	N2	370 ± 57	75 ± 7	26 ± 2	18 ± 2	26 ± 2
<i>A. deliciosa</i>						
	Branco	390 ± 57	82 ± 6	31 ± 3	16 ± 2	31 ± 4
CO ₂	N1	392 ± 62	83 ± 6	31 ± 3	16 ± 3	31 ± 2
	N2	390 ± 67	82 ± 6	31 ± 3	16 ± 2	31 ± 4
O ₃	N1	376 ± 46	80 ± 6	29 ± 3	17 ± 2	29 ± 3
	N2	378 ± 45	82 ± 6	31 ± 2	16 ± 2	31 ± 2

Como se pode observar na tabela 3, os resultados da análise dos grãos de pólen da *Olea europaea* não apresentam grandes variações nos diversos parâmetros estudados, exceto para o pólen fumigado com O₃ de concentração N1 (0,06 ppm, o equivalente ao limite legal) com uma média de área de 345 μm^2 e o perímetro apresentando pelo menos um grupo estatisticamente significativo de acordo com o teste pos-hoc de duncan (valor $p < 0,05$).

Relativamente ao pólen de *Actinidea deliciosa*, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de morfologia polínica analisados nas diferentes amostras.

4.2. Exposição do pólen a diferentes temperaturas

Com o objetivo de avaliar a possível influência das alterações climáticas, particularmente o aumento de temperatura ambiental, no pólen, tentou-se delinear um procedimento experimental de exposição a este parâmetro. Entre as diversas propriedades do pólen avaliadas para quantificar este impacto, a fertilidade, composição bioquímica e morfologia foram estudadas.

Para tal, escolheu-se como espécie modelo a testar no protocolo a *Actinidea deliciosa*. Durante a otimização do protocolo experimental encontraram-se algumas dificuldades em manter as mesmas condições de humidade relativa do ar entre os diferentes ensaios de exposição à temperatura. Este constrangimento poderá ter influenciado os resultados obtidos uma vez que alguns são difíceis de discutir sob o ponto de vista biológico e ambiental.

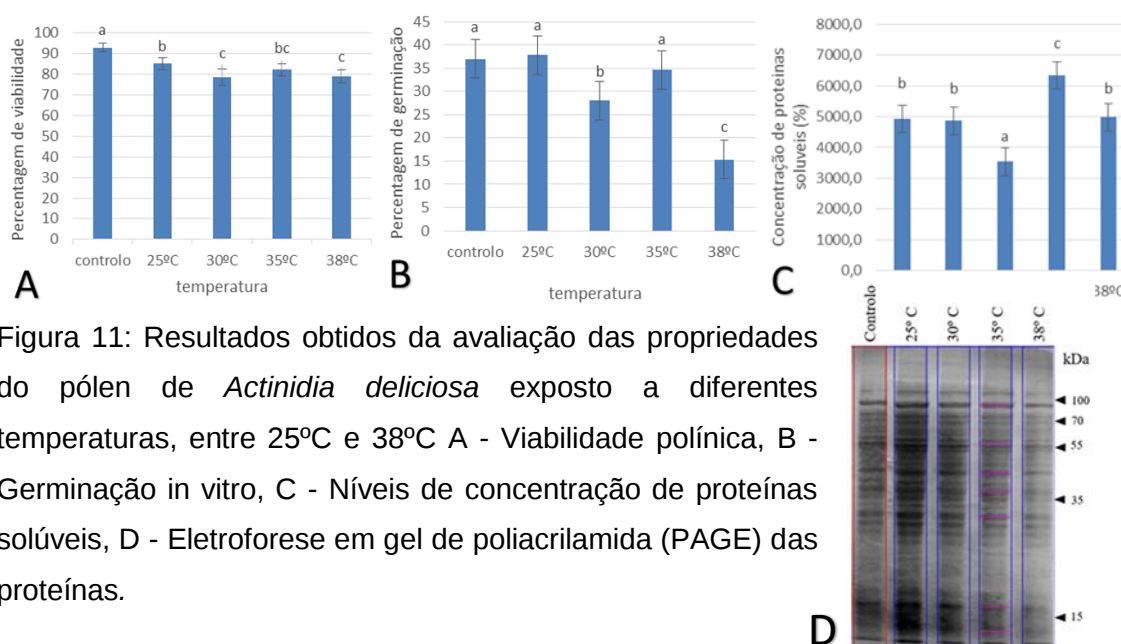


Figura 11: Resultados obtidos da avaliação das propriedades do pólen de *Actinidia deliciosa* exposto a diferentes temperaturas, entre 25°C e 38°C A - Viabilidade polínica, B - Germinação in vitro, C - Níveis de concentração de proteínas solúveis, D - Eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) das proteínas.

Da análise dos ensaios de viabilidade e germinação polínica observou-se uma tendência para a sua diminuição estatisticamente significativa em relação à amostra controlo.

Relativamente à concentração de proteínas solúveis totais, verificou-se um aumento da concentração após exposição às diferentes temperaturas, embora só seja estatisticamente significativo no ensaio a 35°C. O valor das proteínas solúveis totais da amostra do pólen exposta a 30°C é baixo comparativamente às outras amostras da experiência possivelmente devido às variações acentuadas da temperatura nas 6 horas de exposição.

Os extratos de proteínas de pólen submetidas a diferentes temperaturas, apresentam perfis eletroforéticos semelhantes com bandas que variam de 100 a 15 kDa. No entanto, como se pode observar na figura o perfil eletroforético das proteínas do pólen de *A. deliciosa* que foi exposto a 38°C, apresenta as bandas com coloração menos acentuada comparada com as bandas presentes nas outras amostras. Parece existir uma relação inversa com o aumento da temperatura pois a amostra submetida a 25°C apresenta a coloração mais acentuada, diminuindo à medida que aumenta a temperatura. Uma possível explicação para estes resultados é o facto de as proteínas sofrerem desnaturação quando sujeitas a temperaturas elevadas (Tilton, et al., 1992)

Paralelamente, estudou-se a morfologia dos grãos de pólen da *Actinidia deliciosa* submetidos a diferentes temperaturas (tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos valores da área, perímetro, valores maiores e menores dos eixos e diâmetro de feret dos grãos de pólen de *Actinidia deliciosa*.

Temperatura	Área (µm²)	Perímetro (µm)	Diâmetro (µm)		Feret (µm)
			Maior	Menor	
<i>A. deliciosa</i>					
Controlo	382 ± 42	85 ± 14	32 ± 3	15 ± 1	31 ± 2
25° C	385 ± 38	86 ± 12	32 ± 3	16 ± 1	31 ± 2
30° C	391 ± 39	87 ± 15	32 ± 2	16 ± 1	32 ± 2
35° C	369 ± 50	82 ± 9	31 ± 3	15 ± 1	31 ± 2
38° C	388 ± 36	83 ± 9	31 ± 2	16 ± 1	31 ± 2

Como se pode ver pela tabela não existe grande variação na morfologia do pólen submetido a diferentes temperaturas, apenas uma diminuição da média da área do pólen exposto a 35°C relativamente ao pólen da amostra controlo (branco).

Pela análise de variâncias (valor $p < 0,05$) verificamos que não existem diferenças significativas entre as amostras de pólen e assim podemos concluir que as diferentes temperaturas não provocaram alterações na sua morfologia.

5. Conclusão

O pólen de *Olea europaea* e *Actinidia deliciosa* quando expostos aos poluentes atmosféricos (CO₂ e O₃) a níveis elevados apresentaram alterações na fertilidade, com um impacto negativo no potencial de germinação do pólen de ambas as plantas. Relativamente ao teor de proteínas solúveis totais verificou-se uma tendência para o aumento da sua concentração nas amostras fumigadas. Este facto pode ser resultado da indução de stress abiótico nos grãos de pólen pela exposição aos poluentes, mostrando que a presença desses gases mesmo em concentração igual aos limites legislados pode ter impacte na bioquímica das proteínas. No entanto, não se observaram diferenças nos perfis electroforéticos de todas as amostras de ambas espécies. Não se observou um efeito estatisticamente significativo na morfologia do pólen.

Relativamente aos ensaios de exposição do pólen de *Actinidia deliciosa* a temperaturas diferentes (25°C, 30°C, 35°C e 38°C), observou-se uma tendência de diminuição do potencial de germinação. Também foi observado um aumento no teor de proteínas solúveis totais nas amostras de pólen, com a exceção do pólen exposto a 30°C. Novamente, não se observou um efeito estatisticamente significativo na morfologia do pólen. Dado que tivemos dificuldade em conseguir manter as mesmas condições de humidade relativa do ar entre os diferentes ensaios de exposição à temperatura, os resultados obtidos poderão estar enviesados. Assim, recomenda-se a repetição destes ensaios, apenas com o parâmetro temperatura a variar, para confirmar as tendências observadas.

Referências bibliográficas

- Ainsworth, E., Yendrek, C., Sitch, S., Collins, W., Emberson, L., (2012). The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 637-61.
- Akihama, T., Omura, M., Kozaki, I., (1978). Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen. *Brazilian Journal of Botany*, 34 (4) 1-7.
- Akimoto, H., (2003). Global air quality and pollution, *Science*, 302 (5651), 1716–1719.
- Alexander, P. (1969). Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technology* 44, 117-122.
- Alexander, P. (1987). A method for staining pollen tubes in pistil. *Stain Technology* 62, 107–112.
- ANSES, (2014). On the state of knowledge on the health impact associated with exposure of the general population to pollen found in ambient air, French agency for food, environmental and occupational health & safety.
- Barnabás B., Kovacs B., Abranki A., Holgate P., (1988). Effect of pollen storage by drying and deep-freezing on the expression of different agronomic traits in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 39, 221-226.
- Behrendt, H., Becker, W., (2001). Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors, *Current Opinion in Immunology* 13(6), 709-715.
- Behrendt, H., Becker, W., Friedrichs, K., Darsow, U., Tomingas, R., (1992). Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter, *International Archives of Allergy and Immunology*, 99 (2–4), 425-428.
- Behrendt, H., Friedrichs, K., Krämer, U., Hitzfeld, B., Becker, W., Ring, J., (1996). The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases, in *Allergic hypersensitivities induced by chemicals*. American College of Allergy, 87, 173-182.
- Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 7(72), 248-54.
- Britannica, T. (2020,). Carbon dioxide. *Encyclopedia Britannica*.
- Brunekreef, B., Holgate, S. (2002). Air pollution and health. *The Lancet*, 360(9341), 1233–1242.

Buchmann, L. (1986). Vibratile pollination in *Solanum* and *Lycopersicon*: A look at pollen chemistry. *Solanaceae Biology and Systematics*. Columbia University Press, 237–252.
 Título do livro, editores e editora

Cacioppo, O. (1986). “O cultivo do quivi” 1ª edição. Editorial Presença, Lda. Lisboa

Caeiro, E., Camara, I., Luísa, L., Gaspar, A., Todo-Bom, A., Oliveira, J., Trindade, J., Brandão, R., Nunes, C., Morais, M. (2014). Análise das concentrações de pólen de gramíneas na atmosfera de Portugal Continental. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 22(2), 125-138

Cerceau-Larrival, M., Nilsson, S., Cauneau-Pigot, A., (1991). The influence of the environment (natural and experimental) on the composition of the exine of allergenic pollen with respect to the deposition of pollutant mineral particles, *Grana*, 30(2), 532-545.

Chichiriccò, G., Picozzi, P. (2007). Reversible inhibition of the pollen germination and the stigma penetration in *Crocus vernus* ssp. *Vernus* (Iridaceae) following fumigations with NO₂, CO, and O₃ gases. *Plant Biology*, 9 (6) 730–735.

Cícero, A., Amaral, A., Barbosa, N., José, F., Sereno, M., (2011). Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). *Brazilian Journal of Botany*, 34, (4) 493-497.

Clarke, A., Gleeson, P., Harrison, S., Knox, B. (1979). Cell biology pollen-stigma interactions: identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (7), 3358-3362

Colas, F., Mercier, S. (2000). Évaluation et maintien de la viabilité des polens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres.

Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., del Moral, A., López, E., Lombardero, M., del Pozo, V., Lahoz, C. (2004). Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy*. 59 (5), 485-90.

Cresti M., Linskens H., (2000). Pollen-allergy as an ecological phenomenon: A review, *Plant Biosystems*, 134 (3), 341-352.

Cuinica L., Abreu I., da Silva J. (2014). In vitro exposure of *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* pollen to atmospheric levels of CO, O₃ and SO₂. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21 (3), 2256-2262.

- Douwes J., Thorne P., Pearce N., and Heederik D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects, *Annals of Occupational Hygiene*, 47 (3), 187–200.
- EEA, “Air quality in Europe,” EEA Report, European Environment Agency, Copenhagen, Denmark, (2019)
- Eggleton T. (2012). *A Short Introduction to Climate Change*. Cambridge University Press, 52.
- Emberlin, J. (1995). Interaction between air pollutants and aeroallergens, 25 (3), 33-39.
- Feijó J., Malhó R., Obermeyer G. (1995). Ion dynamics and its possible role during in vitro pollen germination and tube growth. *Protoplasma* 187, 155–167.
- Finlayson-Pitts J., and Pitts N. (1986). Atmospheric chemistry. Fundamentals and experimental techniques. *Journal of the American Chemical Society*, 109 (15).
- Heede, R., (2014). Tracing anthropogenic carbon dioxide and methane emissions to fossil fuel and cement producers, *Climatic Change*, 122 (1-2), 229-241.
- Ikeda, N., Takahashi, H., Umetsu, K., Suzuki, T. (1989). The course of respiration and circulation in death by carbon dioxide poisoning. *Forensic Science International*, 41 (1-2), 93-99.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Langematz, U. (2019). Stratospheric ozone: down and up through the anthropocene. *ChemTexts* 5, 2199-3793.
- Langford, N. (2005). Carbon dioxide poisoning. *Toxicological Reviews*, 24 (4), 229-35.
- Leghari, S., Saeed, S., Asrar, M., Ahmed, A., Tariq, I., Marri, A., Sadiq, N., Baloch, A., Latif, A., Shawani, N. (2018). Response of sweet cherry (*Prunus avium* L.) pollen grains to vehicular exhaust pollution at quetta. *Applied Ecology and Environmental Research*, 4387-4399.
- McConnell, R., Berhane, K., Gilliland, F., London, S., Islam, T., Gauderman, J., Avol, E., Margolis, H., Peters, J. (2002). Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. *Lancet*, 359 (9304), 386–391.
- Morton, J. (1987) *Kiwifruit. Fruits of warm Climates*, Creative Resource Systems, 293-300

- Oliveira, M. (2003). Citoquímica e bioquímica do grão de pólen de *actinidia deliciosa*. Tese de mestrado em Recursos Genéticos e Melhoramento de Espécies Agrícolas e Florestas, Universidade e Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Pasqualini, S., Tedeschini, E., Frenguelli, G., Wopfner, N., Ferreira, F., D'Amato, G., & Ederli, L. (2011). Ozone affects pollen viability and NAD(P)H oxidase release from *Ambrosia artemisiifolia* pollen. *Environmental Pollution*, 159 (10), 2823-2830.
- Pio, L., Ramos, D., Pascal, M., Junqueira, k., Santos, F., Rufini, J. (2007). Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 147-153.
- Punt, W., Blackmore, S., Nilsson, S., Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143 (1-2), 1-81.
- Rezanejad, F., Majd, A., Shariatzadeh, S.M., Moein, M.R., Aminzadeh, M.A., Mirzaeian, M. (2003). Effect of air pollution on soluble proteins, structure and cellular material release in pollen of *Lagerstroemia indica* L. [Lythraceae]. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45, 129-132.
- Ribeiro, H. (2008). Previsão da Fenologia e Produtividade da Previsão da Fenologia e Produtividade da *Olea europaea* L. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Rossel, P., Herrero, M., Saúco, G. (1999). Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) in vitro characterization and optimization of in vitro germination. *Scientia Horticulturae* 81, 251-265.
- Roulston, T., Cane, J., and Buchmann, S. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny?. *Ecological monographs*, 70, 617-643.
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., Pham-Thi, N., Poncet, P., Sutra, J., (2015). A Review of the Effects of Major Atmospheric Pollutants on Pollen Grains, Pollen Content, and Allergenicity. *Scientific World Journal*, 940-243.
- Shiraiwa, M., Selzle, K., Yang, H., Sosedova, Y., Ammann, M., Pöschl, U., (2012). Multiphase chemical kinetics of the nitration of aerosolized protein by ozone and nitrogen dioxide. *Environmental Science & Technology*, 46 (12), 6672-80.
- Singer, B., Ziska, L., Frenz, D., Gebhard, D., Straka, J. (2005). Increasing *Amb a 1* content in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen as a function of rising atmospheric CO₂ concentration. *Functional Plant Biology*, 32(7), 667–670.

- Soares, T., de Jesus, O., dos Santos-Serejo, J., de Oliveira, E. (2013). In vitro pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35 (4) 1116-1126.
- Sousa, R., Duque, L., Duarte, A., Gomes, C., Ribeiro, H., Cruz, A., Silva, J., Abreu, I. (2012). In vitro exposure of *Acer negundo* pollen to atmospheric levels of SO₂ and NO₂: effects on allergenicity and germination. *Environmental Science & Technology*, 46, 2406–2412.
- Stanley, R., linskens, H., (1974). *Pollen: biology, biochemistry and management*. Springer Verlag.
- Storme, N., Zamariola, L., Mau, M., Sharbel, T., Geelen, D., (2013). Volume-based pollen size analysis: An advanced method to assess somatic and gametophytic ploidy in flowering plants. *Plant reproduction*, 26, 65-81.
- Taylor, L., Hepler, P. (1997). Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 461-491.
- Thompson, A., Batjer, L., (1950). The effect of boron in the germination medium on pollen germination and pollen tube growth of several deciduous tree fruits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 56, 227-230.
- Tilton, F., Dewan, C., Petsko, A. (1992). Effects of temperature on protein structure and dynamics: X-ray crystallographic studies of the protein ribonuclease-A at nine different temperatures from 98 to 320 K. *Biochemistry*, 31 (9), 2469–2481.
- Wolters, J., Martens, M., (1987). Effects of air pollutants on pollen. *The Botanical Review*, 53 (3), 372–414.
- Żaba, C., Marcinkowski, J., Wojtyła, A., Tężyk, A., Tobolski, J., Zaba, Z. (2011). Acute collective gas poisoning at work in a manure storage tank. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18 (2), 448-51.
- Zohary, D. (1995). *Olive. Olea europaea* (Oleaceae). *Evolution of Crop-Plants*, Longmans, University of Oxford, 279-382.