

Inst. Bot. de Coimbra
A. Quintanilha
Bot. 1
cl. 3

A. Q U I N T A N I L H A

Primeiro Assistente da Faculdade de Ciências
da Universidade de Coimbra

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO

DOS

SYNCHYTRIUM



COIMBRA

IMPRESA DA UNIVERSIDADE

1926

A. Quintanilha — CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS SYNCHYTRIUM

2/6

Ho Dr. Luiz Carrão Compa.
nhois de trabalho e amigo amit
pção, as em existências enxutas,
à em inabalável, fraternal e reconfr
lante amizade

Com um abraço

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO

DOS

SYNCHYTRIUM

visu vivo

reconhecimento

por grat de de

admiração e amigo dedicados.

sim
A. Carrão

20 - I - 926

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is mirrored and difficult to decipher.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO

SYNCHYTRUM

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is mirrored and difficult to decipher.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO

DOS

SYNCHYTRIUM

POR

A. QUINTANILHA

Primeiro Assistente da Faculdade de Ciências
da Universidade de Coimbra

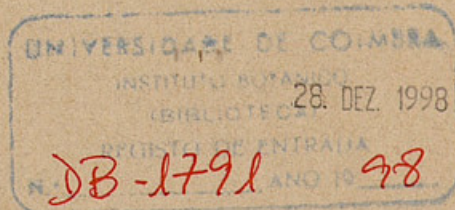
*Dissertação para Doutoramento
na Faculdade de Ciências da
Universidade de Coimbra.*



COIMBRA

IMPRESA DA UNIVERSIDADE

1926



CONTRIBUÇÃO AO ESTUDO

dos

SYNCHYTRIUM

por

A. GUINZBURG

Trabalho apresentado ao Conselho de Instrução
da Universidade de Coimbra

SEPARATA

do

Boletim da Sociedade Broteriana

Vol. III (II série)

Universidade de Coimbra



COIMBRA

IMPRESSA DA UNIVERSIDADE

1930

Handwritten notes in red ink, including the number 1518

A HONRADA MEMÓRIA DE MEU PAI

A MINHA MÃE

A MINHA MULHER

A HONRADA MEMORIA DE MEU PAI

A MINHA MAE

A MINHA MULHER

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I — O Género <i>Synchytrium</i> .	
Ciclo evolutivo de um « tipo morfológico »	5
CAPÍTULO II — História das investigações sobre o Género <i>Synchytrium</i>	19
CAPÍTULO III — O <i>Synchytrium papillatum</i> Farlow	46
Técnica	48
Morfologia	51
Acção sobre o hospedeiro	60
Biologia	64
Distribuição geográfica e lugar de origem	68
CAPÍTULO IV — Sistemática do Género <i>Synchytrium</i>	71
CAPÍTULO V — Posição e afinidades dos <i>Synchytrium</i>	86
Bibliografia	105
Explicação das figuras	109



INDICE

174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190

Introdução
Capítulo I — O Genoma Escherichiae
Capítulo II — História das investigações sobre o Genoma Escherichiae
Capítulo III — O Escherichiae genitívulo I e II
Técnicas
Bacteriologia
Análise ultra-microscópica
História
Distribuição geográfica e lugar de origem
Capítulo IV — Sistemática do Genoma Escherichiae
Capítulo V — Posição e importância nos Escherichiae
Bibliografia
Explicação das siglas



INTRODUÇÃO

O trabalho que agora nos resolvemos a publicar foi começado na primavera de 1923. Andávamos então em busca de assunto aonde fôsse possível ver qualquer coisa de novo, fazer observações cuja publicação tivesse algum interesse. Quando um dia nos apparecem no laboratório umas fôlhas de *Erodium moschatum*, trazidas pelas mãos amigas do Prof. Carrisso e atacadas por um parasita que nenhum de nós conhecia.

Convencido a breve trecho de que se tratava de uma espécie nova para a flora europeia e, ainda por cima, parasitando um hospedeiro nunca mencionado, iniciámos mais minuciosas observações, na esperança de conseguir quaisquer resultados dignos de trazer a público, que mais não fôsse pelo interesse da novidade. Assim, fixámos desde logo bastante material e fomos ao mesmo tempo procurando pôr-nos ao par da bibliografia do assunto.

Inclinados desde muito cedo a trabalhos de citologia — graças à proveitosa aprendizagem que fizemos no Instituto de Histologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, sob a direcção do eminente Prof. Celestino da Costa — o que mais nos interessou, logo de comêço, no estudo do parasita do *Erodium*, foi o aspecto citológico do problema. Por outro lado, as primeiras consultas bibliográficas da especialidade pronto nos revelaram ser êsse precisamente o aspecto mais discutido, mais interessante e de mais prometedores resultados.

Os obstáculos, porém, eram enormes para um debutante inexperto em questões de micologia, e que tinha de resolver sozinho — em terra aonde ninguém se dedica a estudos de citologia vegetal — tôdas as dificuldades que surgissem. Obstáculos de ordem técnica uns, resultantes da dificuldade de encontrar fixadores apropriados a

material de tão difícil penetração; de ordem biológica outros, provenientes do curto prazo em que o fungo apresenta estados favoráveis ao seu estudo; outros, finalmente, de ordem bibliográfica, pois não só eram pobres as bibliotecas portuguesas em trabalhos sobre os *Synchytrium*, mas ainda, e muito principalmente, grande parte das investigações originais, de consulta indispensável, eram escritas em alemão, língua que ao tempo desconhecíamos inteiramente.

Pouco a pouco, fomos reunindo as espécies bibliográficas, colhendo novo material, completando as nossas observações. De modo que hoje conhecemos, ou julgamos, pelo menos, conhecer, tudo o que se tem publicado sobre o assunto que nos ocupa, quasi sempre pela leitura dos próprios originais. O nosso Capítulo II, em que fazemos a história das investigações sobre o género *Synchytrium*, afigura-se-nos por isso bastante completo.

A parte original do trabalho, aquilo que constitui o resultado de observações nossas, encontra-se exposto no Capítulo III.

Se não fôsse a necessidade imperiosa de o publicar agora, teríamos demorado o seu aparecimento até que novas observações viessem preencher tantas lacunas que ainda se encontram no ciclo evolutivo da nossa espécie, ou decidir da exactidão de factos que descrevemos, em manifesta discordância com o que se sabe da morfologia dos *Synchytrium*.

Todavia, se tais escrúpulos são legítimos, é necessário não os levar tão longe que se vá cair naquela categoria de intellectuais a quem Ramón y Cajal, na sua espirituosíssima *charge* (1), classificou de *megalófilos*, êsses que « *desean estrenarse com hazaña prodigiosa* » e, « *recordando acaso Herz, Mayer, Schwann, Röntgen, Curie, iniciaron su vida científica con un gran descubrimiento, aspiran a ascender, desde el primer combate, de soldados a generales, y se pasan la vida planeando y dibujando, construyendo y rectificando, siempre en febril actividad, siempre en plena revisión, incubando el gran engendro, la obra assombrosa y arrolladora.* »

Com a noção bem nítida das imperfeições dêste trabalho, convencidos como estamos de que muito há ainda a investigar a respeito dos problemas que aqui se levantam apenas, entendemos entretanto que a sua publicação, mesmo assim, além de dar idéas gerais aos

(1) S. Ramón y Cajal — *Reglas y consejos sobre investigación científica*, 6.^a ed., Madrid, 1923.

que quiserem estudar este grupo de fungos, pode contribuir para o esclarecimento de certos pontos em litígio.

Depois, a verdade é que não há trabalhos completos. Neste campo, como de resto em todos os outros, à medida que a gente vai trepando pela encosta íngreme do Conhecimento, horizontes cada vez mais largos se desdobram ante nossos olhos maravilhados e surpresos.

O que era de começo um limitado e banal problema de morfologia, de identificação de formas, vai alastrando pouco a pouco. O conhecimento da anatomia externa, das dimensões, não basta; carece de ser completado com as minúcias de ordem citológica, a que dia a dia se vem dando maior importância. Não menos indispensável se nos afigura depois o conhecimento da história do desenvolvimento da espécie, do seu ciclo evolutivo completo, da sua ontogenia, em suma. Como se trata porém de um parasita que foi encontrado e se desenvolve sobre determinado hospedeiro, ocorrerá pesquisar, sem sair da directriz primitiva das nossas investigações, do grau de especificidade do parasita para o parasitado, a fim de poder fazer com segurança a destrição das espécies. ; Quem nos garante, com efeito, que o nosso fungo, encontrado porventura sobre outras plantas e com caracteres morfológicos sensivelmente diferentes, não terá sido já descrito com outro nome? Mas então torna-se necessário ir ver qual a influência do parasita sobre o hospedeiro. ; Há formação de galhas? Pois bem. ; Nesse caso, que factores condicionam a sua forma, aspecto exterior e dimensões? ; Dois parasitas, de espécies diferentes, provocarão, sobre o mesmo hospedeiro, reacções análogas? ; Ou o mesmo parasita, sobre plantas de diversas espécies, determinará a formação de idênticas galhas?

Por outro lado, a simples verificação da existência de determinados caracteres morfológicos em uma dada espécie, é sempre insuficiente para a interpretação do significado de tais caracteres. De modo que não há outro remédio senão comparar a espécie que estudamos com outras, primeiro do mesmo género, depois da mesma família e assim sucessivamente, se quisermos fazer uma idea tão exacta quanto possível do valor morfológico a atribuir a cada um dos caracteres observados. Insensivelmente começam a estabelecer-se as homologias e, sem a gente dar por isso, lá estamos caídos no magno problema filogenético.

; De cima deste cabeço olha-se para trás e vê-se um mundo!

Nossos olhos ansiosos percorrem os vastos horizontes, palpam, febris, os contornos imprecisos das verdades novas, envoltas em bruma, lá muito longe. E novos problemas se divisam ainda, pelos rasgões da névoa, ao largo. Aqui a questão da distribuição geográfica, mais além os problemas ecológicos.

É preciso pois continuar a trabalhar, subir mais alto à montanha do Conhecimento para abranger mais vastos horizontes.

« ... y assi se pasan la vida planeando y dibujando, construyendo y rectificando, siempre en febril actividad, siempre en plena revisión, incubando el gran engendro, la obra assombrosa y arrolladora! »

Ao Sr. Dr. J. Henriques — essa veneranda figura de naturalista de outras eras a quem tanto respeitamos — aqui ficam os nossos agradecimentos pela paternal bondade com que acolheu em sua prestigiosa revista o nosso pobre trabalho.

Ao Sr. Prof. Luís Carrisso, Director do Instituto Botânico, não sabemos como testemunhar o nosso enorme reconhecimento. A fraterna amizade com que sempre nos tratou, a carinhosa solicitude de que nos tem rodeado, fazendo os maiores sacrificios para que nos não falem as condições de trabalho, em um Instituto pobre e mal apetrechado para investigações desta natureza, são coisas que se não agradecem. As palavras de reconhecimento, achamo-las pequeninas e ridículas diante da grandeza moral das atitudes.

Os nossos agradecimentos à Ex.^{ma} Sr.^a D. Maria A. de Seabra, que gentilmente se prestou a fazer os melhores desenhos dêste trabalho.

Finalmente, seria injustiça esquecer a cooperação prestada pelo modesto mas diligente preparador do Laboratório, Sr. António Cabral, a quem aqui fica expressa a nossa gratidão.



CAPÍTULO I

O Género *Synchytrium*

Ciclo evolutivo de um « tipo morfológico »

Antes de mais nada consideramos indispensável dar ao leitor, que não tenha dedicado especialmente a sua atenção a este grupo tão mal conhecido de fungos, umas ideas gerais sôbre o género que agora nos ocupa, tendentes a familiarizá-lo com a terminologia adoptada e a servir-lhe de norte na exposição subsequente dos factos e das doutrinas. Ésse o objectivo dêste primeiro capítulo.

E em vez de descrever, separada e sucessivamente, o ciclo evolutivo daquelas espécies que, por suas características, mais se afastam umas das outras, para que o leitor, sintetizando, daí tirasse ao depois ideas de conjunto, julgámos preferível adoptar aquilo a que Delage chamou, no notável prefácio do seu *Traité de Zoologie Concrète*, um « tipo morfológico », « *cet être qui, idéal ou réel, représente en tout cas la forme fondamentale à laquelle les autres se rattachent.* »

Essa forma sintética, que vamos descrever e figurar, dará, rápida e esquematicamente, uma clara noção de conjunto. Depois, para cada caso especial, saberá o leitor em que é que o seu ciclo se afasta do ciclo evolutivo do tipo morfológico descrito. E poderá descer às minúcias, seguir os casos especiais, depois de ter tido uma vista geral, panorâmica, digamos, da biologia dêste conjunto de espécies.

As noções nada perderão com isso do seu rigor scientifico. Mas a exposição será incomparavelmente mais clara e o assunto mais rápida e facilmente assimilado.

No ciclo evolutivo da vida do nosso *Synchytrium* há, necessariamente, uma fase flagelada a que se dá o nome de *zoósporo*. Partamos, pois, desta fase.

O zoósporo (1, fig. 1) é uma pequeníssima célula (3 a 5 μ , em média) nua, uninucleada, sem vacúolo digestivo nem vesícula pulsátil. No seu plasma hialino percebem-se gotículas de gordura, geralmente amareladas. Contorno regular, não emitindo pseudópodos; e, implantado no polo posterior, um vigoroso e comprido flagelo. Tal é o nosso zoósporo, que na água nasceu e só nela pode viver, deslocando-se por saltos bruscos, mercê das chicotadas enérgicas do flagelo.

Pouco tempo pode durar êste estado de vida livre; umas horas, digamos. Para continuar a evolução, necessita o zoósporo de encontrar, sem sair do seu meio aquático, um *hospedeiro* apropriado, pois o nosso *Synchytrium* é parasita, e parasita de plantas terrestres. Aqui está para o zoósporo uma dificuldade a vencer. Só pode atacar o hospedeiro durante um período de accidental imersão, ou aproveitando o orvalho da manhã, a água das chuvas ou do degêlo das neves. Se lhe não foi possível aproveitar a oportunidade favorável, morre, necessariamente, ao cabo de curto período de vida livre.

Suponhamos, porém, que tal não aconteceu e que o zoósporo teve a felicidade de encontrar uma folhinha nova da planta que é sua hospedeira habitual. Vêmo-lo então poisar sobre a epiderme, perder o flagelo e abrir caminho através da parede externa de uma célula epidérmica, como se fôsse um glóbulo branco em diapedese pela parede de um capilar (3, fig. 1).

Lá conseguiu atravessar o obstáculo; e aí o temos agora no interior da *célula hospedeira* (4, fig. 1). Uma vez instalado, começa o parasita a crescer a olhos vistos. Aumenta rapidamente de volume, atingindo proporções consideráveis comparadas com as minúsculas dimensões primitivas. Envolve-o agora uma delgada membrana (5, fig. 1). Seus contornos são regulares; o citoplasma carregou-se de substâncias de reserva, gordas e proteicas, extorquidas, manifestamente, à sua hospedeira e, muito provavelmente ainda, a algumas vizinhas. Entretanto o núcleo cresceu extraordinariamente e mostra no interior um grande corpúsculo arredondado, muito cromófilo, o *nucléolo* ou *cariosoma*.

A esta fase da vida do parasita, em que êste atingiu as maiores dimensões, dentro ainda do estado uninuclear, chamaremos a *célula inicial*.

Ao mesmo tempo que se passavam estes fenômenos, a célula hospedeira ia-se modificando profundamente, sob a excitação resultante

da presença de tão importuno hóspede. O núcleo aumentou de volume, seus contornos tornaram-se irregulares e foi aplicar-se contra a parede do parasita, com todo o aspecto de uma formação em plena degenerescência. No citoplasma foi-se desenvolvendo um pigmento solúvel, difuso, vermelho-cereja, digamos, que faz realçar a célula infectada no meio de todas as outras. E, ainda sob a acção do parasita, a célula hospedeira aumenta de volume, as suas paredes dilatam-se fortemente, emerge muito acima do nível da epiderme e forma uma *galha*, perfeitamente visível à vista desarmada (5, fig. 1).

O núcleo único da célula inicial — *núcleo primário* — vai agora produzir (por processos a que nos referiremos mais adiante) uma geração de *núcleos secundários*. Esta proliferação continua, novas gerações de núcleos se formam, e, ao cabo de pouco tempo, a galha contém uma célula plurinucleada (6, fig. 1). No plasma desta começam a aparecer septos que partem da periferia, vão avançando para o centro e acabam por dividir a massa única primitiva em grande número de lóculos, contendo, cada um, um só núcleo (7, fig. 1). Cada lóculo uninucleado é um *protósporo*. A proliferação nuclear continua, porém, ininterruptamente. E, quando terminou a fase de multiplicação nuclear, cada protósporo aparece transformado em uma massa multinucleada a que se dá o nome de *esporângio*. Ao conjunto destes chama-se um *soro de esporângios* (1) (8, fig. 1).

O parasita atingiu assim uma primeira *étape* na sua evolução. Estas galhas, contendo soros de esporângios, só podem germinar em presença da água.

Suponhamos que tal facto se dá; que o hospedeiro se encontra imerso, por exemplo, quando os soros de esporângios atingiram a maturação. Dá-se então uma absorção rápida de água; os esporângios intumescem consideravelmente; cada um dos seus núcleos se envolve de uma massa citoplásmica, elabora um flagelo e vai dar um zoósporo, idêntico àquele de que partimos. As paredes dos esporângios, sob a pressão interior, rompem-se; rompe-se a parede da galha, e do interior desta vemos sair milhares de zoósporos que se deslocam aos saltos na água ambiente (9, fig. 1).

E a evolução recomeça. Cada zoósporo que pôde encontrar, em condições favoráveis, o hospedeiro habitual, de novo se instala

(1) Os autores alemães também lhes chamam « *Sommersori* ».

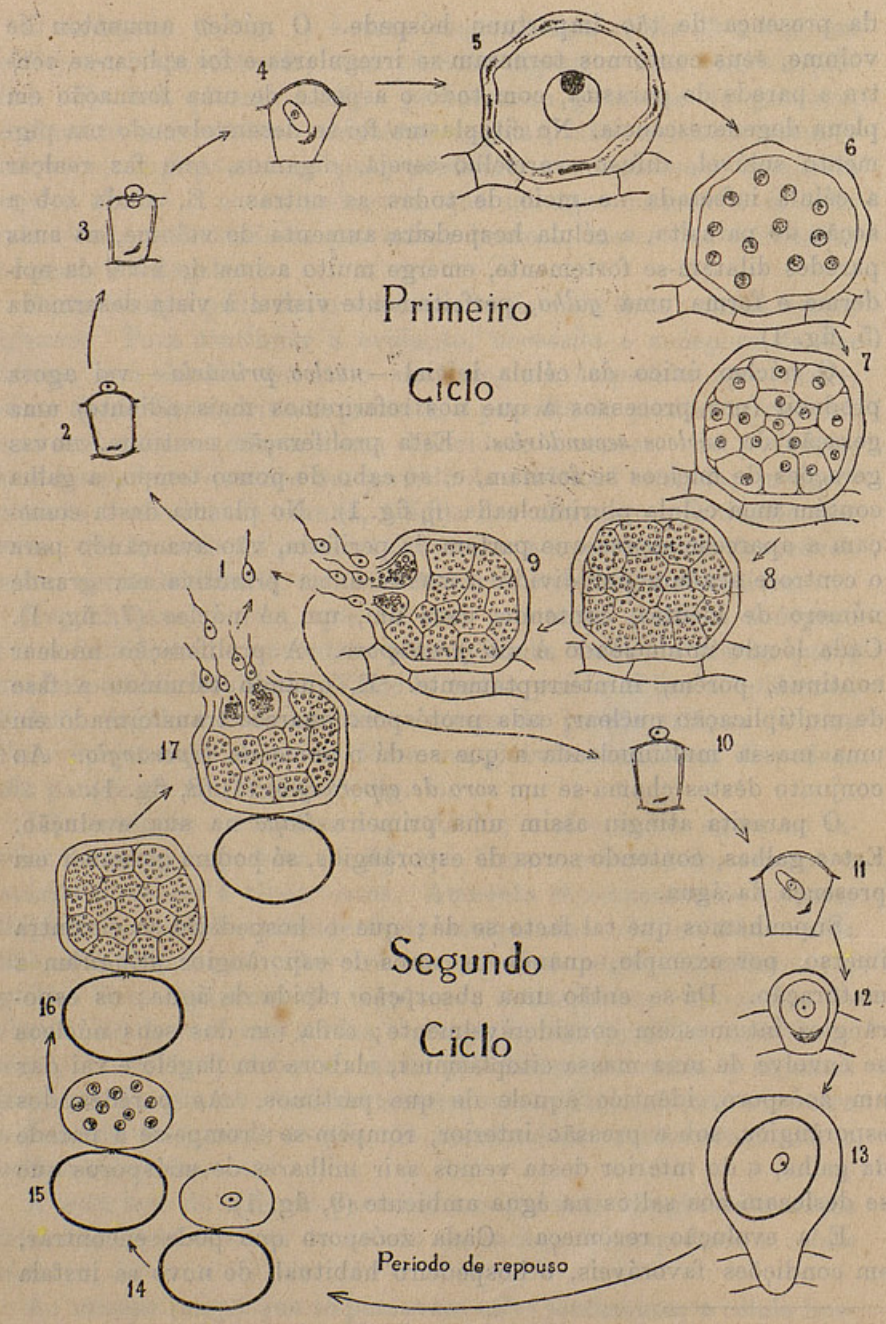


Fig. 1

em uma célula epidérmica; aí cresce e se desenvolve; e uma nova galha se forma, contendo novo soro de esporângios, que por sua vez há-de germinar e produzir novos zoósporos. E assim, sucessivamente, durante muitas gerações.

A infecção vai alastrando com grande rapidez. E, se estamos em terrenos baixos, fácil e freqüentemente inundados às primeiras chuvadas, dentro em pouco tôdas as plantas susceptíveis de serem atacadas apresentam as galhas características do nosso *Synchytrium*.

Mas eis que se aproxima a estação do ano *desfavorável* à multiplicação do parasita. Começam as chuvas a rarear; já não há inundações, mesmo nos pontos mais baixos, aonde as águas dantes costumavam ajuntar-se. O próprio rocío da madrugada vai faltar, pela certa, em os calores apertando.

¿ Que vai ser dessa praga daninha dos *Synchytrium*, privados agora da água, êsse meio indispensável para o seu desenvolvimento e disseminação? Não se extinguem, por certo, pois que, passados meses, em voltando a estação favorável, aí os temos de novo exibindo suas galhas, vermelhas e húmidas como pequeninos morangos. ¿ Como conseguiram então atravessar essa quadra do ano, com semanas seguidas de um sol que tudo queima, sem uma gota de água que mate a sede à terra e às ervas por êsses campos fora?

O ciclo que descrevemos não pode, evidentemente, continuar. Os soros, se chegassem à maturação, não germinariam, pela certa. Nem poderiam esperar pela estação seguinte, pois que suas paredes delgadas não seriam protecção eficaz contra a perda de água; e a morte havia de sobrevir, inevitável.

Acresce, para maior dificuldade, que o hospedeiro da nossa forma-tipo é planta anual. Está em flor aí por alturas de junho. Depois frutifica, espalha as sementes pela terra e tudo o resto, essa parte vegetativa que ao parasita servia de seguro abrigo, entra de murchar, seca, e dentro em pouco é apenas uma pitada de poeira que o vento dispersa em um sôpro.

Que vai ser então do pobre *Synchytrium*?

Em as chuvas começando a faltar, inicia o parasita um novo processo de evolução. Os zoósporos, provenientes da germinação de um soro, penetram ainda em uma célula epidérmica e aí principiam o seu desenvolvimento como se fôsem dar novos soros (10, 11 e 12, fig. 1). Mas em breve começam a aparecer as diferenças. Em vez de se formar, como de costume, uma célula inicial de paredes

delgadas, o que agora vemos, no interior da galha, é um corpúsculo arredondado provido de dupla parede, a interior delgada mas a externa fortemente espessa, opaca quasi e quitinosa (13, fig. 1). A própria galha, em que a célula hospedeira entretanto se foi transformando, é agora diferente. Se as de há pouco eram sensivelmente esféricas, como supusemos, estas agora serão piriformes, por exemplo.

À célula de paredes grossas que esta galha piriforme contém, chamaremos *esporo de resistência* (1).

Dentro daquela dupla membrana há um citoplasma, abundantemente provido de reservas nutritivas, gorduras e proteínas; e, sensivelmente a meio, um grande núcleo.

Este esporo, que se parece bastante com uma célula inicial, não continua a sua evolução. Podíamos pois dizer que o parasita *enquistou*, logo que se fizeram sentir os primeiros sintomas de estiação.

Que venham agora os grandes calores e semanas seguidas sem chuva nem orvalho. O parasita está bem resguardado contra essas eventualidades. Pode o hospedeiro secar, seus órgãos aéreos transformarem-se em pó, sob a acção dos ventos secos e de um sol que faz estalar a própria rocha. O esporo, protegido por uma dupla membrana e ainda envolvido pelas paredes da galha, é um desses grãosinhos de pó que o vento levanta agora da terra, faz redemoinhar um momento, e atira para o largo, sobre outros campos. Mas não perde água; pelo menos, coisa que lhe faça falta. Conserva-se em um estado de *vida latente*, tal qual como as sementes do hospedeiro que por aí andam, espalhadas aos quatro ventos, à espera de melhores dias.

Eis que voltam as primeiras chuvas, « que não há mal que sempre dure nem bem que se não acabe ». Embebem e lavam a face da terra. Formam regueiros, pequeninos cursos de água, que, encosta abaixo, vão arrastando consigo as poeiras e detritos que encontram; e, com êles, sementes várias e os esporos do *Synchytrium* que conseguiram atravessar incólumes esse período de secura extrema.

Carreados pelas águas vêm descendo para as terras baixas e aí se depositam, por decantação, nas depressões do terreno. Depois a

(1) Os autores alemães chamam-lhes « *Dauersorus* », « *Dauersporangium* », « *Dauerzell* », « *Wintersorus* ».

água destes poços é bebida pela terra e os esporos ficam de novo em sêco. Mas novas chuvas sobrevêm. E em períodos alternados de secura e imersão passam os esporos semanas e meses sem darem sinais de vida.

Começam, ainda em pleno inverno, a germinar as sementes. Aparecem as primeiras folhinhas verdes do hospedeiro. E um belo dia, com o tempo ainda frio e os campos encharcados, eis que germinam os primeiros esporos.

Sigamos atentamente o espectáculo, que é novo e curioso.

Em determinado ponto da parede rompe-se a membrana externa. Nada faria supor que aquilo havia de estalar por ali. Mas, enfim, rompeu-se. E, através da pequeníssima fenda formada, um botãozinho de plasma emerge, envolvido pela membrana interna, cresce rapidamente e, ao cabo de um momento, todo o conteúdo do esporo se encontra do lado de fora (14, fig. 1).

O núcleo único, que meses antes lá tínhamos deixado, ainda aí está, sozinho sempre e com o mesmo aspecto. À vesícula plasmática que assim se formou, uninucleada e envolvida de uma delgada membrana, que vem a ser a membrana interna, dilatada, do esporo de resistência, poderemos chamar ainda *célula inicial*, recordando assim a analogia de estrutura com a formação homónima anteriormente descrita.

Analogia de estrutura, dissemos nós. E de destinos, poderíamos ter acrescentado.

Com efeito, do núcleo único desta célula inicial, sucessivas gerações de núcleos se vão formar; de modo que, dentro em pouco, temos uma célula plurinucleada (15, fig. 1).

Começam agora a aparecer septos, da periferia para o centro; a proliferação nuclear continua e em breve a célula inicial se transformou em um *soro de esporângios*, que apenas difere dos outros, que já estudámos, no facto de se ter formado *fora* da célula primitiva que o originou e de trazer, por isso, apenas a membrana exterior, já esvasiada, do esporo de resistência (16, fig. 1).

Atendendo à maneira como se formaram estes dois soros, poderíamos dizer que o primeiro é *endógeno* e o segundo *exógeno*.

Todos estes fenómenos, que vão dos primeiros sintomas de germinação do esporo à formação do soro, decorrem muito rapidamente, duas ou três horas apenas, no caso da nossa forma-tipo. Mas hão-de formar-se necessariamente debaixo de água.

Uma vez terminada a evolução, o soro vai abrir para pôr em liberdade os zoósporos que contém. Rompe-se a parede, que corresponde à membrana interna do esporo de resistência, rompem-se as paredes dos esporângios sob a acção da pressão interior, e êles aí vão, os zoósporos, aos milhares, armados de um comprido flagelo, aos pulos dentro de água, em busca de novos hospedeiros (17, fig. 1).

São estes, afinal, os elementos de onde partimos, no princípio da história da vida do nosso *Synchytrium*. São aqueles zoósporos que então encontrámos, saltitando em uma gota de água, sem sabermos ainda de onde vinham, à cata de uma célula aonde pudessem cómodamente instalar-se e prosperar.

Ei-los de novo em sua faina. E agora, tudo recomeça. Entramos outra vez no *primeiro ciclo*. Enquanto durar a estação favorável, muitas gerações de soros se vão formar; e a peste vai alastrando. Em as chuvas começando a faltar, passamos ao *segundo ciclo*. Os zoósporos, penetrando em novas células hospedeiras, em vez de darem imediatamente soros, *enquistam*, produzem esporos de resistência, isto é, órgãos de disseminação também, mas essencialmente adaptados à vida fora de água, à *disseminação aérea*. Assim se passa a estação desfavorável, a *estação seca*, e os primeiros tempos da estação chuvosa, igualmente desfavoráveis para a multiplicação activa do parasita, pois que vêm acompanhados dos grandes frios e em uma época do ano em que as sementes do hospedeiro ainda não germinaram. Só mais tarde, aos primeiros alvôres da primavera, o fungo despertará do seu longo sono hibernante. E, abandonando o estado de vida latente, recomeçará activamente o primeiro ciclo.

Quanto ao hospedeiro, êsse, na verdade, não parece ressentir-se fundamente da moléstia. É certo que as células epidérmicas atacadas são destruídas pelo parasita, que à custa delas engorda e prospera. Mas, ainda nos casos mais graves, quando a infecção alastra e zonas extensas da fôlha e dos caules tenros são atingidos na sua epiderme, não parece que a economia da planta se ressinta fortemente. A *synchytriose*, mesmo *generalizada*, como logo lhe chamariam os senhores *esculápios*, se uma destas ervas doentes transpusesse irreverente os humbrais de um consultório, não é enfermidade mortal. Pode produzir anomalias de crescimento, nos casos graves. E traz sempre, como conseqüência, um enfraquecimento, um

estado de *anemia*, digamos, dos órgãos atacados, pela quantidade de produtos nutritivos que desvia da sua normal aplicação e ainda pelos entraves que põe à função assimiladora, interpondo a camada espessa, corada, opaca quasi, das suas galhas, entre a luz e o tecido clorofilino hipodérmico. Mas nunca o metabolismo do hospedeiro é tão fundamente afectado, que este deixe de desenvolver-se e até de florescer e frutificar em seu tempo próprio.

O « tipo morfológico » de *Synchytrium*, tal como o acabamos de descrever, não existe provavelmente.

É uma forma ideal, que se aproxima bastante de algumas formas reais, e que poderia perfeitamente ter existido, em condições mesológicas análogas às que encontramos aqui, nos campos do Mondego. Terras baixas, frequentemente inundadas durante o inverno e pela primavera fora, até tarde. Vegetação rasteira, de erbáceas anuais, abundante; verão quente e sêco; inverno frio, chuvoso, mas de curta duração; primavera precoce, temperada, com chuvadas frequentes e madrugadas frias, rociando as ervas pelos prados. Eis as condições que supusemos ao delinear a biologia da nossa forma-tipo.

Mas as outras, as formas reais, em que é que se afastam do tipo morfológico? Vejamo-lo, rápida, sucintamente e apenas para aquelas espécies que apresentam maiores divergências umas das outras, no seu ciclo evolutivo.

O *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percl. é das espécies mais discutidas e estudadas do género. Ataca e destrói os tubérculos da batata vulgar (*Solanum tuberosum*), tornando-os impróprios para o consumo e causando prejuízos consideráveis aos agricultores. É também das formas cujo ciclo mais profundamente se afasta do tipo morfológico.

Os zoósporos, que vivem e se deslocam na terra húmida, atacam as células epidérmicas dos gomos dos rizomas novos e os « olhos » dos jovens tubérculos. Sob a acção do parasita, a célula infectada aumenta de volume e divide-se por uma mitose, de tal modo que, das duas células filhas, a que leva consigo o fungo é geralmente a interna. Produzem-se assim neoplasias importantes, que chegam a atingir volume superior ao do próprio tubérculo, nos casos de fortes infecções.

O parasita desenvolve-se depois, normalmente, nas assentadas

profundas do tecido. Mas chegando à fase plurinucleada (6, fig. 1) não se formam protósporos. Os septos, se chegam a formar-se, separam apenas, no interior do soro, dois a cinco esporângios, desde o começo plurinucleados. Às vezes, porém, os septos não se formam e então o soro é constituído por um único esporângio.

As galhas, profundas, diferem bastante das do tipo, sendo, sobretudo, muito mais pequenas.

Estes soros, com um só esporângio, ou com um reduzido número dêles, formam se em grande abundância nos meses de maio e junho (Inglaterra e países da Europa central). Por germinação, põem em liberdade grande número de zoósporos que vão atacar novos tubérculos; e a infecção vai-se generalizando.

À medida que o verão avança, vão aparecendo, cada vez mais numerosos, esporos de resistência, como os do tipo morfológico, mas em células profundas. Estes passam o inverno na terra, após a putrefacção dos tecidos neoplásicos; só germinam na primavera seguinte (março ou abril) e produzem *um só esporângio, contido sempre no interior do esporo hibernante.*

Os zoósporos originados por este *soro uniesporangiado, endógeno*, vão agora atacar os rizomas da nova plantação e recomeçam o primeiro ciclo.

Nem sempre, porém, as coisas se passam assim. Acontece por vezes que alguns esporos de resistência, bem fáceis de distinguir pela grossura das paredes, *germinam na própria época em que são produzidos, sem interposição de um período de repouso hibernante.*

As principais divergências do tipo morfológico são, pois: vida subterrânea; capacidade de penetração nos tecidos do hospedeiro, como consequência da proliferação celular que a presença do parasita provoca nos órgãos atacados; formação, no primeiro ciclo, de soros de poucos esporângios, às vezes de um só; possibilidade dos esporos de resistência germinarem sem período intermediário de repouso; e, fechando o segundo ciclo, formação endógena de um soro sempre uniesporangiado.

Por estas e outras razões, a que nos referimos adiante, tem-se pretendido formar, com esta espécie, um género à parte. Veremos depois os motivos porque discordamos de tal critério (Cap. IV).

O *Synchytrium taraxaci* de Bary e Woronin é a espécie mais antigamente conhecida dêste grupo de fungos e foi a sua descoberta que

provocou a formação do novo género. Parasita ordinariamente as fôlhas do *Taraxacum officinale* Weber; mas pode atacar ainda o *T. ceratophorum* DC., o *T. erythrospermum* Andrz. e o *T. palustre* DC.

Afasta-se muito menos do tipo morfológico do que o *S. endobioticum*, com o qual, porém, apresenta importantes analogias.

No primeiro ciclo tudo se passa, a bem dizer, como na forma-tipo. A fase de protósporo é suprimida; as galhas menos salientes acima da epiderme e amarelo-alaranjadas; os soros contêm um número muito variável de esporângios, podendo descer até dois, ou mesmo um só, ou ir além de cinqüenta.

No segundo ciclo, os esporos de resistência, postos em liberdade por putrefacção do tecido da fôlha, hibernam na terra e produzem, na primavera seguinte, um soro uniesporangiado, endógeno, como no *S. endobioticum*. É este processo de germinação dos esporos de resistência e a formação de um esporângio único, que mais afasta o *S. taraxaci* do tipo morfológico.

O *Synchytrium fulgens* Schröter, não é das espécies mais bem estudadas. Parasita as fôlhas da *Oenothera biennis* L., em cuja epiderme produz galhas pequenas, vermelho-alaranjadas, cobertas, quasi até acima, pelas células vizinhas, hipertrofiadas. A estas galhas — para cuja formação contribuem, não só a célula atacada, mas também as vizinhas, que, sob a excitação do parasita, crescem, se multiplicam por vezes e vem a formar um revestimento externo — dá-se o nome de galhas compostas.

Tais galhas contêm soros, formados por processo análogo ao da forma-tipo, e compostos, em média, de 10 a 50 esporângios. Ao germinarem, porém, não põem imediatamente em liberdade os zoósporos. Os esporângios é que saem, por deiscência do soro e da galha; e, disseminados pela superfície das fôlhas, dir-se hiam uredósporos de uma ferrugem. Germinando depois em uma gota de orvalho, deixam sair os zoósporos, que vão, por sua vez, infectar novas plantas.

Do segundo ciclo, só se sabe que se formam esporos de resistência, ao mesmo tempo que os soros de esporângios, e também contidos em galhas compostas. Mas desconhece-se o seu processo de germinação. As maiores divergências com o tipo morfológico consistem, por ora, no processo, muito particular, de germinação dos soros de esporângios.

O *Synchytrium papillatum* Farlow, conhecido há muito como parasita do *Erodium cicutarium* (L.) L'Herit., foi agora encontrado por nós e pela primeira vez sobre um hospedeiro novo, o *Erodium moschatum* (L.) L'Herit.

O primeiro ciclo da sua evolução passa-se como na forma-tipo, com omissão apenas da fase de protósporos. Do segundo ciclo só se sabe que se formam esporos de resistência que passam na terra a estação desfavorável (grande parte do verão). Nunca ninguém os viu germinar, ignorando-se portanto se formam soros endógenos ou exógenos, uni ou pluriesporangiaados.

O que se conhece, porém, do seu ciclo evolutivo, aproxima-o consideravelmente do tipo morfológico. (Conf. com o Cap. III aonde tratamos desenvolvidamente a morfologia e biologia desta espécie).

O *Synchytrium decipiens* Farlow, ataca as folhas da *Amphicarpaea monoica* Butl., em cuja epiderme forma galhas hemisféricas, amarelo-pálidas. Estas contêm soros de esporângios originados por processo análogo ao da forma-tipo. Os zoósporos, saídos destes soros multiesporangiaados, vão espalhar a moléstia sobre novos hospedeiros, repetindo muitas vezes o primeiro ciclo.

O mais interessante, porém, é que nunca até hoje foram encontradas formas hibernantes.

O *Synchytrium succissae* de Bary e Woronin, tem sido encontrado parasitando a epiderme das folhas e dos caules da *Succissa pratensis* Much. [*Succissa praemorsa* (Gilib.)]. Apresentamo-lo aqui como tipo de um dos mais interessantes ciclos evolutivos dentro do género.

Os zoósporos produzem, nas células epidérmicas que atacam, galhas compostas. As células epidérmicas, vizinhas da hospedeira, não só a acompanham no seu crescimento, como se septam paralelamente ao plano da folha. Se um grupo de células epidérmicas, contíguas, é simultaneamente infectado, as respectivas galhas coalescem, formando-se uma *galha complexa*, grande, envolvida em conjunto por um revestimento epidérmico.

Quanto ao parasita, êsse, desenvolve-se, até à fase de *célula inicial*, como no tipo morfológico. Daí em diante, porém, notáveis alterações aparecem.

A inicial (5, fig. 1), antes de passar à fase plurinucleada (6, fig. 1), vai germinar, no interior da célula hospedeira, como se fôsse um esporo

de resistência. Quere dizer, o soro de esporângios que se vai formar é *exógeno* em relação à inicial que o origina e *endógeno* em relação à célula hospedeira que o aloja. Por consequência, se substituíssemos no nosso esquema as figuras 6 a 9, do primeiro ciclo, por aquelas que representam, no segundo ciclo, a germinação dos esporos de resistência (14 a 16, fig. 1), teríamos uma noção da primeira fase do desenvolvimento do *S. succissae*.

Os zoósporos, postos em liberdade por ruptura da galha, recomecem o primeiro ciclo.

Além destes soros de germinação imediata, o parasita também produz esporos de resistência, que freqüentemente se formam nas próprias células epidérmicas de revestimento das galhas, à custa de zoósporos que não chegaram a sair para o exterior e apenas tiveram que atravessar a parede de separação entre a célula hospedeira primitiva e uma dessas células de revestimento.

Até à formação dos esporos de resistência, nada há a acrescentar ao que dissemos para o tipo morfológico. Estes, postos em liberdade por destruição dos tecidos do hospedeiro, só germinam passado um período intermediário de repouso. Mas ignora-se o processo de germinação, que até hoje nunca foi observado.

O *S. succissae* apresenta, pois, discordâncias profundas com o tipo morfológico, principalmente no que respeita à formação e desenvolvimento dos soros de germinação imediata.

O *Synchytrium Wurthii* Rytz, foi encontrado recentemente em Java sobre o *Gymnopetalum cochinchinense* Kurz, e cuidadosamente estudado por Rytz.

O que há de mais extraordinário no ciclo evolutivo desta espécie, é o facto de produzir apenas um tipo de esporos, com tôdas as características morfológicas dos esporos de resistência, mas susceptíveis de germinar sem uma fase de repouso hibernante.

Referindo-nos ao esquema do tipo morfológico, poderíamos dizer que houve aqui como que uma fusão dos dois ciclos em um só. Os zoósporos, penetrando nas suas células hospedeiras, desenvolvem-se e transformam-se em células iniciais de paredes grossas, a que Rytz chama « *Dauersporen* ». Estas podem, certamente, funcionar como esporos de resistência, intercalando no ciclo evolutivo um período de repouso, durante a estação desfavorável, e germinando só mais tarde. Mas normalmente germinam na própria estação em que se

formam, produzindo, no interior da respectiva célula hospedeira, soros de esporângios exógenos, tal qual como no caso do *S. succissae*.

O *Synchytrium mercurialis* Fuckel, encontra-se sôbre as fôlhas e caules da *Mercurialis perennis* L., infectando as células epidérmicas e produzindo galhas compostas.

Caracteriza-se esta espécie, e o numeroso grupo de espécies afins que com ela formam importante sub-grupo, pela falta completa do primeiro ciclo do nosso tipo morfológico. Os zoósporos, instalados nas respectivas células hospedeiras, produzem imediatamente esporos de resistência. Estes só podem germinar passado um longo período de repouso, cêrca de um ano, e depois da destruição dos tecidos do hospedeiro; a germinação decorre então exactamente como no tipo morfológico, dando lugar à formação de um soro exógeno, com numerosos esporângios (80 até 120). Do interior dêstes saem zoósporos arredondados, de 3-6 μ . de diâmetro, uniflagelados e contendo uma gotícula gorda incolor, que vão atacar novos hospedeiros.

Em cada ano há, pois, uma só geração de zoósporos; e não se formam nunca soros de germinação imediata.

Rememorando agora o que dissemos a propósito do ciclo evolutivo das espécies que, dentro do género *Synchytrium*, mais se afastam de um tipo médio, que descrevemos como tipo morfológico, fâcilmente se conclui que é possível estabelecer três sub-tipos principais, em volta dos quais estas e as restantes espécies se agrupam naturalmente.

Como forma fundamental de um primeiro núcleo podíamos tomar o *S. taraxaci* e juntar à sua volta aquelas espécies que têm também: várias gerações de zoósporos por ano; soros de esporângios, de germinação imediata, e esporos de resistência, com um período de vida latente prègerminativo, sendo os primeiros sempre endógenos e emitindo os respectivos zoósporos sôbre o hospedeiro vivo.

Em um segundo núcleo agruparíamos as espécies que têm, como o *S. succissae*: várias gerações de zoósporos por ano; soros de esporângios e esporos de resistência, sendo os primeiros sempre exógenos, mas emitindo os respectivos zoósporos sôbre o hospedeiro vivo.

Finalmente o *S. mercurialis* pode ser tomado como forma fundamental de um terceiro grupo de espécies, numeroso e bem homogê-

neo, caracterizado: pela falta completa de um primeiro ciclo de multiplicação activa; pela existência de uma só geração de zoósporos, por ano, formados em soros exógenos e provenientes de esporos de resistência que só germinam fora dos respectivos hospedeiros.

No capítulo IV teremos ocasião de falar mais desenvolvidamente do critério a que há-de obedecer o agrupamento das espécies do género *Synchytrium*.

CAPÍTULO II

História das investigações sobre o Género *Synchytrium*

De Bary e Woronin Em 1863 uma pequena revista de província que
1863 aparecia no sul da Alemanha, o *Berichte der natur-*
forschenden Gesellschaft Freiburg im Breisgau, publicava o primeiro
trabalho sobre o Género *Synchytrium*, firmado por De Bary e Woronin. Pode dizer-se que a história das investigações sobre este grupo de fungos começa por um estudo verdadeiramente magistral.

Usando uma técnica muito elementar, sem fixar, incluir ou corar o seu material; limitando-se à observação *in vivo* e com aparelhos, certamente, rudimentares e imperfeitos, os dois grandes mestres conseguiram, todavia, assistir ao desenvolvimento completo do parasita que estudaram, fazendo observações delicadíssimas, algumas das quais se não repetiram. Se abstrairmos dos fenómenos nucleares que acompanham aquele desenvolvimento, que não podiam, manifestamente, ser estudados com tão rudimentares processos de investigação, pode dizer-se que, a-pesar-de os numerosos trabalhos publicados posteriormente sobre o parasita que De Bary e Woronin estudaram, o que hoje sabemos da sua biologia é ainda o mesmo que sabiam os dois grandes botânicos do século passado. Tal o rigor de suas observações.

Os autores descobriram sobre as fôlhas da *Taraxacum officinale* Wigg. um parasita, muito aparente por seus tubérculos intracelulares, alaranjados, a que deram o nome de *Synchytrium taraxaci*.

Postos estes tubérculos em água, assistiram à sua germinação. Viram que no interior de cada um havia grande número de massas poliédricas, a que depois chamaram esporângios. Descreveram e figu-

raram com a maior clareza o último período da maturação destes esporângios; a agregação, na massa plasmática contínua, de gotículas gordas alaranjadas; a individualização dos zoósporos e a sua saída para a água ambiente através do orifício aberto na parede do esporângio. Observaram cuidadosamente a vida livre dos zoósporos e determinaram a sua duração. Assistiram depois ao ataque de folhinhas novas de *Taraxacum*; mergulhando-as em água, tão carregada de zoósporos que o próprio líquido tomava a cor alaranjada das gotículas gordas dos esporos, viram estes, atraídos em massa pelas fôlhas, encostarem-se à epiderme, transformarem-se em pequenas massas amibóides e aí ficarem, às vezes durante um e dois dias, no trabalho de perfuração da membrana. Representaram, com grande nitidez, os sucessivos estados da passagem dos esporos através da membrana externa da epiderme. Assistiram depois ao desenvolvimento completo do parasita dentro da célula hospedeira, determinando a duração de cada uma das suas fases e, simultâneamente, os fenómenos de reacção que se iam passando na célula atacada e nas vizinhas. Puderam assim constatar que, 48 horas depois de postas as fôlhas em contacto com a água infectada, os esporos tinham atravessado quasi todos a membrana celular e se tinham instalado no interior da sua hospedeira, formando aquilo a que os autores chamaram *Primordialkugeln*.

Estes glóbulos primários começam agora um período de crescimento, atingindo, 6 a 7 dias após a inoculação, um volume 6 a 12, até mesmo 15 vezes maior que o volume primitivo do zoósporo. A reacção da célula hospedeira só começa a notar-se, pelo quinto ou sexto dia, por um aumento de volume, acompanhado de hipertrofia do núcleo e do citoplasma.

Após um período em que a célula hospedeira cresce mais depressa que o glóbulo primário, sobrevém um outro em que o parasita aumenta muito rapidamente de volume, começando então o seu plasma a tornar-se granuloso e alaranjado. Nesta altura, já o parasita se encontra envolvido por uma delgada membrana, cuja época precisa de formação não é porém fácil de determinar. Nove a doze dias após a inoculação, as pequeninas galhas, contendo um parasita cor de laranja, começam a ser visíveis à vista desarmada.

Os autores assistiram ainda à divisão do glóbulo primário (ou célula inicial) em um número de esporângios muito variável, dependente do tamanho do próprio glóbulo. Em glóbulos grandes che-

gavam a formar-se mais de 50 esporângios, enquanto que nos mais pequenos aquele número podia descer até 2. Os autores descrevem mesmo alguns casos raros em que o glóbulo primário, atingida a maturação, não chega a dividir-se, transformando-se directamente em um único esporângio.

A-pesar-de as membranas destes esporângios serem muito difíceis de ver, nos primeiros momentos após a formação, por sua extrema delicadeza e ainda por se encontrarem no seio de um plasma fortemente granuloso e côrado, puderam os autores, plasmolisando estes soros novos por meio da glicerina, observar a sua septação em estados muito precoces e convencer-se de que a formação dos septos e individualização consequente dos esporângios era simultânea e não resultante de sucessivas divisões da massa única primitiva.

Ao cabo de 12 a 14 dias depois da infecção, atingiam os soros o seu estado de maturação completa e encontravam-se portanto em condições de poder germinar novamente. Bastava para o conseguir mergulhar as respectivas fôlhas em água, ou orvalhá-las apenas e conservá-las em câmara húmida. Esta germinação, verificaram os autores, demorava em média 3 horas, contadas a partir dos primeiros sintomas de formação dos zoósporos.

Os soros de esporângios conservam a faculdade de germinação enquanto os órgãos do hospedeiro atacados mantêm o seu estado de turgescência, mesmo que se passem semanas sem que se apresentem as condições favoráveis para o desenvolvimento dos zoósporos. Mas se o órgão em questão murcha e seca, os soros morrem com êle.

A constatação deste facto levou os autores a pensar na existência de formas hibernantes. E, tendo-as procurado cuidadosamente, acabaram por descobri-las, por assistir também ao seu desenvolvimento completo e, por fim, passado o indispensável período de repouso, por observar a sua germinação. A estas formas hibernantes chamaram « *Dauerzellen* », designação que tem sido traduzida por *cellules stables*, *resting spores*, *sporocysts*; dar-lhe hemos a forma portuguesa de *esporos de resistência*.

Estas formas hibernantes desenvolvem-se ao mesmo tempo que os soros de esporângios, aparecendo já na primavera mas em percentagem diminuta. De maio em diante o seu número aumenta constantemente.

Os autores puderam verificar que estes esporos de resistência

provêm dos mesmos zoósporos que os soros, desenvolvendo-se semelhantemente até ao sétimo dia após a inoculação. Daí em diante a maior parte das células iniciais formadas completam rapidamente a sua evolução e produzem soros de esporângios; as restantes evoluem lentamente, envolvendo-se de uma dupla membrana, a princípio incolor. Depois, a massa plasmática interior vai-se carregando de granulações de gordura que lhe dão um aspecto opaco, mas nunca côrado; a membrana externa vai-se tornando amarela e finalmente castanha, coloração que denota a completa maturação do esporo.

A evolução, porém, não continua. Postos estes esporos em água, não germinam. Mas, se se deixarem secar as fôlhas que os contêm e, passados, pelo menos, dois meses, se lançarem sobre a terra húmida, a sua evolução interrompida recomeça. Oito a doze dias depois, o parênquima da fôlha putrefaz-se; o conteúdo dos esporos torna-se granuloso e avermelhado, com o aspecto de um esporângio maduro. Colocado agora em uma gota de água, assistiram os autores à individualização dos zoósporos no plasma do esporo e à sua emissão para o exterior. Estes são semelhantes em tudo aos produzidos no interior dos soros. Simplesmente os esporos de resistência davam lugar à formação de um só esporângio, enquanto que os soros, normalmente, davam origem à formação de grande número dêles.

Além destas observações sobre o parasita do *Taraxacum*, acompanhadas de magníficas gravuras, referem-se os autores a um outro fungo, encontrado sobre as fôlhas da *Succissa pratensis*, cuja evolução não puderam seguir, mas que consideram como pertencente ao mesmo género, pela perfeita analogia entre os seus soros de esporângios e esporos de resistência com as formações homólogas do *S. taraxaci*. Deram-lhe por isso o nome de *S. succissae*. E, tendo observado cuidadosamente o parasita que De Candolle encontrou sobre as fôlhas da *Anemone nemorosa* e a que deu o nome de *Dothidea anemones*, fungo que passou depois para o género *Sphaeria*, e mais tarde para o *Urocystis*, notaram a semelhança dos seus esporos de resistência com os do *S. taraxaci*. Afirmam a sua convicção de que tais formações devem estar relacionadas com o período de repouso do parasita, devendo procurar-se os órgãos de multiplicação, correspondentes aos zoosporângios, na época em que a planta hospedeira desenvolve as suas fôlhas.

Dadas estas analogias, julgam os autores dever aproximar esta espécie do género *Synchytrium*, dando-lhe, provisoriamente, o nome de

Chytridium anemones, até que posteriores estudos sobre o seu ciclo evolutivo permitam assinalar-lhe, com relativa segurança, uma posição definitiva.

Assim se criou o género *Synchytrium*, que, nas suas linhas gerais, muito se assemelha aos géneros *Chytridium* e *Rhizidium* de A. Braun, mas que, ao contrário destes, parasita plantas terrestres. Os autores colocam o seu novo género ao lado dos outros dois acima citados, na família das *Chytridiaceas* e caracterizam-no pela *divisão simultânea dos seus glóbulos primários em grande número de esporângios aglomerados em soros*; ao passo que nos *Chytridium* estes glóbulos ficam indivisos e formam um só esporângio, e nos *Rhizidium* se dividem em duas células, uma basilar ramificada, outra terminal, o zoosporângio.

Estavam, pois, lançadas, e com a maior segurança, as bases sobre que haviam de assentar as futuras investigações respeitantes a este grupo de fungos.

Woronin Em 1868 publica Woronin (Woronin, 68) umas *Neue*
1868 *Beiträge zur Entwicklungsgeschichte einiger Chytridineen*, em que se ocupa, entre outros, do ciclo evolutivo do parasita da *Anemone nemorosa*. Não nos foi possível, infelizmente, obter tão antigo trabalho. Sabemos porém que o autor considera já então esta forma como pertencente ao género e lhe dá o nome de *S. anemones*. Estuda também o *S. mercurialis* e descobre que estas duas espécies se distinguem do *S. taraxaci* e *S. succissae* pelo facto de produzirem anualmente uma única geração de zoósporos, os quais, penetrando nas células hospedeiras, formam imediatamente esporos de resistência.

Kühn, Fuckel, Magnus, Kühn (68), Fuckel (69) e Magnus (74), vão
1868 1869 1874 entretanto descobrindo e estudando novas espécies. Até que, em 1870, Schröter publica o primeiro trabalho de conjunto sobre os *Synchytrium* (Schröter, 70). Aí descreve várias espécies novas, menciona curiosas observações sobre a biologia destas e de outras já anteriormente conhecidas, sugere a aproximação das *Chytridiaceas* e das *Palmellaceas* e apresenta um esboço de classificação onde aparecem três grupos: *Eusynchytrium*, *Chrysochytrium* e *Leucochytrium*, o primeiro com várias gerações anuais de zoósporos, os dois últimos com uma só geração e formação imediata de esporos de resistência.

De Bary Em 1884 publica De Bary uma segunda edição, comple-
1884 tamente refundida e muito ampliada, da *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze*. Conhecemos desta obra, excelente para a época em que apareceu, a tradução inglesa de 1887. O autor cria a designação de *Pycnochytrium* para incluir os *Chryso-* e *Leucochytrium* de Schröter.

Esta tradução inglesa de 1887 traz porém um erro grave, que ignoramos se deve imputar-se aos tradutores se ao próprio autor, pois desconhecemos o original alemão. A pág. 168, descrevendo o ciclo evolutivo dos *Eusynchytrium*, diz: « *After a number of such generations (gerações de soros de esporângios) have been produced, partly perhaps owing to internal causes, the formation of resting-cells recommences. The behaviour in germination OF THESE (esporos de resistência) also varies in different species; in some, as for instance S. stellariae (fig. 78) and S. oenotherae, THEY FORM SORI LIKE THOSE OF THE PYCNOCHYTRIAE; in others each resting-cell becomes a single sporangium directly without forming sori, as in S. taraxaci.* »

Na verdade a fig. 78, a que se refere o texto, mostra a germinação de um esporo de resistência de *S. stellariae*, produzindo um soro de esporângios *exógeno*. Acontece, porém, que, segundo afirmam todos os autores posteriores a De Bary, nunca, até hoje, se observou a germinação dos esporos de resistência do *S. stellariae*. Na época em que De Bary escrevia, nem sequer se tinha ainda assistido à germinação dos soros de esporângios daquela espécie (nem das suas afins), ainda que, já então, Schröter tivesse emitido a hipótese, para explicar o aparecimento de uma membrana vasia junto do soro e no interior da célula hospedeira, da formação *exógena* daqueles soros de esporângios, à custa da respectiva célula inicial; hipótese que, como se sabe, foi ao depois inteiramente confirmada pela observação.

Por outro lado, o parasita da *Oenothera biennis*, a que De Bary chama *S. oenotherae* e inclui nos *Eusynchytrium*, não é outra coisa senão o *S. mercurialis*, susceptível de parasitar dois hospedeiros diferentes, a *Oenothera biennis* e a *Mercurialis perennis*; por consequência um *Pycnochytrium*.

Dangeard Em 1888 publica Dangeard a sua *Mémoire sur les Chy-*
1888-90 *tridinées* (Dangeard, 88). É uma « *mise au point* » da questão, acompanhada de descrições minuciosas da biologia de várias

espécies, que termina por umas considerações gerais, em que o autor se ocupa das afinidades dêste grupo de fungos, e a que nos referimos no Cap. V. Dois anos mais tarde (Dangeard, 90) aparecem as *Recherches histologiques sur les champignons*, onde, entre muitos outros fungos estudados, se encontram as primeiras investigações acêrca da citologia dos *Synchytrium*.

Quási todos os autores que citam e discutem as conclusões de Dangeard apenas conhecem extractos dos seus trabalhos, publicados em uma pequena e pouco espalhada revista de província. Nós, que estudámos demoradamente o texto e as figuras que o acompanham, devemos começar por elucidar o leitor a respeito da técnica que usava Dangeard, pois só assim é possível fazer uma idea do valor científico das respectivas descrições.

O autor fixava o seu material — pedaços de fôlhas infectadas pelo *S. taraxaci* — em alcool absoluto. Sem incluir, fazia cortes à mão, còrava-os por uma laca de hematoxilina ou pelo carmim, desidratava e, finalmente, montava-os em glicerina ou bálsamo do Canadá.

Dangeard começa por descrever o núcleo enorme da célula inicial de um soro de esporângios, com uma membrana muito nítida, um grande nucléolo muito cromófilo e pequenas granulações esparsas pelo núcleo-hialoplasma.

« *Maintenant*, diz o autor, *ce noyau va se diviser activement par des bipartitions successives; C'EST UNE DIVISION DIRECTE PAR SIMPLE ÉTRANGLEMENT; le nucléole s'élargit, se sépare en deux; puis la membrane nucléaire s'infléchit entre eux et isole chacune des moitiés (fig. 19 et fig. 21).* » Vão-se ver, porém, as figuras citadas e verifica-se que o que elas representam não são divisões do núcleo primário, isto é, passagens do estado uninuclear ao estado binuclear, mas sim, amitoses em soros já plurinucleados. Certamente, o autor não assistiu à divisão do núcleo primário, pois não deixaria de a representar se a tivesse visto. Viu fases, ainda atrasadas, do desenvolvimento dos soros, com poucos núcleos e, colocados em relação uns aos outros, de tal modo que o autor se convenceu de que estavam a dividir-se por simples estrangulamento. Foram êsses os estados que o autor desenhou, tendo ao depois, naturalmente, generalizado as suas conclusões à divisão do núcleo primário.

Ainda a propósito das divisões nucleares das células iniciais dos soros de esporângios, diz Dangeard: « *Il est bon de remarquer que la division ne se produit pas avec la même intensité dans tous les noyaux;*



il en résulte que, dans la même cellule, CES NOYAUX PEUVENT AVOIR DES DIMENSIONS EXCESSIVEMENT VARIABLES (fig. 21). » Com efeito, a fig. 21 representa um soro ainda com poucos núcleos, em que os mais pequenos não chegam talvez a atingir $\frac{1}{4}$ do volume dos maiores. Observações idênticas fizeram, como adiante se verá, Stevens no *S. decipiens*, Bally no *S. taraxaci* e nós mesmo no *S. papillatum*, interpretando-as porém de maneira inteiramente diversa.

Dangeard descreve depois as últimas fases de desenvolvimento dos soros de esporângios. Os núcleos, que continuam a dividir-se amitoticamente, vão diminuindo sucessivamente de dimensões até atingirem um diâmetro médio de 3 a 4 μ .

Há um momento em que, « *dans chacun d'eux, la chromatine SEMBLE S'ÊTRE ÉGRÉNÉE* »; mas, acrescenta, « *je ne serais pas étonné cependant qu'il y ait là une illusion d'optique due à la très grande densité du protoplasmé.* » É muito possível que esta « *chromatine égrénée* », que o autor viu, não seja mais que a profase de uma mitose cujo desenvolvimento não podia ser seguido com uma técnica tão rudimentar.

Vem depois a formação simultânea dos esporângios, por fragmentação do citoplasma em grandes massas poliédricas separadas por « *une couche de suc protoplasmique incolore* »; os esporângios formados são, logo de comêço, plurinucleados (ausência da fase de protósporos).

Finalmente, Dangeard assistiu à germinação dos esporos de resistência, descrevendo e figurando os fenómenos nucleares que a acompanham.

« *Ces kystes, après un temps de repos plus ou moins long, germent en un sporange ordinaire; la fig. 30 représente le noyau d'un kyste subissant sa première bipartition.* » Na verdade a figura citada representa um esporo de resistência com o núcleo ligeiramente estrangulado a meio e contendo já dois nucléolos.

Umás linhas abaixo, acrescenta o autor: « *La division des noyaux n'a pas toujours lieu selon le mode direct; il est possible, en étudiant un grand nombre d'échantillons, d'observer quelques stades de la karyokinèse; nous en avons représenté quelques-uns dans la fig. 23. Les noyaux ne ressemblent en aucune façon aux noyaux nucléolés ordinaires: le nucléole, en effet, est absent; il en est de même de la membrane nucléaire; au milieu du hyaloplasme, on trouve six ou sept bâtonnets chromatiques un peu en forme de croissants: nous n'avons pu réussir à suivre tous les stades classiques de la division; le protoplasma, trop dense, gêne l'observa-*

tion. *Cependant nous avons vu une structure fibrillaire se montrer en deux points opposés et les deux noyaux-filles arriver à présenter la structure du noyau mère.* »

A fig. 23 do trabalho de Dangeard representa um esporângio, ainda com poucos núcleos que, segundo a interpretação do autor, devem estar em mitose. É possível que realmente assim seja, pois sabe-se que, muito mais tarde, Bally (11) encontrou nos soros de esporângios plurinucleados do *S. taraxaci*, antes da septação, incontestáveis figuras de mitose; ainda que, nos desenhos de Bally, o nucléolo assiste sempre à divisão do núcleo.

Repare-se porém que a descrição e a gravura de Dangeard se não referem a mitoses do núcleo primário, mas sim dos núcleos secundários. Se o autor tivesse assistido à divisão cariocinética de um núcleo primário, não deixaria de a representar, tanto mais que, sendo aquele muito maior que os núcleos secundários, o processo de divisão havia de ser ali muito mais fácil de observar.

Por consequência, quando o autor, resumindo as conclusões do seu trabalho, nos diz, que « *le noyau reste unique assez longtemps, puis il se multiplie par division directe, quelques fois par division indirecte (karyokinèse)* », parece que estamos autorizados a concluir que generalizou novamente observações feitas sobre os núcleos secundários, ao processo de divisão dos núcleos primários.

Não é nossa intenção, note-se bem, denegrir de qualquer modo o valor incontestável das laboriosas e pacientes investigações levadas a cabo em 1890, com uma técnica rudimentaríssima, pelo prestigioso mestre a quem muito consideramos. De resto, trata-se de um trabalho da juventude, sobre um assunto dos mais difíceis da citologia vegetal e ao tempo ainda completamente por desbravar. Posteriormente, muitos outros autores, servindo-se de técnicas complicadas e dispondo de meios de observação mais rigorosos, não conseguiram ver mais que o então jóven chefe de trabalhos práticos da Faculdade de Caen.

Sob o ponto de vista concreto da existência ou não existência de uma mitose na divisão do núcleo primário, o trabalho de Dangeard, pelas razões que apontámos, não pode ter senão um interesse meramente histórico.

Fischer, Rosen
1892 1893

A. Fischer publica em 1892 um trabalho de conjunto sobre os *Phycomycetes* na *Rabenhorst's Krypto-*

gamen-Flora. A êle teremos ocasião de nos referir no Cap. IV a propósito da sistemática dos *Synchytrium*.

Vem depois os trabalhos de Rosen (93) cujo original nos não foi possível obter. Da leitura, de vários extractos ficámos convencidos de que se trata de investigações feitas com uma técnica que nenhuma confiança pode hoje merecer. O autor observou e desenhou uma amitose do núcleo primário no *S. taraxaci*. Bally, que estudou o original e a gravura de Rosen, admite a possibilidade de se tratar de um erro de observação, pois que a sobreposição parcial de dois núcleos podia dar a impressão de um núcleo estrangulado a meio.

Schröter Schröter, depois de ter publicado alguns trabalhos par-
1897 celares sôbre o género (70, 73, 76 e 89), descrevendo bastantes espécies novas e estudando minuciosamente a biologia dêste grupo de fungos, colabora em 1897 no *Engler's Pflanzen Familien* encarregando-se, entre outros capítulos, da exposição das *Chytridinea*, que o autor considera como uma sub-ordem dos *Oomycetes* na classe dos *Phycomycetes*. Trata-se de um estudo de conjunto, onde se não encara a questão da evolução citológica e cujo principal interêsse reside no aspecto sistemático do problema. Por isso a êle nos referiremos com a atenção que merece em capítulo especial.

A contribuição de Schröter para o estudo do género *Synchytrium* é, todavia, muito importante. A êle se deve o conhecimento do ciclo evolutivo das espécies para as quais criou o grupo dos *Mesochytrium*, pois em 1897 já sabia que os soros de esporângios do *S. succissae* e do *S. stellariae* se formavam exògenamente, mas no interior das respectivas células hospedeiras. O resultado das investigações sôbre estas duas espécies, deve pois ter sido publicado em algum dos anteriores trabalhos do autor que só conhecemos de referências e extractos.

Harper Harper (99) interessa-se particularmente pelo processo de
1899 segmentação dos soros de esporângios e estuda, sob êste ponto de vista, o *S. decipiens* e o *S. taraxaci*.

Depois da célula inicial do *S. decipiens* ter atingido as dimensões máximas, o seu núcleo vai dividir-se rápida e repetidamente de modo a encher todo o plasma com grande número de núcleos filhos. Não se refere nunca ao processo de divisão nuclear, a cujas fases certamente não assistiu.

Atingido que foi este estado plurinuclear começa a septação que não é *successiva* nem *simultânea*, mas sim *progressiva*. Quere dizer, os septos começam a formar-se à periferia, a partir da membrana do soro, e vão invadindo pouco a pouco a massa plasmática central, fragmentando-a em lóculos, a princípio com vários núcleos, e finalmente uninucleados.

Esta septação é acompanhada de contracção de volume por perda de água. Quando o processo chegou ao seu termo os segmentos uninucleados encontram-se separados e flutuando em um líquido aquoso contendo numerosas gotículas gordas que tomam avidamente o Laranja G. e enegrecem pelo ácido ósmico.

A estes segmentos uninucleados chama Harper protósporos e considera-os « *as typical vegetative spores homologous with those of Saprolegnia, and the process as representing typical asexual reproduction.* »

Os protósporos não são postos em liberdade. Aumentam primeiro de volume, absorvendo provavelmente a emulsão oleaginosa em que se encontravam suspensos, e enchem de novo todo o espaço interior do soro, comprimindo-se mutuamente e adquirindo, por isso, contornos poliédricos irregulares. Germinam depois *in situ*, transformando-se cada protósporo em um esporângio plurinucleado. A germinação, porém, não é simultânea, nem determinado e fixo o número final de núcleos em cada esporângio; em média 8 a 12, às vezes mais.

Este período de multiplicação nuclear é seguido de uma nova fase de contracção, separando-se os esporângios uns dos outros, arredondando outra vez os seus contornos e envolvendo-se agora de uma verdadeira parede celular.

Terminou a fase de maturação. Os esporângios, depois de um curto período de repouso, vão germinar produzindo zoósporos. « *This formation of swarm-spores, diz Harper, must be considered as a continuation of the stage of nuclear division in the spores which was interrupted by the ripening period. The whole may be roughly characterized as an embryonic stage in the life of the fungus.* »

No *S. taraxaci* as coisas passam-se sensivelmente do mesmo modo; mas a fase de protósporos é suprimida formando-se logo, por septação, esporângios plurinucleados.

Em resumo: para Harper, no ciclo evolutivo do *S. decipiens* podem considerar-se dois períodos: um de reprodução, que começa com

a divisão do núcleo primário da célula inicial e termina com a formação dos protósporos; outro de desenvolvimento vegetativo, com uma fase embrionária, que vai do crescimento dos protósporos à germinação dos esporângios, e uma fase post-embrionária, que tem o seu início nos zoósporos e termina na célula inicial madura, uninucleada.

Nenhuma referência, durante todo o trabalho, ao processo de divisão dos núcleos.

Lüdi Com o trabalho de Lüdi (01) entramos em um período novo
1901 da história das investigações sobre os *Synchytrium*.

Pondo de parte o estudo sobre o *Cladochytrium menyanthis* de Bary, que não interessa agora ao nosso ponto de vista, podemos considerar duas partes no trabalho do autor. Na primeira, Lüdi procura demonstrar — e demonstra-o, brilhantemente — « *dass die morphologischen Charaktere allein nicht genügen zur Unterscheidung der Arten; denn die Verschiedenheit der morphologischen Charaktere bedingt noch nicht Verschiedenheit, und Gleichheit derselben bedeutet nicht Identität von Formen auf verschiedenen Nährpflanzen. Daher muss zur morphologischen Beschreibung unerlässlich das Experiment treten.* »

O autor foi levado a esta conclusão, inteiramente revolucionária, pelo estudo das variações dos diferentes caracteres morfológicos até então empregados para a determinação específica dos *Synchytrium*. Assim, a forma e dimensões das galhas, o tamanho dos soros de esporângios e esporos de resistência, o número destes últimos em cada célula hospedeira bem como a sua forma e posição; a existência e natureza do plasma remanescente no interior da célula hospedeira, o tamanho relativo desta e dos esporos que contém; a cor e o aspecto da parede destes, bem como a do pigmento que no interior das galhas se forma sob a acção excitante do parasita, todos os caracteres, em suma, adoptados para a individualização das espécies, ou variam para muitas dentro de tão largos limites, ou dependem a tal ponto do próprio hospedeiro, da constituição histológica do órgão atacado e da intensidade da infecção, que não podem ser tomados em rigor como caracteres específicos.

« *Ferner ist die Warscheinlichkeit gross, dass diese Variabilität ihren Ursprung darin findet, dass die als äussere morphologische Merkmale den Synchytrien zugeschriebenen Eigenschaften nicht diesen angehören, sondern vielmehr spezifische Eigenheiten der Wirthspflanze sind, dass*

somit verschiedene Wirthspflanzen in verschiedener Weise auf denselben Parasiten reagiren, und umgekehrt zwei wirklich verschiedene *Synchytrium*arten auf anatomisch ähnlichen Nährpflanzen morphologisch gleiche Erscheinungen hervorrufen können.»

Daqui a necessidade indispensável de proceder *experimentalmente* à determinação das espécies.

Na segunda parte do trabalho, Lüdi expõe os métodos empregados e os resultados obtidos nas infecções experimentais que realizou com zoósporos de *S. taraxaci*. O autor procurava assim verificar se o parasita do *Taraxacum officinale* era realmente uma espécie diferente das outras espécies de *Synchytrium*; e, por outro lado, determinar o grau de especificidade do parasita.

Para isso experimentou se era possível infectar outros géneros de Compostas mais ou menos aparentados com os *Taraxacum*. Tendo operado sobre 238 exemplares pertencentes a 40 espécies diferentes, não conseguiu nenhuma infecção; experiências de contraprova, feitas simultaneamente sobre o *Taraxacum officinale*, deram, em geral, resultados positivos.

Passou em seguida a investigar do grau de especificidade do parasita dentro do género do seu hospedeiro habitual. Empregando sempre a mesma técnica, a fim de que fôsem comparáveis os resultados, conseguiu assim apurar que o *S. taraxaci* era susceptível de infectar também, e em elevada percentagem (81 %), o *Taraxacum ceratophorum* DC., o *T. erythrospermum* Andrz., e o *T. palustre* DC.; mas não atacava o *T. leptcephalum* Reichb., o *T. Gymnanthum* DC., nem o *T. corniculatum* DC.

De tudo isto conclui Lüdi « dass *S. taraxaci* nicht nur in morphologischem Sinn, sondern vielmehr noch in biologischer Hinsicht eine scharf abgegrenzte Art ist, und dass zum mindesten bei den *Eusynchytrien* eine hochgradige Specialisirung auf besondere Nährpflanzen vorhanden ist, die dem Systematiker das Mittel an die Hand giebt, eine genaue Unterscheidung der *Synchytrium*arten vorzunehmen.»

Behla Behla (03) vem apresentar um aspecto inteiramente inédito no estudo das *Chytridiaceae*.

O autor dedica-se a investigações sobre o cancro. As suas estatísticas e as observações de Aschoff mostram que são de preferência atacadas pela terrível enfermidade as pessoas que vivem mais em contacto com a terra. Levou o êste facto a admitir a hipótese de

que o tão procurado agente do cancro podia muito bem ser um parasita vegetal.

Posta de parte a *Plasmodiophora brassicae* que não deu resultados positivos, conseguiu o autor obter, nas suas experiências de infecção, edemas de aspecto canceroso por inoculação de esporos de *Chytridiaceae* (1).

O estudo histológico destes edemas mostrou que nêles « *dieselben Körperschen erzeugen liessen, wie wir sie beim Krebsprozesse beobachten, die X-Körperchen, das Wachsen, Sporangien mit Schwärmsporen, Zellvergrößerung, Zellproliferation, asymmetrische Mitosen, etc.* »

Os corpúsculos, conhecidos dos anátomopatologistas pela designação de *vogelaugenartigen Körperschen*, não são senão zoósporos e os seus grupos, esporângios de *Chytridiaceae*. O facto de tais formações se encontrarem também em tumores benignos e em simples processos inflamatórios das mucosas, não demove Behla de suas opiniões, pois que, por um lado, pode haver *Chytridiaceae* menos virulentas, e, por outro lado, pode a eclosão do tumor maligno ser precedida de uma longa e inofensiva simbiose entre o fungo e o seu hospedeiro.

Tais são as conclusões do trabalho de R. Behla. Como adiante veremos não só não foram confirmadas, como se demonstrou a incapacidade dêste grupo de fungos para o parasitismo animal. Por isso a hipótese de Behla foi posta de parte e as investigações sobre o cancro estão sendo hoje dirigidas por outros caminhos.

Stevens Stevens (03) assistiu, pela primeira vez, à divisão do núcleo primário da célula inicial do *S. decipiens*.

A divisão é uma mitose. Mas o fenómeno deve passar-se tão rapidamente que raríssimas foram as fases encontradas, a-pesar-do grande número de cortes observados. Assim Stevens só conseguiu ver e desenhar os primeiros estados, até à metafase.

Loewenthal Loewenthal (05), interessado no estudo do cancro, procura verificar as conclusões de Behla. Os resultados a que chegou foram inteiramente negativos, o que o levou a pôr de parte as *Chytridiaceae* como possíveis agentes do cancro.

(1) Rahn, que resumiu o trabalho para o *Centrb. f. Bakt.*, não menciona género nem espécie, nem indica a natureza dos esporos empregados.

« Will man nun die Chytridiaceen mit einen supponierten Krebsparasiten vergleichen, so können hier nur die verschiedenen Krebseinschlüsse in Betracht kommen; zwischen diesen und den untersuchten Chytridiaceen kann ich keinerlei morphologische Ähnlichkeit finden. Eine Vergleichung des Entwicklungsgang der Krebseinschlüsse nichts Sicheres bekannt ist. Ich muss also noch wie vor (04) zu dem Schluss kommen, dass bisher keine Anhaltungspunkte dafür vorliegen, den Krebs mit den Chytridiaceen in Zusammenhang zu bringen. »

Aproveitou o autor a ocasião para publicar algumas observações citológicas sobre o *S. anemones* Woronin, o *Olpidium Diksonii* (Wright) Wille e uma outra *Chytridiaceae* por ele descoberta, a que deu o nome de *Zygorhizidium Willei* nov. gen., nov. sp. Ao nosso ponto de vista só interessam as que se referem ao *S. anemones* e essas mesmo escassamente pois o autor só teve ocasião de estudar os esporos de resistência adultos, não tendo assistido nem à sua formação nem à germinação.

Os casos que Loewenthal menciona de núcleos primários desprovidos de membrana, com uma demarcação pouco nítida e *échancrée* entre o plasma nuclear e o citoplasma, são, a nosso ver, imperfeições de fixação que o *Schaudinn* produz amiúde nos esporos de paredes muito espessas e difícil penetração.

Viu também dois espessamentos polares, na membrana nuclear dos zoósporos, colocados na direcção do movimento. O flagelo é posterior, geralmente único, algumas vezes duplo; raramente 3 a 4 flagelos.

Algumas observações o levaram a supor a existência de uma conjugação entre os zoósporos; mas o autor narra o facto sob tôdas as reservas, como quem não está muito convencido da sua exactidão.

Rytz 1907 O trabalho de Rytz (07) é manifestamente influenciado pelas anteriores investigações de Lüdi.

O conhecimento de certos grupos de fungos (*Ustilaginaceae* por exemplo) veio modificar consideravelmente o conceito clássico de espécie. Veio mostrar que, além das *espécies morfológicas*, se podem considerar outras, impossíveis de distinguir por caracteres morfológicos, mas facilmente separáveis por seu comportamento biológico. São formas parasitas, idênticas na forma e nas dimensões, mas com hospedeiros diferentes e bem determinados,

« *Es ist klar, diz Rytz, dass diese « biologischen Arten » wie man sie nennt, nicht völlig in eine Linie zu stellen sind mit jenen, deren Artcharakter auch im morphologischen Bau zum Ausdruck gelangt; die Annahme war aber nahegelegt, in diesen biologischen Arten die Anfänge für wirkliche morphologische Arten zu sehen und somit eine Möglichkeit der Artentstehung gefunden zu haben.* »

Sob esta idea directriz procurou investigar até que ponto podia ser considerada como uma espécie única o *S. aureum* Schröt., para o qual já então haviam sido mencionadas mais de cem espécies de hospedeiros, pertencendo a famílias filogeneticamente muito afastadas.

O método das inoculações experimentais, empregado por Lüdi com tão belos resultados, teve Rytz que o abandonar, por não conseguir obter zoósporos da germinação dos esporos de resistência e ser o *S. aureum* desprovido de soros de esporângios. Privado assim do mais seguro processo de investigação, viu-se o autor reduzido ao estudo comparativo do conjunto dos caracteres morfológicos do parasita nos diferentes hospedeiros e a observações feitas na natureza.

Se encontrava lado a lado duas ou mais espécies, tidas como hospedeiras do *S. aureum*, uma delas largamente infectada e as restantes intactas, mas em posições tais que só uma preferência do fungo pudesse logicamente explicar tal escolha, concluía o autor que os parasitas encontrados sobre esses dois grupos de hospedeiros deviam pertencer a espécies biológicas diferentes.

Contra a opinião de Lüdi, deu Rytz grande importância à forma das galhas, considerando esse caracter, a-pesar-das oscilações a que está sujeito, como próprio do fungo e largamente utilizável na determinação específica.

Depois de um largo e bem documentado estudo, conclui o autor pelo desmembramento do antigo *S. aureum* Schröt. em várias espécies, umas apenas biológicas, outras susceptíveis de distinção pelo conjunto dos seus caracteres morfológicos.

Infelizmente não pode o assunto considerar-se arrumado. Rytz apresenta como hipóteses, carecendo de ulterior confirmação, algumas das suas conclusões. As observações na natureza estão com efeito muito longe de ter a força probatória das inoculações experimentais de Lüdi.

Termina o trabalho de Rytz por um estudo do ciclo evolutivo e da citologia de três espécies ainda mal conhecidas: *S. succissae* de Bary e Wor., *S. alpinum* Thomas e *S. cupulatum* Thomas. No pri-

meiro assistiu o autor a tôdas as fases do desenvolvimento dos soros de esporângios à custa das respectivas células iniciais e documenta as suas observações com belas gravuras. A fase de protósporos, que Harper havia descoberto no *S. decipiens*, não existe no *S. succissae*; por septação do soro formam-se logo esporângios plurinucleados. Viu também a germinação dos esporos de resistência do *S. alpinum* e *S. cupulatum* até à formação dos soros; mas não conseguiu que estes produzissem zoósporos.

Quanto ao processo de divisão nuclear, tão insistentemente procurado por todos os que da citologia dos *Synchytrium* se têm ocupado, o autor confessa-se sem elementos para sobre êle emitir um juízo. ; A-pesar-dos milhares de cortes que estudou, não conseguiu encontrar um único núcleo primário em divisão! E nos núcleos secundários apenas viu uma figura, que representa, e que supõe ser uma *metafase*, sem todavia poder garanti-lo terminantemente. Convém ter êste facto bem presente para poder avaliar da rapidez com que se passam estes fenómenos de divisão nuclear e da conseqüente dificuldade da sua observação.

Stevens 1907 Stevens (07) volta a ocupar-se da citologia dos *Synchytrium*, em um trabalho que tem para nós especial interêsse, porquanto nêle se fazem, pela primeira vez, referências à citologia do *S. papillatum*.

Começa o autor por confirmar as conclusões do seu trabalho anterior (03) e declara que « *structures showing a primary mitosis practically identical with that exhibited in S. decipiens were found also in S. fulgens and S. papillatum.* » Factos ulteriores, porém, levaram-no a admitir a hipótese de que poderia haver, a par dêste processo mitótico, bem estabelecido, de divisão dos núcleos primários, um outro amitótico.

Com efeito, Stevens encontrou estados atípicos dos núcleos primários, antes da divisão, que não podem intercalar-se nas fases da cariocinese por êle descritas. Por outro lado encontrou soros, não septados ainda, mas possuindo já muitos núcleos de dimensões consideravelmente diferentes e corpúsculos com o aspecto, tamanho e afinidades cromáticas dos nucléolos, dispersos pelo citoplasma, não fazendo parte de uma estrutura nuclear definida.

Estes factos, conjugados com a falta de estados intermediários entre a fase uninucleada e a fase plurinucleada, levaram o autor a

admitir a possibilidade de existência de um segundo processo de divisão do núcleo primário, consistindo talvez em um esfacelamento simultâneo (*a simultaneous breaking of*) do núcleo único primitivo em grande número de núcleos secundários.

Nos soros plurinucleados, antes da septação encontrou numerosos ásteres dispersos pelo citoplasma e parecendo não estar em relação com os núcleos. Posteriormente, segundo a interpretação de Stevens, núcleos e ásteres aproximar-se-iam, tomando a membrana nuclear uma forma ovóide e voltando para o áster a extremidade mais adelgada, como se uma atracção por parte daquele se exercesse sobre o núcleo.

Entre este estado e as metafases que se seguem não encontrou formas de transição. Porém as metafases e anafases que o autor representa e descreve mereceram-nos especial atenção, pois delas discordam, como adiante se verá, as nossas observações. Com efeito afirma Stevens que o nucléolo desapareceu por completo antes da metafase, não se percebendo também nesta altura quaisquer vestígios de áster nem de centrosoma. A membrana do núcleo porém conservou-se e o fuso é claramente intranuclear. As figuras de anafase são muito estiradas; desapareceu a membrana nuclear e continua a não se perceber quaisquer vestígios de áster.

Após a septação, a multiplicação nuclear continua; mas o autor não menciona quaisquer diferenças entre as mitoses anteriores e posteriores à formação dos septos.

A estampa que acompanha o trabalho não traz legenda, de modo que é impossível saber, para cada uma das figuras, a qual das espécies de *Synchytrium* diz respeito.

Kusano As investigações de Kusano (07, 07, 08, 09) são, sem 1907-08-09 sombra de dúvida, das mais notáveis que até hoje se têm feito sobre a citologia dos *Synchytrium*.

Usando de uma técnica impecável — fixação em Flemming ou Keiser, coloração pelo triplice Flemming ou hematoxilina férrica — e tendo tido a felicidade de cair sobre um parasita eminentemente favorável aos estudos que ia empreender — o *S. puerariae* Miyabe — as conclusões de Kusano marcam pela segurança dos factos em que se apoiam.

O autor estudou especialmente o fungo que Miyabe descobrira pouco antes; a título de comparação, para verificar as suas conclu-

sões, o *S. decipiens*, que tinha já sido objecto de trabalhos importantes de Harper e Stevens.

A biologia do *S. puerariae* afasta-se consideravelmente da de tôdas as outras espécies. Em primeiro lugar o parasita não ataca, como os outros *Synchytrium*, células epidérmicas, mas sim os tecidos profundos, não clorofilinos, da fôlha ou dos ramos novos de uma leguminosa japonesa, a *Pueraria thunbergiana* Benth. Por outro lado não produz esporos de resistência; hiberna, sob a forma de soros de esporângios, abrigado nos tecidos profundos do caule do hospedeiro; na primavera estes soros intumescem, germinam, rasgando as assentadas superjacentes, e os zoósporos, postos assim em liberdade, recommçam um período activo de infecções e formação de novos soros.

Daqui as consideráveis facilidades que o autor encontrou. Peças de fácil penetração aos fixadores; material abundante e encontrando-se quasi todo o ano em condições favoráveis ao estudo.

Kusano conseguiu averiguar que os zoósporos penetram pelas fendas estomáticas, atravessam os espaços intercelulares do tecido clorofilino hipodérmico, quimiotáticamente atraídos por substâncias segregadas pelo parênquima incolor subjacente, e vão infectar uma célula dêste tecido. Uma vez aí instalados, aumentam rapidamente de volume, dissolvem, primeiro, a parede da sua célula hospedeira e logo depois as paredes das células vizinhas, passando daí em diante a desenvolver-se em um espaço lisigénico, intercelular, rodeados pelo simplasto resultante da fusão das células cujas paredes foram destruídas. Kusano afirma, porém, que o parasita, cuja acção é tão enérgica sôbre as membranas celulares, não digere o simplasto, que se conserva sensivelmente intacto até à última fase do desenvolvimento do fungo. E ainda mesmo quando esta derradeira fase é atingida e o simplasto começa a dar mostras de degenerescência e vai pouco a pouco desaparecendo, crê o autor, que o facto deve antes attribuir-se a uma auto-desorganização do que pròpriamente à acção do fungo.

Tudo isto — modo de penetração dos zoósporos, natureza dos tecidos atacados, desenvolvimento, primeiro intra- e depois intercelular do parasita, acção dêste sôbre o plasma do hospedeiro — são factos, ao que parece bem observados, mas em manifesta discordância com tudo o que até então se sabia da biologia dos *Synchytrium*.

As investigações de Kusano sôbre a evolução nuclear do parasita são de uma grande clareza.

O núcleo primário da célula inicial, antes da divisão, tem um grande corpúsculo contendo tôda ou quási tôda a cromatina nuclear. O autor chama-lhe nucléolo primário. Quando se aproxima o período de divisão, formam-se, à custa dêste, nucléolos secundários e granações de cromatina que se distribuem pelo plasma nuclear. A segregação de cromatina continua, tanto no nucléolo primário como nos secundários, que vão assim perdendo as suas afinidades para os còrantes e acabam por ser constituídos apenas por substância acromática ou *plastina*, perdendo a forma primitiva regular e transformando-se em massas estriadas.

Da cromatina, segregada pelos nucléolos, uma parte dissolve-se e a restante reúne-se em cinco massas globosas que são os cinco cromosomas.

No seio das massas acromáticas estriadas, resultantes da transformação última dos nucléolos, vai agora formar-se o fuso que é manifestamente de origem intranuclear.

As restantes estrias tornam-se cada vez menos aparentes e transformam-se finalmente em uma massa granulosa mal còrada, que forma um halo em volta do fuso.

Antes da metafase, a membrana do núcleo, que se havia espessado mercê da deposição de granações cromáticas, desaparece completamente. Os cinco cromosomas dispõem-se agora em placa equatorial, dividem-se, e os grupos de cromosomas filhos caminham para os polos, já unidos em uma massa única. As figuras de anafase são bastante estiradas. O fuso adelgaça-se a meio e parte-se, indo as fibrilhas acromáticas que o compõem unir-se à massa cromática dos cromosomas para dar o nucléolo dos dois núcleos secundários.

No fim da telofase aparece, junto de cada uma das massas cromáticas, uma formação semelhante a um centrosoma, com fibrilhas asteróides radiantes. A membrana nuclear vai formar-se à custa dessas fibrilhas, por um processo inteiramente semelhante ao descrito por Harper (97), e depois largamente confirmado por outros, nos ascósporos dos *Ascomycetes*. O nucléolo filho aproxima-se do centro do áster; forma-se no citoplasma envolvente uma zona mais hialina; as fibrilhas acromáticas inflectem-se, circundam o novo núcleo e acabam por lhe formar uma membrana em tôda a volta.

A esta formação, que aparece no seio do citoplasma ao terminar da telofase e vai dar origem à membrana nuclear, não pode cha-

mar-se com propriedade um centrosoma. O autor dá-lhe por isso o nome de *cariodermatoplasto*.

Os núcleos secundários, bem como todos os outros que deles derivam, dividem-se por mitoses que apenas diferem da do núcleo primário pela ausência de um halo na metafase. O processo continua, sem alterações, ainda depois da individualização dos esporângios.

Em cada geração de núcleos há pois uma fase em que o nucléolo possui, além da sua própria plastina, tôda a cromatina nuclear. Segue-se-lhe um período de separação das massas acromáticas e da cromatina. Esta, porém, não é tôda empregada na formação dos cromosomas, dissolvendo-se a cada mitose uma parte que vai impregnar o citoplasma. Os nucléolos da geração seguinte são constituídos pela fusão da massa cromática dos cromosomas com metade das fibrilhas do fuso.

Segundo o autor, a citologia do *S. decipiens* concorda inteiramente com a do *S. puerariae* e difere em muitos pontos das conclusões de Stevens.

Guttenberg 1908 Do trabalho de Guttenberg (08) não nos foi possível obter o original. Do extracto no *Bot. Centr.*, e das referências que lhe fazem os outros autores depreende-se que Guttenberg estudou o *S. mercurialis*, o *S. anemones* e o *S. anomalum*, principalmente sob o ponto de vista da acção do parasita sôbre a célula hospedeira.

O que mais interessa na descrição do autor são as alterações nucleares.

O núcleo da célula atacada aumenta extraordinariamente de dimensões, chegando a atingir, no *S. mercurialis*, um volume *duzentas e cinqüenta vezes maior que o primitivo (!)*. Os nucléolos também engrossam muito e fragmentam-se por vezes. As granulações cromáticas tornam-se maiores e mais numerosas.

Contra a parede do esporo em formação vem adaptar-se o núcleo hipertrofiado da célula hospedeira, vendo-se aparecer no interior dêste e no ponto de contacto com o parasita, um canalículo que vai avançando para o interior e ramificando-se. Se entram dois zoósporos na mesma célula, o núcleo desta forma dois canais e coloca-se entre os parasitas. As partes mais densas do conteúdo nuclear do hospedeiro acumulam-se agora na vizinhança dos canalículos e vão sendo por estes conduzidas até ao fungo.

O autor conclui que o parasita absorve a substância nuclear do hospedeiro por intermédio destes sistemas de canais.

Griggs 1908-09 Griggs (08, 09, 09, 09) continua as investigações de Stevens sobre o *S. decipiens*. Confirma os resultados de Kusano sobre o momento de aparição e a função cariodermatoplástica dos ásteres. Mas afirma que depois da divisão do núcleo primário há um período de multiplicação amitótica seguido de uma fase terminal de divisão cariocinética.

As amitoses, que o autor estudou cuidadosamente, são de dois tipos. Na *gemulação nuclear (nuclear gemmation)* pequenas porções de cromatina aproximam-se da parede do núcleo, emergem, formando uma gémula, e destacam-se para o seio do citoplasma como novos núcleos. Na *heterosquize (heteroschizis)* a membrana nuclear dissolve-se, a cromatina fragmenta-se e, de cada pedaço, se vai formar um novo núcleo.

Nas mitoses ulteriores o autor encontra quatro cromosomas apenas, como Stevens e ao contrário de Kusano, que afirma serem aqueles em número de cinco.

Percival 1910 Percival (10), em um magnífico trabalho, lindamente ilustrado, estuda a biologia e a citologia do *S. endobioticum*, que poucos anos antes (1900) havia aparecido em Inglaterra e produzia, já em 1908, enormes prejuízos aos cultivadores de batata: « *The pest, diz Percival, has now spread through several of the midland counties of England and has been reported from Wales, Scotland and Ireland. Where it has appeared it has become one of the most serious troubles of the potato grower and it threatens to destroy the industry unless measures are taken to check its progress.* »

A espécie, descoberta por Schilberszky (96), tinha então recebido o nome de *Chrysophlyctis endobiotica*. Percival, porém, tendo em atenção as profundas analogias que encontrou entre o parasita da batata e os representantes do velho género *Synchytrium*, propõe a substituição do nome primitivo pelo de *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.

Das conclusões do autor acerca da biologia do parasita, nada mais acrescentaremos ao que dissemos a pág. 13, quando tratámos do seu ciclo evolutivo, factos cujo conhecimento se ficou devendo ao eminente fitopatologista inglês.

Vejamos agora os resultados das investigações de Percival sobre a evolução citológica do fungo em questão.

A célula inicial que se vai desenvolver em um soro de esporângios, distingue-se muito cedo da que há-de transformar-se em esporo de resistência, por um protoplasma mais denso. Aquela, ao atingir a maturação, possui um volumoso núcleo com uma membrana bem aparente, algumas granulações de cromatina irregularmente distribuídas, poucas fibras de linhina e um grande nucléolo fortemente impregnado de cromatina.

« With the beginning of the reproductive stage the chromatin of the nucleus often becomes associated with the linin threads. The nucleolus becomes vacuolated and loses its staining power, at the same time the nucleus shrinks and soon disappears entirely, the chromatin contained within it being found in the form of very distinct « chromidia » scattered through the cytoplasm of the parasit; round the chromidia small vacuoles appear and nuclei arise at these points. »

Estes núcleos secundários continuam a dividir-se amitoticamente até atingirem dimensões excessivamente pequenas. Nessa altura intervém uma mitose que o autor figura mas não descreve. As gravuras representam metafases, de fuso intranuclear, sem centrosomas nem ásteres. A membrana nuclear persiste, pelo menos, até à metafase; os cromosomas são globosos e em pequeno número (talvez quatro, pelo que se pode ver nas figuras). Não se vêem vestígios de nucléolo dentro ou fora dos núcleos em mitose.

Os zoósporos que destes núcleos resultam são pequeníssimos — $1,5 \mu$ de diâmetro — e todos iguais.

Mais interessantes ainda as observações que dizem respeito à formação e germinação dos esporos de resistência. O plasma das células iniciais que hão-de vir a transformar-se nestes esporos, não possui, a princípio, uma membrana que o separe do plasma da sua hospedeira, de modo que os limites respectivos são imperceptíveis. O núcleo do parasita também não é limitado, de começo, por uma membrana própria.

A inicial, porém, cresce rapidamente; os seus contornos tornam-se nítidos, mercê da formação de uma delgada membrana envolvente; o núcleo, que também aumentou consideravelmente de volume, aparece agora rodeado de uma membrana própria, e contém além de um grande nucléolo, esférico e fortemente impregnado de cromatina, um outro corpo de contornos irregulares e expansões amibóides,

encostado ao nucléolo e muito pouco cromófilo. Percival considera-o homólogo do *Kerngerüst*, que Guttenberg havia descrito anteriormente no núcleo de outros *Synchytrium* e a que Pavillard chama *corpo cromático acessório*.

Pela descrição do autor parece depreender-se que a formação do esporângio único, à custa dêste esporo de resistência, se dá logo após a maturação da célula inicial e sem interposição de qualquer período de repouso. Êste só sobrevém depois do esporângio formado, porquanto « *the sporangial wall gradually thickens as zoospore production proceeds and finally measures about 2 μ in thickness.* »

A formação dos núcleos secundários, à custa do núcleo primário da célula inicial, é descrita com grande precisão e acompanhada de belas gravuras (1).

O nucléolo do núcleo primário começa por expulsar a sua cromatina, vacuolizando-se e perdendo as suas afinidades para os corantes básicos. Ao mesmo tempo que isto se dá, aumenta a colorabilidade do *kerngerüst*, em cuja massa se vêem mesmo granulações cromáticas (figs. 10 e 11). Em uma segunda fase, a cromatina começa a sair do núcleo, acumulando-se primeiro sôbre a membrana nuclear, dando muitas vezes a impressão de que é conduzida pelas expansões pseudopodiais do *kerngerüst* (fig. 13 e outras, que não reproduzimos, 22, 23, 24, etc.). Em uma terceira fase, quási tôda a cromatina se encontra disseminada no citoplasma, tendo aí dado lugar à formação dos núcleos dos zoósporos. Entretanto o núcleo e o nucléolo contraíram-se fortemente, a membrana nuclear engehou-se e acaba por se dissolver. Finalmente, no esporângio maduro, o que resta do nucléolo e do *kerngerüst* aparece, no seio da massa plurinucleada, como um resíduo informe (fig. 13).

Durante todo o decurso da evolução dêstes esporos não viu o autor quaisquer vestígios de mitoses.

Os zoósporos produzidos por germinação dos esporos de resistência são maiores que os que provêm dos soros de esporângios (2 a 2,2 μ) e, muitas vezes, não são todos do mesmo tamanho. Êste facto leva o autor a admitir a possibilidade de uma conjugação entre êles, de que todavia não encontrou vestígios, a-pesar-de os ter procurado cuidadosamente.

(1) As nossas figuras n.ºs 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 (Est. III) reproduzem respectivamente as de Percival, n.ºs 21 b, 18 a, 21 c, 21 d, 21 e, 19, 20.

Á Percival não interessava grandemente o problema das alterações citológicas produzidas pelo parasita sobre o hospedeiro. Apenas, referindo-se ao processo de penetração nos tecidos profundos, diz: « *The organisms stimulate the invaded cell and at the same time appear to stimulate division and growth in the adjoining cells. As the new tissue is pushed out from the irritated eye of the tuber fresh infection occurs and this is repeated and continues throughout the summer months.* »

Bally 1911 Bally (11) estuda, além do *Urophlyctis Rübsaameni* Magn., que não interessa agora ao nosso ponto de vista, o *S. taraxaci* e o *S. endobioticum*. Trata-se de um trabalho de citologia, em que se procura seguir a evolução nuclear dos parasitas, sua influência sobre as células hospedeiras, e daí tirar conclusões sobre as afinidades deste grupo de fungos.

Vejamos as conclusões do autor a respeito do aspecto morfológico da questão; adiante nos ocuparemos de seus pontos de vista acêrca do problema filogenético (Cap. V).

Nas investigações sobre o *S. taraxaci*, empregou como fixador, exclusivamente, a mistura alcool-acética (Strassburger).

Descreve o núcleo primário da célula inicial dos soros de esporângios, a cuja divisão não assistiu. Descreve as três fases, já conhecidas, da saída da cromatina para o citoplasma. Na primeira, quasi tôda a cromatina se encontra armazenada no nucléolo; na segunda, encontra-se disseminada pelo núcleo, apresentando-se o nucléolo vacuolizado e menos cromófilo; na terceira fase, vamos encontrá-la espalhada pelo citoplasma. « *Die Frage, acrescenta Bally, ob aus diesen in das Cytoplasma übergewanderten Chromatinstücken dort neue Kerne ihren Ursprung nehmen oder ob sie aufgelöst werden, kommt für dieses Object nicht entschieden werden.* »

A existência de soros não septados com núcleos de tamanhos muito diferentes podia na verdade encontrar uma explicação nesse processo de multiplicação nuclear por emissão de cromídias. O autor admite isso como uma hipótese, ao lado de outras igualmente aceitáveis. Podiam, por exemplo, os núcleos dividir-se uns mais rapidamente que outros; ou os mais volumosos provirem de um fenómeno de conjugação prévia. Em apoio desta última hipótese poderiam ser chamadas algumas observações do autor e as clássicas e discutidas figuras de Dangeard e de Rosen representando pretensas divisões amitóticas.

Os soros mais atrasados que Bally encontrou, apresentavam já 8 a 16 núcleos. Dêsse estado em diante as divisões fazem-se regularmente por meio de mitoses.

Os núcleos, ao entrarem em profase, apresentam uma rêde laxa de filamentos de linhina, com granulações cromáticas, um nucléolo vacuolizado, deformado por vezes e com poucas afinidades para os corantes. Fibrilhas de linhina e grânulos de cromatina provenientes certamente do nucléolo.

Em uma dada altura da profase e antes da dissolução da membrana nuclear, aparece o nucléolo junto da parede do núcleo, *mas do lado de fora*. Êste nucléolo persiste, vacuolizando-se cada vez mais, até ao fim da anafase, acabando depois por se dissolver completamente.

O fuso forma-se à custa das fibrilhas de linhina já existentes, que agora se dispõem paralelamente e convergem depois para os polos, onde não existem centrosomas nem ásteres. Os grânulos de cromatina agregam-se pouco a pouco e formam quatro cromosomas que se dispõem em placa equatorial. A membrana nuclear dissolve-se; mas o plasma granuloso extra-nuclear conserva-se separado da figura de mitose por uma zona areolar hialina. Na anafase, as duas massas de cromosomas afastam-se consideravelmente uma da outra, vendo-se apenas a porção média do fuso, reduzida a uma ou duas fibrilhas finíssimas e extremamente alongadas. Estes vestígios do fuso, diz Bally, nem se partem, nem contribuem para a formação dos núcleos filhos, como afirmou Kusano; dissolvem-se simplesmente no plasma ambiente, uma vez terminada a telofase.

Quanto à formação das novas membranas nucleares, não viu o autor que nela interviesse qualquer coisa de parecido com um cario-dermatoplasto. Em cada uma das massas de cromatina, provenientes da concrecência dos cromosomas, aparece um vacúolo central que aumenta de dimensões; a parede envolvente, muito desigualmente espessa, é que vai dar a membrana nuclear, dilatando-se e adelgaçando sucessivamente. Dos intumescimentos primitivos, que acabam por se destacar da parede, um, muito volumoso, dará o futuro nucléolo, enquanto que alguns outros, de exíguas dimensões, ficarão no núcleo como granulações cromáticas.

Até à septação do soro, as mitoses são isócronas em toda a massa plasmática; depois, o isocronismo mantém-se apenas dentro de cada esporângio.

No interior destes continuam as divisões nucleares segundo o esquema já descrito. A única diferença consiste no comportamento do nucléolo, que não assiste à mitose, sendo tãda a sua massa empregada na formação dos cromosomas e do fuso.

Bally é de opinião que « *die Zusammensetzung des Nucleolus, der ausser der in den Chromosomen sich abscheidenden Erbsubstanz und dem Kinetoplasma noch zur Ernährung dienende Stoffe in sich speichert, lässt uns dies ganze Verhalten erklärlich finden. Aus einer Periode, in der das Ansammeln von Nähr- und Reservestoffen die wichtigste Lebenserscheinung ist, tritt das Synchytrium in eine andere Periode, in der die Bildung von zur Verbreitung der Art dienenden Schwärmosporen in den Vordergrund rückt.* »

As observações que dizem respeito à influência do parasita sobre o hospedeiro têm menos interêsse. Afirmo o autor que, como no *S. puerariae*, as paredes da célula hospedeira, e de algumas vizinhas, são atacadas e dissolvidas, formando-se assim um simplasto. Julga também que, como na espécie que Kusano estudou, o parasita atacaria de preferência células subepidérmicas. A nós afigura-se-nos sem fundamento bastante qualquer destas asserções.

Quanto ao *S. endobioticum*, as observações do autor concordam com as de Percival, publicadas pouco antes e feitas, por certo, simultâneamente. De novo acrescenta Bally poucos factos. Citemos dois que se nos afiguram de maior interêsse.

A membrana externa do esporo de resistência provém da lenhificação da parede celulósica da célula hospedeira.

A excitação provocada pela presença do parasita promove, como de costume, uma hipertrofia nuclear nas células atacadas. Mas os núcleos destas são ainda susceptíveis de se dividirem muito tempo depois de se ter dado a infecção e fazem-no por mitoses perfeitamente regulares.

Este último facto, da proliferação das células infectadas, pôsto em evidência por Bally, é importante e explica, mais satisfatòriamente que a hipótese de Percival (pág. 43), a penetração do parasita nos tecidos profundos do hospedeiro.

Tobler 1913 O magnífico trabalho que Gertrud Tobler (13) modestamente intitula *Studien zu einer Monographie der Gattung Synchytrium* é uma autêntica monografia, uma *mise au point* muito completa, bem exposta e ilustrada, dos nossos conhecimentos sobre o género,

A autora não se limita porém a expor o que então se sabia sobre os diferentes aspectos do problema, revendo e discutindo as conclusões dos investigadores que a precederam. Ela própria estudou a citologia e a biologia de várias espécies, para esclarecer pontos obscuros e para se colocar em condições de poder ajuizar seguramente da verossimilhança das conclusões dos outros.

Muito ficámos devendo à clara e metódica exposição de M.^{me} To-
bler, que nos serviu de seguro guia em um capítulo tão pouco conhecido e tão difícil da biologia vegetal.

Quando, mais adiante, nos referirmos ao problema da posição relativa das espécies em um sistema natural de classificação dos *Synchytrium*, teremos ocasião de analisar mais detidamente o trabalho da autora.

CAPÍTULO III

O *Synchytrium papillatum* FARLOW

Em 1885 descobriu Farlow, na Califórnia, uma espécie nova de *Synchytrium* parasitando as fôlhas do *Erodium cicutarium* L'Her. Descreveu-o com o nome de *S. papillatum* no *Bull. Bussey Instit.* (Farlow, 85). Volta a ocupar-se d'ele no seu artigo *The Synchytria of the United States* (Farlow, 85), fazendo acompanhar a diagnose de uma gravura que reproduzimos (Est. 1, fig. 1) e de uma curta descrição.

A título de curiosidade transcrevemos também a diagnose de Farlow.

« Spots dark purple, galls glandular, formed of papillate, pyriformely swollen epidermal cells, resting spores ellipticall, 0,06-0,07 mm. by 0,04-0,05 mm., epispore brown somewhat roughened. Sori superficial, spherical, 0,10-0,12 mm. in diameter. On leaves of *Erodium cicutarium* L'Her. California. »

Na breve nota que segue a diagnose, o autor limita-se a descrever sucintamente a morfologia externa das galhas e esporos de resistência, constatando já o facto de serem estes muito mais abundantes que os soros de esporângios.

Em 1888, Saccardo (*Sylloge Fungorum*, vol. VII) dá a primeira diagnose latina:— « *Maculis obscure purpureis, galls glandularibus,*

e cellulis piriformibus, turgidis, papillatis formatis, sporeas ellipsoideas 60-70 × 40-50, episporo brunneo cinctas, saepe rugulosas continentibus; soris superficialibus, sphaeroideis 100-120 μ. d.

« *Hab. in foliis Erodii cicutarii in California.* »

Poucos anos depois Magnus (93) encontra novamente o fungo em exemplares de *Erodium cicutarium* provenientes das Canárias (Teneriffe) e, ao mesmo tempo, sobre folhas de uma outra espécie de *Erodium*, que o autor não conseguiu identificar, enviadas por Marloth do Cabo da Boa Esperança (Stellenbosch). Pelas gravuras que acompanham o trabalho facilmente se depreende que o novo hospedeiro do Cabo não é o *E. cicutarium*, nem tão pouco o *E. moschatum*.

Magnus aproveita a ocasião para comparar os exemplares de *S. papillatum* provenientes da Califórnia com os oriundos do Cabo e das Canárias. Em todos encontrou uma característica, que parece ter escapado ao próprio Farlow, e à qual liga o autor grande importância. Trata-se de um adelgaçamento anular da parede das galhas, portadoras de esporos de resistência, ao nível da superfície externa da epiderme da folha parasitada. Por esta região de maior fragilidade se rompe depois a parede, destacando-se a galha com os esporos e deixando sobre a superfície da folha uma cicatriz circular ligeiramente saliente.

O autor considera o facto como um curioso fenómeno de adaptação do parasita à biologia do hospedeiro. « *E. cicutarium*, diz Magnus, *lässt weder die Blätter abfallen, noch stirbt das steifstengelige Laub so ab, dass es gleich auf den Boden zu liegen kommt; ... ferner bleiben die Blätter an den überwinternden Pflanzenstößen grün, wie das ja bei zweijährigen Pflanzen der Fall zu sein pflegt. Aus allen diesen Gründen würden die Dauersporangien, wenn sie nicht durch das Abfallen mit den grössten Theile ihrer Wirthszelle auf den feuchten Boden gelangten, nur schwer die günstigen Feuchtigkeitsbedingungen zum Auskeimen finden. Daher fallen sie ab.* »

Pelo que respeita aos caracteres morfológicos utilizados para a classificação, os exemplares das Canárias concordam inteiramente com os da Califórnia. Já o mesmo, porém, não acontece com os do Cabo. Nestes, as galhas de esporos de resistência são lisas, sem papilas e obovadas, em vez de piriformes. Ao longo das paredes apresentam pontuações, provenientes de uma diminuição de espessura e correspondentes às papilas das galhas papilosas.

O autor entende todavia que tais divergências não justificariam a criação de uma espécie nova e limita-se a formar, com os exemplares do Cabo, a variedade *Marlothianum*, do *S. papillatum*.

Tanto o trabalho de Farlow como o de Magnus são, porém, pequenas notas em que os autores apenas encararam a questão da morfologia externa do fungo e das deformações mais aparentes sobre o hospedeiro, como base para o estabelecimento da espécie.

Mais tarde Tobler (13) transcreve a diagnose de Saccardo, alterando-a, por um lado, de acôrdo com as observações de Magnus e, por outro lado, de harmonia com o seu critério sobre a terminologia dos órgãos de multiplicação. Diz assim a diagnose de Tobler: — « *Maculis obscure purpureis, gallis glandularibus, e cellulis piriformibus, turgidis, papillatis, MATURIS DEHISCENTIBUS BASI; SORIS PERDURANTIBUS ovoideis 60-70 : 40-50 μ , MEMBRANA EXTERNA brunnea, saepe rugulosa; SORIS AESTIVALIBUS superficialibus, globosis 100-120 μ diam.*

« *Hab. in Erodii cicutarii foliis in California, Teneriffa, ad promontorium bonae Spei.* »

Não se encontrando porém este carácter da deiscência das galhas nos exemplares por nós descobertos sobre o *E. moschatum*, como adiante se verá, e, por outro lado, não concordando com as modificações de terminologia introduzidas por M.^{me} Tobler, preferimos e adoptamos a antiga diagnose de Saccardo.

Depois apenas Stevens (pág. 32 e 35) volta a ocupar-se da espécie de Farlow, para confirmar alguns dos resultados das suas investigações citológicas sobre o *S. decipiens*. Para o *S. papillatum* o único facto importante que Stevens menciona é, como vimos já, a existência de uma mitose na divisão do núcleo primário da inicial dos soros de esporângios.

Até agora o *S. papillatum* era, por consequência, das espécies mais mal conhecidas do género. Os grandes problemas citológicos e biológicos, que tanto se têm estudado e discutido para os outros *Synchytrium*, nunca tinham sido postos nem cuidadosamente investigados para esta espécie. Por isso, principalmente, se nos afiguram de algum interêsse os resultados do nosso trabalho.

Técnica

As observações *in vivo*, de que largamente usámos, eram seguidas e completadas pelo estudo de material fixado e incluído.

Uma das maiores dificuldades que encontrámos foi a da escolha de fixador apropriado. Os soros de esporângios e os esporos de resistência, principalmente quando adultos, difficilmente deixam penetrar os agentes fixadores. A membrana espessa e quitinosa das células epidérmicas do hospedeiro aumenta ainda as dificuldades.

O formol a 10 0/0, fixador enérgico e com boas facultades de penetração, não permite porém o emprego ulterior de colorações citológicas delicadas.

Das misturas pícricas, a de Bouin penetra mal. *Não molha* a epiderme, de modo que as peças ficam, em geral, sobrenadando à superfície do líquido. A de Duboscq-Brasil penetra muito melhor, mercê do alcool que entra na sua constituição; mas produz frequentemente fenómenos de plasmólise e a ruptura dos soros de esporângios maduros, que se apresentam nas preparações rebentados e vasios.

A mistura de Flemming, além de pouco penetrante, tem o grande inconveniente, neste nosso caso, de ennegrecer por tal forma o plasma do fungo que se torna impossível, na maior parte dos casos, o branqueamento ulterior dos cortes, por mais enérgicos que sejam os processos empregados. Das várias tentativas que fizemos, empregando processos vários de descoloração (água oxigenada, método de Pal, etc.), nunca conseguimos um branqueamento sufficiente, a-pesar-de deixarmos por vezes actuar muitas horas o agente descórante. O plasma, fortemente impregnado de gorduras, ou se conservava negro, ou os cortes se descolavam, por mais cuidado que tivesse havido na sua colagem.

Admiram-nos por isso os resultados obtidos por Kusano e Bally com a mistura de Flemming. Ou as espécies por êsses autores estudadas tinham muito menos substâncias gordas que a nossa, ou a mistura empregada como fixador teria talvez menor percentagem de ácido ósmico. A dificuldade em encontrar material de estudo, consequência da raridade do fungo, impediram-nos depois de empregar como tencionávamos uma mistura de Flemming assim atenuada.

De todos os fixadores empregados, o que nos deu resultados mais satisfatórios foi o de Schaudinn, a-pesar-de provocar algumas vezes, principalmente em soros de esporângios maduros, ligeiros fenómenos de plasmólise.

Após a fixação, as peças eram incluídas, com passagens muito lentas nos alcoóis, xilol e parafinas.

Como coloração empregámos quasi exclusivamente a hematoxilina férrica de Heidenhain. Quando hábilmente usado, é este, ainda hoje, o método por excelência para trabalhos de citologia geral, sobretudo em casos como o nosso, em que a impossibilidade do emprêgo do ácido ósmico nas misturas fixadoras torna impraticável a aplicação do tríplice Flemming.

Quanto aos zoósporos, apenas conseguimos obtê-los por duas vezes e sempre à custa de soros de esporângios. Não foi possível fazer germinar os esporos de resistência, a-pesar-de termos empregado os artificios aconselhados em casos idênticos. Depois de observarmos os zoósporos em gota pendente e de termos assistido aos seus saltos bruscos tão característicos, fixávamos-los pelos vapores do ácido ósmico, deixávamos evaporar a gota líquida e montávamos em bálsamo. Todo o plasma se cora então de negro intenso, deixando apenas na região posterior uma vesícula arredondada incolor (o núcleo). O flagelo percebia-se com dificuldade. Frequentemente o fixador provocava a rutura da parede nuclear e o extravasamento do nucleoplasma.

Além dêste método, empregámos um outro nosso e com os melhores resultados. Com a ponta de um dedo molhado na mistura de clara de ovo e glicerina, em partes iguais, passávamos sôbre uma lâmina, de modo a deixar-lhe uma delgada película albuminosa. Deixávamos enxugar um pouco e lançávamos sôbre a lâmina uma gota de água com zoósporos. Espalhávamos a gota, inclinando a lâmina em várias direcções, e deixávamos enxugar ao abrigo das poeiras. Antes de completamente enxuta, fixávamos a preparação como se fôsse um esfregaço, empregando fixadores que coagulassem a albumina. Os zoósporos ficavam ao mesmo tempo fixados e colados à lâmina, o que facilitava consideravelmente o seu manejo ulterior. Para a coloração dos flagelos usamos o método da tano-fucsina de Zimmermann.

Muito desejo tivemos, principalmente depois da leitura do trabalho de Lüdi, de completar o nosso estudo com experiências de inoculação no *Erodium cicutarium*, bem como em outras espécies de *Erodium* e alguns *Geranium*. Infelizmente, porém, quando obtivemos zoósporos, ainda não tínhamos à nossa disposição as plantas necessárias para as inoculações experimentais; e quando conseguimos estas não tornámos a apanhar zoósporos!

Não desistimos, todavia, de tais experiências. Enquanto se im-

prime este trabalho, estão já novas sementeiras feitas, à espera dos primeiros soros de esporângios do *S. papillatum*. Mas é necessário ter em linha de conta que, nesta espécie, as experiências de inoculação são incomparavelmente mais difíceis do que com o *S. taraxaci*, estudado por Lüdi. Ao passo que neste último são abundantíssimos os soros de esporângios durante muitos meses, no *S. papillatum* tais soros aparecem em percentagem insignificante em relação aos esporos de resistência e durante um curto espaço de tempo. Esta dificuldade, resultante da carência de material, foi para nós incomparavelmente mais grave do que todos os obstáculos de ordem técnica que tivemos de remover.

Morfologia

Os zoósporos do *S. papillatum* são maiores que os de quasi todas as outras espécies do género. Medem em média 6 a 7 μ . de comprimento por 4 de largo. Têm forma ovóide e um comprido flagelo de 20 a 25 μ . implantado na região posterior, mais larga, do corpo do esporo.

No vivo são difíceis de observar, não tanto por suas exíguas dimensões, mas, muito principalmente, por se apresentarem incolores, pouco refringentes e movendo-se por saltos bruscos e rápidos. As gotículas gordas, coradas de amarelo, que outros autores viram em algumas espécies do género, devem ser aqui incolores; de contrário ter-nos-íamos apercebido delas.

O processo de deslocamento é muito original. Quando o flagelo se encontra na posição representada pela fig. 2, c (Est. I) o zoósporo distende-o bruscamente, como para dar uma chicotada na água, e é assim projectado a umas 20 μ . ou mais de distância, indo o flagelo encontrar-se, novamente incurvado, em posição simétrica da primeira.

Em preparações fixadas pelos vapores de ácido ósmico e montadas sem ulterior coloração, aparece o plasma homogêneamente corado de negro, com exclusão de uma vesícula esférica na porção posterior junto à inserção do flagelo (fig. 2, c, Est. I). Não existem pois gotículas gordas no seio do citoplasma como nas outras espécies. A gordura aqui impregna homogêneamente todo o plasma.

Quanto à vesícula desprovida de substâncias gordas é fácil pôr em evidência a sua natureza em preparações fixadas por misturas que não contenham ácido ósmico. Trata-se de um núcleo esférico, muito volumoso (confronte as dimensões com as da fig. 45, Est. IV), desprovido de nucléolo e com a cromatina, sob a forma de granula-



ções, irregularmente disposta à periferia, como que incrustando a membrana nuclear.

Em alguns zoósporos, raros, encontrámos dois núcleos (fig. 2, *b*, Est. I). Em outros, também pouco freqüentes, dois flagelos, implantados lado a lado. Os dois fenómenos, porém, nunca coexistiam. Nada nos leva a admitir que tais factos sejam a conseqüência de uma prévia conjugação. Inclinação de preferência para a hipótese de que deve tratar-se aqui de fenómenos teratológicos.

Os primeiros estados que encontrámos, depois dêste de zoósporos em vida livre, estão representados nas figs. 5 e 4, Est. II. O parasita encontra-se já instalado no interior da sua hospedeira. Perdeu o flagelo; os contornos, mais ou menos regulares, são nítidos, apesar da falta de uma membrana própria; assim, o plasma do parasita e da célula parasitada estremam-se com facilidade.

A membrana nuclear existe sempre, mas por vezes tão ténue que se vê com extrema dificuldade. O nucleoplasma é menos granuloso que o citoplasma.

Aonde porém as modificações de estrutura mais se acentuaram, foi no arranjo da cromatina. Esta, com efeito, em vez de continuar distribuída pela membrana nuclear, acha-se agora condensada em um volumoso nucléolo, esférico, homogéneo e muito siderófilo. Fora desta massa, muito pouca cromatina, e essa distribuída em pequenas granulações, geralmente encostadas à parede do nucléolo (figs. 4 e 5, Est. II).

Não nos foi possível encontrar estados intermediários entre os representados nas figs. 2 e 5. É de presumir porém que a cromatina, distribuída à superfície do núcleo, se vá reunindo pouco a pouco no interior, até formar um nucléolo com o aspecto do da fig. 5.

À medida que o parasita se vai desenvolvendo, vão o núcleo e o nucléolo aumentando também de dimensões, bem como a quantidade de cromatina. A fig. 3 representa um estado posterior aos das figs. 4 e 5. Não existe ainda uma membrana a envolver o esporo. O plasma dêste aparece vacuolizado, talvez pela acção dissolvente do líquido de Schaudinn sobre certas reservas. O núcleo sobressai agora como um corpúsculo de contornos muito bem definidos; mas a quantidade de cromatina extra-nucleolar é ainda insignificante.

Se êste glóbulo primário vai agora transformar-se na inicial de um soro de esporângios, vemo-lo envolver-se de uma delgada mem-

brana e aumentar consideravelmente de volume, até atingir um diâmetro de 110 a 120 μ (fig. 6, Est. II).

O plasma, nas fixações pelo Schaudinn, apresenta-se esponjoso mas quasi desprovido de proteínas de reserva. As grandes malhas, que formam por assim dizer o esqueleto do citoplasma, continham reservas gordas que o fixador dissolveu, mas que o ácido ósmico põe em evidência com grande nitidez. O núcleo chega a atingir as dimensões extraordinárias de cerca de 40 μ , com um nucléolo de 18 a 20 μ de diâmetro. São estes talvez os maiores núcleos até hoje observados nos fungos.

A cromatina porém já se não encontra exclusivamente impregnando o nucléolo. Por todo o núcleo se vêem, homogêneamente distribuídas, massas cromáticas de contornos irregulares.

O estado de célula inicial madura, que a fig. 6 representa, é relativamente freqüente. Raros os estados intermédios entre as figs. 3 e 6. Como, por outro lado, nós não foi possível encontrar nenhuma figura de divisão do núcleo primário da célula inicial, somos levados a concluir que os fenômenos se hão-de passar sensivelmente assim: 1.º Uma fase de crescimento rápido até à maturação da inicial dos soros; 2.º Uma paragem no desenvolvimento, cuja duração não podemos avaliar; 3.º Uma fase muito rápida de multiplicação nuclear.

Se porém o glóbulo primário, em vez de se transformar na inicial de um soro de esporângios, vai dar um esporo de resistência, as coisas passam-se de maneira diferente. Em lugar da membrana simples e delgada de há pouco, forma-se agora uma espessa e dupla membrana envolvente (fig. 8, Est. II). O esporo atinge também dimensões muito consideráveis mas o seu núcleo fica sempre menos volumoso que o da inicial dos soros. O plasma oferece um aspecto diferente, menos esponjoso, contendo, além das reservas gordas que o fixador dissolveu, muitas granulações proteicas que a hematoxilina cora de negro, mais ou menos acinzentado, conforme o grau de diferenciação. O núcleo não chega a atingir 30 μ de diâmetro. Possui uma membrana bem aparente e grande número de granulações cromáticas pequeníssimas e irregularmente distribuídas pelo nucleoplasma. Em todos os núcleos se vê um nucléolo, consideravelmente mais pequeno que o da inicial dos soros (conf. fig. 6), mas igualmente siderófilo. Na maior parte dos esporos maduros, vê-se ainda, junto do nucléolo e formando como que um gomo dêste, um

segundo corpúsculo de menores dimensões, contornos perfeitamente circulares, que a hematoxilina cora intensamente de negro. Êste corpúsculo, de dimensões muito variáveis, parece formar-se à custa do nucléolo.

Se nos tivesse sido possível empregar a fixação e coloração de Flemming, teríamos procurado ver se êste segundo corpúsculo intranuclear tem precisamente as mesmas afinidades para os côrantes que o nucléolo. Igualmente impossível seguir o seu destino ulterior, porquanto nunca conseguimos obter a germinação dos esporos de resistência.

O que podemos porém afirmar é que, seja qual fôr a verdadeira natureza, origem e funções dêste corpúsculo, não se trata, de nenhum modo, de uma formação análoga ao *Kerngerüst*, que, nas espécies aonde tem sido encontrado, se apresenta com aspectos inteiramente diversos (figs. 9 a 13, Est. III). Por isso lhe chamaremos, provisoriamente e até que novas investigações melhor esclareçam o problema, *nucléolo acessório*.

Deixemos o esporo de resistência no estado de completa maturação e voltemos à célula inicial dos soros para seguirmos o seu desenvolvimento.

A-pesar-de termos cortado muitas dezenas de blocos e de termos examinado cuidadosamente milhares de cortes, nunca conseguimos observar qualquer das fases de divisão do núcleo primário. Ou encontrávamos a célula ainda no estado uninucleado, sem que o seu núcleo mostrasse indícios de próxima divisão, ou íamos encontrá-la já no estado de soro plurinucleado, pelo menos com uma dúzia de núcleos disseminados pelo plasma, e todos, sensivelmente, das mesmas dimensões.

Êste último facto, em contradição com as observações de Stevens (07) sôbre o *S. decipiens*, e talvez também sôbre o *S. papillatum*, contraria de certo modo a hipótese da existência de uma amitose do núcleo primário.

Seja porém como fôr a divisão dêste — uma mitose ou uma amitose, — deve passar-se tão rapidamente que em tantos milhares de cortes estudados não foi possível observá-la uma única vez! É possível até que as divisões se passem de preferência durante a noite, determinadas por condições muito particulares de iluminação e temperatura.

Os soros de esporângios mais atrasados que conseguimos ver,

tinham já mais de uma dúzia de núcleos secundários, mas encontravam-se ainda muito longe do período de formação dos septos. Estes núcleos secundários eram, como dissemos acima, sensivelmente das mesmas dimensões e apresentavam-se com aspecto muito diverso dos que Stevens nos mostra nas figuras 2 e 3 do seu trabalho (07). Os nossos núcleos secundários possuem, além do nucléolo, muita cromatina disseminada sob a forma de granulações de contornos regulares. Também não encontramos no plasma do soro as formações asteróides de que fala Stevens, nem vimos vestígios de mitoses.

Ainda que não tenhamos assistido à divisão do núcleo primário, nem tão pouco às primeiras divisões dos núcleos secundários, o aspecto e as dimensões destes, nos soros mais atrasados, inclinam-nos para a hipótese de que tais divisões sejam do tipo mitótico, como pretendem Kusano e Stevens (03). Com efeito, os núcleos secundários mais atrasados que se encontram, são relativamente muito volumosos (8 a 10 μ de diâmetro), todos, pouco mais ou menos, das mesmas dimensões, e possuem, além disso, uma estrutura complicada — membrana nuclear, nucléolo e abundantes granulações de cromatina. Aspecto muito diverso oferecem os núcleos provenientes de divisões amitóticas; são mais pequenos, de dimensões, em geral, bastante diferentes e, principalmente, com uma estrutura muito mais simples, como teremos ocasião de ver dentro em breve.

Deve pois haver no *S. papillatum* um primeiro período de multiplicação nuclear por meio de mitoses regulares. A êste segue-se agora um outro de multiplicação amitótica, que vamos descrever.

Quando os soros contêm próximamente 40 a 50 núcleos, as dimensões destes variam entre 5 e 8 μ . O número de granulações de cromatina aumenta consideravelmente dentro do núcleo, amontoando-se primeiro em volta do nucléolo (figs. 21, 20, 17, 24, Est. III), que perde pouco a pouco a sua colorabilidade, espalhando-se depois pelo plasma do núcleo. Ao mesmo tempo que isto se passa, a membrana nuclear vai-se tornando cada vez menos aparente (figs. 24, 25, 21, Est. III) até que por fim deixa de ser visível. Os contornos do núcleo percebem-se ainda, mercê da diferença de aspecto e de colorabilidade entre o nucleoplasma e o citoplasma. As granulações cromáticas aproximam-se da zona limitante, acumulam-se aí e vão pouco a pouco emigrando para fora da primitiva área nuclear sob a forma de cromídias (figs. 17, 19, 20, 25, Est. III). Estas disseminam-se agora pelo citoplasma, isoladamente ou em grupos (figs. 23,

mitose e
amitose

24 e 16) mais ou menos compactos. Convém porém advertir que na fig. 16, além das cromídias, oriundas dos núcleos, se encontram numerosas granulações de proteínas de reserva, que a hematoxilina cora também de negro, ainda que com um tom mais claro que a cromatina.

¿ Qual o destino destas cromídias assim dispersas pelo citoplasma?
¿ Que vai ser destes núcleos tão empobrecidos agora de cromatina?

Antes de respondermos a estas perguntas, vejamos o aspecto que oferecem os soros no estado que supomos, pelo número e dimensões dos núcleos, imediatamente posterior (figs. 26 e 27, Est. IV).

No seio do citoplasma encontramos ainda numerosas cromídias, mas de diferentes dimensões; as maiores são bastante mais volumosas do que as que vimos há pouco emigrando dos núcleos e encontram-se, muitas vezes, rodeadas de uma zona areolar, mais clara que o plasma envolvente.

A semelhança de tais formações com as representadas por Stevens (07) na sua fig. 2, é manifesta. Consideramo-las como representando diferentes estados da formação de novos núcleos. As cromídias grandes que se vêem nas figs. 26 e 27 envolvidas por uma zona hialina, podem muito bem ter resultado da agregação de outras mais pequenas e, de comêço, dispersas. Nesta hipótese, tais cromídias viriam a dar o nucléolo dos novos núcleos.

Ao lado destas formações, que supomos núcleos em via de organização, outros núcleos se encontram, já com a sua estrutura definitiva, mas de menores dimensões que os das figuras 16 a 25. A transição dos primeiros para os segundos é fácil de conceber. Pequenas granulações cromáticas agrupar-se-iam em determinados pontos (figs. 16 e 23) dando origem à formação de cromídias maiores; em volta destas, por retracção do plasma envolvente, formar-se-ia como que um vacúolo, ainda não limitado por membrana própria; tais formações passariam então a funcionar como centros de atracção, agrupando à sua volta as pequenas cromídias distribuídas na vizinhança (fig. 26); finalmente uma membrana se individualizaria na região de contacto dos dois plasmas heterogéneos e o novo núcleo encontrar-se-ia formado. Repare-se, especialmente na fig. 27, na transição quási insensível entre as dimensões do nucléolo e dos grânulos de cromatina intranuclear.

Assim, após um primeiro período de multiplicação nuclear por meio de mitoses regulares, sobreviria um outro período de multi-

plicação irregular, por um processo análogo ao que Griggs (pág. 40) descreve sob o nome de heterosquise.

Quanto aos núcleos representados na fig. 16, é natural que, resolvendo-se em cromídias, venham a desaparecer completamente em um período em que novos núcleos se encontram já formados no plasma do soro. Essa talvez a razão porque se não encontram estados acarióticos.

Stevens (07), ainda que admitindo a existência de uma fase de multiplicação atípica, imaginava-a de modo diferente. Não havia propriamente emissão de cromídias, mas um esfacelamento simultâneo do núcleo primário e dos primeiros núcleos secundários em agregados nucleares com o aspecto de mórulas (Vid. fig. 3, f. — Stevens, 07) que só depois se separavam, espalhando-se pelo plasma do soro.

A única formação que encontramos, que de algum modo faz lembrar a mencionada gravura de Stevens, representámo-la na nossa fig. 28 (Est. IV). Não se trata porém, como ao primeiro exame supusemos, de um agregado de núcleos, mas sim de um núcleo único, consideravelmente maior que os outros do mesmo soro, envolvido por uma membrana, contendo sete granulações com o aspecto de nucléolos e várias outras de menores dimensões. Para mais acentuar a divergência entre a nossa formação e as mórulas nucleares de Stevens, repare-se que estas aparecem nos primeiros períodos da evolução dos soros, enquanto que aquela faz parte de um soro em estado adiantado de desenvolvimento, com núcleos bastante pequenos e numerosos. Em volta, outros núcleos se estão formando ainda à custa de cromídias errantes.

A observação deste facto isolado não nos permite um juízo sobre a origem e destino deste grande núcleo. É possível que tenha resultado de um processo anómalo de agregação cromidial e se venha a resolver em novas cromídias, ponto de partida de futuros núcleos. O que pretendemos frisar é que as nossas observações não confirmam de nenhum modo a doutrina de Stevens, de multiplicação nuclear por esfacelamento simultâneo e subsequente formação de mórulas.

Não assistimos à formação dos septos em preparações fixadas e coradas. Apenas uma ou outra vez conseguimos observar no vivo alguns soros que pareciam estar ainda incompletamente septados. Tais observações, porém, são extremamente difíceis, mercê da pouca

transparência da espessa camada de pigmento que fica entre o soro e a parede da galha. Quiz-nos todavia parecer que os septos começavam a formar-se da periferia para o centro, segundo o processo que Harper descreveu pela primeira vez.

As dimensões dos soros e o número de esporângios que contêm variam dentro de largos limites. Os maiores atingem 110-130 μ de diâmetro e incluem pelo menos 20 a 25 esporângios. São os que se formam no interior de células epidérmicas dos caules tenros, do pecíolo e limbo das fôlhas — os únicos até agora conhecidos. Além destes porém encontramos nós outros mais pequenos (50 μ de diâmetro, em média) e apenas com 8 a 10 esporângios (fig. 7, Est. II), desenvolvendo-se nas células das estípulas.

Entretanto a multiplicação nuclear tem continuado. O número de núcleos aumenta consideravelmente, o seu volume diminui em proporção, mas no aspecto e estrutura assemelham-se ainda aos da fig. 28, Est. IV (ao alto, à esquerda).

Nesta altura do desenvolvimento intervém uma mitose, que precede imediatamente a formação dos zoósporos e que se afasta, sob muitos e importantes pontos de vista, de todas as até agora descritas para o género *Synchytrium*.

Os núcleos *em repouso* têm próximamente 2 μ de diâmetro (fig. 29). Possuem um nucléolo volumoso, uma membrana muito nítida e, encostadas à face interna desta, numerosas granulações de cromatina.

Os primeiros sintomas da divisão consistem na redução, a quatro, do número destas granulações cromáticas (fig. 30). Tal redução pode explicar-se ou pela concrecência dos grânulos primitivos, ou pela dissolução parcial destes, ou ainda pela coexistência dos dois fenómenos, pois que as granulações de cromatina das figs. 30 e 31 são sensivelmente maiores que as da fig. 29.

Dissolve-se agora a membrana nuclear, *antes que tenham aparecido quaisquer vestígios de fuso* (fig. 31). *As fibrilhas deste só se diferenciam depois, no seio do citoplasma.*

Na metafase (figs. 32, 33 e 34) os *quatro cromosomas globosos* dispõem-se em uma placa equatorial regular. O fuso apresenta a forma de um duplo cone cujos vértices são ocupados por pequeníssimos centríolos, corados de negro pela hematoxilina. Em volta destes não se vêem centrosferas nem ásteres; o plasma apresenta-se nessas regiões perfeitamente homogéneo. Ao lado do fuso, *sempre o nucléolo.*

No começo da anafase (fig. 35) a distância entre os dois polos

Formação de núcleo de esporângio.

do fuso conserva-se ainda a mesma. Os dois grupos de cromosomas filhos separam-se, deixando no espaço intermediário fibrilhas acromáticas bem visíveis. À medida que a mitose prossegue, vão-se afastando os cromosomas e com eles os centríolos (figs. 36, 37 e 38), alongando-se muito o fuso que chega a atingir o dôbro do comprimento primitivo.

Os cromosomas filhos, separados durante muito tempo, acabam por se fundir em uma massa única (fig. 39) antes de terem atingido os polos.

Até esta altura encontra-se sempre, ao lado de cada figura de mitose, um nucléolo inalterável. De repente, em vez de um nucléolo só, aparecem-nos dois corpúsculos mais pequenos (fig. 40) com todo o aspecto de provirem da divisão do nucléolo das figuras anteriores. Estes nucléolos filhos afastam-se agora um do outro, aproximam-se das massas cromáticas em marcha para os polos, e acabam por se fundir com elas (figs. 41 e 42). A porção intermédia do fuso dissolve-se, nada indicando que a substância das fibrilhas se vá incorporar no futuro núcleo.

Terminada a divisão, os novos núcleos apresentam o aspecto de massas compactas, homogêneamente coradas de negro pela hematoxilina (fig. 43). Os seus contornos tornam-se mais regulares e um pequeno vacúolo se forma no centro. A massa nuclear — mixto de cromatina e de plastina — distribui-se à superfície, primeiro por uma forma irregular (fig. 44), depois mais regularmente (fig. 45). Assim se forma a membrana nuclear, que é, por consequência, de origem plastino-cromática como todo o núcleo. Não há pois intervenção de cariodermatoplasto, nem se vêem formações asteróides em qualquer fase do desenvolvimento dos soros.

Quanto ao isocronismo das mitoses dentro de cada esporângio, de que largamente nos fala Bally, devemos dizer que o não encontramos de um modo regular. As excepções são frequentes. No mesmo esporângio onde estava o núcleo da fig. 32, outros núcleos havia *em ropouso* e em profase.

O processo de divisão que descobrimos nos núcleos do *S. papillatum* compartilha assim dos caracteres da mitose e da amitose, e afasta-se notavelmente dos processos até agora descritos para as outras espécies do género.

Com efeito: a cromatina de que vão formar-se os cromosomas não provém *directamente* do nucléolo, mas existia já, muito antes,

no nucleoplasma; o fuso não é de origem intranuclear e os seus polos são ocupados por dois pequeníssimos centríolos; o nucléolo assiste à divisão até quasi ao fim da anafase, bipartindo-se então e indo os dois nucléolos filhos juntar-se às duas massas de cromosomas; a membrana nuclear forma-se por vacuolização do núcleo à custa da substância plastino-cromática que o compõe.

Além do incontestável interesse morfológico que apresenta a descoberta de tais factos, um interesse porventura maior nos oferecem pelas conclusões que deles é legítimo tirar sob o ponto de vista filogenético. Reservamo-nos porém para tratar o assunto em seu tempo e lugar próprio (Cap. V).

Os núcleos representados na fig. 45 correspondem ao estado de maturação dos esporângios (fig. 7, Est. II). São por isso muito freqüentes os Soros nesse estado, que representa uma paragem no desenvolvimento. Os zoósporos, esses só se formam após a imersão em água, sendo a sua evolução muito rápida. Até hoje ainda ninguém conseguiu observar as modificações citológicas que acompanham o seu desenvolvimento, desconhecendo-se, por exemplo, a origem e processo de formação do flagelo.

Da comparação dos núcleos dos zoósporos (fig. 2, Est. I) com os dos esporângios maduros (fig. 45, Est. IV) facilmente se deduzem as alterações que se produziram no decurso da germinação.

A camada homogênea de substância plastino-cromática que forra interna e regularmente a membrana nuclear, fragmenta-se agora, forma grânulos irregulares e dispersos, que pouco a pouco irão coalescendo e acumulando-se no interior até apresentarem o aspecto de um nucléolo central (fig. 5, 4 e 3).

Acção sôbre o hospedeiro

Os primeiros sintomas de reacção do hospedeiro sôbre o parasita são de ordem citológica.

Antes da hipertrofia das células atacadas, começam os núcleos a alterar-se sob a excitação resultante da presença do parasita. As suas dimensões aumentam consideravelmente, chegando a atingir, na primeira fase de desenvolvimento do glóbulo primário, um volume superior a este. A nossa fig. 5 (Est. II) representa à direita um esporo de *S. papillatum* recentemente instalado na sua célula hospedeira; à esquerda, o núcleo desta, muito hipertrofiado, com um

nucléolo enorme e granulações de cromatina muito mais abundantes e volumosas que no estado normal.

As alterações provocadas no núcleo nem sempre acompanham de uma maneira regular o desenvolvimento do parasita. Assim, ao passo que o glóbulo primário da fig. 3 (Est. I) representa incontestavelmente um estado ulterior ao da fig. 5 (Est. II), o núcleo da célula hospedeira apresenta-se, no primeiro caso, quasi no estado normal (à direita do parasita, em baixo) enquanto que no segundo se encontra já profundamente modificado.

Para melhor compreensão das figuras convém explicar que os núcleos destas células hospedeiras, no estado normal, são fusiformes, contêm um nucléolo pouco volumoso e numerosas granulações cromáticas, pequenas.

O núcleo da célula parasitada, na fig. 3, foi cortado transversalmente e a secção não apanhou o nucléolo, enquanto que na fig. 5 foi cortado quasi longitudinalmente.

Tais discordâncias entre a evolução do parasita e dos núcleos das respectivas hospedeiras, atribuímo-las nós ao facto de serem mais rápida e profundamente modificados aqueles núcleos que vieram ao contacto do glóbulo primário, sendo a acção a distância necessariamente menos enérgica. A fig. 4 vem ainda em reforço desta conclusão. Representa uma célula atacada simultaneamente por dois zoósporos, em um estado de desenvolvimento ulterior ao da fig. 5 e anterior ao da fig. 3. Pelo que respeita aos núcleos das células hospedeiras, o da fig. 4 é de todos o que apresenta mais profundas alterações, não só por estar em contacto com os parasitas mas ainda por estes serem dois. A membrana nuclear dissolveu-se; já se não vêem vestígios do nucléolo; o núcleo encontra-se reduzido a um agregado informe de granulações siderófilas, em estado de manifesta degenerescência.

Daqui em diante as modificações do núcleo são mais lentas e menos acentuadas. Quando a inicial do soro atingiu o estado de maturação, o núcleo da hospedeira vê-se como uma massa de contornos irregulares que a hematoxilina cora muito intensamente (fig. 6, Est. II, ao alto, entre a membrana do parasita e a da célula infectada).

Mais tarde, nos soros maduros e prontos para a deiscência ainda se percebem vestígios do núcleo, em avançado estado de degenerescência (fig. 7, Est. II, por baixo do soro).

Nas galhas que contêm esporos de resistência, as modificações produzidas no núcleo pela presença do parasita são do mesmo género: fenómenos de hipertrofia, seguidos de degenerescência e incompleta digestão nuclear. Simplesmente aqui os fenómenos de desagregação manifestam-se mais tardiamente, conservando os núcleos a membrana e o nucléolo até as galhas atingirem as suas dimensões definitivas. Por fim acabam por se transformar em uma massa granulosa que fica incrustando a parede externa do esporo.

Nunca encontramos vestígios do sistema de canais intranucleares que Guttenberg (08) descreveu. Todavia a acção digestiva do parasita é aqui incontestável, ainda que a substância dos núcleos atacados não seja completamente absorvida.

Pelo que respeita à reacção do citoplasma da célula hospedeira sobre o fungo, o que há de mais notável a mencionar é o aparecimento de um pigmento difuso, vermelho-cereja, do tipo das antocianinas. Não podemos precisar rigorosamente a época da sua formação. Sabemos que não aparece senão depois que a célula hospedeira começa a hipertrofiar-se; mas encontrámo-lo em galhas ainda muito jóvenes.

Sob a acção dos fixadores, o pigmento, e provavelmente ainda outras substâncias que se encontram dissolvidas na água dos vacúolos, precipita e aparece depois nas preparações sob a forma de pequenas granulações negras (figs. 6 e 7, Est. II).

Fenómenos de dissolução das membranas celulares do hospedeiro e formação conseqüente de simplastos — como os descritos por Kusano no *S. puerariae* — não se encontram no nosso caso. Nas galhas que contêm esporos de resistência a acção do fungo limita-se à célula infectada. Nas outras, onde se formam os soros de esporângios, há, na verdade, uma ligeira excitação, provocada pelo parasita, sobre o conteúdo das células vizinhas, excitação que se traduz por uma pequena hipertrofia do núcleo e da própria célula, nunca acompanhada de fenómenos de divisão ou de desenvolvimento de substâncias pigmentares.

Quanto à forma das galhas sabe-se, desde a primitiva descrição de Farlow, que elas são de dois tipos: umas piriformes, papilosas, contendo um ou mais esporos de resistência; outras esféricas, lisas, incluindo um só soro de esporângios.

As nossas observações corroboram inteiramente a diagnose de

Farlow. Não encontrámos galhas de esporos de resistência lisas e obovadas como as da variedade *Marlothianum* de Magnus. Por outro lado podemos afirmar que as galhas piriformes do *S. papillatum* que se formam sobre o *E. moschatum*, não apresentam na base aquele adelgaçamento anular, descoberto por Magnus, que possibilita a queda das galhas, por rutura da região basilar da parede, nas formas parasitas do *E. cicutarium* e da outra espécie desconhecida de *Erodiun* do Cabo da Boa Esperança.

Tal facto afigura-se-nos tanto mais importante quanto o podemos considerar como mais um argumento em apoio da hipótese de Magnus, que considera a caducidade das galhas como uma adaptação à biologia especial do *E. cicutarium*, cujas fôlhas não caem durante o inverno. Com efeito o *E. moschatum* é, entre nós, planta quasi sempre anual. À medida que novas fôlhas se vão formando, as mais antigas murcham, secam, caem à terra e pulverizam-se ou putrefazem-se conforme o grau de humidade do solo. Para que os esporos de resistência se encontrem nas condições óptimas de germinação não é pois necessário que as galhas se destaquem do hospedeiro, como acontecia no caso do *E. cicutarium*.

Independentemente desta discordância com as observações de Magnus, que as diferentes condições biológicas dos hospedeiros parecem explicar, um outro facto descobrimos e do mais alto interesse. Não só as galhas de esporos de resistência são diferentes, na forma e dimensões, das de soros de esporângios, como estas ainda não são tôdas do mesmo tipo. Além daquelas galhas esféricas, grandes, contendo muitos esporângios e emergindo acima do nível da epiderme, que Farlow e Magnus descreveram e desenharam (fig. 1, Est. I), outras existem, com aspecto e tamanho muito diferentes. Estas últimas aparecem exclusivamente nas estípulas, emquanto que as primeiras se formam, como se sabe, nas células epidérmicas dos caules novos, do pecíolo e limbo das fôlhas.

As galhas de soros das estípulas atingem, em média, 50 μ . de diâmetro, ou seja menos de metade das das fôlhas (fig. 7, Est. II)!. Emergem pouco acima do nível das células vizinhas; possuem soros pequenos, com um reduzido número de esporângios e afastados uns dos outros. Distinguem-se apenas, no tecido da estípula, pela sua coloração típica.

Mais adiante teremos ocasião de nos referirmos novamente ao facto, a propósito da biologia do parasita, e aí exporemos a nossa

maneira de ver sôbre os factores que determinam a existência dêstes dois tipos de galhas de soros.

Biologia

¿ O *Synchytrium* que encontrámos em Portugal, parasitando o *E. moschatum*, é ou não uma espécie nova?

Morfológicamente vimos já que o fungo, agora descoberto, cabe perfeitamente dentro da diagnose de Farlow para o *S. papillatum*. Êste facto, porém, apenas nos permite afirmar que se não trata de uma espécie morfológica nova. ¿ Mas, não estaremos em presença de uma nova espécie biológica?

Como já tivemos ocasião de afirmar, a propósito dos trabalhos de Lüdi e de Rytz, o exame dos caracteres morfológicos não é suficiente para a destrição das espécies. Para que dois *Synchytrium*, encontrados sôbre hospedeiros diferentes, possam ser considerados como pertencendo à mesma espécie, não basta a coincidência da forma e dimensões; é necessário ainda que se prove que cada um deles é susceptível de parasitar o hospedeiro do outro, conservando-se inalteráveis os caracteres morfológicos do fungo e das galhas.

Na Califórnia o *S. papillatum* aparece exclusivamente sôbre o *E. cicutarium*, planta ali introduzida da Europa. Sôbre o *E. moschatum*, que também lá existe, igualmente introduzido, nunca o fungo foi encontrado.

Pelo contrário em Coimbra e arredores, sendo os dois hospedeiros muito freqüentes, apenas aparece parasitado o *E. moschatum*.

A simples constatação de tais factos não permite porém tirar conclusões seguras, tanto mais que nunca encontrámos lado a lado as duas espécies de *Erodium*, uma infectada e outra não.

Para resolver cabalmente o problema torna-se indispensável a realização de inoculações experimentais. Depois de várias tentativas infrutíferas nesse sentido, dada a dificuldade de obtenção de zoósporos, estamos actualmente realizando novas experiências de infecção, sem que até agora tenhamos obtido quaisquer resultados positivos.

Quanto aos exemplares oriundos do Cabo da Boa Esperança, nem ao menos se sabe, porque Magnus o não diz, sôbre que espécie de *Erodium* foram encontrados. Pela forma das fôlhas (Magnus, 93,

fig. 1) deve ser um hospedeiro diferente do de Farlow e do nosso; possivelmente o *E. incarnatum*, cujas fôlhas se assemelham às da gravura de Magnus e é endêmico no Cabo.

Experiências de inoculação, feitas com zoósporos desta variedade *Marlothianum*, sobre o *E. cicutarium* e o *E. moschatum*, seriam do mais alto interesse, não só para o esclarecimento do aspecto sistemático do problema como ainda dos aspectos biológico e ecológico.

No estado actual dos nossos conhecimentos o que se nos afigura mais prudente é considerar o *Synchytrium*, agora descoberto em Portugal, como pertencendo à espécie *papillatum* de Farlow, até que infecções experimentais, levados a cabo com êxito, possam lançar uma nova luz sobre a questão. E registar o aparecimento de um hospedeiro ainda não conhecido.

O *E. moschatum*, abundantíssimo em Coimbra e arredores, é planta quasi sempre anual. As sementes passam o verão na terra e germinam aí pela segunda quinzena de setembro, após as primeiras chuvadas anunciadoras do Outono. Em fins de setembro e princípios de outubro já a planta é por aqui muito freqüente.

Logo que apareciam os primeiros pés do hospedeiro, iniciávamos as nossas pesquisas, nos lugares aonde o fungo costumava desenvolver-se, afim de determinarmos a época precisa do seu aparecimento. Os exemplares mais precoces que conseguimos ver, encontramos-os a 4 de novembro.

Pode pois assentar-se em que o fungo, nas condições climatéricas de Coimbra, começa o seu desenvolvimento pela segunda quinzena de outubro.

A princípio os exemplares parasitados são muito raros. Mas o número de galhas contendo esporos de resistência é, desde começo, muito considerável; encontram-se sensivelmente tantas galhas de soros quantas as de esporos de resistência.

A percentagem destes últimos vai porém aumentando sempre à medida que a estação avança; de tal modo que em fevereiro e março já são raros os soros de esporângios (menos de 10% em relação aos esporos de resistência).

Em fins de maio encontra-se por aqui o *E. moschatum* em plena frutificação e o fungo entra na última fase do seu ciclo evolutivo. O número de exemplares parasitados é cada vez mais diminuto e as galhas que nêles se encontram são quasi exclusivamente de esporos de resistência.

Depois o hospedeiro seca e morre, deixando na terra as sementes que hão-de germinar no Outono imediato (1).

De uma vez ainda conseguimos, nos últimos dias de junho, encontrar um exemplar muito fracamente parasitado e só com galhas de esporos de resistência. Normalmente, porém, pode dizer-se que o período de vida activa vai, para o fungo, de meados de outubro a meados de junho; enquanto que o período de repouso abrange quasi exclusivamente o verão (junho a outubro).

Para as outras espécies de *Synchytrium* poucas notícias encontramos a respeito dos períodos de aparecimento e desaparecimento. Parece-nos entretanto poder afirmar que a regra geral é inteiramente outra, pelo menos para as formas da Europa central e setentrional e da América do Norte — as mais numerosas e cuidadosamente estudadas. Para essas o desenvolvimento começa, em geral, na primavera. Se há sucessivas gerações de zoósporos, os soros de esporângios que os produzem repetem-se pela primavera e pelo verão adiante, até tarde. Só depois aparecem os esporos de resistência, ao aproximar-se o inverno.

A própria terminologia reforça esta afirmação. Os alemães chamam, como já vimos, aos soros de esporângios, « *Sommersori* », e aos esporos de resistência, « *Wintersporen* » (entre outras designações). Quere isto dizer que os soros de esporângios só se encontram de verão, enquanto que os esporos de resistência aparecem durante o inverno.

Precisamente o contrário acontece com a nossa espécie. O *S. papillatum*, entre nós, pelo menos, tem o seu período de vida activa no inverno, quando os esporos das outras espécies se encontram no estado de vida latente. À medida que o verão se aproxima, os esporos de resistência são cada vez mais numerosos. E o período de repouso vem a cair precisamente no estio, época em que as outras espécies se encontram em plena actividade (Tobler, l. c., pág. 16).

A que attribuir semelhantes discordâncias? ¿A um fenómeno de adaptação a diferentes condições de meio? Certamente; mas a uma adaptação indirecta. Queremos com isto significar que quem se

(1) Na sua *Flora de Portugal*, diz o nosso querido Mestre sr. D. António Pereira Coutinho, que o *E. moschatum* é planta anual ou bienal que floresce e frutifica de março a agosto. Os exemplares que por aqui temos encontrado são sempre anuais e desaparecem em fins de junho ou, quando muito, nos começos de julho.

adapta directamente às nossas condições climatéricas é o hospedeiro; o fungo, êsse adapta-se às condições de vida da planta parasitada.

Nos países de invernos rigorosos (Europa central e setentrional, América do Norte, etc.) as plantas anuais germinam normalmente na primavera e frutificam no fim do verão; as bienais e as perenes passam o inverno mais ou menos cobertas por uma camada de neve, sem formarem novas fôlhas. O inverno é assim a estação fria e sêca, pois que a água no estado sólido é inutilizável para a vida das plantas; enquanto que a primavera e, muitas vezes, o verão, são as estações temperadas ou quentes e húmidas. Os *Synchytrium* que vivem em tais regiões têm necessariamente que se adaptar às respectivas condições climatéricas. Se são parasitas de plantas anuais, durante o inverno não têm hospedeiro. Se atacam plantas bienais ou perenes, não têm, durante a estação fria, nem água no estado líquido, indispensável para a germinação dos soros e disseminação dos zoósporos, nem fôlhas novas, as únicas, como se disse já, susceptíveis de serem atacadas pelos esporos.

Compreende-se assim que a biologia do fungo, em países de invernos rigorosos, não podia ser outra.

Em Coimbra e arredores as condições são, porém, inteiramente diferentes. De inverno não há neves; no verão pode dizer-se que não chove. Pelo que respeita às condições de humidade da terra, há uma inversão de estações. A nossa estação sêca é o verão; as estações húmidas são o outono, o inverno e, pelo menos, parte da primavera.

Só assim se compreende que uma planta anual germine em fins de setembro ou começos de outubro e frutifique em maio, passando o verão na terra sob a forma de sementes.

O parasita, por sua vez, adapta-se perfeitamente à biologia do seu hospedeiro. Repousa durante o estio e multiplica-se activamente no resto do ano. Ao contrário do que supuseram vários autores, não é o frio que impede a germinação dos soros e disseminação dos zoósporos, mas sim a falta de água no estado líquido e de hospedeiros em condições de receptividade, como o prova o facto de se multiplicar activamente o *S. papillatum* de novembro a fevereiro.

Quanto ao aparecimento de dois tipos de soros de esporângios, contidos em galhas diferentes no aspecto e nas dimensões, formando-se uns exclusivamente nas estípulas e os outros nas fôlhas e

caules tenros (cf. págs. 58 e 63), supomos ter encontrado a explicação do facto.

O que parece condicionar o tamanho e, conseqüentemente, o número de esporângios de cada soro, não são as dimensões das respectivas células hospedeiras, mas sim a riqueza destas e do tecido subjacente em substâncias nutritivas.

Com efeito, as estípulas do *E. moschatum* são formadas apenas por duas assentadas de células, incolores; no interior de cada célula adulta, um núcleo pequeno, umas magras trabéculas de citoplasma e um enorme vacúolo aquoso, ocupando quási todo o espaço interior; nem reservas figuradas, nem possibilidade do seu transporte fácil por falta de tecido condutor.

Nas fôlhas e nos caules, não só as próprias células hospedeiras são mais ricas de plasma, como ainda e sobretudo a vizinhança de um tecido clorofilino subjacente, ricamente vascularizado e em plena actividade elaboradora, há-de necessariamente permitir uma nutrição mais abundante e, conseqüentemente, um maior desenvolvimento do parasita. Por isso os soros dos caules, do pecíolo e limbo das fôlhas atingem dimensões que ultrapassam o dôbro do volume dos soros das estípulas.

Distribuição geográfica e lugar de origem

Dois problemas, igualmente importantes e qualquer dêles de mui difícil solução, se levantam quando, em uma carta do globo, se marcam as regiões aonde até hoje tem sido encontrado o parasita.

¿ Que planta deve ser considerada como hospedeiro primitivo do *S. papillatum* ?

¿ Qual o lugar de origem do fungo e como se explica a sua actual distribuição geográfica ?

Recordemos sucintamente os factos.

O *S. papillatum* apenas foi encontrado até hoje em quatro regiões do globo, consideravelmente afastadas umas das outras e sempre separadas por extensas massas oceânicas. Em 1885 foi descoberto na Califórnia; em 1893, assinalado nas Canárias e no Cabo da Boa Esperança; em 1923, novamente encontrado em Portugal.

Pelo que respeita aos hospedeiros, não se apresenta o problema menos complicado. Na Califórnia e nas Canárias o fungo parasita exclusivamente o *E. cicutarium*. Em Portugal têmo-lo encontrado

apenas sobre o *E. moschatum*. No Cabo, o hospedeiro é uma terceira espécie de *Erodium*, que não foi possível a Magnus identificar. Todavia, em qualquer destas quatro estações, encontram-se os dois hospedeiros conhecidos do fungo.

Para melhor compreensão do problema, vejamos primeiramente qual a distribuição geográfica do *E. cicutarium* e do *E. moschatum*.

Tanto uma como outra, são plantas espontâneas da Europa central e região mediterrânica, e daí originárias. Foram depois levadas a quasi todo o mundo, encontrando-se hoje, como plantas introduzidas, na Califórnia, no Cabo, nas Canárias, etc. (Knuth, 12).

Farlow (85), referindo-se ao problema em questão, antes que o *S. papillatum* tivesse sido encontrado fora da Califórnia, diz: « *The species is known only in California, although Erodium cicutarium is a common european weed, and occurs somewhat rarely as an introduced plant in our Atlantic States. If the Synchytrium is really, as it seems to be an endemic species in California, one would expect to find it on some other host than the Erodium, which is an introduced plant.* »

A descoberta do fungo nas Canárias e no Cabo veio logo mostrar que, contrariamente ao que supunha Farlow, o *S. papillatum* não era endêmico na costa americana do Pacífico. Por outro lado, e ainda contra as previsões de Farlow, nunca o fungo foi encontrado na Califórnia senão sobre o *E. cicutarium*, a-pesar-de existirem ali como espécies endêmicas o *E. texanum* e o *E. macrophyllum*, e como planta introduzida o *E. moschatum* (Knuth, l. c.).

Magnus (93), depois de ter mostrado a sua discordância da hipótese de Farlow, acrescenta: « *Synchytrium papillatum Farl. möchte vielmehr ein in den südlichen Ländern der alten Welt auf Erodium weit verbreiteter Pilz sein, der mit dem Erodium cicutarium nach California übergewandert ist. In der Heimat des Erodium haben wir auch seine Heimat zu suchen. Ohne Zweifel ist dieser durch seine purpurrothen hervorragenden Gallen sehr auffallende Schmarotzer schon öfter gesammelt, aber verkannt worden.* »

Na verdade, a hipótese de Magnus é a que logo nos acode ao espírito e se nos afigura mais lógica. Desde que o parasita não é endêmico na Califórnia, é natural que tenha sido introduzido com o hospedeiro, da pátria deste.

A descoberta do fungo em Coimbra vem dar maiores probabilidades de verossimilhança a esta hipótese.

Todavia, é caso para provocar uma justificada estranheza o facto

de, na região do globo mais antiga e cuidadosamente explorada pelas maiores sumidades botânicas, um fungo, tão aparente pela coloração das galhas que determina, ainda, até hoje, não ter sido mencionado.

Não é impossível que tal tenha acontecido, dada, sobretudo, a diminuta dispersão do parasita, que sempre encontramos em pequeníssimas estações, de alguns metros apenas de diâmetro, e a sua relativa raridade; mas é sem dúvida estranho.

Em Coimbra tem o fungo todo o aspecto de uma forma recentemente introduzida, pois apareceu pela primeira vez no Jardim Botânico e suas vizinhanças, a uma distância de aquele sempre inferior a uma légua. É possível que tenha vindo, sob a forma de esporos de resistência, juntamente com sementes de *Erodium*.

A não aceitar esta hipótese, teríamos que admitir que se trata de uma forma recentemente adaptada à vida parasitária, ou, pelo menos, ao parasitismo dos *Erodium*.

Não se conhece mais nenhuma espécie de *Synchytrium* parasita dêste género. Na família das *Geraniaceae* só há uma outra planta atacada pelos *Synchytrium*, o *Geranium carolinianum*, sobre o qual Clendenin descobriu em 1895 o *S. geranii*. Até agora o fungo só foi encontrado ao sul dos Estados Unidos (Luísiânia), não muito longe, portanto, da Califórnia. O hospedeiro, por sua vez, é originário da América.

Ainda que os caracteres morfológicos do *S. geranii* se afastem sensivelmente dos do *S. papillatum*, em especial no que respeita às dimensões dos esporos de resistência e dos soros, e sejam muito diferentes as galhas provocadas sobre os respectivos hospedeiros, a hipótese de que se trate do mesmo fungo, apresentando-se, em hospedeiros diferentes, com caracteres discordantes, não é inteiramente para pôr de parte. Nunca se fizeram trabalhos de inoculação experimental com as duas espécies de *Synchytrium* em questão, e não nos admiraríamos de que tais experiências viessem demonstrar a possibilidade de infectar o *E. moschatum* ou o *E. cicutarium* com o parasita do *G. carolinianum*, ou vice-versa, e, conseqüentemente, a identidade das duas pretensas espécies de *Synchytrium*.

Em suma: os nossos conhecimentos sobre a distribuição geográfica do fungo são ainda incompletíssimos. Tudo leva a crer que a área de dispersão do parasita deve ser muito mais vasta do que aquela que lhe está hoje assinalada.

Não há observações que permitam afirmar a existência, lado a

lado, de dois ou mais *hospedeiros prováveis*, em condições que favoreçam a transmissão do parasita, um deles largamente infectado e os restantes absolutamente sãos. Finalmente, as únicas experiências de inoculação até hoje tentadas com o *S. papillatum*, foram as nossas; e essas, com tão diminuto êxito, que nem sequer conseguimos transmitir experimentalmente a infecção de um a outro hospedeiro *da mesma espécie*, a-pesar-de termos feito nesse sentido dezenas de tentativas, em muitas das quais verificámos previamente a existência de zoósporos na água de inoculação.

De um tão reduzido número de factos compreende-se que não seja possível tirar conclusões científicas acêrca do lugar de origem e hospedeiro primitivo do fungo que agora nos ocupa. O que se pode é, sobre o terreno movediço dêstes conhecimentos vagos, construir o castelo de cartas de uma hipótese fantasiosa e sedutora, mas com poucas probabilidades de resistir ao sôpro das primeiras objecções.

CAPÍTULO IV

Sistemática do Género *Synchytrium*

G. Tobler (13), na sua monografia sôbre os *Synchytrium*, considera, das espécies até então descritas, 51 como pertencendo incontestavelmente ao género. Das restantes, imperfeitamente observadas, 12 são espécies duvidosas, que, provavelmente, nada têm que ver com os *Synchytrium*. Além destas 63, entre certas e prováveis, Tobler exclui 8 como não pertencendo ao género.

¿ Como agrupar, por suas afinidades, estas espécies? ¿ Que caracteres nos hão-de servir de preferência para a determinação de tais afinidades?

O primeiro esboço de classificação que aparece, é o de Schröter (70). Com as espécies até então conhecidas do género *Synchytrium*, forma o autor três grupos.

I. *Eusynchytrium*: Plasma amarelo-avermelhado; soros de esporângios sôbre o hospedeiro vivo e, por fim, esporos de resistência.

II. *Chrysochytrium*: Plasma amarelo ou avermelhado; formação imediata de esporos de resistência, que, após um período de repouso, são postos em liberdade e germinam, produzindo soros de esporângios.

III. *Leucochytrium*: Plasma branco; em tudo o resto como os *Chrysochytrium*.

Nesta data, já Schröter conhecia numerosas espécies de *Synchytrium*; entre elas o *S. stellariae* e o *S. succissae*, que o autor colocava no primeiro grupo com o *S. taraxaci*. As restantes espécies, com uma única geração de zoósporos por ano, colocava-as Schröter nos dois restantes grupos, segundo a coloração do plasma dos esporos.

De Bary (84), que havia criado em 1863 o género *Synchytrium*, desdobra-o agora em dois novos géneros — *Eusynchytrium* e *Pycnochytrium* —, manifestamente influenciado pelas ideias de Schröter.

O novo género *Eusynchytrium* corresponde ao grupo homónimo de Schröter; o *Pycnochytrium* abrange os *Leucochytrium* e os *Chrysochytrium*.

Com estes dois géneros e ainda com a *Rozella* e a *Woronina*, formava De Bary o grupo das *Synchytriae*. Mas tal classificação não dava uma ideia justa do grau de parentesco entre os quatro géneros, pois que as afinidades entre os dois primeiros eram incomparavelmente maiores do que as de qualquer deles com os dois últimos.

Como caracteres distintivos dos dois novos géneros, apresenta De Bary os seguintes:

Gén. **EUSYNCHYTRIUM**. — Várias gerações de zoósporos seguidas do aparecimento de formas hibernantes. Soros de esporângios exógenos (*S. stellariae*) ou endógenos (*S. taraxaci*).

Gén. **PYCNOCHYTRIUM**. — Uma só geração de zoósporos. Soros de esporângios sempre exógenos.

Para De Bary, o carácter mais importante no ciclo evolutivo da vida destas formas era a existência ou a falta de soros de verão intercalados entre duas gerações sucessivas de esporos hibernantes. O processo de formação, endógeno ou exógeno, dos soros de esporângios, era para De Bary carácter secundário.

A. Fischer (92) aceita o critério de Schröter e De Bary, mas considera os *Eusynchytrium* e os *Pycnochytrium* como sub-géneros do antigo género *Synchytrium*. No sub-género *Eusynchytrium* separa já as formas de soros endógenos (*S. taraxaci* e *S. fulgens*) das de soros exógenos (*S. stellariae* e *S. succissae*), sem todavia introduzir para este último sub-grupo qualquer designação especial.

Os *Pycnochytrium* são agrupados segundo a côr do conteúdo dos esporos, a natureza das galhas (*simplitia* ou *composita*) e os caracteres dos esporos. As suas ideas podem resumir se abreviadamente no seguinte quadro:

Gén. SYNCHYTRIUM	sub-gén. <i>Eusynchytrium</i> Soros de esporângios e esporos de resistência	Soros	{	endógenos	{	<i>S. taraxaci</i>	
				<i>S. fulgens</i>			
				exógenos	{	<i>S. stellariae</i>	
						<i>S. succissae</i>	
					<i>S. myosotidis</i>		
					<i>S. cupulatum</i>		
					<i>S. punctum</i>		
					<i>S. lactum</i>		
					<i>S. anreum</i>		
					<i>S. pilificum</i>		
					<i>S. punctatum</i>		
					<i>S. rubrocinctum</i>		
					<i>S. alpinum</i>		
					<i>S. anomalum</i>		
					<i>S. anemones</i>		
					<i>S. globosum</i>		
					<i>S. mercurialis</i>		

Para Fischer, como para De Bary, o carácter mais importante era ainda a alternância dos dois tipos de multiplicação, por soros de germinação imediata e por esporos de resistência.

Schröter volta a ocupar-se da sistemática dos *Synchytrium* em 1897, no *Engler's Pflanzenfamilien*. Aceita a scisão do antigo género em dois novos, como propusera anteriormente De Bary, mas com um novo arranjo das espécies e um critério diferente na determinação das afinidades. Os dois novos géneros, *Synchytrium* (em vez de *Eusynchytrium*) e *Pycnochytrium*, ficavam formando, com a *Rozella* e a *Woronina*, a família das *Synchytriaceae*. O quadro que segue, mostrará mais claramente as ideas de Schröter sôbre a sistemática d'êste grupo de fungos.

Gén. SYNCHYTRIUM	} Repetidas gerações de zoósporos. Soros de esporângios endógenos.	}	<i>S. taraxaci</i>
			<i>S. fulgens</i>
			<i>S. decipiens</i>
			<i>S. papillatum</i>
Gén. PYCNOCHY- TRIUM	} Repetidas gerações do zoósporos <i>Mesochytrium</i>	}	<i>P. succissae</i>
			<i>P. stellariae</i>
Soros de esporângios exógenos.	} Uma só geração de zoósporos. Conteúdo dos esporos de resistência	}	<i>P. Holwayi</i>
			amarelo ou avermelhado <i>Chrysochytrium</i>
			<i>P. aureum</i>
			<i>P. laetum</i>
			<i>P. myosotidis</i>
			<i>P. pilificum</i>
			<i>P. anemones</i>
		incolores <i>Leucochytrium</i>	<i>P. globosum</i>
			<i>P. mercurialis</i>
			<i>P. plurianulatum</i>

O que choca desde logo neste novo arranjo é o desmembramento do velho grupo dos *Eusynchytrium*, até aí aceite sem discrepâncias, e a passagem conseqüente dos *Mesochytrium* para junto de formas que, no seu ciclo evolutivo, só têm esporos de resistência. Quere isto dizer que Schröter considera carácter dominante o processo de formação dos soros de esporângios e secundário a existência de soros de germinação imediata. A designação de *Mesochytrium* significa ainda que tais formas devem ser consideradas como estabelecendo a transição entre os dois géneros, pois possuem em comum com os *Synchytrium* (*stricto sensu*) soros de esporângios e esporos de resistência, e com os *Pycnochytrium* o processo de formação dos soros.

G. Tobler (13), depois de discutir largamente o problema, aceita o critério de Fischer, mas modifica profundamente as designações dos diferentes grupos e sub-grupos, sob o pretexto de que as até então usadas não são suficientemente características.

O seu sistema, comparado com o de Schröter, representa um incontestável retrocesso, pois a autora faz voltar o grupo dos *Mesochytrium* para junto de formas de soros endógenos, dando assim importância primacial ao facto da existência ou não existência de repetidas gerações de zoósporos dentro de um mesmo período vegetativo. A única vantagem que lhe reconhecemos é a do restabelecimento da unidade do velho género *Synchytrium*.

Vejamos o seu quadro de classificação do género.

	<p>Sub-gén. Pleiochytrium Muitas gerações de zoósporos em um verão, seguidas da formação de esporos de resistência. Conteúdo amarelo-avermelhado.</p>	<p><i>Eusynchytrium</i> Formação de soros de esporângios no interior da célula inicial.</p> <p><i>Mesochytrium</i> Formação de soros de esporângios fora da célula inicial mas ainda sobre o hospedeiro vivo.</p>	<p><i>S. endobioticum</i> <i>S. fulgens</i> <i>S. geranii</i> <i>S. papillatum</i> <i>S. taraxaci</i> <i>S. trichophilum</i></p>
<p>Gén. SYNCHYTRIUM</p>	<p>Sub-gén. Haplochytrium Formação directa de esporos de resistência. Soros de esporângios, por germinação daqueles, só depois da destruição do hospedeiro.</p>	<p><i>Chrysochytrium</i> Conteúdo amarelo.</p> <p><i>Leucochytrium</i> Conteúdo incolor.</p>	<p><i>S. aureum</i> e afins <i>S. aurantiacum</i> <i>S. laetum</i> <i>S. myosotidis</i> <i>S. pilificum</i> <i>S. potentillae</i> <i>S. punctum</i> <i>S. ulmariae</i> <i>S. alpinum</i> <i>S. anemones</i> <i>S. anomalum</i> <i>S. globosum</i> <i>S. Holwayi</i> <i>S. mercurialis</i> <i>S. Niesslii</i> <i>S. punctatum</i> <i>S. rubrocinctum</i></p>

O que há de novo aqui é a terminologia. A autora substitui as designações dos sub-géneros, *Pycnochytrium* e *Eusynchytrium*, absolutamente consagradas pelo uso de muitos anos, pelas de *Haplochytrium* e *Pleiochytrium* (1). E emprega o termo *Eusynchytrium*, por oposição a *Mesochytrium*, para designar um dos grupos do 1.º sub-género, dando-lhe assim um sentido restrito que se não coaduna com o sentido histórico e possibilitando confusões absolutamente desnecessárias.

Por outro lado, a inclusão do *S. Holwayi* no sub-género *Haplochytrium* não se justifica, pois a autora reconhece (*loc. cit.*, pág. 57) que

(1) Do grego *haploos* = simples; e *pleion* = múltiplo.

o fungo em questão produz esporos de resistência e soros de esporângios.

Do que fica exposto, claramente ressaltam os caracteres até hoje considerados como mais importantes para o agrupamento das espécies dentro do antigo género *Synchytrium*. 1.º Existência ou não existência de gerações sucessivas de soros de esporângios entre dois períodos de repouso, entre duas gerações de esporos de resistência. 2.º Formação dos soros de esporângios, no interior ou no exterior da célula inicial.

Estes são, na verdade, os únicos caracteres de que ainda hoje se pode tirar partido quando se busca uma solução para o problema das afinidades entre as espécies dêste curioso género de fungos. A forma das galhas, que ocorre desde logo como um dos caracteres mais salientes, não pode ser tomada em consideração mesmo por quem se preocupe apenas com a elaboração de tabelas para a determinação fácil das espécies, sem quaisquer objectivos de natureza filogenética, pois Lüdi demonstrou no seu esplêndido trabalho (01) que galhas produzidas no mesmo hospedeiro pelo mesmo parasita variam por vezes de forma segundo o órgão atacado ou segundo a densidade da infecção. Assim no *S. anemones*, que Fischer considerava de galhas compostas e incluía por isso na secção *Composita* dos *Leucochytrium*, encontrou Lüdi galhas simples, semi-compostas e compostas. O próprio Fischer, de resto, dava a êste caracter importância muito secundária e só dêle se servia para as últimas dicotomias das suas tabelas. Recorde-se aqui, de passagem, que as nossas observações trazem um facto novo em apoio da tese de Lüdi, pois as galhas que os soros do *S. papillatum* produzem nas estípulas, são diferentes na forma, nas dimensões e no número de esporângios daquelas que se encontram no limbo das fôlhas ou nos caules (vid. págs. 63 e 67).

Quanto aos caracteres tirados da evolução citológica destas formas, êsses sim, que nos haviam de fornecer directrizes seguras para um agrupamento racional e científico das espécies de *Synchytrium*. Infelizmente, porém, pouquíssimas têm sido cuidadosamente estudadas sob êsse ponto de vista. Como vimos já, o problema da evolução nuclear completa, fechando um ciclo, apresenta ainda lacunas consideráveis e pontos que necessitam de ser esclarecidos, mesmo naquelas espécies que, como o *S. taraxaci*, o *S. decipiens* e o *S. endo-*

bioticum, têm sido mais persistentemente trabalhadas. Enquanto se não fizer para a maioria das espécies o que vimos fazendo com o nosso *S. papillatum*, a resolução do problema filogenético há-de necessariamente ser tentada às apalpadelas, como se andássemos jogando a « cabra cega ». A-pesar-de reduzidas e manifestamente insuficientes, têm sido as investigações citológicas e o conhecimento, delas resultante, da evolução nuclear, que têm permitido, como veremos no próximo capítulo, estabelecer pontos de contacto e graus de parentesco para fora das fronteiras do género.

À falta de dados citológicos precisos, não há outro remédio senão irmo-nos contentando com os dois caracteres citados e que até hoje têm sido invariavelmente utilizados na discussão da sistemática dos *Synchytrium*.

De Bary, Fischer e Tobler consideram mais importante a existência de soros de germinação imediata. Schröter, pelo contrário, dá maior relevo ao facto dos soros se formarem endógena- ou exógenamente em relação à célula inicial de que provêm. Mas nem uns nem outro justificam seus pontos de vista.

Seja-nos permitido, antes de nos pronunciarmos sobre o pleito, fazer algumas considerações e rememorar certos factos que permitam ao leitor ajuizar criteriosamente da importância relativa destes caracteres.

Sem entrarmos, por agora, na discussão do problema das relações do género *Synchytrium* com os outros seres vegetais ou animais, recordemos desde já que tôdas as soluções até hoje propostas admitem a proveniência necessária destas formas de outras de vida aquática, saprófitas ou parasitas. Os *Synchytrium* podem pois ser considerados como parasitas primitivos de plantas aquáticas que gradual e progressivamente se foram adaptando, com os seus hospedeiros, a uma vida *anfibia*, com períodos de emersão cada vez mais largos, até que lhes foi possível viver sobre plantas essencialmente terrestres, nunca imersas e apenas de longe em longe banhadas pela água das chuvas ou das neves. Assim, a existência de gerações sucessivas de soros de esporângios, formas essencialmente de multiplicação, entre dois períodos de repouso, é uma característica da vida aquática, que se mantém nos parasitas de hospedeiros sujeitos a longos períodos de imersão (*S. taraxaci* p. ex.) e desapareceu por completo nas formas mais perfeitamente adaptadas à vida terrestre.

O nosso *S. papillatum* fornece um argumento valioso em auxílio

desta tese. Vivendo, entre nós, sobre um hospedeiro normalmente emerso e que dispõe apenas, nos seus órgãos aéreos, da água das precipitações atmosféricas, as suas formações de germinação imediata encontram-se em manifesto declínio, pois aparecem em percentagem insignificante relativamente às formas de repouso, mesmo na época do ano mais favorável para o seu desenvolvimento. Se atendermos a que tal facto se não dá, por exemplo, no *S. taraxaci* e no *S. endobioticum*, aonde os soros de esporângios são abundantíssimos, pelo menos durante tôda a primavera; se atendermos ainda a que no *S. decipiens* nem sequer se conhecem esporos de resistência, tendo-se encontrado apenas até hoje soros de esporângios, a nossa doutrina aparece assente em muito fortes probabilidades de verossimilhança.

Admitida esta hipótese, como a mais lógica dentro do estado actual dos nossos conhecimentos, a existência de sucessivas gerações de soros de esporângios, no decurso de um mesmo período vegetativo, não pode ser considerada carácter de primacial importância filogenética. A existência ou a ausência dêste tipo de órgãos de multiplicação indicar-nos há o grau de adaptação às condições de vida das plantas permanentemente emersas e a *antiguidade relativa* da fase de transição da vida aquática para a vida terrestre.

É um carácter *fisiológico* e não *morfológico*. Os *Pycnochytrium* (no sentido de Fischer) também apresentam o carácter *morfológico* da existência de soros de esporângios, provenientes da germinação dos esporos de resistência; simplesmente têm *uma só geração* de tais soros, no decurso de um ciclo vegetativo completo, enquanto que os *Eusynchytrium* (ainda no sentido de Fischer) possuem *mais do que uma*.

Quanto ao segundo carácter, o que respeita ao modo de formação dos soros de esporângios, já o caso é muito outro. Aqui trata-se realmente de dois processos *diferentes na sua essência, morfologicamente bem distintos*. Ou o soro de esporângios se forma no interior da célula inicial, cuja parede só se rompe para dar saída aos zoósporos; ou a germinação começa pela rutura da parede da célula inicial e saída do conteúdo desta, através da fenda formada, ainda no estado uninuclear (cf. pág. 8, fig. 1); só então começam as divisões do núcleo e formação dos esporângios por septação da massa plasmática primitiva.

O valor filogenético dos dois caracteres em questão é pois manifestamente diferente. E agora escusado seria talvez acrescentar que

consideramos muito mais importante, sob o ponto de vista sistemático, o carácter morfológico do processo de formação dos soros que o carácter fisiológico da existência de várias gerações de zoósporos no mesmo período vegetativo.

¿ Que significado devemos atribuir a este tipo de formação exógena dos soros ?

Admitida a hipótese acima exposta, da derivação dos *Synchytrium* de formas de vida aquática, a posição relativa das espécies dentro do género deve ser tal que nos venham a ficar no tópo da escala os tipos mais bem adaptados às condições de vida das plantas permanentemente emersas. Por consequência, na base do género, formas como o *S. endobioticum* e o *S. taraxaci*, com sucessivas gerações de zoósporos no mesmo período vegetativo; ao cimo, o grupo dos *Pycnochytrium* (no sentido de Fischer) com uma só geração de zoósporos entre dois períodos de repouso.

Ora, a consideração do processo de formação dos soros não só se adapta inteiramente a esta conclusão, como vem em apoio da doutrina sôbre a qual ela assenta.

Com efeito, o processo mais simples de formação dos soros é o endógeno; e é esse, precisamente, o que nos aparece nas formas consideradas da base (grupo dos *Eusynchytrium* de Tobler). Nas formas superiores aparece-nos, pelo contrário, o processo mais complexo de formação exógena dos soros (*Pycnochytrium* de Fischer).

Note-se ainda que a formação exógena dos soros não é apenas um carácter de maior complexidade morfológica. A aquisição d'este processo representa, em nossa opinião, uma vantagem para a disseminação da espécie, que facilmente se pode relacionar com a adaptação à vida terrestre.

Nos parasitas de plantas freqüentemente imersas, como o *S. taraxaci*, ou nos que atacam órgãos subterrâneos e estão por consequência em contacto permanente com a humidade do solo, como o *S. endobioticum*, os zoósporos encontram-se nas condições mais favoráveis para a sua formação e disseminação. Correspondentemente aparecem aqui os processos mais primitivos e que menos favorecem a germinação dos soros e a disseminação dos zoósporos. Aqueles formam-se no interior da célula inicial e aí permanecem até à eclosão dos zoósporos; estes partem das células atacadas do hospedeiro ainda vivo e vão infectar outras células da mesma planta ou de plantas vizinhas.

Nas formas superiores do género, mais perfeitamente adaptadas à vida terrestre, não só desapareceram, como vimos, as sucessivas gerações de zoósporos, mas os soros de esporângios nunca se formam sobre o hospedeiro vivo. Os esporos de resistência, que lhes dão origem, ou se destacam com as respectivas galhas dos órgãos atacados (Magnus, l. c.) ou caem com estes à terra, e são postos em liberdade por putrefacção dos tecidos do hospedeiro. Depois, disseminados pelos ventos como poeiras, ou arrastados pelas águas das chuvas *para os lugares onde estas convergem e se acumulam*, aí germinam, produzindo um soro de esporângios *exógeno, nas condições de maior exposição*, isto é, nas mais favoráveis portanto para a disseminação pela água.

Como tipos de transição entre as formas inferiores e superiores do grupo aparecem-nos o *S. stellariae* e o *S. succissae* (*Mesochytrium*), com caracteres mixtos entre os *Eusynchytrium* e os *Pynochytrium*. Em comum com os primeiros, parasitas de plantas freqüentemente imersas, mal adaptados à vida terrestre, possuem várias gerações de zoósporos no mesmo período vegetativo e soros de esporângios, provenientes do desenvolvimento daqueles, germinando no interior da célula parasitada, sobre o hospedeiro vivo; e com os segundos têm o característico processo de formação exógena dos soros. Infelizmente, não se conhece, ao contrário do que afirma De Bary (l. c., trad. ingl. de 1887, pág. 168), o modo de germinação dos esporos de resistência de qualquer das espécies de *Mesochytrium*; e, a-pesar-do interessante trabalho de Rytz, pouco se sabe ainda da evolução citológica d'este curioso grupo de formas intermediárias.

Quanto ao desmembramento do antigo género *Synchytrium* em dois novos géneros, como pretenderam primeiro De Bary e depois Schröter, não nos parece aconselhável. De resto, os próprios partidários d'esse desmembramento não estão de acôrdo, como vimos, nem no critério em que há-de assentar, nem, por consequência, na repartição das espécies dentro dos dois novos agrupamentos. E é, por outro lado, incontestável que, dentro das *Chytridiaceae*, os *Synchytrium* nos aparecem como um todo bem homogéneo, como um grupo natural de incontroversas afinidades, apresentando suas formas extremas bem ligadas por ininterrupta cadeia de peças intermediárias.

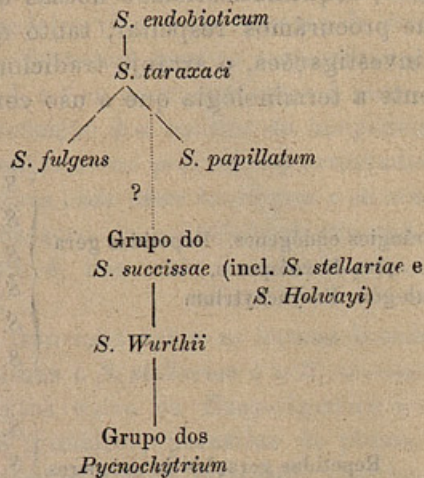
Por isso, e ainda por razões de ordem tradicional, muito de respeitar em tudo que se prende com a sistemática, somos de opinião

que deve conservar-se a unidade do género que De Bary criou em 1863. E se, nesta matéria, fôsse permitido à nossa insignificância propor alguma coisa, esquematizaríamos nossas opiniões no quadro que segue, em que procurámos respeitar, tanto quanto o permitem as mais recentes investigações, o arranjo tradicional, e onde conservámos integralmente a terminologia que o uso consagrou.

Gén. SYNCHYTRIUM	Soros de esporângios endógenos. Repetidas gerações de zoósporos, sub-gén. <i>Eusynchytrium</i>			<i>S. endobioticum</i>
				<i>S. taraxaci</i>
			<i>S. fulgens</i>	<i>S. tricophyllum</i>
			<i>S. geranii</i>	<i>S. papillatum</i>
Soros de esporângios exógenos, sub-gén. <i>Pycnochytrium</i>	Repetidas gerações de zoósporos <i>Mesochytrium</i>		<i>S. stellariae</i>	
			<i>S. Holwayi</i>	
		<i>S. succissae</i>	<i>S. Wurthii</i>	
		<i>S. aureum (lato sensu)</i>	<i>S. aurantiacum</i>	
		amarelo ou avermelhado <i>Chrysochytrium</i>	<i>S. lactum</i>	
			<i>S. myosotidis</i>	
			<i>S. pilificum</i>	
			<i>S. potentillae</i>	
			<i>S. punctum</i>	
			<i>S. ulmariae</i>	
		Uma só geração de zoósporos. Conteúdo dos esporos de resistência	<i>S. alpinum</i>	
			<i>S. anemones</i>	
			<i>S. anomalum</i>	
		incolor <i>Leucochytrium</i>	<i>S. globosum</i>	
			<i>S. mercurialis</i>	
			<i>S. Niesslii</i>	
			<i>S. punctatum</i>	
			<i>S. rubrocinctum</i>	

A posição relativa das diferentes espécies e grupos de espécies

dentro do género, poderia grosseiramente representar-se no seguinte esquema:



Justifiquemos ainda alguns pontos de vista em manifesta discordância com opiniões expostas por investigadores que do género se têm ocupado.

1.º A inclusão do *S. endobioticum* neste grupo de fungos e na posição que lhe assinalámos acima, não significa desconhecimento das conclusões de Walter Bally. As razões por êste apresentadas para fazer voltar esta espécie ao antigo género *Chrysophlyctis* são: a) Que nem Percival nem o A. encontraram mitoses dos núcleos primários do *S. endobioticum*, mas sim fenómenos nítidos de produção amitótica de núcleos secundários; enquanto que, para algumas espécies de *Synchytrium*, Guttenberg (1), Stevens e Kusano demonstraram a existência incontestável de mitoses dos núcleos primários. b) Que nos esporângios produzidos por germinação dos esporos de resistência do *S. endobioticum* nunca se viram mitoses, em qualquer fase do desenvolvimento, o que se não dá para as espécies, sob êsse ponto de vista investigadas, do género *Synchytrium*. c) Que o ataque do *S. endobioticum* aos tecidos do hospedeiro e a sua penetração nas

(1) Só conhecemos o trabalho de Guttenberg, aqui citado, através da referência, aliás desenvolvida, do *Bot. Centralb.* 1909, (vol. 111, pág. 224); mas nenhuma indicação lá encontramos a respeito do processo de divisão dos núcleos primários.

camadas profundas, se faz por processos muito especiais, sem paridade com o que se passa nas outras espécies do género.

A isto, porém, poder-se-ia objectar: a) Que a própria raridade com que têm sido descritas mitoses nos núcleos primários, nos indica que tal processo se não pode generalizar a todo o género e muito menos servir de pretexto para a exclusão de qualquer espécie. Não há nenhuma razão para supôr que todos os *Synchytrium* dividam mitôticamente os seus núcleos primários; pelo contrário, há muito sérias presunções para admitir a existência de fenómenos amitóticos nesses núcleos (cf., entre outros, Stevens (07) e os trabalhos de Griggs). b) Que as investigações sôbre a germinação dos esporos de resistência têm sido tão reduzidas e tão falhas de dados seguros sôbre os fenómenos nucleares que acompanham a formação dos zoósporos, que seria arriscado fazer assentar quaisquer resoluções sôbre factos tão pouco esclarecidos. c) Que o carácter respeitante ao processo de ataque dos tecidos do hospedeiro, divergente na verdade do que se encontra nos outros *Synchytrium*, nos não parece, *por si só*, bastante para a exclusão de uma espécie cujas características dominantes no seu ciclo evolutivo se adaptam inteiramente ao conceito tradicional do género (1).

O *S. endobioticum* apresenta, de resto, maiores afinidades com o *S. taraxaci*, do que êste com o grupo dos *Pycnochytrium* ou, até mesmo, com os *Mesochytrium*. O próprio Bally o reconhece, quando diz (l. c., pág. 127): « *Damit soll natürlich nicht geleugnet sein, dass Beziehungen zu Synchytrium vorhanden sind, darauf hindeutet der ganz Entwicklungsgang der Sporangiosori und auch im grossen Ganzen der Bau der Kerne und ich bin geneigt, anzunehmen, dass sich Chrysophlyctis phylogenetisch von Synchytrium ableitet.* »

Por outro lado, a inclusão do *S. endobioticum* no quadro do género, se não há razões fortes que a contra-indiquem, tem motivos poderosos que a aconselhem. Além de que o seu ciclo evolutivo se adapta inteiramente, como já afirmámos, ao conceito histórico do género, a sua colocação junto das outras espécies de *Synchytrium*

(1) O *S. puerariae*, não só penetra no hospedeiro por um processo diferente das outras espécies (através dos ostíolos estomáticos), como vai atacar, exclusivamente, parênquimas incolores profundos, deixando indemnes a epiderme e o tecido clorofílico subjacente, cujos meatos todavia tem de atravessar. A-pesar-de isso nunca ninguém se lembrou de propôr a sua exclusão do género.

vem preencher uma vaga e facilitar a compreensão das afinidades e relações de parentesco dêste grupo de fungos.

2.º A posição especial que marcámos ao *S. fulgens* justifica plenamente o modo de germinação dos seus soros (cf. Fischer (92), pág. 50). Estes, com efeito, ao germinarem, não põem logo em liberdade os zoósporos, como nas outras espécies do género; são os próprios esporângios que saem, por rutura da parede do soro, se dispersam « *und liegen dann wie lose Uredosporen auf der Blattfläche* ». Só depois germinam deixando sair os zoósporos que têm assim um raio de acção muito mais amplo.

Fischer considera, muito criteriosamente, êste processo de germinação como um primeiro passo para a diferenciação de conídios, que não são mais que esporângios adaptados às condições de vida das plantas terrestres, com disseminação aérea e um período de repouso entre a maturação e a emissão de zoósporos.

O *S. fulgens*, única espécie em que até hoje se encontrou êste curioso modo de germinação, tem, por isso, direito a um lugar à parte, fora da linha de derivação filogenética das formas superiores do género.

3.º Contrariamente à opinião de Rytz (07, pág. 810) collocámos o *S. Wurthii* nos *Mesochytrium*, como forma de transição para os *Pycnochytrium*.

Esta espécie, que Wurth descobriu em Java sôbre o *Gymnopetalum cochinchinense* Kurz, e Rytz estudou e descreveu minuciosamente, forma apenas um tipo de esporos.

Estes têm paredes grossas como os esporos de resistência, mas são de germinação imediata como os soros de esporângios dos *Eusynchytrium*. Por outro lado, produzem soros exógenos, no interior da célula parasitada e sôbre o hospedeiro vivo, como os *Mesochytrium*.

Rytz inclui o fungo em questão no grupo dos *Pycnochytrium*, ainda que assinalando-lhe um lugar à parte, por suas características especiais. « *Zu den Pycnochytrien ist der Pilz aber aus dem Grunde zu rechnen, weil er nur Dauersporen bildet, aus denen dann die Sori hervorgehen, allerdings schon auf der lebenden Pflanze. Die dicke Sporenhülle scheint demnach eine Schutzvorrichtung gegen Austrocknen zu sein* », diz Rytz, porquanto, « *die infizierten Pflanzen standen auf einem hohen Eisenbahndamm und erhalten daher kein anderes als Regenwassers.* »

; Mas então o que é que caracteriza os esporos de resistência e

os distingue dos soros de esporângios? ; Será a existência de uma membrana espessa que, neste caso, Rytz é o primeiro a considerar como aparelho de protecção contra uma possível excessiva dissecação do meio ambiente? ; Ou será pelo contrário o facto de que os soros de esporângios são formações de germinação imediata, enquanto que os esporos de resistência são órgãos hibernantes, com um período de repouso prègerminativo?

A solução do problema não é simples, tanto mais que há factos, — confessemos-lo honestamente — a que Rytz se não refere e que, todavia, podem ser chamados em refôrço de um critério de que continuaremos discordando. É o caso do *S. endobioticum*. Este produz, como vimos, dois tipos de esporos: uns de paredes delgadas, germinação imediata, formando no interior dois a cinco esporângios, e, às vezes, um só; outros de paredes grossas, dando sempre um só esporângio na germinação, normalmente hibernantes, mas podendo também germinar sem período de repouso intermediário.

Que significa isto? Significa que soros de esporângios e esporos de resistência são formações homólogas.

Os esporos hibernantes não são mais que células iniciais de soros que, não encontrando condições favoráveis para a sua germinação imediata, se foram adaptando a uma vida sucessivamente menos imersa, com mais prolongados períodos de repouso; e ao mesmo tempo se foram espessando suas paredes, como meio de defesa contra as novas condições de vida.

Os esporos do *S. Wurthii* e, melhor ainda, os do *S. endobioticum*, fornecem magníficos exemplos desta transição.

Concluir porém daqui que o lugar do *S. Wurthii* deve ser entre os *Pycnochytrium*, parece-nos, salvo o devido respeito, manifesto desacêrto. Os esporos de tipo único desta espécie, germinando normalmente sem período de repouso intermediário, estão muito mais próximos dos soros de esporângios que dos esporos de resistência. E não deve colocar-se nos *Pycnochytrium* uma espécie cujos soros se formam sobre o hospedeiro vivo, facto que naqueles nunca se dá, mas que é de regra nos *Mesochytrium*. Por isso o colocámos entre estes, ao topo do grupo, já como forma de transição — e bem demonstrativa — para os *Pycnochytrium*, de cujo ciclo evolutivo desapareceram definitivamente as sucessivas gerações de zoósporos.

CAPÍTULO V

Posição e afinidades dos *Synchytrium*

Não é nossa intenção tratar aqui desenvolvidamente o problema, extraordinariamente complexo, das relações do género *Synchytrium* com os outros organismos animais ou vegetais.

Para empresa de tamanha responsabilidade nos faltam, antes de mais nada, competência e autoridade, qualidades estas que só se conquistam ao cabo de longos anos de investigações especializadas e pelo conhecimento directo da maioria dos grupos com os quais se podem presumir relações filéticas.

Consideramos porém indispensável, como remate lógico deste trabalho, expor a traços largos o que se pensa da posição e afinidades dos *Synchytrium* e em que é que as nossas investigações podem contribuir para esclarecimento do problema.

Não há talvez, no campo da Biologia, questão mais cheia de encantos e atractivos espirituais que esta do estabelecimento das relações filéticas entre os diferentes grupos de seres vivos. E se é certo que, para muitos desses grupos, reina já hoje, entre os investigadores especializados, uma relativa unidade de vistas sobre o problema da sua origem, não é menos certo que, acerca de outros, estamos ainda muito longe de uma solução aceite pela maioria.

Neste último caso estão os fungos, em geral, onde o problema das origens e relações se apresenta particularmente complicado. Os diferentes critérios a que tem obedecido a sistemática deste grupo de plantas, a partir de meados do século passado, e as profundas revoluções a que tem sido sujeita a sua classificação, dão bem idea da evolução dos nossos conhecimentos a respeito da sua morfologia e processos de reprodução.

Sachs 1868 Até à publicação do *Lehrbuch der Botanik* de Sachs (68) o critério dominante para a divisão das Talófitas era o da nutrição. Os Fungos formavam por isso um grande grupo de plantas saprófitas ou parasitas, por opposição às Algas, plantas de nutrição holofítica.

Á medida porém que novas descobertas se iam registando sobre

a morfologia dos aparelhos reprodutores dêstes dois grandes grupos de plantas, ia-se pouco a pouco radicando a idea de que existiam muitas vezes afinidades maiores entre certas Algas e certos Fungos do que entre representantes afastados de cada um dêstes dois grupos. Assim se começaram aproximando as Chytridiaceae das Palmellaceae, as Saprolegnieae das Siphoneae, as Mucorineae das Conjugatae, *Monoblepharis* das Oedogoniae, os Ascomycetes das Florideae, etc.

Cohn e depois Sachs deram um grande impulso a estas novas ideas apresentando um sistema de classificação das Talófitas que vinha fazer uma verdadeira revolução e se baseava exclusivamente sôbre caracteres morfológicos dos órgãos de reprodução, abstraindo por completo do modo de vida dos respectivos seres.

Assim, Sachs considerava quatro classes de Talófitas: Protophyta, Zygosporaeae, Oosporeae e Carposporaeae.

As Protophyta incluíam as Cyanophyceae, parte das Palmellaceae, os Schizomycetes e os Saccharomycetes.

As Zygosporaeae compreendiam as Pandorineae, Hydrodictyeae, Conjugatae, Diatomaceae, Myxomycetes e Zygomycetes.

As Oosporeae englobavam formas como Sphaeroplea, Vaucheria, Volvocineae, Oedogoniae, Fucoideae, Saprolegnieae e Peronosporaeae.

Finalmente nas Carposporaeae ficavam as Coleochaeteae, Florideae, Characeae, Ascomycetes (com os Liquens), Aecidiomycetes (Uredineae) e Basidiomycetes.

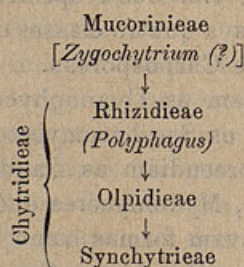
Quanto às Chytridinae não se pronuncia claramente Sachs a respeito da sua posição e afinidades. Mas admite a possibilidade de que possam vir a ficar entre as Zygosporaeae, junto dos Myxomycetes.

Por muito disparatado que se nos afigure hoje um sistema que separa em classes diferentes, por exemplo, as Pandorineae e as Volvocineae, para colocar depois lado a lado, em uma mesma classe, os Myxomycetes, as Pandorineae, as Conjugatae e os Zygomycetes, havemos de convir que um tal processo de agrupamento representou manifestamente um progresso e constituiu um poderoso estimulante para novas investigações, tendentes umas a alicerçar em maior número de factos a nova doutrina, outras a provar a sua inanidade.

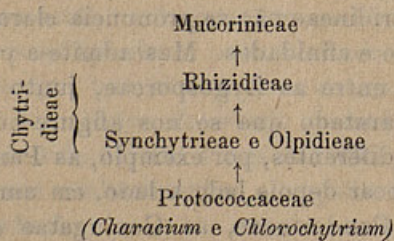
O critério de Sachs, sobrepondo caracteres de ordem morfológica aos de ordem fisiológica, até então seguidos, representa uma reacção salutar contra uma tendência empírica e anacrónica. Simplesmente,

Sachs foi demasiadamente longe, tendo apenas em linha de conta os caracteres tirados da configuração dos órgãos reprodutores. O seu sistema desmembra grupos evidentemente naturais, apanhando os ramos da árvore genealógica das Talófitas em diferentes alturas do seu desenvolvimento e amputando-os, para os meter nas gavetas de um sistema artificial.

De Bary 1884 De Bary (84) admite a possibilidade de três hipóteses, inclinando-se de preferência para a primeira. Assim as Chytridieae, que incluem para o autor as Rhizidieae, Cladochytriae, Olpidieae e Synchytriae, derivariam por regressão das Mucorinieae e constituíriam o último termo de uma cadeia regressiva e monofilética.



Em uma segunda hipótese as Chytridieae constituíriam ainda um grupo monofilético, derivado das Protococcaceae por evolução progressiva conduzindo às Mucorinieae.



Finalmente, De Bary admite ainda a possibilidade de uma terceira hipótese, segundo a qual as Chytridieae seriam consideradas como um grupo polifilético, derivando as Rhizidieae e as Cladochytriae, por regressão, das Mucorinieae e Ancylistinieae, enquanto que as Olpidieae e as Synchytriae se ligariam talvez às Protococcaceae.

Por outro lado, De Bary aproxima, como vimos já (cf. pág. 72), dos *Eusynchytrium* e *Pycnochytrium* os géneros *Rozella* e *Woronina* de Cornu, formando com os quatro o grupo das Synchytrieae, provavelmente com o valor sistemático de uma família.

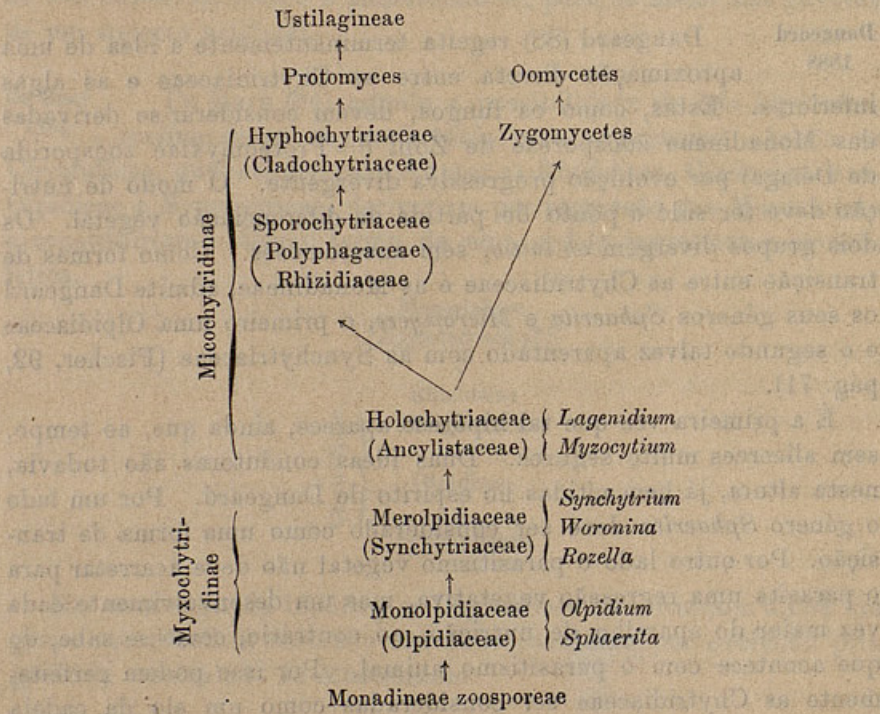
Dangeard 1888 Dangeard (88) regeita terminantemente a idea de uma aproximação directa entre as Chytridiaceae e as algas inferiores. Estas, como os fungos, devem considerar-se derivadas das Monadineae zoosporeae de Zopf (= Proteomyxiae zoosporida de Delage) por evolução progressiva divergente. O modo de nutrição deve ter sido o ponto de partida da diferenciação vegetal. Os dois grupos divergem *ab initio*, sem anastomoses. Como formas de transição entre as Chytridiaceae e as Monadineae, admite Dangeard os seus géneros *Sphaerita* e *Micromyces*, o primeiro uma Olpidiaceae e o segundo talvez aparentado com as Synchytriaceae (Fischer, 92, pág. 71).

É a primeira vez que tal hipótese aparece, ainda que, ao tempo, sem alicerces muito seguros. Duas ideas condutoras são todavia, nesta altura, já bem nítidas no espirito de Dangeard. Por um lado o género *Sphaerita* deve ser considerado como uma forma de transição. Por outro lado o parasitismo vegetal não deve acarretar para o parasita uma regressão vegetativa, mas um desenvolvimento cada vez maior do aparelho de nutrição, ao contrário, como se sabe, do que acontece com o parasitismo animal. Por isso podem perfeitamente as Chytridiaceae ser consideradas como um elo da cadeia ascendente que liga as Monadineae zoosporeae aos fungos superiores.

Fischer 1892 As ideas que Dangeard apenas esboçara em 1888 apenas depois metódica e desenvolvidamente expostas na obra de Fischer (92). Contra as opiniões então dominantes de Saccardo, De Bary, Brefeld, Zopf e outros, defende Fischer a doutrina de que as Chytridiaceae devem provir das Monadineae zoosporeae e servir de elemento de ligação para os Zygomycetes e Oomycetes. E, sobretudo contra Cohn e Sachs, afirma a sua convicção na unidade dos Fungos, agrupamento monofilético sem relações imediatas com as Algas.

A classe dos Phycomycetes divide-a o autor em três ordens: Archimycetes (Chytridinae), Zygomycetes e Oomycetes.

Quanto à posição relativa e afinidades dos diferentes grupos de Phycomycetes, o quadro que segue dará rapidamente uma noção de conjunto das ideias de Fischer.



Lagerheim 1893 A descoberta do *Rhodochytrium Spilanthidis* de Lagerheim (93), vem trazer um novo ponto de apoio aos que defendem a doutrina da origem polifilética dos fungos a partir de diferentes grupos de algas, por adaptação gradual e progressiva à vida saprofitária e parasitária.

Com efeito, ¿ deve o novo género *Rhodochytrium* ser considerado como uma alga ou como um fungo? Sem plastídeos nem clorofila, levando uma vida completamente parasitária, o micro-organismo de Lagerheim é fisiologicamente um fungo. A sua morfologia e a sua embriologia asseguram-lhe, por outro lado, um lugar incontestável entre as Protococcaceae, como último termo de uma série de sucessivas adaptações à vida endofítica. Assim as Phyllobiaceae (vid. Oltmanns, III vol., 1923) constituem um grupo bem homogêneo, que,

começando no género *Phyllobium* com formas simplesmente endófitas, mas susceptíveis de nutrição holofítica, nos vai conduzir, pelas *Scotinosphaera*, até ao género *Rhodochytrium*, de um parasitismo indiscutido.

Lagerheim considera por isso o novo parasita como uma forma de transição entre as Protococcaceae e os Phycomycetes, correspondendo o sistema rizoidal do *Rhodochytrium* ao micélio das Mycochytridinae.

Schröter 1897 Schröter (97) enfileira ao lado de Fischer. A aproximação das algas e dos fungos e a conseqüente doutrina polifilética da origem destes, baseia-se, diz o autor, em simples semelhanças exteriores. Após as importantes investigações de Brefeld e outros sobre a morfologia e a embriologia comparada de vários grupos de fungos « *wird die Aufstellung eines Pilzsystems von einheitlichem Gesichtspunkte möglich, die Abteilung der Pilze von mehreren Stämmen erscheint dadurch mindestens entbehrlich* ».

As Chytridinae constituem para o autor uma sub-ordem da ordem dos Oomycetes, na classe dos Phycomycetes.

As suas analogias com as Protococcoideae, por um lado, e, por outro, com certos Flagelados (particularmente do grupo das Monadinae zoosporeae) tornam aceitável ao espírito de Schröter a doutrina da derivação, a partir de um tronco comum, dos três grupos de micro-organismos: Flagelatae, Chytridinae e Protococcoideae.

Dentro dos fungos a evolução deve ter-se feito a partir das formas inferiores, segundo determinadas directrizes: desenvolvimento progressivo do micélio até à formação de hifas típicas; transformação dos esporângios em ascos; aparecimento de conídios à custa de esporângios entravados no seu desenvolvimento; transformação de conidióforos em basídios; e, dentro de cada grupo, desenvolvimento de frutificações a partir de um primitivo entrelaçamento laxo de hifas e transformação progressiva das frutificações abertas em frutificações fechadas.

São estas, em resumo, as ideas condutoras do sistema de Schröter, que não podemos tratar aqui com maior desenvolvimento.

Quanto aos Myxomycetes — que o autor divide em Acrasiae, Phytomyxinae e Myxogasteres — não tem, na opinião de Schröter, nenhuma ligação com o resto do mundo das plantas. As tentativas para o estabelecimento de uma transição entre elles e os fungos

mais simples não deram resultados. É certo que algumas Chytridiaceae (*Olpidium*, *Synchytrium*) também não apresentam vestígios de micélio e começam o seu desenvolvimento por zoósporos, que se transformam em grandes corpos plasmáticos, de comêço apenas envolvidos por uma delgada membrana que não limita o seu crescimento. Tem-se pretendido comparar estes corpos com plasmódios sem se reparar que não têm nenhuma analogia com os plasmódios dos Myxomycetes, formados por agregação de muitas massas plasmáticas. Além disso, tais pseudo-plasmódios carecem de movimentos amibóides (excepto na *Reessia*), um dos caracteres essenciais dos Myxomycetes.

Tal é, resumidamente, o critério de Schröter.

Poder-se-ia porém objectar desde já que as Phytomyxinae — que o autor considera como fazendo parte da Divisão dos Myxomycetes — também carecem de movimentos amibóides nos seus plasmódios, formados exactamente pelos mesmos processos dos pseudo-plasmódios de muitas Chytridiaceae.

Entretanto encontram-se divididas as opiniões. Os livros de texto continuam espalhando e defendendo a doutrina, sedutora na verdade, da existência de ligações estreitas e anastomoses freqüentes entre as algas e os fungos. Os micologistas por outro lado são quasi todos partidários da doutrina oposta.

Atkinson (09), em um magnífico trabalho de conjunto, procura demonstrar que a hipótese da derivação dos Oomycetes e Zygomycetes a partir dos Archimycetes e dêstes, por sua vez, de micro-organismos do tipo das Protococcoideae ou dos Flagelados (Protomastigineae), é muito mais lógica e adapta-se melhor aos factos, que a hipótese contrária, da derivação dos fungos a partir das algas, por regressão vegetativa e adaptação à vida heterotrófica.

Na impossibilidade manifesta de analisar detidamente as conclusões de Atkinson, limitemo-nos a resumir os seus pontos de vista essenciais.

1.º Não é admissível que formas desprovidas de micélio como as Myxochytridinae tenham derivado, por regressão sob a influência do parasitismo, de formas de micélio bem desenvolvido, como as Peronosporae e as Saprolegniae. O desenvolvimento progressivo do micélio representa uma vantagem para o parasita, que vê assim

aumentada a sua capacidade de nutrição. E, por outro lado, as plantas hospedeiras não são tão sensíveis à acção deletéria dos aparelhos sugadores dos seus parasitas como os hospedeiros animais.

É natural por consequência supor que, como nas plantas autotróficas, o aparecimento de formas sucessivamente mais complexas foi sendo possível à medida que se foi desenvolvendo a capacidade de nutrição.

2.º O fenómeno do diplanetismo dos zoósporos, que se apresenta com tóda a clareza nas Saprolegniae, e se não encontra nunca nas algas, procura Atkinson, um pouco forçadamente, a sua origem nas Chytridíneae inferiores, com uma evolução progressiva através das Ancylistaceae. Tal diplanetismo representa para o autor um obstáculo muito sério à aproximação tão comum das Saprolegniaceae das Vaucheriaceae.

3.º A variabilidade do número de flagelos, às vezes dentro da mesma família, não destrói o conceito de unidade nos Phycomycetes. O aparecimento de zoósporos uniflagelados pode explicar-se: « *either by deriving the uniciliate ones from the biciliate by one more division, or by a halting in the process of division of the protoplasm by one step* ».

Pelo contrário, pretender basear uma classificação dos Phycomycetes, à maneira do que se faz com as algas, sobre o número de flagelos dos seus zoósporos, conduziria aos mais estapafúrdios resultados.

4.º Sob o ponto de vista do aparecimento da sexualidade, formam as Chytridíneae o ponto de partida de uma série ascendente e divergente, um ramo isogâmico conduzindo aos Zygomycetes, outro ramo heterogâmico levando aos Oomycetes.

Pavillard Pavillard (10), pondo em relêvo os fenómenos citoló-
1910 gicos descobertos poucos anos antes nos *Synchytrium*, faz notar que fenómenos semelhantes se não encontram em nenhum outro grupo de fungos, mas foram descritos nos Esporozoários, o que permite supor a existência de um estreito parentesco entre os dois grupos.

Bally Bally (11) considera como carácter de primacial importância
1911 o facto de os *Synchytrium* se conservarem uninucleados até ao fim do período de crescimento, emquanto que no género *Urophlyctis* (= *Cladochytrium* de Fischer) e em algumas Olpidiaceae as divisões

nucleares acompanham o desenvolvimento do glóbulo primário. Os primeiros são até ao fim monoenergídeos; os segundos, desde o começo, polienergídeos.

Por isso distingue o autor nas Chytridíneae duas séries: a dos *Synchytrium*, por um lado, e, por outro, a das Olpidiaceae, Rhizidiaceae até aos *Cladochytrium*.

Sobre a origem filética desta segunda série não se pronuncia claramente Bally. A série dos *Synchytrium* considera-a derivada dos Esporozoários, entre os quais se encontram formas, como a *Eimeria Schubergi* e a *Adelea ovata*, com ciclos evolutivos muito semelhantes ao dos *Synchytrium*, sobre-tudo se abstrairmos da questão da conjugação, que ainda não foi descoberta neste grupo de fungos inferiores.

Griggs (12), depois de ter trabalhado largamente na citologia dos *Synchytrium*, retomou o estudo do *Rhodochytrium* de Lagerheim, em um belo trabalho acompanhado de esplêndidas gravuras. O autor propõe-se verificar se o estudo citológico deste tão discutido micro-organismo confirma a existência de um parentesco entre as Protococcaceae e as Chytridíneae.

Pondo de parte a existência de uma conjugação isogâmica no *Rhodochytrium*, que não encontra paralelo no género *Synchytrium*, o ciclo evolutivo dos dois micro-organismos assemelha-se na verdade estreitamente, mesmo em certas minúcias de ordem citológica.

« It is difficult to imagine, acrescenta Griggs, that such peculiar cytological features originated independently. If the cytology of the other members of the Phyllobiae and of the genera closest to *Synchytrium* should fall into line with the evidence now available in *Rhodochytrium*, and *Synchytrium*, it would make a strong case in favor of a phyletic relationship between the two groups. But it would afford no reason for supposing them closely related, for *Synchytrium*, appears to occupy an isolated position. The gap which separates it from *Phyllobiae* would appear to be of ordinal rank, and, at the same time, it is generally recognized that it is far from most other *Archimycetes*. Nor would it show that *Synchytrium*, was derived directly from *Rhodochytrium* or even from *Phyllobiae*. But it would indicate that these forms may serve as a guide post pointing out the most probable location of the evolutionary path followed by the ancestors of *Synchytrium* ».

Tobler 1913 Tobler (13) perfilha a opinião de Pavillard de que as Chytridíneae podem considerar-se derivadas dos Esporozoários pelo género *Synchytrium*. Por outro lado, a autora admite a existência de relações estreitas com o género *Chytridium*, por intermédio de formas como o *S. taraxaci*, cujo esporo de resistência, ao germinar, produz um só esporângio; e, melhor ainda, pelo *S. endobioticum*, que, além desta característica comum com o *S. taraxaci*, produz muitas vezes soros com um esporângio apenas e esporos de resistência capazes de germinar sem um período de repouso intermediário.

Esboçados assim, rapidamente, os diferentes critérios por que tem sido encarado o problema, vejamos o que se nos oferece dizer sobre a posição e afinidades dos *Synchytrium*.

A existência de relações tão estreitas com os géneros *Woronina* e *Rozella* que permitam a inclusão dos três em uma mesma família, afigura-se-nos absolutamente improvada. Se outros obstáculos se não levantassem contra semelhante critério, bastaria a existência, na *Woronina* e na *Rozella*, de zoósporos biflagelados, deslocando-se suavemente, sem os saltos zig-zagueados, tão característicos dos esporos dos *Synchytrium*, para tornar ilógica e artificial uma família assim constituída.

Se, de acôrdo com Atkinson, julgamos que não pode dar-se, nos Phycomycetes, tamanha importância ao número de flagelos dos zoósporos de modo que seja possível basear sobre esse carácter a formação dos grandes grupos, não vamos todavia tão longe que consideremos o facto de somenos importância para o agrupamento dos géneros em famílias.

Mas há outros e poderosos argumentos. Tanto a *Woronina* como a *Rozella* são formas parasitas de fungos aquáticos; os agregados de esporângios, laxos como na *Woronina*, ou unisseriados como na *Rozella*, não têm nunca uma membrana comum a envolvê-los, e bem pouco se assemelham, a-pesar-de ordinariamente designados pelo mesmo nome, aos soros dos *Synchytrium*. Finalmente as formas de resistência na *Woronina* são soros pluriesporangiados, emquanto que na *Rozella* e nos *Synchytrium*, com excepção talvez do *S. endobioticum* (cf. pág. 42), são verdadeiros esporos unicelulares.

As relações entre os três géneros não são de molde a permitir a

sua inclusão em uma única família. Os *Synchytrium* ocupam uma posição tão isolada em relação aos outros Archimycetes, que é perfeitamente legítimo considerá-los como únicos representantes da família das Synchytriaceae e criar para a *Woronina* e *Rozella* uma família nova.

Quanto ao problema da origem dos Phycomycetes em geral e dos *Synchytrium* em particular, analisemos rapidamente a verossimilhança das diferentes hipóteses apresentadas.

Os que aceitam como boa a doutrina de que os Archimycetes devem ser considerados como formas de regressão dos Phycomycetes superiores, derivam estes, por sua vez, de diferentes grupos de algas verdes — as Saprolegniae e Peronosporae das Vaucheriaceae, *Monoblepharis* das Oedogoniaceae, Mucorineae das Zygnemaceae. Apesar do diplanetismo dos zoósporos dos Phycomycetes, a que Atkinson deu tão grande importância, e das diferenças, por vezes consideráveis, que se encontram quando se cotejam os vários órgãos destes grupos de plantas, ficam ainda, entre os respectivos ciclos evolutivos, tamanhas analogias, que é difícil admitir que umas e outras se tenham originado e evoluído independentemente, que tais semelhanças sejam o resultado fortuito de uma simples evolução paralela em análogas condições mesológicas. Assim, principalmente, o caso das Vaucheriaceae e das Saprolegniae.

Todavia, mesmo que tenhamos de admitir a doutrina da filiação, total ou parcial, dos Phycomycetes superiores, nos grupos mais altamente diferenciados de Clorofíceas, ou nas Conjugadas, isso não implica de nenhum modo concordância com a segunda parte da hipótese. Os Archimycetes não podem ter derivado, por regressão, dos Oomycetes e Zygomycetes, como provaram brilhantemente, primeiro Dangeard, e depois Atkinson. Ou o grupo dos Phycomycetes deve ser encarado como um todo homogêneo, monofilético, que, partindo de organismos inferiores, evoluiu pelos Archimycetes até aos Oomycetes e Zygomycetes; ou devemos considerá-lo como um agregado heterogêneo, polifilético, de dois ou mais grupos diferentes, cada um deles com sua linhagem independente.

A primeira hipótese, da derivação dos Archimycetes a partir de fungos filamentosos, deve pois ser posta inteiramente de parte.

Dos que defendem a doutrina da existência de relações estreitas entre os Archimycetes e as Protococcaceae, parecem-nos particularmente dignos da nossa atenção os trabalhos de Lagerheim e de Griggs,

A descoberta do género *Rhodochytrium* foi alegremente saúdada por Lagerheim, como uma prova indiscutível da existência de formas de transição entre os Phycomycetes e as Clorofíceas.

As minuciosas investigações citológicas de Griggs não confirmam porém, segundo êle próprio afirma, a existência de *relações estreitas* entre os *Rhodochytrium* de um lado e os *Synchytrium* do outro. Nós vamos mesmo mais longe, e afirmamos que o trabalho de Griggs nos conduz necessariamente a rejeitar, por impossível, a idea de uma aproximação filética entre os Archimycetes e as Protococcaceae.

Com efeito. Os zoósporos do *Rhodochytrium* têm dois flagelos, implantados no polo anterior, pigmentado pelo hematocrómio, do corpo do esporo; possuem freqüentemente reservas hidrocarbonadas sob a forma de grãos de amido, com os caracteres químicos e a estrutura física do amido das algas verdes; deslocam-se suavemente, sem saltos bruscos e zig-zagueados, e conjugam-se freqüentemente como se fôsses isogâmetos. Ao contrário dos *Synchytrium*, é o *Rhodochytrium* sempre parasita intercelular, desprovido, é certo, de clorofila e de plastídeos durante todo o ciclo evolutivo, mas acumulando abundantes grãos de amido, formados no seio do plasma sem intervenção de quaisquer elementos figurados.

Por outro lado, a afirmação de Griggs de que «*the cytology of Rhodochytrium bears a strong resemblance to that of Synchytrium*» não sabemos realmente em que possa basear-se. Na verdade o autor não encontrou nada de semelhante à tão característica multiplicação nuclear dos *Synchytrium* por emissão de cromídias. As mitoses também só vagamente se assemelham às até hoje descritas para o género *Synchytrium*; o número e a forma dos cromosomas são nos dois casos bastante diferentes.

A hipótese da derivação dos Archimycetes (pelos *Synchytrium*) e das Protococcaceae (pelas Phyllobiae) a partir de antepassados próximos comuns, deve também ser posta de parte.

A idea da aproximação dos Esporozoários, lançada, ao que parece, por Haeckel (cit. por Pavillard), perfilhada e defendida por Pavillard e Tobler, precisada por Bally, parece-nos, pelo contrário, assente em bases mais seguras, ainda que não conheçamos directamente os trabalhos modernos sôbre a citologia dêstes micro-organismos.

Se pusermos de parte a existência de uma conjugação nos Esporozoários, que se não encontra todavia em todos os grupos e que

é muito possível que venha ainda a descobrir-se nos *Synchytrium*, as semelhanças entre o ciclo evolutivo destes e o de muitos Esporozoários são, na verdade, flagrantes.

Uns e outros são parasitas intracelulares, que, desenvolvendo-se no interior de uma célula hospedeira, se conservam uninucleados até ao estado de célula inicial madura, ou de esquizonte adulto. Intervém depois uma fase de multiplicação nuclear (esquizogonia), onde são freqüentes os casos de formação de novos núcleos por emissão de cromídias (França, (09), na *Haemogregarina splendens* Labbé; Swarczewsky, (12), em uma *Lankesteria*, e muitos outros que só conhecemos de citações). A esquizogonia termina nos Esporozoários pela formação de merozoites, talvez homólogos dos protósporos dos *Synchytrium*. Nos primeiros são os merozoites os agentes de disseminação, enquanto que nos segundos se teria intercalado uma fase nova de germinação dos protósporos e formação de zoósporos. Em uns e outros intervém depois uma fase de enquistamento — oocistos nos Esporozoários, esporos de resistência nos *Synchytrium* — fase que possibilita uma disseminação aérea. Ao germinarem, os quistos das Coccididae produzem esporos, no interior dos quais se formam esporozoites. Nos *Synchytrium* os esporos de resistência dão origem a esporângios, que, por sua vez, geram zoósporos. A ideia de que os esporos e esporozoites dos primeiros sejam formações homólogas, respectivamente, dos esporângios e zoósporos dos segundos, salta desde logo ao espírito como a mais lógica.

O paralelismo dos dois tipos de ciclo evolutivo, nunca até agora postos lado a lado tão concreta e minuciosamente, afigura-se nos incontestável.

Não concluímos porém daqui pela derivação dos *Synchytrium* a partir de qualquer das ordens de Esporozoários, mas sim pela existência de um tronco comum aos dois grandes grupos de micro-organismos.

Finalmente, resta-nos analisar a doutrina de Dangeard e de Fischer, da derivação das Chytridíneae a partir das Monadíneae zoosporeae (1).

Mas, antes de mais nada, em que grupo de Monadíneae zoosporeae se pretende filiar as Chytridíneae?

(1) Este grupo das Monadíneae zoosporeae foi criado por Zopf (cit. por Schröter

Não conseguimos averiguá-lo, pois a hipótese vem exposta de uma maneira bastante vaga, tanto nos autores como nos comentadores. Entretanto, parece-nos que as afinidades que Dangeard e Fischer julgaram ter encontrado entre as Monadineae zoosporeae de um lado e as Chytridineae do outro, não foram por intermédio das Plasmodiophoreae. A *Sphaerita*, que Dangeard considera, pelas Chytridineae, como forma de transição, tem um ciclo evolutivo muito mais próximo das *Pseudospora* do que das *Plasmodiophora*.

De resto o estabelecimento de um estreito parentesco entre as Plasmodiophoreae e as Chytridineae só podia basear-se em delicadas investigações citológicas, todas posteriores a Dangeard e Fischer. Aquele escreveu em 1888; éste em 1892. Emquanto que o que se sabe da citologia das Plasmodiophoreae se deve principalmente a Nawaschin (99), Prowazek (05) e Maire et Tison (09).

Por outro lado Schröter, pouco depois (97), afirmava que os Myxomycetes — entre os quais incluía as Plasmodiophoreae sob a designação de Phytomyxinae — «haben in der ganzen übrigen Reihe der Pfl. keine Verwandte» e sobretudo «keinen Anschluss nach oben zeigen».

Pois bem. As nossas investigações sobre a citologia dos *Synchytrium* e, particularmente, a descoberta de uma divisão nuclear de tipo mixto, partilhando ao mesmo tempo dos caracteres da mitose e da amitose, não só vem trazer à doutrina de Dangeard e Fischer aliterceres seguros, no campo citológico, mas provam ao mesmo tempo a existência de um parentesco muito estreito entre as Synchytriaceae e as Plasmodiophoreae — precisamente o grupo de Monadineae que daquelas parecia mais afastado.

e Delage) que dividia assim os Myxomycetes:

Myxomycetes	{	Eumycetozoa	{	Acrasidae
				Myxogasteres
		Monadineae	{	Azoosporeae
				{ Pseudosporae
				{ Gymnococceae
				{ Plasmodiophoreae

As Monadineae azoosporeae correspondem às Proteomyxiae azoosporida de Delage, emquanto que as M. zoosporeae vêm a ser por éste designadas de Proteomyxiae zoosporida.

As minúcias de ordem citológica do ciclo evolutivo dos outros grupos de Monadineae zoosporeae (Pseudosporae e Gymnococceae) não as conhecemos nós. Supomos mesmo que o assunto está mal estudado e que não tem aparecido sôbre êle trabalhos importantes. Mas conhecemos perfeitamente a citologia das Plasmodiophoreae, não só pela leitura dos mais importantes trabalhos originaes que têm aparecido, mas ainda pelas nossas próprias investigações sôbre a *Plasmodiophora brassicae* Wor.

Podemos assim afirmar que entre o ciclo evolutivo das Plasmodiophoreae e o dos *Synchytrium* existem importantes pontos de contacto; e as divergências que se encontram podem attribuir-se, ou a um conhecimento imperfeito de todo o ciclo evolutivo (particularmente no que respeita aos *Synchytrium*), ou a adaptações secundárias a diferentes condições mesológicas.

Começam as Plasmodiophoreae (1) o seu desenvolvimento por uma fase flagelada, de vida aquática, que, perdendo o flagelo, se transforma em uma mixamiba. Esta atravessa a parede de uma célula do hospedeiro habitual, aí se instala e se desenvolve parasitariamente, produzindo por vezes neoplasias importantes. Os núcleos das células infestadas, constatámo-lo nós, apresentam alterações extraordinariamente semelhantes às que descrevemos para o caso do *Synchytrium*.

Segue-se uma fase de multiplicação activa que conduz à formação de plasmódios multinucleados intracelulares, desprovidos sempre de uma membrana envolvente. As divisões nucleares, que acompanham esta fase, são de um tipo extremamente curioso e único no mundo dos seres vivos. Com efeito, tóda a cromatina nuclear está a princípio acumulada em um corpúsculo, o nucléolo ou cariosoma. Depois, uma parte é expulsa para o nucleoplasma e vai dar ali origem aos cromosomas, que se dispõem em placa equatorial, em volta do resto do nucléolo colocado ao centro; êste estira-se agora no sentido dos polos, formando com a placa equatorial, vista de perfil, as célebres *figuras cruciformes* [Prowazek (05), Maire et Tison (09), Favorsky (10)]. Depois, os cromosomas separam-se e marcham para os polos em duas placas equatoriais paralelas, ao mesmo tempo que

(1) Referimo-nos em especial à *P. brassicae* Wor. e à *Sorosphaera veronicae* Schrôt., as mais completamente conhecidas.

o nucléolo se estira mais, se estrangula a meio, formando as *figuras em haltere* ou *em dupla âncora*, e acaba por se partir em dois nucléolos-filhos que, unindo-se às massas cromáticas dos cromosomas, vão reconstruir os novos núcleos (cf. com as nossas figs. 29 a 45, Est. IV).

Esta fase, a que Maire et Tison chamam esquizogónica, termina por um fenómeno de depuração nuclear, em que grande parte da cromatina (trofocromatina) migra para o citoplasma sob a forma de cromídias. A pequena porção de cromatina que fica nos núcleos (idrocromatina) é agora empregada exclusivamente na formação dos cromosomas. Por isso as divisões que seguem (duas, segundo Maire et Tison) são mitoses regulares (fase esporogónica), em que não inter-vém nucléolo algum.

Afirmam ainda estes autores que a primeira destas duas divisões, na *Sorosphaera veronicae*, é uma meiose, em que o número de cromosomas passa de 16 a 8. O facto porém não foi até hoje confirmado por ulteriores observações. E quem conhece as dimensões destes núcleos e respectivos cromosomas, difíceis de diferenciar em um plasma impregnado de cromatina, pode bem avaliar do grau de confiança que merecem tais descrições.

Prowazek afirma que esta fase esporogónica, na *Plasmodiophora brassicae*, não é acompanhada de uma meiose, na primeira divisão, mas termina por uma conjugação nuclear, precedendo imediatamente a formação dos esporos. Os núcleos dos gâmetos comportar-se-iam diferentemente, pois que um deles sofreria, antes da conjugação, uma redução cromática. O autor porém é o primeiro a confessar (*loc. cit.*, pág. 402) que, precisamente nesta altura, as observações se tornam extraordinariamente difíceis, dada a extrema pequenez dos núcleos.

Maire et Tison contestam, por sua vez, a existência desta conjugação e atribuem a interpretação de Prowazek à observação de esporos anómalos, caso freqüente na *Sorosphaera veronicae*.

Se pusermos, por consequência, de parte estes fenómenos de redução cromática e de cariogamia, que carecem, em nosso entender, de ser confirmados por novas observações, fica-nos um ciclo evolutivo que, nas suas linhas gerais e nas minúcias de ordem citológica que o acompanham, se assemelha consideravelmente ao ciclo evolutivo dos *Synchytrium*. A divisão nuclear que descrevemos e figuramos no Capítulo III, é, na essência, do mesmo tipo das que se encontram nas Plasmodiophoreae — uma mitose da idrocromatina, acompanhada de uma divisão directa da trofocromatina. A dife-

rença mais importante entre os dois processos de divisão nuclear consiste na posição ocupada pelo nucléolo durante o fenómeno. Nas Plasmodiophoreae o nucléolo ocupa uma posição central e simétrica no meio da placa equatorial; nos Synchytrium fica o nucléolo fora e ao lado da placa equatorial. Tais divergências porém são inteiramente secundárias e não afectam de nenhum modo nem a essência do processo nem o seu significado filogenético.

Por outro lado pode assemelhar-se o plasmódio da *Plasmodiophora brassicae*, imediatamente antes da formação dos esporos, a um soro uniesporangiado de *Synchytrium*. É certo que estes são sempre envolvidos por uma membrana própria, enquanto que aqueles são nus. Mas na *Rozella* e na *Woronina* os soros também não formam nunca uma membrana própria, e todavia os dois géneros têm sido considerados tão próximos parentes dos *Synchytrium*, que até foram incluídos, com unânime assentimento, na mesma família.

A própria existência de dois tipos de divisão nuclear nas Plasmodiophoreae, o primeiro acompanhado de uma amitose da trofocromatina, o segundo sem intervenção do nucléolo, encontraria correspondência nos *Synchytrium*, onde, segundo Bally (cf. pág. 45) as mitoses nos soros do *S. taraxaci* são também de dois tipos; antes da formação dos esporângios, o nucléolo é visível quasi até ao fim da divisão nuclear; depois da septação do soro deixa o nucléolo de assistir à mitose.

A única divergência importante que se encontra entre os dois tipos de ciclo evolutivo, consiste na existência, nas Plasmodiophoreae de esporos imóveis, envolvidos de espessa membrana e adaptados à disseminação aérea, que não encontram facilmente homologia entre os *Synchytrium*. Nem a sua ontogenia nem o seu destino ulterior permitem que os consideremos homólogos dos esporos de resistência das Synchytriaceae.

Muito mais aceitável nos parece a hipótese de que tais formações sejam homólogas de zoósporos, em cujo desenvolvimento se tivesse intercalado secundariamente uma fase de enquistamento e de repouso.

Em conclusão: Os *Synchytrium* constituem um género tão isolado no seio dos Archimycetes, que devemos considerá-los como representantes únicos da família das Synchytriaceae. O seu ciclo evolutivo e as minúcias de ordem citológica que o acompanham permitem a

aproximação do género, por um lado, dos Esporozoários, e, por outro, das Plasmodiophoreae; e dão foros de verossimilhança à hipótese da existência de um tronco comum de micro-organismos flagelados, parasitas de vida aquática, de onde teriam derivado em séries divergentes os Esporozoários, as Plasmodiophoreae e os Archimycetes.

...mundo de gente, por se lá, das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...
...e das freguesias de São ...

BIBLIOGRAFIA

- Atkinson, G. F. 1909. « Some problems in the evolution of the lower fungi, » *Ann. Mycol.*, 7, 441-472.
- Bally, W. 1911. « Cytologische Studien an Chytridineen, » *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 50, 95-156.
- Bary, A. De, e Woronin, M. 1863. « Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Chytridiaceen, » *Ber. d. naturf. Ges. Freiburg i. B.*
- Bary, A. De. 1884. *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze*. Leipzig. (Trad. ingl. de 1887).
- Bensaude, M. 1923. « A species of *Olpidium* parasitic in the roots of tomato, tobacco and cabbage, » *Phytopathology*, 13, 451.
- Bloomfield, I. E. a. Schwartz, E. I. 1910. « Some observations on the Tumors on *Veronica chamaedris* caused by *Sorosphaera Veroniceae*, » *Ann. of Bot.*, 24, 35.
- Brumpt, E. 1910. *Précis de parasitologie*. Paris.
- Cledenin, I. 1895. « *Synchytrium* on *Geranium carolinianum*, » *Botan. Gaz.*
- Cowdry, E. V. 1924. *General Cytology*, 350. Chicago.
- Coutinho, A. X. P. 1913. *A Flora de Portugal*. Lisboa.
- Dangeard, P. A. 1888. « Mémoire sur les Chytridinées, » *Le Botaniste*, 1.° Sér., 2.° fasc., 39-74.
- 1890. « Recherches histologiques sur les Champignons, » *ibid.*, 2.° Sér., 2.° et 3.° fasc., 63-149.
- Delage, Y. et Hérouard, E. 1896. *Traité de Zoologie Concrète*. Paris.
- Farlow, W. G. 1885. « The *Synchytria* of the United States, » *Botan. Gaz.* 10, 240.
- Faworsky, B. 1910. « Nouvelles recherches sur le developpement et la cytologie du *Plasmodiophora Brassicae* Woron., » *Mémoires de la Soc. des Natur. de Kieff*, 20, 149-184 (em russo com resumo em francês).
- Fischer, A. 1892. *Phycomycetes*, in Rabenhorst's *Kryptogamen-Flora*, 2. Auf. Leipzig.
- França, C. 1909. « Quelques notes sur l'*Haemogregarina splendens* Labbé, » *Arch. R. Inst. Bact. Câmara Pestana*, 2, 123.
- Fuekel, L. 1869-70. « *Symbolae mycologicae*. Beiträge zur Kenntnis der rheinischen Pilze, » *Jahrb. d. nassanischen Vereins f. Naturwiss.*, Wiesbaden.
- Goebel, 1884. *Tetramyxa parasitica*, *Flora*, 67, 517.
- Gonklin, E. G. 1924. « Cellular differentiation, » in Cowdry's *General Cytology*. Chicago.
- Griggs, R. F. 1908. « On the cytology of *Synchytrium*, » *Ohio Naturalist*, 8, 277-286.
- 1909 a. « A note on amitosis by constriction in *Synchytrium*, » *ibid.*, 9, 513-515.

- Griggs, R. F. 1909 b. « Some aspects of amitosis in *Synchytrium*, » *Botan. Gaz.*, **47**, 127-138.
- 1909 c. « Mitosis in *Synchytrium*, » *ibid.*, **48**, 339-358.
- 1912. « The development and cytology of *Rhodochytrium*, » *ibid.*, **53**, 127-173.
- Guilliermond, A. 1905. « Remarques sur la Kariokinèse des Ascomycètes, » *Ann. Mycol.*, **3**, 343.
- Guttenberg, H. von. 1909. « Cytologische Studien an *Synchytrium*-Gallen, » *Jahrb. f. wiss. Bot.*, **46**, 453-477.
- Harper, R. A. 1897. « Kernteilung und freie Zellbildung im Ascus, » *Jahrb. f. wiss. Bot.*, **30**, 249.
- 1899. « Cell-Division in Sporangia and Asci, » *Ann. of Bot.*, **13**, 467.
- Knuth, R. 1912. *Geraniaceae*, in Engler's Pflanzenreich. Leipzig.
- Kühn, J. 1868. « *Synchytrium myosotidis*, » *Hedwigia*, **8**, 125.
- Kusano, S. 1907 a. « On the cytology of *Synchytrium*, » *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt., **19**, 538-543.
- 1907 b. « On the nucleus of *Synchytrium Puerariae* Miyabe (Preliminary note), » *The Bot. Mag.*, **21**, 118-121.
- 1908. « Studies on a Disease of *Pueraria* caused by *Synchytrium Puerariae*, » *ibid.*, **22**, 1-2.
- 1909. « A contribution to the cytology of *Synchytrium* and its hosts, » *Bull. College of Agric. of the Imp. Univ. Tokio*, **8**, 79-147.
- Lagerheim, G. De. 1893. « *Rhodochytrium* nov. gen., eine Uebergangsform von den Protococcaceen zu den Chytridiaceen, » *Bot. Zeit.*, **51**, 43-51.
- Lindau. 1900. « Nachträge zum I. Teil. 1. Abt., » in « Engler's Pflanzenfamilien », Leipzig.
- Loewenthal, W. 1905 a. « Tierversuche mit *Plasmodiophora brassicae* und *Synchytrium taraxaci* nebst Beiträgen zur Kenntniss des letzteren, » *Zeitschr. f. Krebsforschung*, **2**.
- 1905 b. « Weitere Untersuchungen an Chytridiaceen, » *Arch. f. Protistenk.*, **5**, 221-239.
- Lüdi, R. 1901. « Beiträge zur Kenntnis der Chytridiaceae, » *Hedwigia*, **40**, 1-44.
- Magnus, P. 1874. « Über *Synchytrium rubrocinctum*, » *Hedwigia*, **13**.
- 1893. « Ueber *Synchytrium papillatum* Farl., » *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, **11**, 539-542.
- 1902. « Kurze Bemerkung über Benennung und Verbreitung der *Urophlyctis bohémica* Bubák, » *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt., **9**, 895.
- Maire, R. 1904. « Sur l'existence des corps gras dans les noyaux végétaux, » *C. R. Soc. Biol.*, **56**, 736.
- 1905. « Recherches cytologiques sur quelques Ascomycètes, » *Ann. Mycol.*, **3**, 125.
- Maire, R. et Tison, A. 1909. « La cytologie des Plasmodiophoracées et la classe des Phytomyxinae, » *Ann. Mycol.*, **7**, 226.
- 1910. « Sur quelques Plasmodiophoracées, » *C. R. d. l'Acad. d. Sc.*, 1910.
- 1911. « Recherches sur quelques Cladochytriacees, » *ibid.*, **152**, 106.
- Miyabe, K. 1905. « *Synchytrium puerariae* n. sp., » *Bot. Mag. Tokio*, **19**, 199.
- Möbius, M. 1912. *Mikroskopisches Praktikum für systematische Botanik*. Berlin.
- Nawaschin, S. 1899. « Beobachtungen über den feineren Bau und Umwandlungen

- von *Plasmodiophora Brassicae* Woron. im Laufe ihres intracellulären Lebens, » Flora, 86, 404.
- Olive, E. W. 1908. « Sexual cell fusions and vegetative nuclear divisions in the rusts, » Ann. of Bot., 22, 331.
- Oltmanns, F. 1922-23. *Morphologie und Biologie der Algen*, 2. Aufl., Jena.
- Pavillard, J. 1910. « Etat actuel de la Protistologie végétale, » Progressus rei botan., 3, 474-544.
- Percival, J. 1910. « Potato « Wart » Disease: the life history and cytology of Synchytrium endobioticum (Schilb.) Percl., » Centralbl. f. Bakt., II Abt. 25, 440-447.
- Prowazek, S. 1905. « Über den Erreger der Kohlhernie *Plasmodiophora brassicae* Woronin und die Einschlüsse in den Carcinomzellen, » Arb. a. d. K. Gesundheitsamte Berlin, 22, 396-410.
- Rosen, F. 1893. « Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenzellen. II. Studien über die Kerne und die Membranbildung bei Myxomyceten und Pilzen, » Cohn's Beitr. z. Biol., 6, 237-266.
- Rytz, W. 1906. « Beiträge zur Kenntnis der Gattung Synchytrium, » Centralbl. f. Bakt., II Abt., 16, 511-512.
- 1907. « Beiträge zur Kenntnis der Gattung Synchytrium, » Centralbl. f. Bakt., 18, 635-655 e 799-825.
- Saccardo, P. A. 1888. *Sylloge Fungorum*, vol. 7.
- Sachs, J. 1868. *Lehrbuch der Botanik* (trad. inglesa de 1882, sobre a 2.ª ed. alemã).
- Schenck, E. 1923. *Talofitas*, in Strasburger — *Tratado de Botânica* (trad. espanhola sobre a 15.ª ed. alemã).
- Schilberszky, K. 1896. « Ein neuer Schorfparasit der Kartoffelknollen, » Ber. d. deutsch. bot. Ges., 16, 36-37.
- Schinz, H. 1912. *Pilze, Myxogasteres*, in Rabenhorst's Kryptogamen-Flora. Leipzig.
- Schröter, J. 1870. « Die Pflanzenparasiten aus der Gattung Synchytrium, » Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, 1, 1-50.
- 1873. « Synchytrium fulgens n. sp., » Hedwigia, 12, 141.
- 1876. « Über neue von demselben beobachtete Arten resp. Standorte von Pilzen, » Hedwigia, 15, 134.
- 1889. « Pilze, » in Cohn's Kryptogamenflora von Schlesien, 1.
- 1897. « Chytridinae, » in Engler und Prantl, *Natürl. Pflanzenfamilien*, 1, Leipzig.
- Stevens, F. L., a. A. Ch. 1903. « Mitosis of the primary nucleus in Synchytrium decipiens, » Botan. Gaz., 35, 405-415.
- Stevens, F. L. 1907. « Some remarkable nuclear structures in Synchytrium, » Ann. Mycol., 5, 480-484.
- Strasburger, E. 1911. *Handbook of Practical Botany* (trad. inglesa sobre a 7.ª ed. alemã). London.
- Swarzewsky, B. 1912. « Die Chromidien der Protozoen und ihre Beziehung zur Chromatidialismushypothese, » Mémoires de la Soc. des Natur. de Kieff, 22, 1-176 (em russo, com resumo em alemão).
- Tobler, G. 1913. « Die Synchytrien. Studien zu einer Monographie der Gattung, » Arch. f. Protistenkunde, 28.
- Van Thieghem, P. 1884. *Traité de Botanique*. Paris.

- Wager, H. 1904. «The nucleolus and nuclear divisions in the root apex of *Phaseolus*,» *Ann. of Bot.*, 18, 31.
- Winter, G. 1884. *Die Pilze*, in Rabenhorst's Kryptogamen-Flora, I Abt. Leipzig.
- Woronin, M. 1868. «Neue Beiträge zur Entwicklungsgeschichte einiger Chytridien,» *Bot. Ztg.*, 26.
- 1878. *Plasmidiophora Brassicae*, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 11.
- Zopf, W. 1884. «Zur Kenntniss der Phycomyceten. I. Zur Morphologie und Biologie der Ancylisteen und Chytridiaceen, zugleich ein Beitrag zur Phytopathologie,» *Nova Acta der Ksl. Leop.-Carol. d. Ak. d. Naturforscher*, 47, 145-236.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Todas as figuras foram desenhadas com o auxílio da câmara clara de Abbe e, em geral, com as objectivas apocromáticas de Zeiss 1,30-1,5 e 1,30-2 mm.; oculares compensadoras de 6, 12 e 18. As ampliações vão indicadas por escala em cada caso particular.

ESTAMPA I

Fig. 1. — Reprodução da primeira gravura de Farlow representando o corte de uma folha de *Erodium cicutarium* com duas galhas de esporos de resistência e uma com um soro de esporângios de *S. papillatum*. (Da *Bot. Gaz.* vol. x, 1885).

Fig. 2. — Zoósporos de *S. papillatum* provenientes de um soro de esporângios. *a, a', b* — fixados pelo Bouin, corados pela tano-fucsina de Zimmermann. *c* — fixado pelos vapores de ácido ósmico e montado sem coloração.

Fig. 3. — Estado bastante precoce do desenvolvimento do parasita em uma célula de uma estípula de *E. moschatum*. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica.

ESTAMPA II

Fig. 4. — Célula de uma estípula atacada simultaneamente por dois zoósporos. Estado anterior ao da *fig. 3*. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica.

Fig. 5. — Estado muito precoce do desenvolvimento do parasita em uma célula de uma estípula. Pelas dimensões e aspecto do parasita deve ser este estado anterior aos das *figs. 3 e 4*. À esquerda do parasita o núcleo da célula hospedeira muito hipertrofiado. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica.

Fig. 6. — Corte de uma folha de *E. moschatum* mostrando uma galha completamente desenvolvida. No interior a inicial de um soro de esporângios imediatamente antes da divisão do núcleo primário. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica.

Fig. 7. — Galha contendo um soro de esporângios, completamente desenvolvido, sobre uma estípula. Confronte com a galha central da *fig. 1*. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica-eosina.

Fig. 8. — Esporo de resistência maduro. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica.

ESTAMPA III

Figs. 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15. — Reprodução, respectivamente das *figs. 21 b, 18 a,*

21 c, 21 d, 21 e, 19 e 20 de Percival (Centralb. f. Bakt. 1910), mostrando a formação dos núcleos dos zoósporos por emissão de cromídias, no *Synchytrium endobioticum*, à custa do núcleo primário do esporo de resistência. Fixação: líquido de Flemming; coloração: tríplice Flemming. Ampliação: figs. 10, 14 e 15 — 1:1.000; as restantes 1:950.

Fig. 16. — Fragmento do plasma de um soro de esporângios na fase plurinucleada, antes da septação. Período de multiplicação nuclear amitótica. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica-eosina.

Figs. 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25. — Núcleos do corte representado na fig. 16, desenhados com maior ampliação para mostrar o desaparecimento da membrana nuclear e a emissão de cromídias para o seio do citoplasma.

ESTAMPA IV

Figs. 26 e 27. — Núcleos de um soro de esporângios, antes da septação, mas em uma fase muito mais avançada que o soro da fig. 16 (confronte as dimensões e aspecto dos núcleos). No citoplasma, novos núcleos em via de formação à custa de nucléolos errantes. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica-eosina.

Fig. 28. — Porção de um soro de esporângios ainda antes da septação, mas em estado mais avançado que os das figuras anteriores.

Ao centro um núcleo consideravelmente maior que todos os outros, com membrana bem aparente numerosos nucléolos e granulações cromáticas. À esquerda três núcleos já formados; à direita e ao alto dois núcleos em via de formação à custa de nucléolos errantes. Fixação: líquido de Dubosq-Brasil; coloração: hematoxilina férrica.

Figs. 29 a 45. — Fases sucessivas da mitose dos núcleos dos esporângios, depois da septação. Fixação: líquido de Schaudinn; coloração: hematoxilina férrica-eosina.

Fig. 29. — Núcleo em repouso.

Fig. 30. — Profase; redução a quatro do número de granulações cromáticas.

Fig. 31. — Profase; desaparecimento da membrana nuclear.

Figs. 32, 33 e 34. — Metafases, em várias posições (33 e 34 ligeiramente esquematizadas).

Fig. 35. — Primeiros momentos da anafase.

Figs. 36, 37 e 38. — Ulteriores aspectos de anafases.

Fig. 39. — Reunião dos cromosomas-filhos em duas massas cromáticas.

Fig. 40. — Divisão do nucléolo.

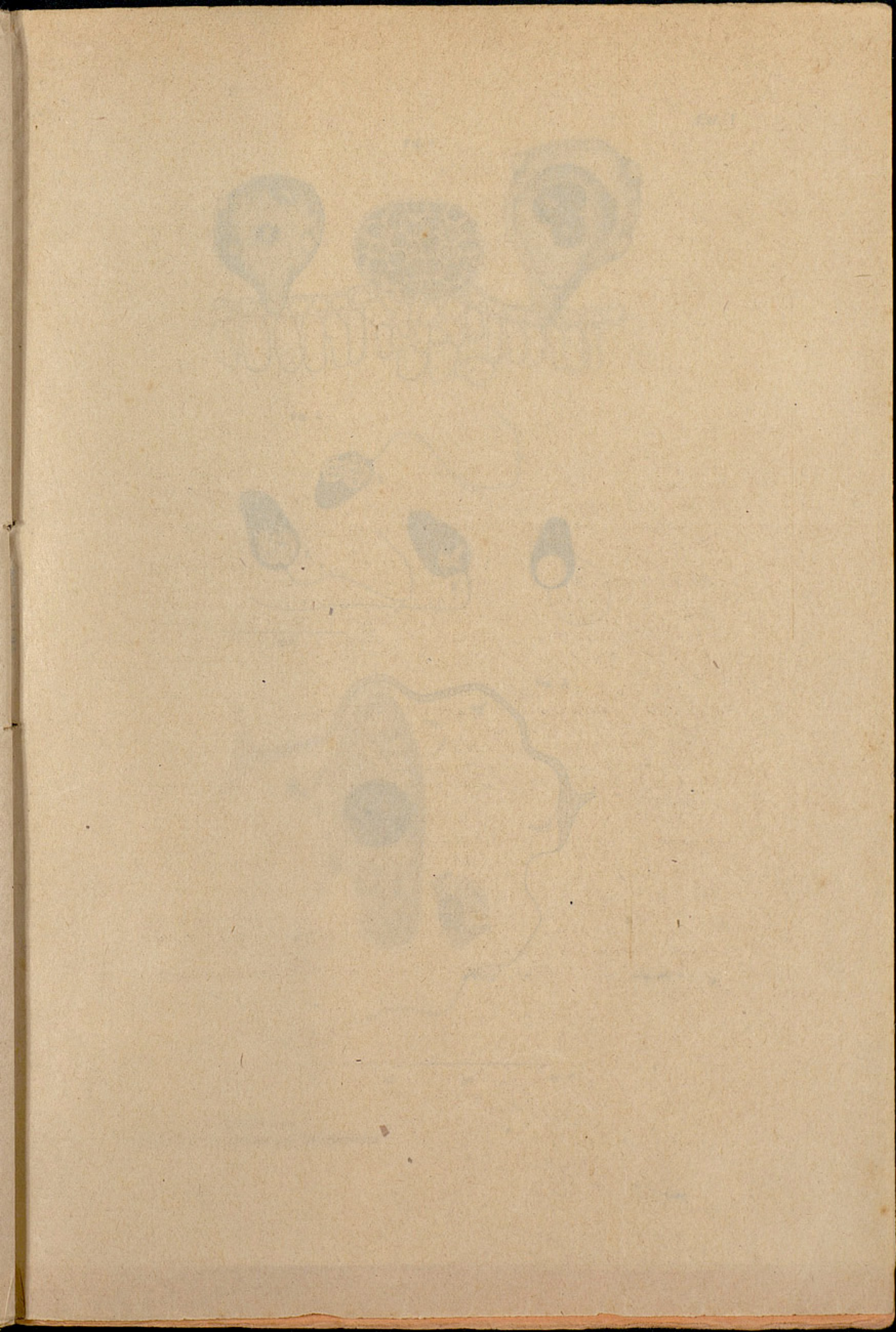
Fig. 41. — Afastamento dos dois nucléolos-filhos.

Fig. 42. — União dos nucléolos-filhos com as massas cromáticas dos cromosomas.

Fig. 43. — Três novos núcleos, logo após a divisão. Desapareceram os vestígios da porção intermediária do fuso.

Figs. 44 e 45. — Vacuolização dos novos núcleos e formação das membranas nucleares.





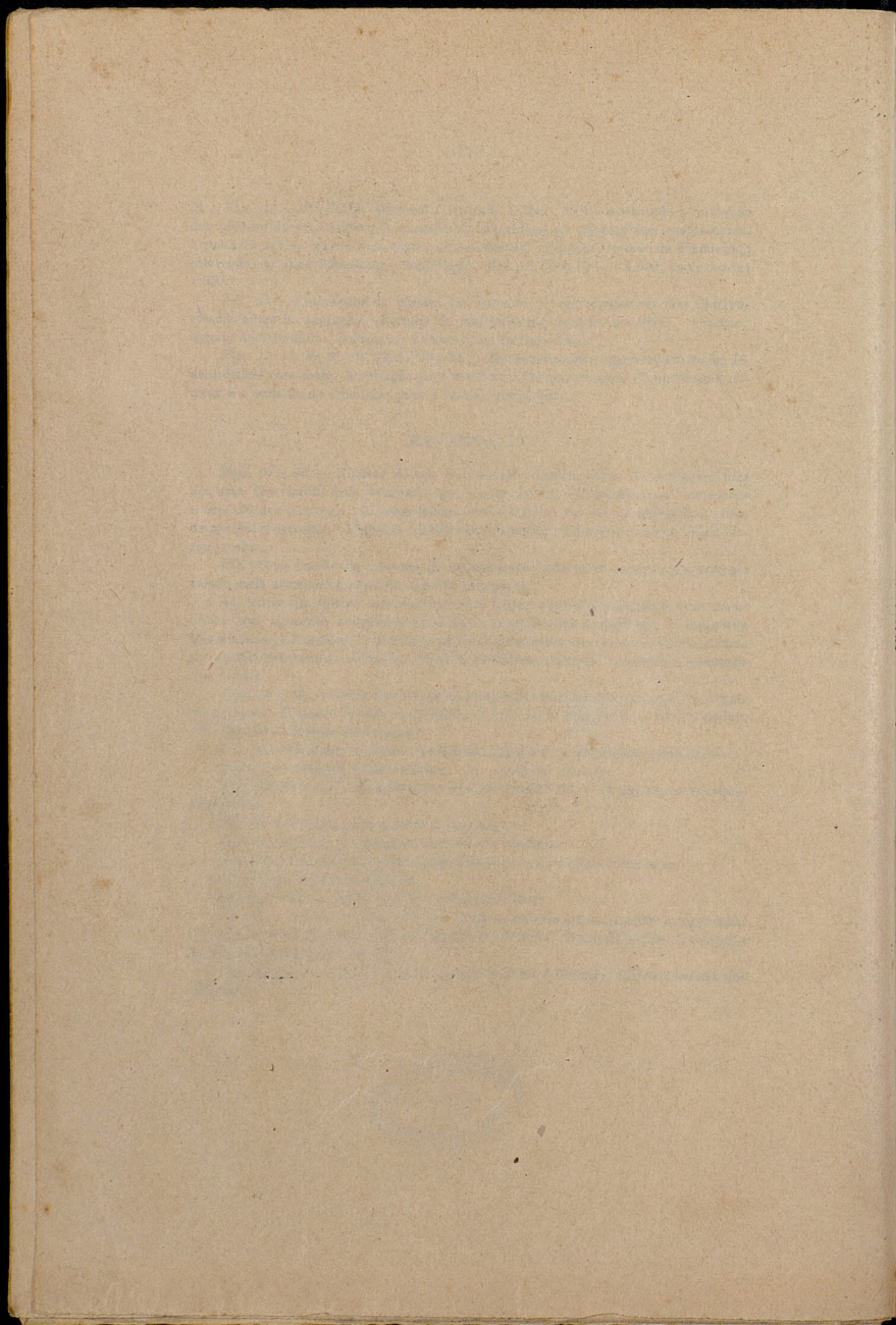


Fig. 1

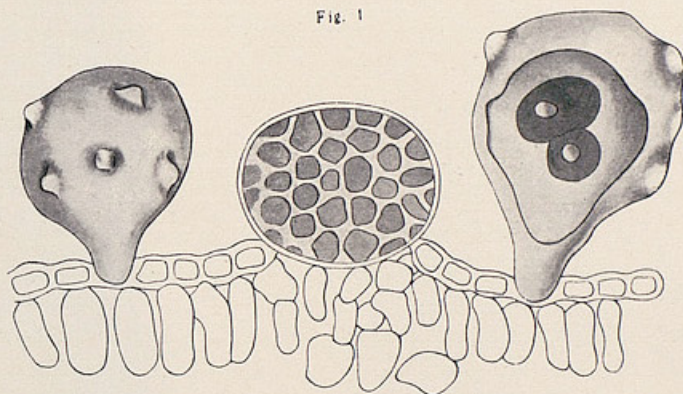


Fig. 2

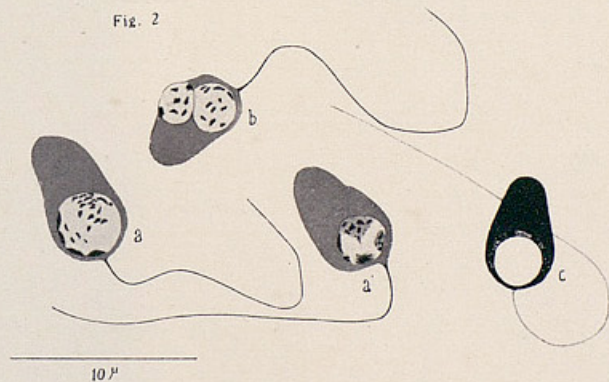
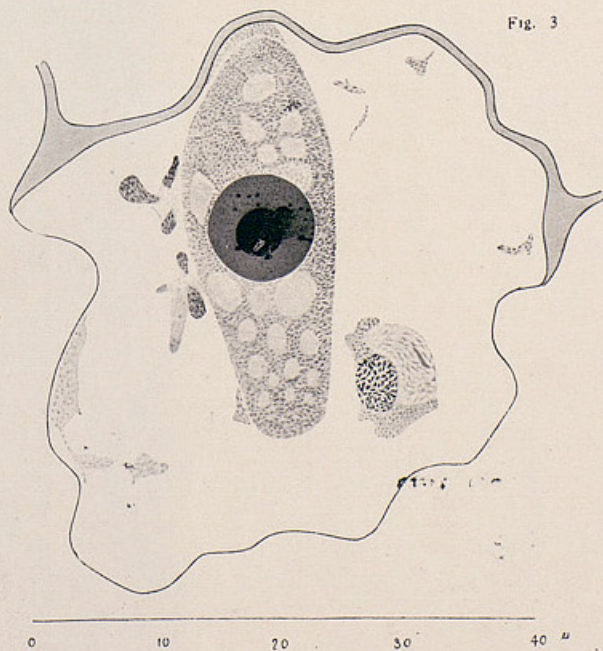
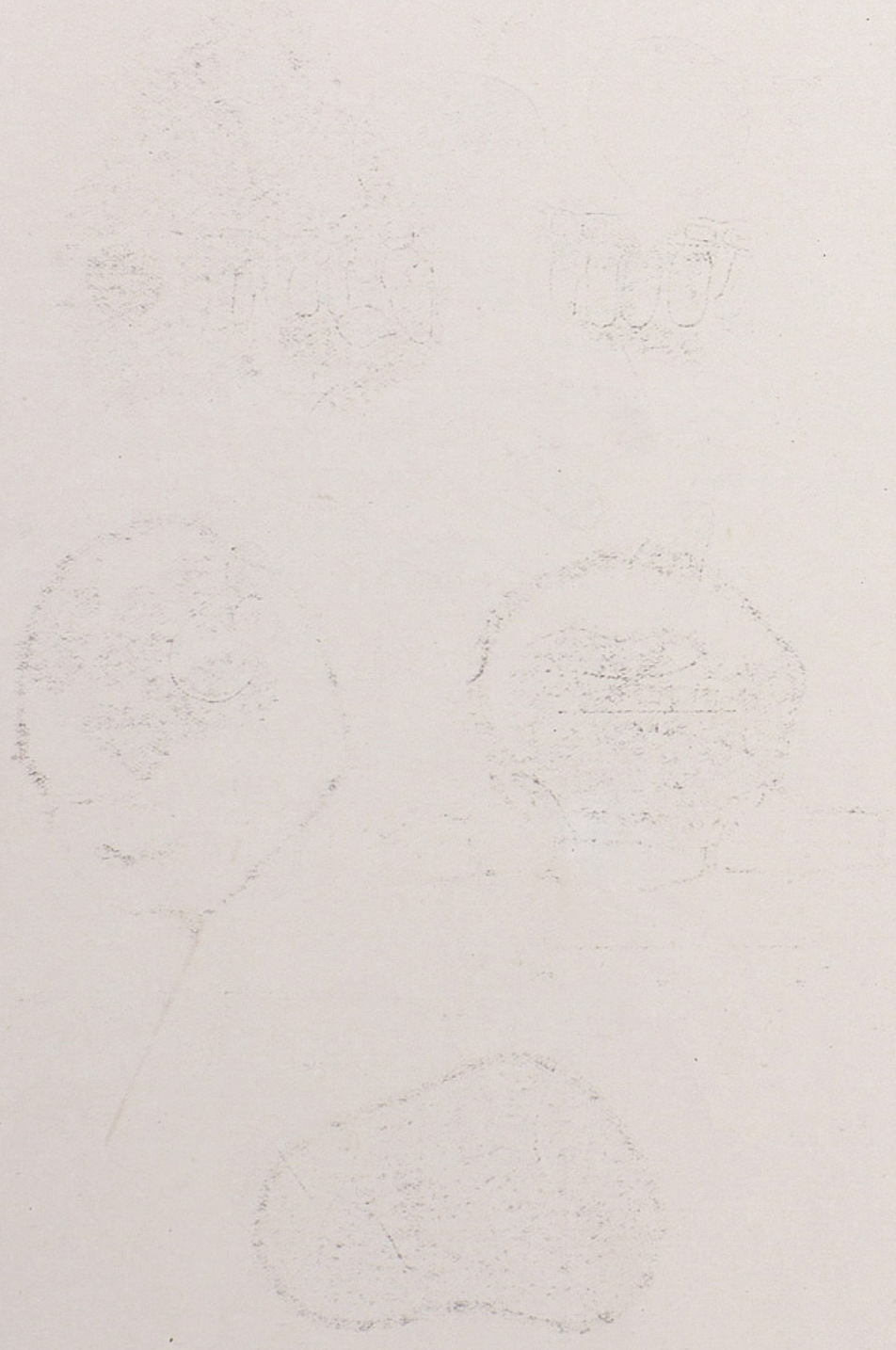
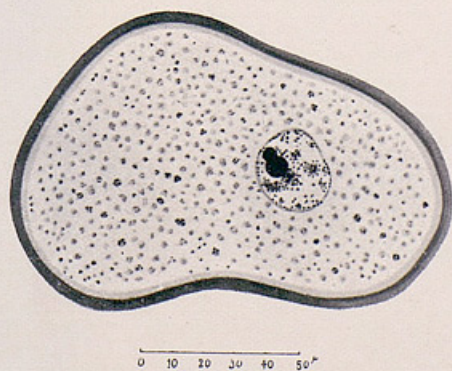
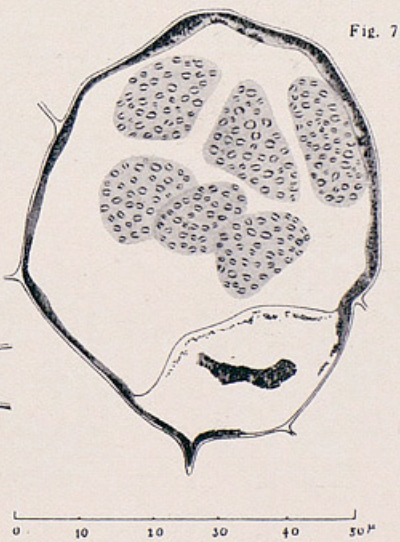
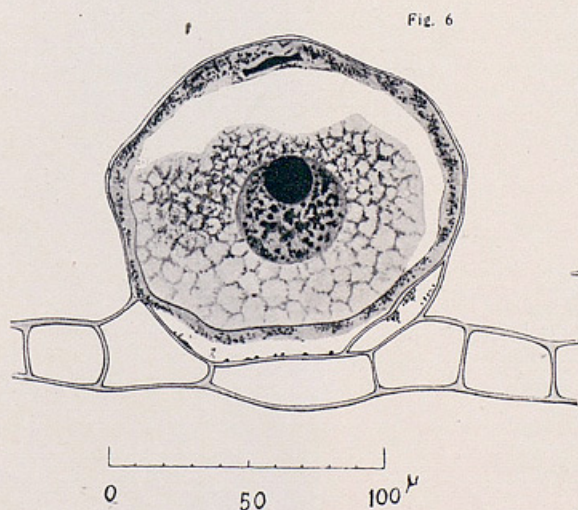
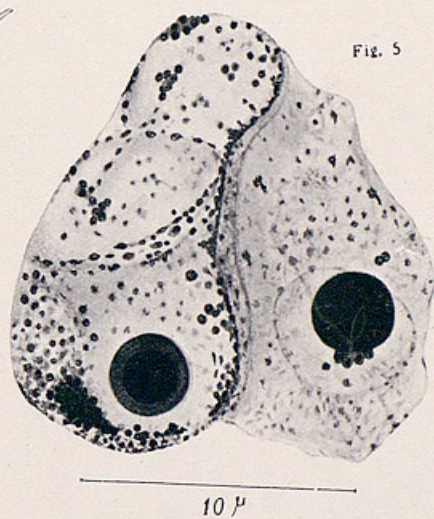
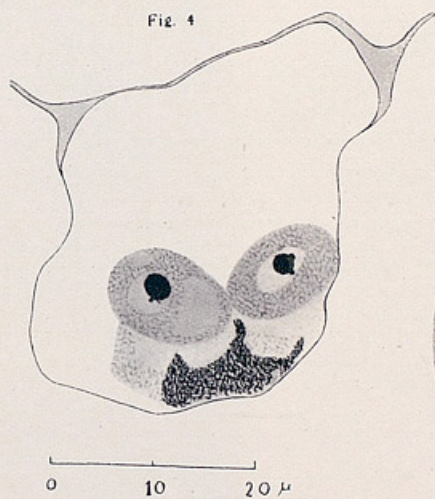


Fig. 3







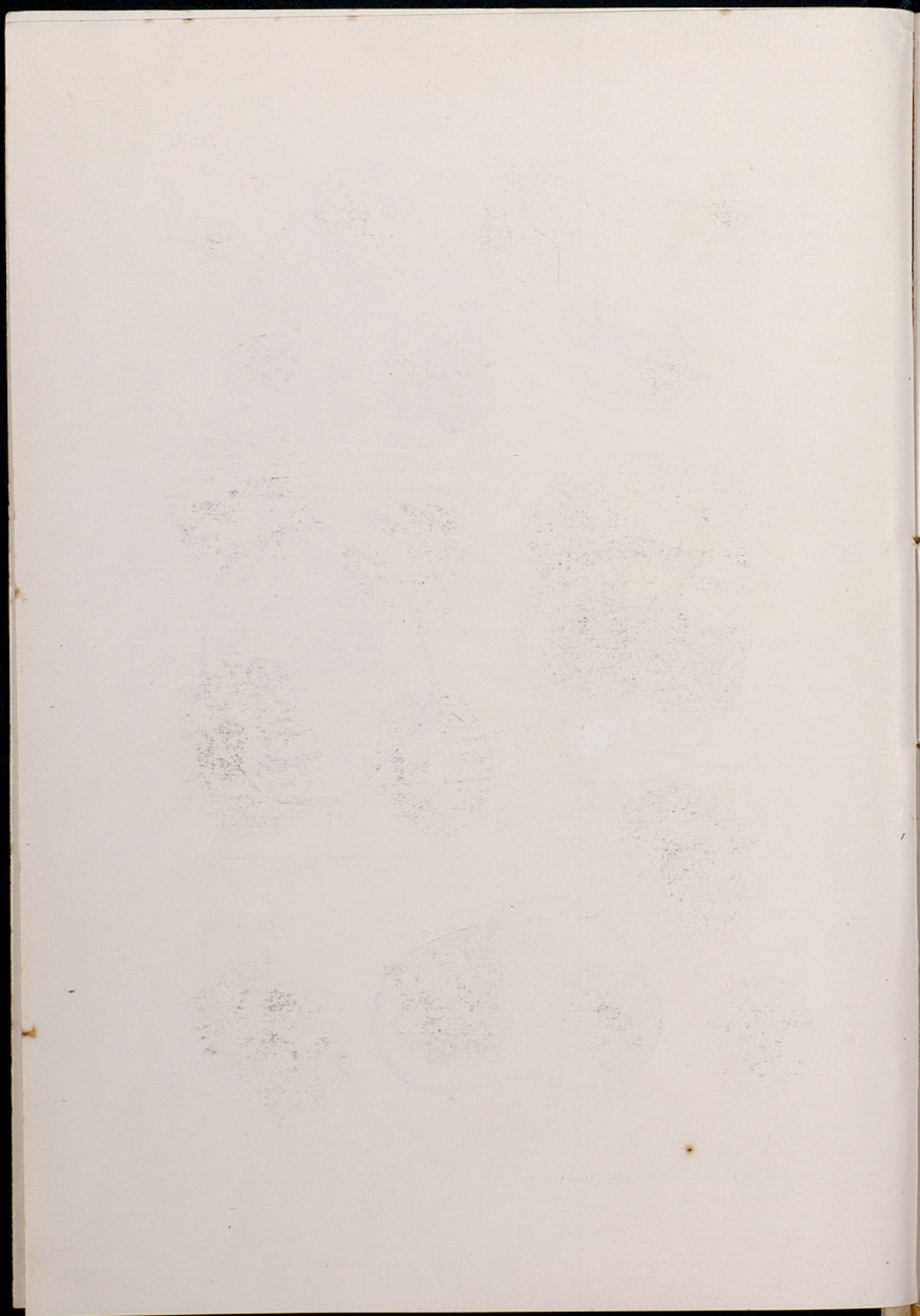


Fig. 9



Fig. 10

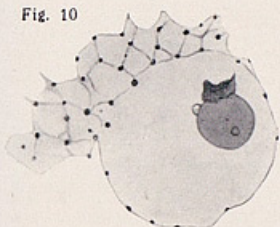


Fig. 11

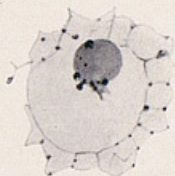


Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15

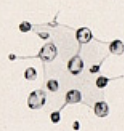
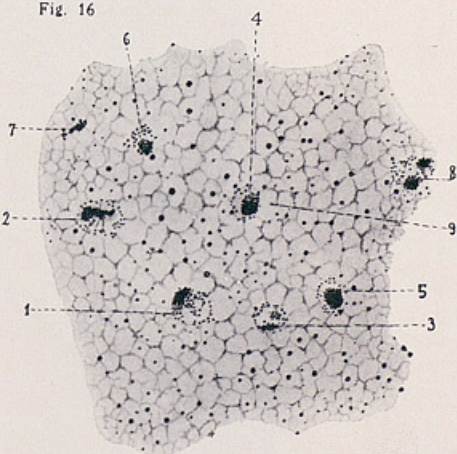


Fig. 18

Fig. 16



0 10 20 30 40 50 μ

Fig. 17



Fig. 19



Fig. 20

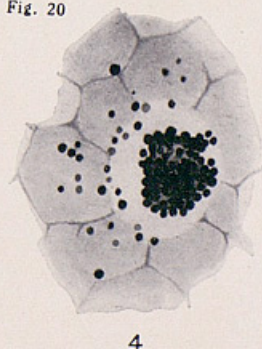


Fig. 21

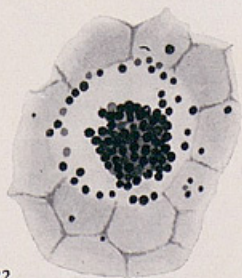


Fig. 24

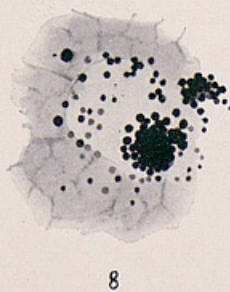


Fig. 25



Fig. 22

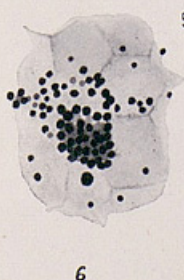


Fig. 23



10 μ

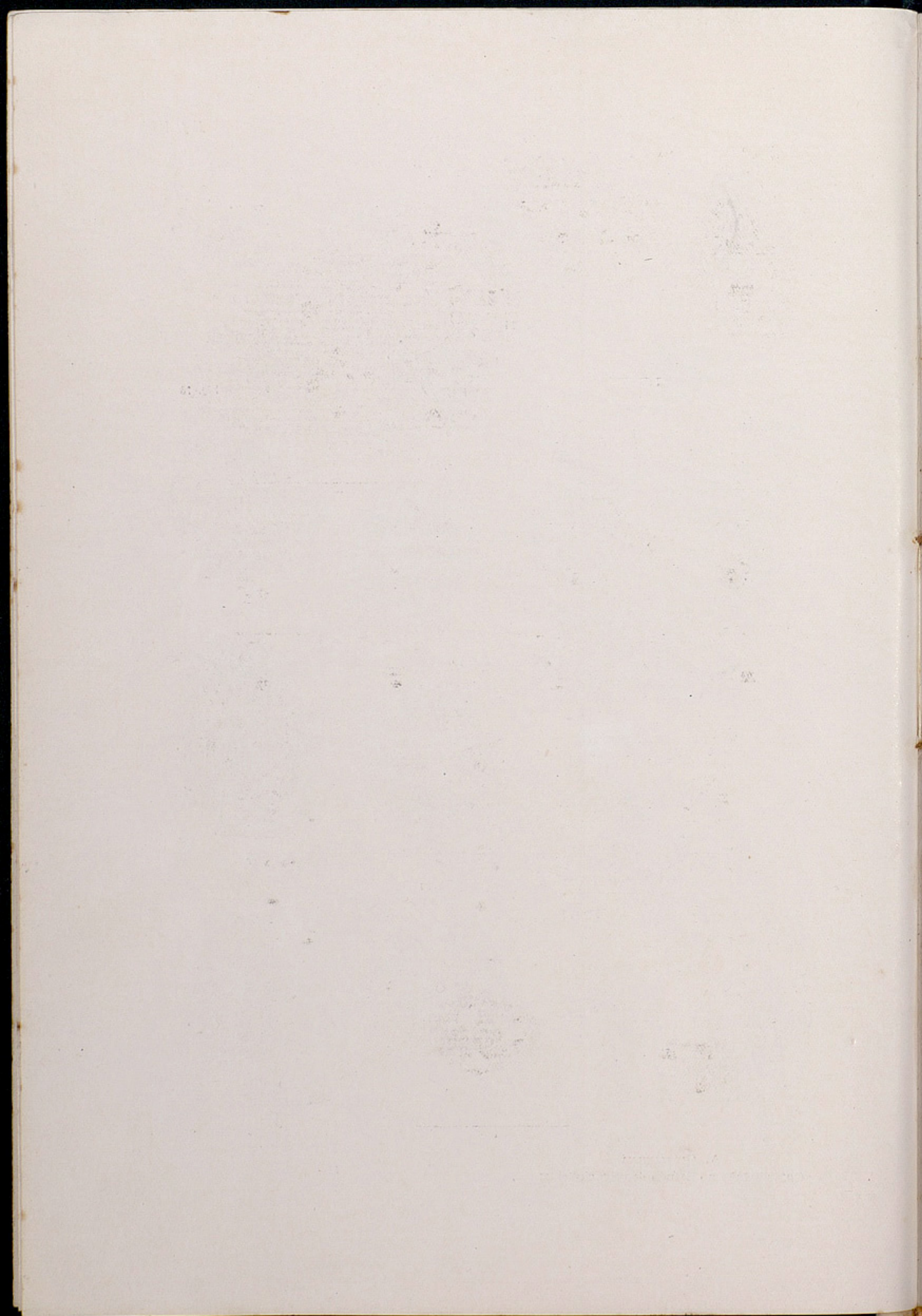


Fig. 26

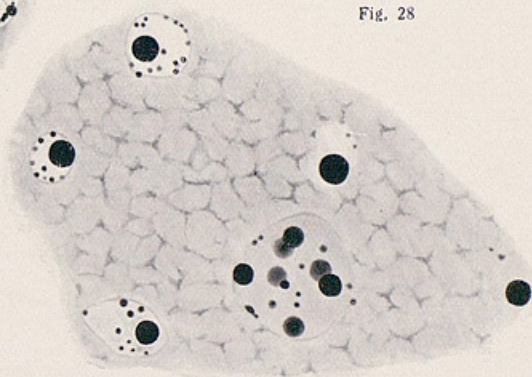


Fig. 27



10 μ

Fig. 28



10 μ

Fig. 29



Fig. 30



Fig. 31



Fig. 32



Fig. 33



Fig. 34



Fig. 35



Fig. 36



Fig. 37



Fig. 38



Fig. 39



Fig. 40



Fig. 41



Fig. 42



Fig. 43



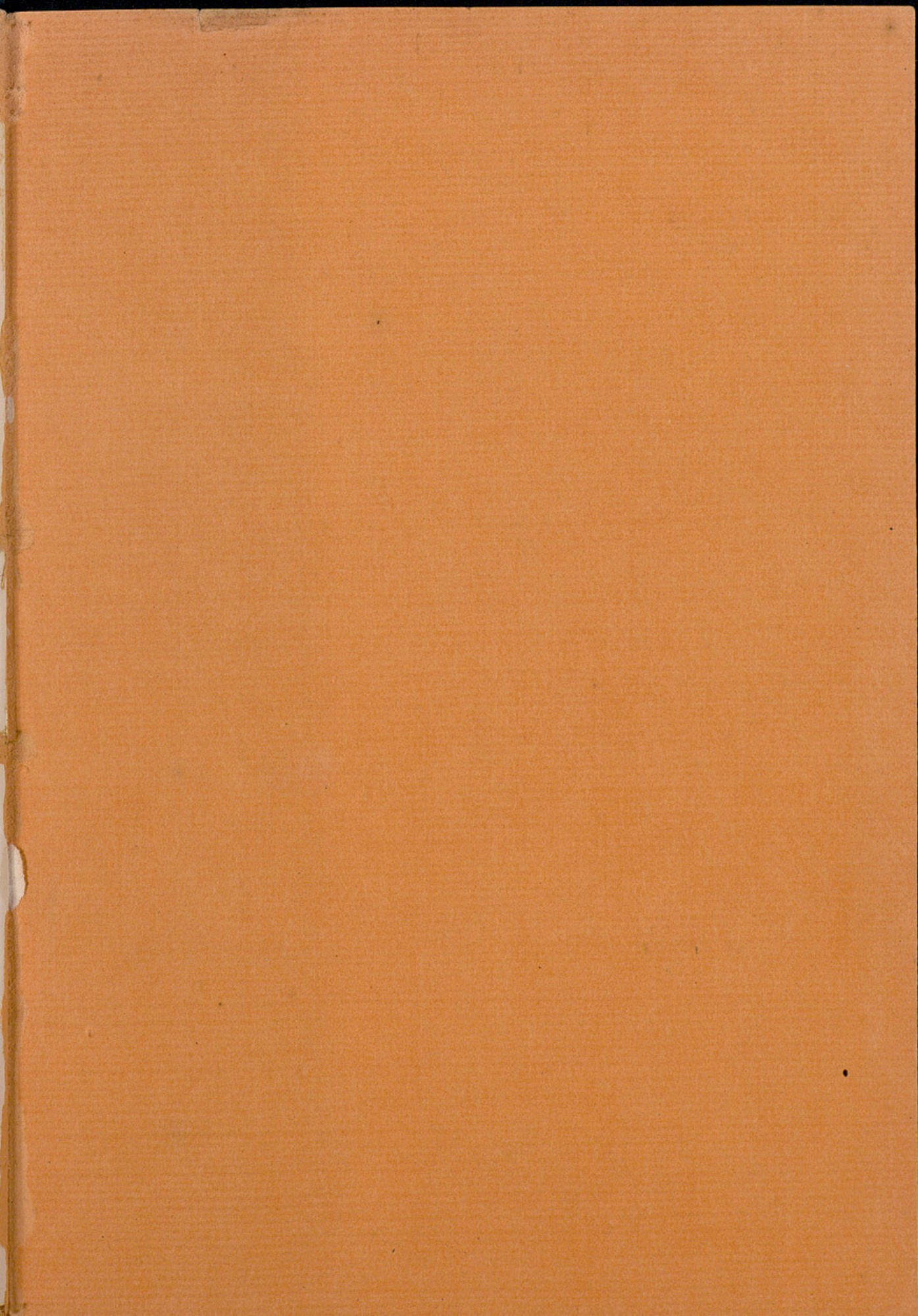
Fig. 44



Fig. 45



10 μ





UNIVERSIDADE DE COIMBRA
Departamento de Botânica



1322529786