

INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem em vista o estudo do ciclo evolutivo de *Pilacrella delectans* (1), um protobasidiomiceto incluído entre as *Auriculariales*.

Este fungo foi descoberto por Möller, (13) em 1891, quando em viagem de estudos a Blumenau, Estado de Santa Catarina, e descrito pelo mesmo autor em 1895.

Möller encontrou-o sobre troncos de *Euterpe edulis*, palmito, formando grandes colônias em forma de tufos brancos. Estes tufos formam-se, de preferência sobre a substância mucilaginosa que recobre os ferimentos produzidos pelo corte da árvore.

Neste substrato, o micélio se alastra formando um verdadeiro emaranhado. Decorridos alguns dias, de espaço em espaço, sobre o substrato, elevam-se os tufos de hifas que, mais tarde, vão constituir o corpo de frutificação. As hifas destes tufos, inicialmente, se colocam lado a lado paralelamente. Depois de algum tempo, é possível distinguir dois tipos de hifas: umas finas e de um modo geral mais longas e outras mais curtas e entumecidas. Estas últimas vão dar origem aos basídios.

O corpo de frutificação é constituído de um pedúnculo e de uma cábecinha. As hifas mais longas, estéreis, poderiam ser denominadas paráfises, apesar de sua pouca diferenciação. Elas envolvem o corpo de frutificação e entremeiam os basídios. Na maioria dos casos, a cábecinha do corpo de frutificação é arredondada, e, quando madura, recobre-se de uma substância mucilaginosa que contém os esporos, ou melhor, os basidiósporos.

Möller, sendo da escola de Brefeld, (1) empregou os métodos deste, isto é, semeou os esporos em meios líquidos, no caso decocto de ameixas pretas. Como naquela época

1) Nos tratados modernos o nome *Pilacrella* foi substituído por *Hoehneliomyces* segundo Weese (19). Como porém todas as considerações sistemáticas dependem do comportamento nuclear que ainda não é conhecido para a maioria dos representantes do grupo, preferimos conservar o primeiro nome, *Pilacrella delectans*, sob o qual este fungo é conhecido no Brasil desde que aqui foi descoberto. Aliás, Weese trabalhou apenas com material seco, herbórizado.

ainda não se cogitava de fazer pesquisas nucleares — para as quais, aliás, ainda faltavam as bases técnicas — Möller limitou suas pesquisas à parte morfológica. Observou suas culturas em gôta pendente, durante o tempo de germinação, transferindo-as, depois, para novas soluções, afim de poder estudá-las durante todo o desenvolvimento.

Como as demais descrições clássicas deste autor, também no caso de *Pilacrella delectans*, suas observações são acertadas, e as figuras por ele apresentadas, das quais reproduzimos parte, (fig. 1), são muito boas. Nossas observações concordam em grande parte com os dados fornecidos por Möller, embora existam divergências quanto ao tamanho dos esporos e a formação dos microconídios. Salientamos especialmente que encontramos mais um tipo de esporos, os esporos redondos, que não tinham sido descritos por Möller. Alguns dos dados divergentes, talvez possam ser explicados, levando-se em conta a diferença de meio de cultura e o fator pH. Pode bem ser que as formas por nós encontradas, não correspondam inteiramente à espécie descrita por Möller, mas as diferenças existentes não justificam o estabelecimento de uma nova espécie.

Infelizmente, nossas pesquisas tiveram que se limitar ao material encontrado uma única vez, assim mesmo acidentalmente, nas estufas do Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. A determinação do material foi feita por F. Rawitscher.

MÉTODOS EMPREGADOS

Nada conhecendo sobre o comportamento sexual do fungo ou existência eventual de heterotalismo, resolvemos fazer culturas monoesporídias, isto é, partindo cada vez de um só basidiósporo. Para a obtenção das culturas, empregamos o método das diluições. Em pequenos frascos Erlenmeyer, contendo solução Malte a 3%, esterilizada, colocamos alguns corpos de frutificação. Depois de agitar a solução por algum tempo, retiramos, por meio de tubos capilares, um pouco deste líquido, distribuindo-o em forma de pequenas gôtas sobre lamínulas previamente flambadas. Essas gôtas foram colocadas em câmaras van Tieghem e controladas ao microscópio. Somente as gôtas que continham um esporo eram aproveitadas. Os esporos depois de terem germinado, eram transferidos com a alça de platina para tubos de ensaio contendo o meio de cultura sólido. Os principais substratos sólidos por nós empregados, foram agar agar a 3%, acrescido de 3% de Malte, agar de bata-

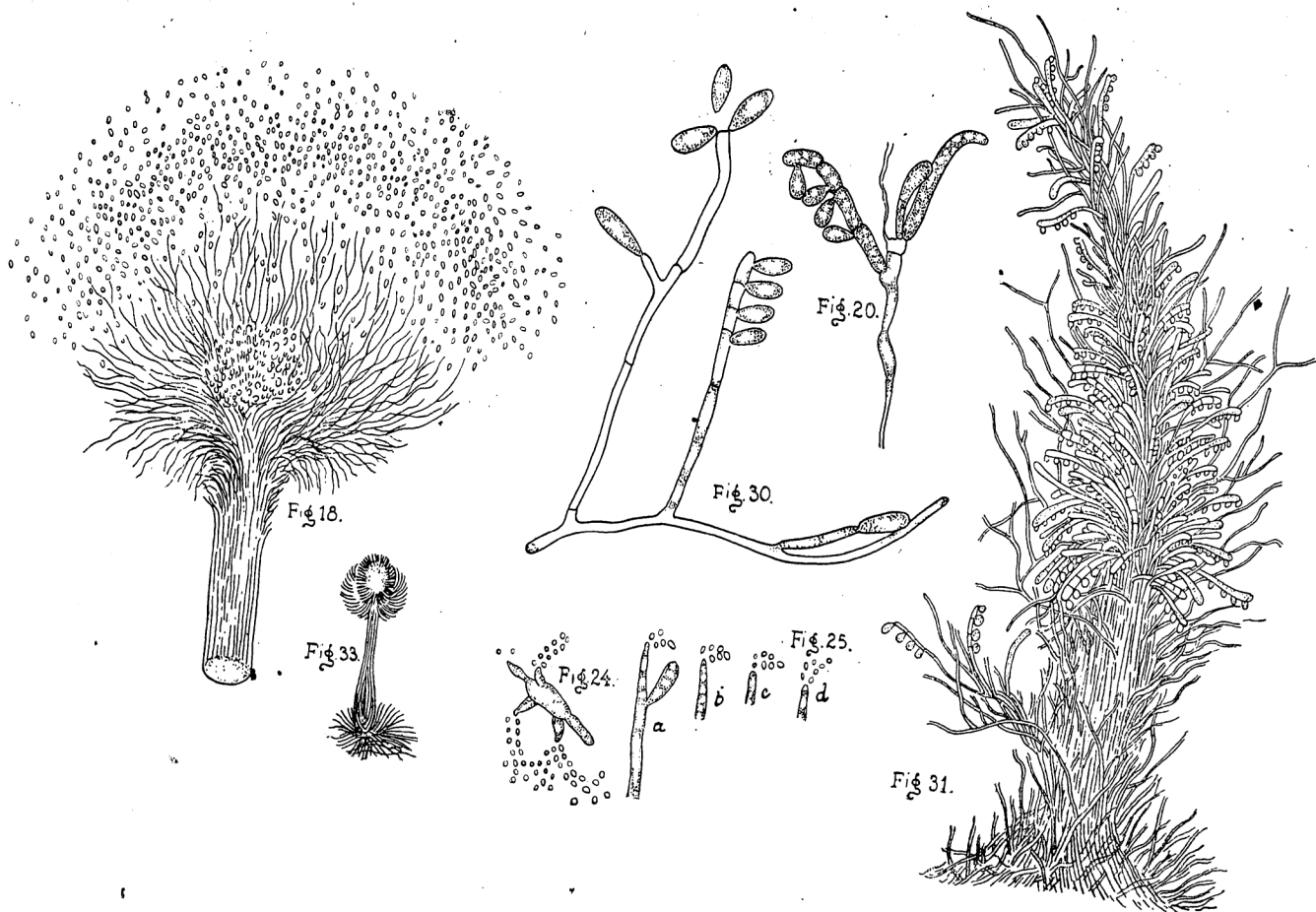


Fig. 1 — Reprodução parcial de uma das pranchas do trabalho de Müller — Protobasidiomyceten — Jena, 1895. Em 18 e 33, corpos de frutificação normais; em 31 corpos de frutificação em forma de penacho; em 30, formação de basidiósporos; em 24 e 25 formação de microconídios.

las inglesas, palmito (*Euterpe edulis*) e cenoura (*Daucus carota*). Empregando êste processo, que é trabalhoso mas garantido, conseguimos obter vinte e cinco culturas puras, das quais, por motivos independentes de nossa vontade, conservamos no presente momento apenas quinze. Os meios de cultura eram esterilizados duas vezes seguidas, com um intervalo de vinte e quatro horas. O pH ótimo dos diversos meios, determinado pelo processo colorimétrico, era 6,5.

Fizemos uma série de experiências, afim de verificar quais as modificações produzidas pela alteração do fator pH no desenvolvimento do fungo. Quando o meio é muito ácido ou muito básico, o aspecto do micélio é modificado, tornando-se as hifas muito mais frageis; são então mais finas, apresentando modificações quanto à sua estrutura citoplasmática e nuclear. O citoplasma é vacuolizado, possuindo o aspecto do de hifas velhas. O núcleo contraído é bem menor do que o das hifas normais. Obtivemos aspectos semelhantes aos acima descritos, submetendo as culturas à iluminação contínua, isto é, durante vinte e quatro horas e durante uma semana.

FIXAÇÃO

Nossas primeiras observações foram realizadas em material vivo, colocando-se o micélio entre lâmina e laminula, em água. Como nosso objetivo, porém, era observar o comportamento nuclear, durante o ciclo evolutivo de *Pilacrella*, tivemos que lançar mão de diversos processos de coloração usuais em histologia vegetal.

O preparo de lâminas de um micélio tão delicado, como no caso presente, oferece as dificuldades conhecidas de todos os micólogos. Empregamos, na confecção de preparações, de preferência os três métodos seguintes:

- 1) O material era tratado como se fosse tecido vegetal comum, isto é, submetido à fixação, lavagem, desidratação, inclusão em parafina seguida de microtomia.
- 2) Como o conjunto do micélio é parcialmente destruído durante a confecção dos cortes, mesmo quando os cortes são seriados, recorremos ao processo da fixação e coloração entre lâmina e laminula, afim de obtermos uma visão geral do conjunto.

- 3) As culturas eram feitas diretamente sôbre a lâmina. O método, que é pouco empregado, é muito recomendável, pois dêste modo consegue-se obter as diversas fases do desenvolvimento "in situ". Executamos as culturas segundo a técnica de Kniep e Rawitscher (9, 14).

Lâminas bem limpas, esterilizadas a sêco, são mergulhadas em um "becher" contendo o meio de cultura liquefeito, no caso presente agar Malte a 3%, isto é, segundo receita já descrita. As lâminas, quando retiradas do meio de cultura, ficam revestidas em ambas as faces de um filme delgado de agar. O agar deve recobrir mais ou menos dois terços da superfície total da lâmina.

As lâminas assim preparadas são colocadas imediatamente em placas de Petri, — também esterilizadas a sêco —, de tal modo a aderirem ao fundo da placa por meio do filme de agar da face inferior. A película de agar deve ser bem fina e homogênea, afim de facilitar o exame ao microscópio. Sôbre estas lâminas, agora é feita a inoculação do material, quer sob forma de micélio, quer sob forma de esporos. Depois da inoculação, as lâminas são conservadas em câmaras úmidas, construídas com as próprias placas de Petri. Invertendo-se as placas, as lâminas permanecem aderidas a uma das metades pelo filme de agar, que as reveste em sua face inferior; colocando-se um pouco de água na metade inferior da placa, o conjunto é transformado em câmara úmida. O meio ambiente assim obtido, é favorável ao desenvolvimento das culturas. Dêste modo torna-se possível observar as culturas sob o microscópio, com aumento fraco e médio, diretamente, sem expor as preparações ao ar. Depois de atingido o grau de desenvolvimento desejado, as lâminas são submetidas à fixação. Para evitar o desprendimento do filme de agar durante o processo da fixação, torna-se necessário deixar secar um pouco os bordos da lâmina.

Os fixadores que mais empregamos foram: Flemming fraco, Bouin Allen e vapores de ácido ósmico a 1 %, seguidos de uma solução de glicerina, álcool e água destilada em partes iguais. Outros fixadores, tais como por exemplo Carnoy, ácido cromo acético, Flemming forte ou Nawaschin, geralmente produziram extravasamento do citoplasma, nas regiões terminais das hifas, ponto em que a parede celular ainda é muito jovem e delicada, por ser região de crescimento. Este fenômeno é conhecido pelo nome plasmoptise.

A plasmoptise, muitas vezes, é provocada pela desigual velocidade de penetração de álcool e água através das membranas celulares (1).

Nos casos em que o álcool ou, então, outros líquidos atravessam as membranas mais rapidamente do que a água, as células entumescem muito, ocasionando este fenômeno o rompimento das membranas mais delicadas das células terminais, que ainda estão em crescimento. Por este motivo, afim de evitar a plasmoptise, acrescenta-se ao álcool uma certa porcentagem de glicerina, porcentagem esta que, geralmente, varia de caso para caso e que deve ser empiricamente determinada.

Por esta razão, o fixador que melhor conservou o aspecto da célula e do citoplasma foi o ácido ósmico sob forma de vapor, que mata as células e é bom fixador nuclear, seguido de imersão em mistura de álcool, glicerina e água destilada em partes iguais.

Os tempos de fixação para os diversos fixadores empregados foram os seguintes: Flemming fraco, uma hora. Bouin-Allen, quinze minutos a uma hora. Vapores de ácido ósmico a 1%, durante dez minutos, seguidos de mistura de álcool, glicerina e água destilada, durante duas horas, no mínimo. Os tempos de fixação dependem muito da espessura do material. Depois de fixado, o material é lavado em água, e submetido à coloração. Os blocos ou lâminas fixados em Bouin ou Bouin-Allen, quando, apesar da lavagem ainda conservam a cor amarela do ácido picrico, podem ser descorados pelo emprego de uma solução de carbonato de lítio a 5%.

COLORAÇÃO

Empregamos vários processos de coloração, inclusive o da coloração vital. Obtivemos porém, os melhores resultados com hematoxilina Heidenhein, Delafield e Regaud. Esta última oferece a vantagem de poder ser empregada logo após seu preparo, sem ser necessário esperar por um amadurecimento. A maioria de nossas lâminas foi corada por esta hematoxilina. O mordente empregado foi uma solução de alúmen de ferro a 3%, durante o espaço de cinco horas. As lâminas retiradas do mordente passam diretamente ao corante, onde permanecem durante doze horas, sendo então lavadas e diferenciadas ao microscópio, em solução de alú-

(1) Quanto a outros fatores que provocam plasmoptise, ver Maja Kopp (12).

men de ferro a 3%. A lavagem do material deve ser prolongada, afim de evitar que as preparações se tornem amarelas, descoloradas pelo alumínio que ainda pudesse ter ficado retido entre as hifas. Fizemos a desidratação lentamente, em série alcoólica crescente, desde a concentração de 10% até o álcool absoluto. Neste último, as lâminas podem permanecer, sem dano, durante o espaço de meia hora. Em seguida, foram transportadas para uma mistura de álcool absoluto e xilol, em partes iguais, para, finalmente serem diafanizadas em xilol, e montadas em bálsamo do Canadá. Algumas vezes empregamos, em lugar de bálsamo do Canadá, glicerina-gelatina fenicada. Pelo emprego deste método conseguimos obter boas preparações das diversas fases de desenvolvimento, ou seja, fixar o ciclo evolutivo do protobasidiomiceto objeto deste estudo, desde o esporo antes de sua germinação, passando pela formação do micélio, dos microconídios, esporos redondos e basídios.

Em micologia, os métodos de coloração e fixação constituem um problema sério, principalmente devido ao pequeno tamanho dos núcleos, que só permitem a observação de poucos detalhes.

Só os núcleos maiores dos ascos e basídios podem ser comparados aos núcleos de plantas superiores. Nas hifas vegetativas a distinção entre o nucléolo e a parte cromática propriamente dita, muitas vezes, torna-se impossível. Revendo a abundante literatura de micologia, sempre tem-se a impressão de que o método da coloração pela hematoxilina ainda é o que fornece os resultados mais garantidos. Ritchi (16), em trabalhos recentes discutiu o emprego dos diferentes métodos e dificuldades encontradas em sua aplicação.

As figuras constantes deste trabalho, restringem-se, apenas, aos casos em que a fixação e a coloração deram resultados inequívocos.

GERMINAÇÃO DOS BASIDIÓSPOROS

FORMAÇÃO DO MICÉLIO

Afim de podermos observar a germinação dos basidiósporos, o tempo de germinação e a formação das primeiras hifas, empregamos o processo das gotas pendentes, em câmaras de van Tieghem, do mesmo modo como tínhamos

procedido para a obtenção de culturas puras a partir de um só esporo.

Sôbre laminulas previamente flambadas, distribuimos a solução de Malte a 3%, contendo os esporos em suspensão. As gôtas que continham os esporos, foram invertidas junto com as laminulas sôbre o anel de van Tieghem, ligeiramente vaselinado. Colocando-se um pouco de água destilada no espaço delimitado pelo anel, obtém-se uma pequena câmara úmida, com tôdas as vantagens necessárias a uma boa observação ao microscópio.

Os esporos foram controlados ao microscópio, de duas em duas horas, para observarmos o progresso da germinação. Verificamos que, de um modo geral, nas quatro primeiras horas após a disseminação, os esporos entumescem um pouco, formando, depois, uma pequena saliência que corresponde ao ponto em que vai aparecer o primeiro tubo germinativo. A maioria de nossos esporos iniciou a germinação por um só tubo germinativo, depois de decorrido um tempo médio de cinco horas.

Nas horas que se seguem a êste período, forma-se do lado oposto um segundo tubo germinativo. Geralmente, depois de vinte e quatro horas, as hifas começam a ramificar-se. Depois que o tubo germinativo atingiu um determinado desenvolvimento, aparecem nas hifas os septos, que, aliás, já podem ser observados em preparações de material vivo. Fizemos esporos de várias idades e estados de germinação, para podermos controlar o comportamento do núcleo nestas fases. Na fig. 2, apresentamos diversos estados de desenvolvimento dos esporos.

Antes da germinação, os esporos maduros geralmente possuem dois núcleos, embora existam casos de esporos uninucleados. No capítulo que trata da formação dos basidiósporos, ver-se-á que, no momento da origem dos esporos êstes costumam receber um só núcleo que, depois, rapidamente se divide. O fato porém não constitue regra geral, pois existem casos em que esta divisão nuclear se processa já no momento da formação do esporo, permanecendo um dos dois núcleos na célula basal do basídio.

Esporos binucleados, geralmente, formam micélio de células também binucleadas, ao passo que os raros esporos uninucleados dão origem a micélio também uninuclear. Acompanhamos o desenvolvimento das culturas, fazendo fixações destes esporos, 5, 12, 24 e 48 horas após a disseminação. As paredes celulares são delgadas e as células possuem

tamanho diverso, dependente da idade do micélio. Em células jovens e em preparações bem fixadas não é possível reconhecer vacúolos; mas, logo que o micélio se torna mais idoso, aparecem no citoplasma das células pequenos vacúolos que vão dar ao material um aspecto característico. No citoplasma, quando velho, existem inclusões gordurosas que se coram pelo Sudan III, inclusões estas também encontradas mais tarde nos esporos redondos. A quantidade de inclusões em forma de gotas está em estreita relação com o bom meio de cultura e a idade do micélio. Preparações coradas pela hematoxilina Delafield ou pela hematoxilina férrica de Regaud nos permitiram verificar que, na maioria dos casos, o micélio é constituído por células binucleadas. Os

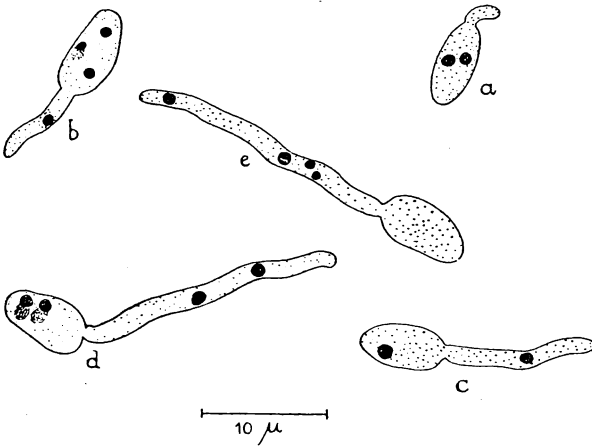


Fig. 2 — Esporos em diversas fases de germinação. Em a, basidiósporo quatro horas após a germinação, vendo-se o início do tubo germinativo e os dois núcleos do esporo. Em b, cinco horas após a germinação; os núcleos já se dividiram, tendo um migrado para dentro do tubo germinativo. Em c, esporo uninucleado, de cinco horas e meia. Em d e e, esporos com seis e meia horas de idade.

núcleos na célula adulta ocupam uma posição mediana no citoplasma. Encontramos, porém, os casos já mencionados em que as células possuíam um só núcleo, casos esses em que todo o micélio era constituído por células uninucleadas desde a germinação. Como veremos adiante, tanto no micélio binucleado como no uninucleado, as células formadoras de microconídios são uninucleadas.

Os núcleos são mais ou menos esféricos, de contornos bem definidos. Cada núcleo possui um nucléolo bem desenvolvido, de posição excêntrica, parecendo mesmo possuir a tendência a separar-se do resto do núcleo, fato este que lem-

bra em muito as observações feitas neste sentido em *Allomyces* (11). Considerando-se o pequeno tamanho do núcleo, uma boa técnica de diferenciação é muito importante; nem sempre, contudo, este fato tem sido posto em foco em publicações micológicas, onde muitas vezes os núcleos são representados por pequenas esferas que, provavelmente, na maioria dos casos são nucléolos. Por este motivo, apresentamos a fig. 3, que mostra num mesmo campo visual núcleos em diversos estados de diferenciação. Nesta preparação, dois núcleos apresentam coloração perfeita, ao passo que outro já foi demais diferenciado, permitindo reconhecer dificilmente o corpo nuclear que contém o nucléolo bem nítido. A hifa mais jovem desta figura, por estar cheia de citoplasma, ainda não foi, como acontece facilmente em hifas novas, diferenciada suficientemente, aparecendo por este motivo, o núcleo muito escuro, mal diferenciado. As divisões nucleares são dificilmente observadas, provavelmente porque, durante seu decorrer, o nucléolo desaparece e o corpo nuclear é pouco visível. Aliás, todo o processo da divisão parece decorrer com grande rapidez. Este pormenor será abordado mais tarde.

Inicialmente, as hifas ramificam-se muito, emitindo prolongamentos em ângulo quasi reto, constituindo este fato ca-

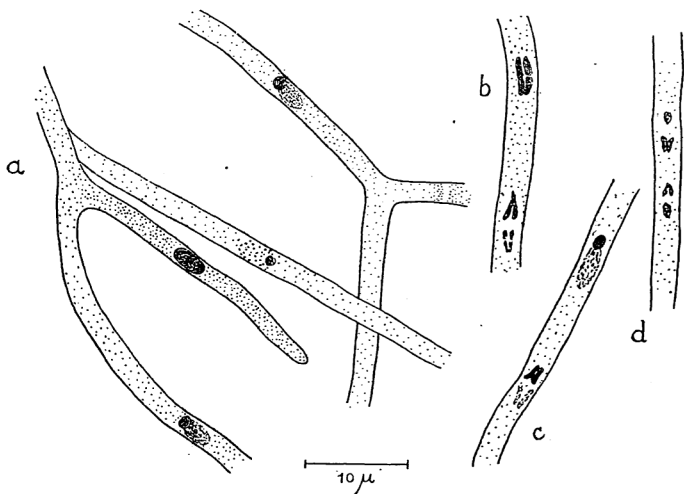


Fig. 3 — Núcleos do micélio vegetativo em repouso e divisão. Em a, quatro hifas com núcleos em vários estados de diferenciação. O primeiro e o último, bem diferenciados permitem reconhecer o nucléolo e o corpo nuclear; o segundo excessivamente e o terceiro pouco diferenciados. Em b e d, divisão dos dois núcleos de uma célula vegetativa. Em c, célula em que um dos dois núcleos já iniciou a divisão ao passo que o outro ainda está em repouso.

racterística para o micélio jovem. Em tais casos, a ramificação começa antes de ter início a divisão nuclear. Geralmente os núcleos de uma hifa binucleada dividem-se simultaneamente, migrando os dois núcleos filhos para dentro da ramificação formada. Existem porém casos, em que a formação de uma ramificação está diretamente ligada a separação dos dois núcleos. Neste caso, apenas um núcleo penetra na ramificação, permanecendo o segundo na célula da hifa;

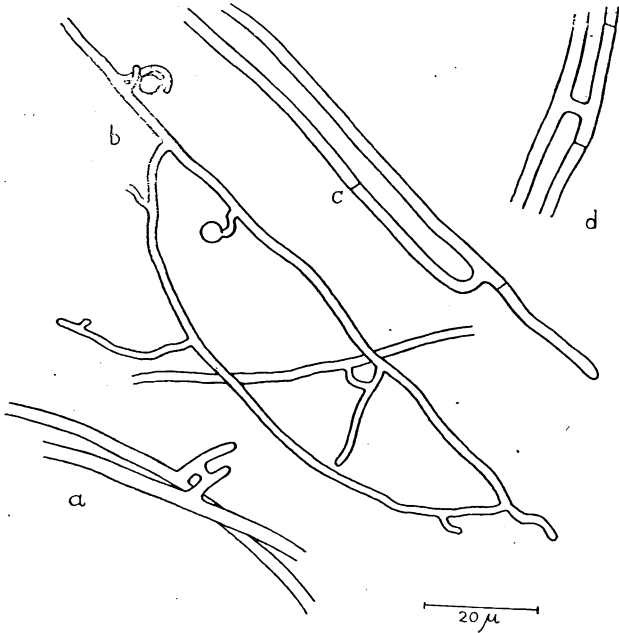


Fig. 4 — Anastomoses vegetativas. Em a, anastomose em um micélio de quarenta e oito horas. Em b, anastomose por ocasião da formação dos esporos redondos. Em c e d, anastomoses em células do pedúnculo do corpo de frutificação.

o septo celular que está em formação, vai separar os dois núcleos, originando-se por este processo uma célula uninucleada. O fato descrito é normal por ocasião do início da formação dos microconídios, como veremos mais adiante.

Na fig. 3, em b, c e d apresentamos núcleos do micélio vegetativo, em divisão. Os fenômenos que pudemos observar nestas células não permitem distinguir muitos detalhes; verificamos porém, que a divisão não é obrigatoriamente simultânea, podendo existir uma diferença quanto ao início do momento da divisão de cada um dos núcleos. Ocorre também que só um dos núcleos se divide, e em casos ex-

espcionais encontramos células com três núcleos. Isto como também a posição dos núcleos em divisão deixa ver claramente, que aqui não se trata de divisões conjugadas, apesar de tratar-se de micélio binucleado. Também ganchos, tão requentes no micélio binucleado dos basidiomicetos superiores, não foram encontrados em *Pilacrella*.

A interpretação das figuras de divisão nas células do micélio vegetativo requer grande cautela, pois, tratando-se por acaso de hifas velhas, os núcleos estão sujeitos a várias deformações; muitas vezes eles se alongam, ficam mais delgados, tomando então o aspecto de núcleos em divisão. Melhores observações sobre divisão nuclear obtivemos nas células formadoras de microconídios, onde temos plena certeza de estar diante de células em crescimento rápido e cujos núcleos estão em divisão contínua.

Anastomoses vegetativas das hifas, freqüentes em asco e basidiomicetos — vide p. ex. Buller (2) —, foram encontradas em *Pilacrella* já nos primeiros dias após a germinação, bem como mais tarde, durante a formação dos esporos redondos ou dos basídios, especialmente do pedúnculo do corpo de frutificação. Não foram observadas passagens de núcleos através da ponte celular formada pela anastomose das células. Na fig. 4 apresentamos as diversas anastomoses encontradas em *Pilacrella*.

Fusão de núcleos do micélio vegetativo não foi observada. Os núcleos do micélio uni ou binucleado não parecem divergir no que respeita à estrutura e tamanho.

MICROCONÍDIOS

Em nossas culturas quando ainda muito novas, isto é, com apenas três a quatro dias de idade, o micélio inicia a formação dos “pequenos conídios”, assim denominados por Möller e que, de acordo com outros autores da micologia moderna, como Gäumann (4), passaremos a chamar microconídios. Microconídios são esporos do tipo dos conidiósporos, pequenos, que se formam pelo estrangulamento das partes terminais de células especiais, os esterigmas.

A velocidade com a qual se desprendem estes esporos já tinha sido observada por Möller. Verificou ele que, em média de trinta e cinco minutos, desprende-se um microconídio, estando implicada neste tempo tanto sua formação como sua separação. Repetimos a experiência, encontrando valores correspondentes. Em uma cultura de três dias, verificamos que um primeiro microconídio se tinha destacado às sete horas e quarenta minutos. Quinze minutos após, já um novo microconídio estava em formação, apare-

cendo na ponta da hifa uma pequena saliência; esta aumentou progressivamente, até destacar-se do esterigma às oito horas e vinte e seis minutos. Observamos várias vezes este fenômeno chegando a um resultado médio de trinta e cinco minutos para a formação completa de um destes conidiósporos. Na fig. 5 representamos o decorrer de processo descrito. Os conidiósporos, assim formados, colocam-se uns atrás dos outros, formando inicialmente verdadeiras fileiras. Möller refere-se à existência de uma substância mucilaginosa que une os microconídios, responsável pelo fato de permanecerem os esporos enfileirados durante algum tempo. Não conseguimos evidenciar a existência desta substân-

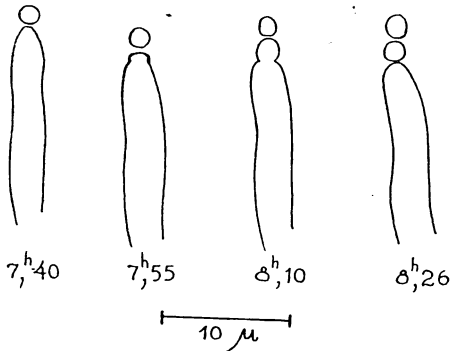


Fig. 5 — Microconídios em formação.

cia. Na tentativa de fazê-lo, empregamos uma solução de nanquin, distribuindo-a sobre a lâmina que continha a cultura com microconídios em formação. Se de fato existisse tal substância mucilaginosa, os pontos por ela ocupados teriam que permanecer claros, pois não permitiriam a distribuição imediata do nanquin. Os microconídios porém, foram totalmente envolvidos pela solução, não sendo possível reconhecer outra coisa a não ser a membrana do conidiósporo. Os primeiros esporos formados, depois de algum tempo, distribuem-se desordenadamente pelo substrato. Uma mesma ponta de hifa pode fornecer sucessivamente muitos esporos. Estes sempre se formam terminalmente; não nos foi possível observar um esporo que se destacasse lateralmente.

As hifas formadoras de microconídios podem ser elementos não especialmente diferenciados, mas, em micélio robusto, cultivado em substrato sólido ou líquido, apresentam-se sob forma de esterigmas terminais, laterais, e, muitas ve-

zes, até verticilados. Estes esterigmas destacam-se facilmente do micélio, constituindo provavelmente as células que Möller denominou conídios grandes. Chegamos a esta interpretação, comparando as figuras apresentadas por este autor com as nossas preparações. Uma comparação precisa de nossos resultados com os de Möller, todavia, é difícil, porque as culturas deste último estavam contaminadas por ocasião de suas observações. Ora, os produtos do metabolismo das bactérias poderiam ter alterado o ciclo vital do fungo em questão.

Quanto à germinação dos microconídios, Möller não parece tê-la observado com certeza. Refere-se ao fraco poder germinativo dos mesmos, mas em todo seu trabalho não apresentou figuras de tal germinação. Também em nossas culturas não conseguimos encontrar microconídios em germinação; o máximo que conseguimos verificar foi um entumescimento dos esporos, mas nunca germinação no verdadeiro sentido da palavra.

A rapidez e a regularidade com a qual se destacam sucessivamente os microconídios de um só esterigma sugeriram-nos a procura de divisões nucleares nestas formações. O resultado foi positivo. Assim, na fig. 6, tem-se plena certeza de se estar diante de núcleos em divisão. Nesta figura, em c, a hifa à esquerda mostra um fuso disposto de tal maneira que uma parte do mesmo já está dentro do conídio em formação e a outra permanece no esterigma. Os dois futuros núcleos, contudo, ainda estão ligados entre si. Este aspecto de halteres foi encontrado repetidas vezes em nossas preparações. Na hifa à direita pode-se observar um conidiósporo ligado ao esterigma, mas já provido de seu núcleo, enquanto o núcleo do esterigma está em nova divisão. Ainda na mesma figura, agora porém em d, apresenta-se o aspecto já descrito para a hifa mediana, ao passo que os esterigmas laterais apresentam núcleos em divisão para formar o primeiro microconídio.

E' muito raro encontrarem-se figuras semelhantes a um fuso, como no caso representado na fig. 6, a. Na mesma figura, em b, tudo indica tratar-se de fases mais adiantadas do processo de divisão. Os conídios já estão bem desenvolvidos, mas ainda desprovidos de núcleos. Verificamos frequentemente que esterigmas vizinhos apresentam núcleos em um mesmo estado de divisão. As células que vão dar origem aos microconídios são uninucleadas, mesmo quando o restante do micélio é constituído por células binucleadas. A separação dos dois núcleos das células do micélio binucleado

para formar células uninucleadas, constitui caso mencionado muitas vezes na literatura micológica, principalmente nos himenomicetos. Nas *Ustilaginales*, mais próximas a *Pilecrella*, o fenômeno foi observado por Sleumer (18), em *Ustilago Zeae*. O fenômeno porém, não é certamente análogo ao por nós estudado, pois, no caso referido, trata-se comprovadamente da volta da fase dicariontica para a uninucleada

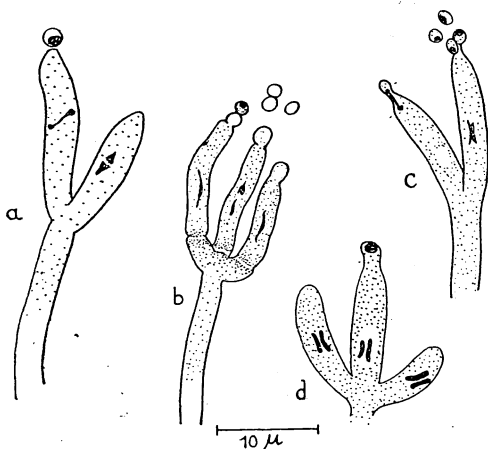


Fig. 6 — Divisão nuclear por ocasião da formação dos microconídios. Em a, duas células cujos núcleos em divisão apresentam o aspecto de fuso. Em b, células formadoras de microconídios, dispostas verticaladamente. Os microconídios ainda ligados à célula estão desprovidos de núcleos. Em c, duas células com núcleos em divisão. A hifa à esquerda mostra um fuso disposto de tal maneira que uma parte do fuso já está dentro do microconídio ao passo que a outra permanece na célula esterigmática. A hifa à direita mostra um microconídio ainda não destacado, porém já provido de seu núcleo, enquanto a célula esterigmática apresenta um núcleo já em nova divisão. Em d, tres células com núcleo em divisão. Na hifa mediana vemos um microconídio ainda não destacado, mas, já provido de seu núcleo.

haplonte. Em nosso caso, como se verá mais adiante, não sabemos se se trata de um dicáron, que seria formado pela presença de dois núcleos de sexos diferentes, mas o comportamento deve talvez ser comparado à formação de conídios uninucleados sobre micélio de células plurinucleadas.

Os dois corpos alongados — parecidos com os braços de um H —, tão bem visíveis na fig. 6, d, são característicos e repetem-se freqüentemente em certa fase da mitose. A interpretação dos mesmos nos parece incerta. Nasas figuras lembram muito as apresentadas por Geitler (6) em um trabalho em que estudou o comportamento nuclear

de várias espécies de *Cladophoraceae*. (l.c. fig. 19c). Este autor também verificou que o fuso é dificilmente visível durante o decorrer da divisão, devendo a distensão do nucléolo ser considerada como início da mitose. Nestes núcleos, que são muito maiores do que os de *Pilacrella*, foi possível reconhecer que os dois braços do H, nada mais são do que dois nucléolos que vão ser distribuídos pelas células filhas. A existência destes nucléolos relativamente grandes dificulta muito a observação dos outros fenômenos que ocorrem durante a divisão, principalmente no que se refere à parte cromática. Provavelmente se se pudesse ver maiores detalhes em *Pilacrella*, as figuras obtidas seriam idênticas às apresentadas por Geitler.

Verificamos um fato interessante, logo após a formação dos microconídios: os nucléolos quasi sempre ocupam posição completamente oposta à do ponto de desprendimento, fenômeno este que perdura mesmo durante algum tempo depois da separação do esporo do esterigma. Parecem existir, durante e mesmo depois da divisão, forças internas, análogas, talvez, às conhecidas em diatomáceas, que promovem o afastamento rápido dos dois núcleos filhos. Este afastamento parece processar-se com grande velocidade, quasi explosivamente, o que concordaria com nossas explicações da pouca freqüência ou mesmo raridade de figuras de divisão. Cada microconídio possui e permanece com um só núcleo. Sobre a estrutura deste último, nada podemos adiantar, pois ele é muito pequeno e não permite reconhecer detalhes. O máximo que se pode dizer é que o núcleo é esférico, contendo um pequeno nucléolo.

ESPOROS REDONDOS

Em nossas culturas, algum tempo após a formação dos microconídios, apareceu regularmente e em grande quantidade, um outro tipo de esporos, por nós denominado esporos redondos devido à sua conformação esférica. Inicialmente, as hifas, que vão dar origem a estes esporos, formam pequenas saliências, que aumentam gradativamente de volume. Este aumento de volume é acompanhado de um espessamento da membrana. Esta torna-se tão robusta, que inicialmente denominamos os esporos, esporos de resistência. Pensamos que se tratasse de um estado introdutor à formação de basídios, correspondente aos "Zeugites" mencionados por Gäumann (4) comparáveis aos probasídios que ocorrem em outras *Auriculariales*, como por exemplo, em *Septobasidium*, ou ainda, órgãos homólogos aos teleutósporos das *Uredi-*

nales ou clâmidosporos das *Ustilaginales*. Todas as formações são precursoras de basídios. Mais tarde porém, verificamos que não existe relação alguma entre estes esporos redondos e a formação dos basídios. Estes últimos originam-se de outras hifas, sem qualquer diferenciação especial, como passaremos a descrever em outro capítulo.

O desenvolvimento completo de um esporo redondo leva geralmente cinco dias. Os esporos permanecem aderentes ao micélio por um pedúnculo basal, formado por uma só célula, que é claviforme. O micélio neste estado da formação dos esporos, apresenta freqüentemente anastomoses vegetativas. A fig. 4 representa um destes aspectos. Quan-

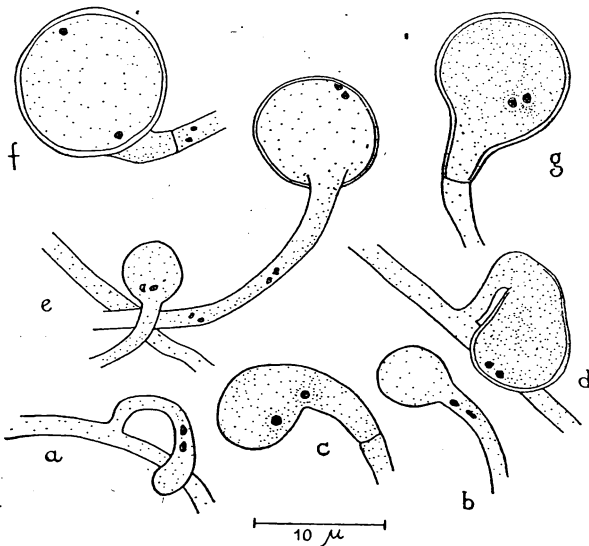


Fig. 7 — Desenvolvimento dos esporos redondos. Em a e b, início da formação. Os dois núcleos migram para dentro do esporo em desenvolvimento. Em c, esporo jovem, já separado da célula basal por um septo. Em d, espessamento da membrana do esporo. Em e, f e g, esporos adultos. Cada esporo possui dois núcleos e é envolvido por uma membrana bastante reforçada.

do os esporos atingem certo grau de desenvolvimento e o meio de cultura é favorável, apresentam em seu interior uma série de gôtas de diversos tamanhos, que muito dificultam a observação. Trata-se de gorduras como evidencia a forte coloração pelo Sudan III. Gôtas semelhantes podem ser também encontradas no micélio, nas vizinhanças dos pontos em que se encontram os esporos redondos. Elas desaparecem, em parte, durante o processo da fixação, quando o fixador contiver solvente de gorduras, e tornam-se escuras pelo em-

prego do ácido ósmico. Fixação e coloração destes esporos são dificultadas não só pela presença destas gôtas, mas também pela espessura da membrana.

Os esporos, uma vez atingido seu completo desenvolvimento, não se destacam da célula basal que os formou. Cada esporo normalmente possui dois núcleos, que migram para dentro dele, por ocasião de sua formação. Antes, porém, que se processe tal migração, o esporo deve ter crescido, até assumir mais ou menos a forma de uma pêra. A fig. 7 apresenta várias fases deste desenvolvimento. Os núcleos dos esporos são arredondados, apresentando um nucléolo bem desenvolvido, visível quando as preparações são bem diferenciadas.

Encontramos alguns esporos que possuíam três ou mais núcleos, as vezes até cinco, que, certamente, podem ser interpretadas como anomalias. A fig. 8 apresenta os aspectos pouco frequentes, por nós encontrados em algumas preparações.

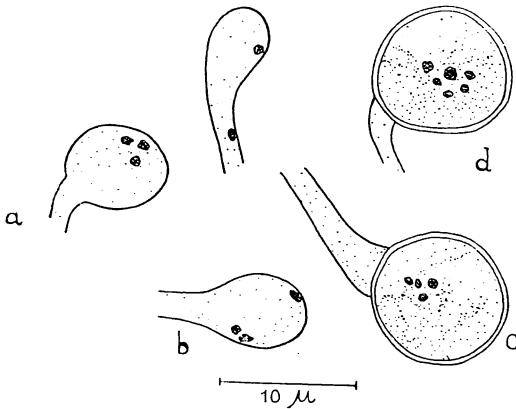


Fig. 8 — Esporos anômalos. Em a e b, esporos jovens, com membrana ainda não reforçada, apresentando três núcleos. Em c e d, dois esporos adultos, o primeiro com quatro núcleos e o segundo com seis.

Não conseguimos esclarecer qual a função dos esporos redondos. Todas as tentativas de provocar a sua germinação em meio de cultura sólido ou líquido, fracassaram. Quando isolados, brotam as células basais que não se destacam do esporo mesmo quando ele atingiu o completo desenvolvimento. Este brotamento não deve ser confundido com uma verdadeira germinação, isto é, germinação proveniente do próprio esporo. O micélio que se origina por este processo de germinação, é capaz de fornecer todos os

outros tipos de esporos. O número de esporos redondos que se forma é muito grande, não parecendo existir um ponto preferencial para o início do desenvolvimento. Até o presente momento, empregamos o nome esporo para designarmos tais formações. Como, porém, não germinam nem se destacam das células basais que os formam, esta denominação pode ser inapropriada. Como já dissemos anteriormente, pode tratar-se de formações que inicialmente desempenharam funções bem diferentes.

BASÍDIOS E SUA FORMAÇÃO

Quando *Pilacrella* atingiu a fase de desenvolvimento em que é capaz de formar basídios, elevam-se do substrato tufo de hifas que vão constituir mais tarde os corpos de frutificação. Em condições muito favoráveis ou então naturais, estes corpos de frutificação têm o aspecto de cabecinhas pedunculadas que em sua morfologia correspondem exatamente às descritas por Möller, cujas figuras, aqui reproduzimos (fig. 1, pg. 3). Em nossas culturas conseguimos obter corpos de frutificação normais, do tipo descrito por Möller, apenas durante os primeiros tempos. Mais tarde, provavelmente pelo enfraquecimento do micélio pelas contínuas repicagens e conservação em substratos artificiais, eles não mais se formaram, sendo substituídos por outros tipos, mais simples em sua organização, como, por exemplo, os tufo em forma de penachos, já observados por Möller. Os penachos contêm os mesmos elementos do corpo de frutificação, dispostos de maneira mais simples. Outras vezes porém os corpos de frutificação organizam-se de um modo mais simples ainda, grupando-se apenas dois ou mais basídios, sem uma disposição especial.

Os corpos de frutificação em forma de cabecinha ou em forma de penacho são formados por dois tipos de hifas: umas mais longas e mais finas, que entreteem e envolvem outras mais grossas e menores. As primeiras, por sua função, podem ser denominadas paráfiases e as segundas são as que vão dar origem aos basídios. O pedúnculo que sustenta o corpo de frutificação é constituído por hifas que se dispõem lado a lado, paralelamente; nelas é freqüente encontrarem-se anastomoses do tipo vegetativo como as apresentadas na fig. 4.

Tôdas as hifas que vão constituir basídios são binucleadas. Inicialmente estas células são pequenas, arredondadas na extremidade e um pouco entumescidas. Depois de decor-

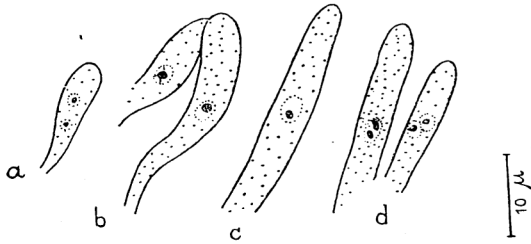


Fig. 9 — Formação de basídios. Em a, hifa ainda jovem, binucleada cujos núcleos estão afastados. Em b, duas hifas mais desenvolvidas, cujos núcleos estão apressos um ao outro. Em c, hifas bem desenvolvidas, agora uninucleadas; este único núcleo resultou da fusão dos dois anteriores.

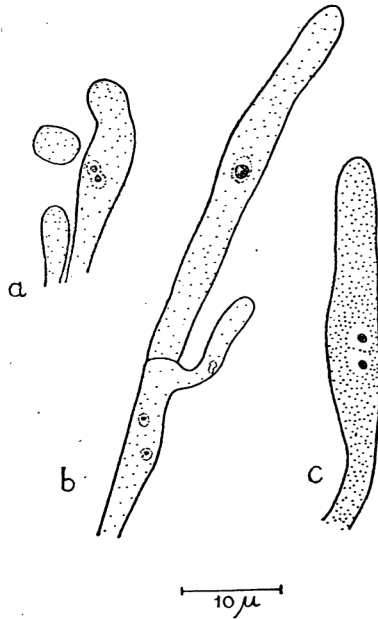


Fig. 10 — Formação de basídios. Em a e c, hifas entumescidas, apresentando ainda dois núcleos. Em b, hifa com um só núcleo, resultante da fusão dos dois anteriores.

rido algum tempo, processa-se um crescimento bastante acentuado. A hifa em sua porção terminal entumescce mais ainda, aumentando também em comprimento. Os dois núcleos vão ocupar a porção mediana da célula. Não existe

neste estado em *Pilaerella* o grande aumento nuclear geralmente descrito para esta fase, em outros basidiomicetos. Lembramos que Ritchi (17), estudando certos himenomicetos, descreveu os núcleos antes da copulação como sendo quarenta vezes maiores do que núcleos no estado vegetativo.

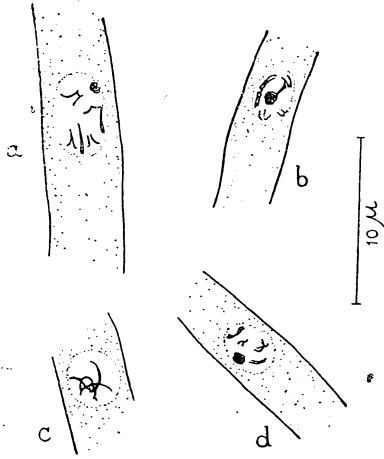


Fig. 11 — Formação de basídios. Em a, b, c e d, vários aspectos de núcleos de fusão.

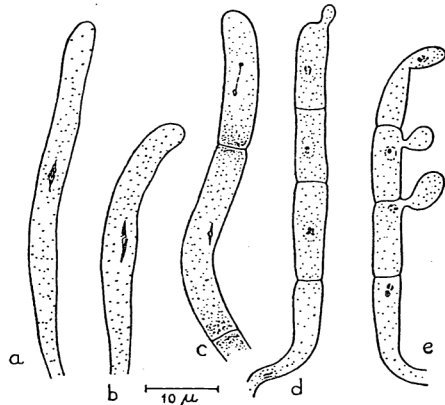
Depois desta fase preparatória, segue-se a fusão dos dois núcleos. As hifas, agora bem desenvolvidas, passam a ser uninucleadas, apresentando um núcleo bem maior do que os das células binucleadas. A fusão nuclear propriamente dita é de difícil observação. Frequentes vezes encontramos em nossas preparações dois núcleos dispostos de tal modo a ficarem em contacto muito íntimo. Nas figs. 9 e 10 apresentamos aspectos que interpretamos como esse estado de fusão. A fusão deve processar-se rapidamente, pois assim se explicaria a pouca frequência de aspectos que fixam o momento exato desta fase.

Durante o processo de preparação do núcleo para a primeira mitose e durante o decorrer da mesma, encontramos pela primeira vez, formações que se assemelham a cromosomas. Na fig. 11 apresentamos vários núcleos durante esta fase, em que parecem existir pares de cromosomas, em número de cinco ou seis. A seguir, todo o núcleo se contrae, não mais podendo ser distinguido o nucléolo da parte cromática restante. Métodos que permitam distinguir nucléolos e cromosomas, durante esta fase, poderiam ser tentados

para núcleos maiores. Em nosso caso não foram empregados devidos o exíguo tamanho do núcleo.

Vários aspectos da primeira divisão são apresentados na fig. 12 em *a* e *b*. A segunda sêgue-se imediatamente à primeira, provavelmente com grande rapidez, pois só encontramos um caso feliz em que o fenômeno poude ser observado, apesar das inúmeras preparações examinadas. Na fig. 12, *c*, podemos ver um basídio em formação em que fo-

Fig. 12 — Formação de basídios. Em *a* e *b*, primeira divisão. Em *c*, segunda divisão dos dois núcleos. O primeiro septo que divide o basídio em duas células já foi formado. Em *d*, basídio com quatro células; a célula apical está formando o primeiro basidiósporo. Em *e*, fase mais avançada da formação dos basidiósporos.



ram fixadas duas divisões; o septo formado após a primeira divisão ainda é muito fino. Por êste processo os basídios são divididos em quatro células, cada uma munida de seu núcleo.

Os basidiósporos originam-se destas células, geralmente próximo dos septos e são quasi sésseis. A formação dos basidiósporos se processa tanto de um como de outro lado do basídio, não existindo, portanto, preferência por um dos lados, como ocorre por exemplo em certas *Uredinales*. Apenas a primeira célula costuma formar um basidiósporo terminal. Parece ser regra que cada célula do basídio origine um só basidiósporo. O núcleo da célula do basídio migra para dentro da célula do basidiósporo, junto com grande parte do citoplasma, ficando a célula do basídio quasi vazia, após o desprendimento do basidiósporo. O núcleo do basidiósporo então se divide, dando origem a esporos normais, binucleados. Esporos binucleados são também conhecidos em outros basidiomicetos, como se depreende da literatura existente.

Encontramos, contudo, alguns casos em que êste esquema não foi seguido. A divisão que deveria ocorrer no basidiósporo, antecipou-se, efetuando-se na célula do basídio, enquanto o basidiósporo ainda estava brotando desta célula.

la. Um dos dois núcleos assim formados permanece na célula do basídio com um pouco de citoplasma, ao passo que o outro migra para dentro do esporo em formação. Dêste modo, resulta um basidiósporo uninucleado e uma célula basal, capaz de formar mais um esporo. Na fig. 13, apre-

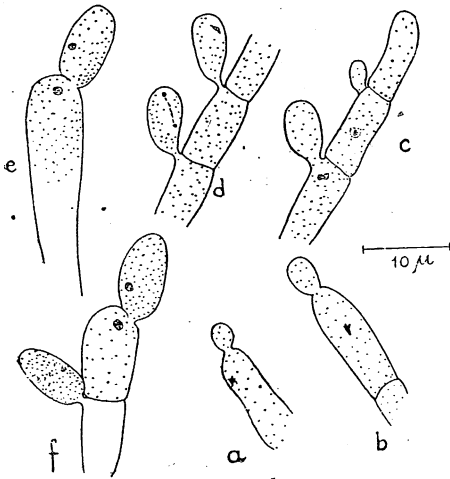


Fig. 13 — Em a e b, formação do primeiro basidiósporo. Os núcleos da célula do basídio estão em divisão. Em c, basidiósporo ainda desprovido de núcleo. Em d, dois basidiósporo completamente desenvolvidos mas, ainda presos as células do basídio. Em ambos os esporos o núcleo está em divisão. Em e e f, formação de basidiósporos uninucleados.

sentamos dois casos dêste tipo. Encarando agora o processo acima descrito, poderemos compreender como de um mesmo corpo de frutificação podem originar-se esporos uni e binucleados. A freqüência de esporos do primeiro tipo é muito menor do que a do segundo tipo.

CRUZAMENTO

A fusão nuclear que ocorre nos basídios novos, sem dúvida, é um processo sexual. Qual porém a proveniência dos núcleos copulantes não o sabemos com certeza: poderiam ser derivados dos pares já observados desde a germinação, poderiam também resultar de nova combinação sexual. Na primeira das hipóteses os micélios forçosamente seriam homotáticos.

Afim de verificarmos se existe heterotalismo ou homotalismo em nossa *Pilacrella*, fizemos uma série de cruzamentos a partir das culturas puras já existentes, combinando-as de todos os modos possíveis.

Os primeiros cruzamentos foram feitos em tubos de ensaio, sobre agar Malte a 3%. Inoculamos no substrato micélio proveniente de duas culturas diferentes, deixando en-

tre as duas inoculações um espaço de mais ou menos dois centímetros. Controlamos o desenvolvimento das culturas ao microscópio, afim de observarmos o comportamento das hifas na linha da junção dos micélios, pois nosso principal objetivo foi encontrar corpos de frutificação nesta zona de contacto. Com os resultados obtidos, elaboramos a tabela anexa.

Cada experiência compreendia um lote de cinquenta e cinco cruzamentos; nestes, foi possível observar vários tipos de comportamento, dignos de nota. Do total de cada lote de cruzamento, quarenta e quatro culturas apresentavam um entrelaçamento das hifas no ponto de contacto dos dois micélios, dando à cultura um aspecto homogêneo, como se os micélios fôsem de uma mesma proveniência. As onze culturas restantes, apresentaram na zona de contacto aspecto completamente diferente do das outras culturas, formando uma espécie de *faixa saliente*, quasi sem tufos de hifas, por nós denominada faixa de contacto (fig. 14).

Destas onze culturas que formam linha de contacto, três isto é, as combinações AxE, BxJ e ExD, apresentaram corpos de frutificação normais sôbre a referida linha. Re-

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A		c			c.f.				c	
B	c									c.f.
C					c					
D					c.f.					
E	c.f.		c	c.f.			c	c		c
F										
G					c				c	
H					c					
I	c						c			c
J		c.f.			c				c	

Fig. 14 — Tabela de cruzamentos. As letras e e f indicam respectivamente linha de contacto e frutificação.

petimos várias vezes os mesmos cruzamentos, obtendo os mesmos resultados para as quarenta e quatro primeiras culturas. As onze restantes, apresentaram um comportamento inconstante quanto a nitidez da linha de contacto, podendo esta ser mais ou menos acentuada.

Para podermos estudar mais detalhadamente o comportamento das hifas na zona de contacto, repetimos as mesmas culturas sobre lâminas. Estas foram confeccionadas segundo a técnica já descrita por ocasião do estudo dos basidiósporos em germinação. Fizemos fixações de cruzamentos de várias idades, já após o encontro das hifas provenientes das duas inoculações. Os resultados obtidos, sempre foram os mesmos. Não foi possível constatar um desvio em relação ao comportamento do micélio normal. Não observamos anastomoses nem sinal de migração nuclear.

A raridade de corpos de frutificação pode ser atribuída à várias causas, mas, como verificamos mais tarde, deve ser explicada principalmente pela fraquesa geral do micélio de nossas culturas, que já estavam em observação durante vários anos. No que decorreu entre 1947 e 48, obtivemos em substratos modificados, (agar Malte com cenouras ou simplesmente cenouras) corpos de frutificação em todas as nossas culturas monoesporídias. Depreende-se deste fato que a espécie de *Pilacrella* por nós estudada é homotática. A série de cruzamentos que fizemos entre as culturas monoesporídias, parece mostrar que em culturas enfraquecidas, certas combinações, tem um valor estimulante. Se nestes casos existe ou não migração de núcleos de um micélio para o outro, não podemos afirmar.

Não está fora de cogitação que o fungo como nós o encontramos, poderia ser heterotático, mas que durante nossas culturas se deram as mutações mencionadas por Buller (l. c. pg. 354 e 355), que citaremos mais adiante. Como não conseguimos obter *Pilacrellas* de novas proveniências temos que deixar em suspenso este problema.

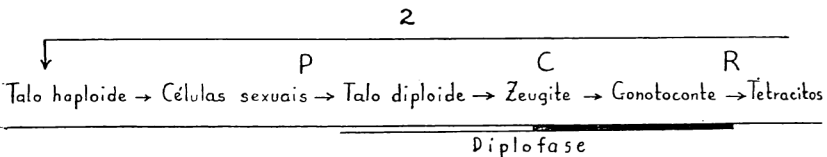
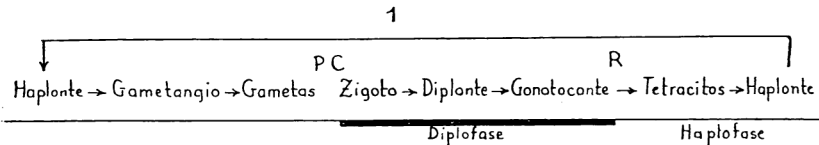
DISCUSSÃO

A discussão dos fatos por nós estudados é dificultada pelos poucos conhecimentos existentes, até o presente momento, sobre a citologia e o ciclo evolutivo de quase todos os grupos de *Pilacrella delectans*. Assim, Gäumann, terminando sua apresentação da classe das *Auriculariales* com a família das *Phleogenaceae*, dentro da qual *Pilacrella* costuma ser incluída, diz "o ciclo evolutivo de todas estas formas, sob o ponto de vista citológico, ainda é desconhecido". Esta mes-

ma observação pode ser estendida a toda a ordem das *Auriculariales*, pelo menos, se consideramos a totalidade do ciclo evolutivo. Nos poucos casos em que foram feitos estudos citológicos, as observações se limitaram à formação dos basídios e raras vezes à germinação dos basidiósporos.

Os vinte anos que decorreram após a publicação do trabalho de Gäumann, não ampliaram muito os conhecimentos existentes, como se depreende do recente trabalho de Wolf and Wolf (20).

Antes de iniciarmos uma discussão detalhada sôbre os fatos por nós observados em *Pilacrella*, desejamos lembrar as diversas particularidades pelas quais se distingue o ciclo evolutivo dos fungos superiores. Confrontando o esquema geralmente apresentado para o comportamento das plantas superiores, diagrama n.º 1, ao n.º 2, que se refere ao comportamento dos fungos superiores (v. Gäumann, l. c. pg. 1 e 14), verificamos que a diferença essencial reside na localização dos pontos P e C, significando P a plasmogamia, isto é, fusão das células copulantes e C a cariogamia ou fusão nuclear. A mitose reducional é indicada por R.



P e C costumam coincidir na maioria das plantas e animais, ou melhor, ocorrem em rápida seqüência. (Se entre P e C decorre um intervalo maior, a fusão, apesar deste intervalo, ainda se processa nas próprias células que copularam).

Nos fungos superiores, como asco-e-basidiomicetos, a plasmogamia porém ocorre muito antes da cariogamia, e, P e C agora colocam-se em lugares distantes do ciclo evolutivo, não mais coincidindo.

Após a plasmogamia, os dois núcleos ainda não se unem, mas constituem uma fase dicariônica. Durante o decorrer desta fase, os núcleos multiplicam-se por divisão conjugada, permanecendo as células constituintes do micélio binuclea-

das. Tais micélios, podem crescer e permanecer na diplofase, neste caso especial, também chamada de dicaríofase (Terminologia compare Buller l. c. p. 399) por muito tempo. Esta fase termina para dar lugar à cariógamia, que nos ascomicetos, se processa no asco novo e, nos basidiomicetos, no basídio novo ou, numa fase anterior, denominada “Zeugite” “probasídio” ou “hipobasídio”. Esta última particularidade se explica pelo fato de que, nos basidiomicetos, o probasídio muitas vezes serve de esporo progador, que freqüentemente só germina após uma época de repouso, talvez na primavera seguinte, formando então um promicélio que corresponde ao basídio verdadeiro.

Para melhor compreensão dos fatos que ocorrem em *Pilacrella*, é preciso levar em conta também a grande involução da sexualidade nos fungos superiores. Desejamos novamente mencionar o trabalho de Gäumann, (4) que, empregando a terminologia de Hartmann, distingue os casos seguintes: Se designarmos por *anfimixia* (amphimixis) a copulação normal de dois gametas de proveniência diferente, o primeiro passo de involução seria a *automixia*, que corresponde a autofecundação, mediante a copulação de duas células sexuais ou, então, de dois núcleos sexuais aparentados. Se a copulação se processar entre duas células do órgão feminino, teríamos partenogamia ou autogamia, no caso de existir fusão de dois núcleos dentro de uma única célula feminina. Estes casos são encontrados em ascomicetos, onde ainda existem órgãos sexuais bem reconhecíveis.

Nos basidiomicetos, onde não mais se podem reconhecer nitidamente órgãos sexuais, trata-se mais de casos de *pseudomixia*, como Hartmann denomina a copulação de duas células vegetativas ou de somatogamia, segundo a terminologia hoje mais usada, de Kniep (10). Para a copulação de células que não estão em relação íntima de parentesco, Hartmann reserva a denominação pseudogamia. Pedogamia e adelfogamia seriam os casos de copulação pseudomictica que ocorre entre célula mãe e célula filha ou entre células irmãs. Estes últimos casos são conhecidos especialmente para os levedos, que são ascomicetos. O último caso de involução seria a *apomixia*, em que as células sexuais se propagam vegetativamente, sem que haja copulação.

Devemos finalmente salientar a grande variabilidade no comportamento sexual que pode ser encontrada não só em famílias, gêneros e espécies, mas ainda em indivíduos da mesma espécie. Muito ilustrativas são as palavras acrescentadas por Harder à última edição de “Strasburgers Lehrbuch” (8) aplicadas em seu conjunto aos ascomicetos, mas também válidas para os basidiomicetos. Após a descrição da

copulação ainda anfimictica de *Pyronema* e *Boudiera*, continua do modo seguinte: “O tipo de fecundação descrito, pode ser substituído por outros, podendo incluir até ausência completa de órgãos sexuais, copulação de duas hifas vegetativas ou mesmo copulação antecipada de dois ascósporos. Muitas vezes apenas falta o anterídio, e a migração do núcleo parte de uma hifa vegetativa, ou de conídios exógenos que podem ser formados em órgãos especiais. Em certos casos, em que existem tricogines, estas aproximam-se das células que desempenham o papel de gametas masculinos, como sucede em *Bombardia lunata*. A copulação também pode ser inteiramente suprimida. O núcleo do ascogônio por divisão, dá origem à fase dicariônica, ou então, o núcleo haploide do ascósporo divide-se durante a germinação perpetuando-se em todas as células do micélio vegetativo o dicácion assim formado, até o momento em que se processa a fusão nuclear no asco. Tais involuções da sexualidade e ainda muitas outras, podem ser observadas não só dentro de uma mesma família mas também em um mesmo indivíduo.

O primeiro fato que chamou nossa atenção em *Pilacrella*, foi a *binuclearidade* da maioria dos esporos e do micélio formado por sua germinação. Este fato porém não constitui caso único entre os fungos superiores, embora o basidiósporo uninucleado constitua regra entre os basidomicetos. Nos casos de formação de esporos binucleados, estes podem se comportar das seguintes maneiras: durante a germinação, pode-se formar um micélio constituído de células uninucleadas, como por exemplo em *Kneiffia*, por simples separação dos núcleos. Em outros casos porém, originam-se células plurinucleadas, como em certos *Coprinus*. Outras vezes ainda, como em *Corticium terrestre Kniep*, os dois núcleos do basidiósporo constituem um dicácion verdadeiro, migrando junto para dentro do tubo germinativo, dividindo-se em seguida sempre simultaneamente em divisão conjugada.

Pilacrella parece se aproximar deste último caso, mas nós não temos certeza absoluta se os pares de núcleos que fusionam no basídio são provenientes destes pares primitivos de núcleos. Se *Pilacrella* representa uma forma primitiva, poderia ser que os dois núcleos correspondam a um dicácion ainda não diferenciado nitidamente. Se porém lembramos a involução da sexualidade descrita por Harder (8), poderíamos também pensar na possibilidade de *Pilacrella* constituir um caso de involução, em que a sexualidade anteriormente bem definida, estivesse em declínio, perdendo a fase dicariônica sua nitidez.

A formação dos conídios por nós denominados *microconídios* também é conhecida em outras *Auriculariales*. As-

sim *Auricularia auricula Judae* (L) Schroet. produz conídios em forma de ganchos, que podem germinar, constituindo um micélio ramificado. Também *Septobasidium albidum* Pat., produz conídios mas estes não podem ser comparados aos de *Pilacrella*.

Quanto a interpretação do papel destes conídios que em *Pilacrella* não germinam, não podemos deixar de pensar nos picnósporos dos líquens, ascomicetos e uredinaes. Nestas últimas a função masculina dos picnósporos, que também normalmente não germinam, era desconhecida até a descoberta de Craigie (3). É bem possível que nossos microconídios sejam gametas masculinos, que perderam definitivamente sua função, ou que ainda possam exercê-la para a diploidização do micélio de uma maneira desconhecida.

Quanto aos *esporos redondos*, deparamos com problemas semelhantes. Também eles não germinam nas condições em que fizemos nossas culturas. Não podemos excluir a possibilidade de também tratar-se de órgãos rudimentares, agora fora de função. Quem com Gäumann (4, l. c. pg. 400) procura derivar os basidiomicetos dos ascomicetos, poderia interpretar estes esporos redondos como rudimentos de *antigos ascos*. De outro lado porém, os esporos redondos poderiam representar gametas femininos, oogônios, ora fora de função, cuja existência corresponderia a dos microconídios, que seriam os espermácios correspondentes a estes oogônios. Pouco provável parece a interpretação do esporo redondo como "Zeugites" ou "probasídio" fora de função, pois os basídios são formados em outros pontos e de células bem diferentes.

Sobre os *basídios* e seu desenvolvimento, não precisamos dizer muito, pois trata-se de fragmobasídios também denominados probasídios, do tipo descrito em *Auriculariales*, *Uredinales* e *Ustilaginales*.

As primeiras divisões, após a fusão do dicáriorion ou formação do sincáriorion, devem compreender a mitose reducional, que, como se sabe, em asco e basidiomicetos, pode ocorrer durante a primeira ou segunda das divisões. Em nosso caso, acrescenta-se uma terceira divisão, que se realiza dentro do basidiósporo. O aparecimento de oito núcleos provenientes destas divisões, não parece ser casual. Neste sentido fala não só o número oito comum para o ascósporos, mas também a frequência da terceira divisão em basidiomicetos, responsável pela existência de basidiósporos binucleados, conhecidos por exemplo em *Corticium terrestre Kniep*, *Tulasnella thelephorea Juel*, *Nidularia pisiformis Tul.* e outros.

Se supusermos que os caracteres sexuais só se separam durante esta terceira divisão, seria compreensível o comportamento de *Corticium*, onde os dois núcleos formados na terceira divisão, dentro do basidiósporo, dão origem à uma série de dicárrions que, finalmente, copulam por ocasião da formação dos basídios. Sugestivo também é o caso de *Coprinus sterquilinus* Fr., assim citado por Buller: "Na espécie homotática *Coprinus sterquilinus*, a fusão nuclear no basídio é seguida pela meiose; a seguir, cada basidiósporo recebe um dos quatro núcleos haploides, que agora se dividem, constituindo basidiósporos binucleados. Cada basidiósporo origina um micélio inicialmente plurinucleado, a seguir dicariótico, provido de ganchos ⁽¹⁾. (Brunswig 1924, Buller 1924, 1931). Jackson crê que, em espécies homotáticas, como *Coprinus sterquilinus* Fr., os dois núcleos do dicárrion devem ser iguais quanto aos seus cromosomas, pois derivam de um mesmo núcleo haploide. Entretanto, sabemos que normalmente, em espécies heterotáticas, como por exemplo *Coprinus lagopus* Fr., dois núcleos iguais, em nenhum haplonte, se unem para formar um dicárrion e que um dicárrion é formado só por dois núcleos de sexos diferentes. Pode-se supor, portanto, que, em *Coprinus sterquilinus*, deve existir uma diferença fisiológica entre os núcleos do dicárrion, pois senão não ficariam associados um ao outro". (l. c. pg. 354 e 355). Buller, em continuação, cita casos em que núcleos de uma só proveniência, por mutação, tornam-se capazes de copular. Não desejamos discutir estas probabilidades; deixamos apenas assinalada a possibilidade da separação do caráter de sexualidade durante a terceira divisão. Como já se provou ser tal separação possível na segunda mitose, nada impede admitir que também possa ocorrer na terceira. Neste caso, o micélio de *Pilacrella* constituiria um micélio diploide, dicariótico.

É porém verdade que este micélio origina os microconídios, que possuem um só núcleo, sem dúvida haploide. O fato tem seus paralelos em outros casos, onde também os núcleos do dicárrion se separam, formando conídios ou outras células uninucleadas, haploides. Tal processo foi denominado por Buller dediploidização (l. c. pg. 411). Os diversos exemplos citados por este autor, incluem vários casos ocorrentes entre *Ustilaginales* e *Uredinales*, sistematicamente tão próximas das *Auriculariales*.

(1) Os ganchos tão característicos em micélios dicarióticos da maioria dos *Autobasidiomicelos*, como também em muitas das espécies de *Coprinus*, faltam, com poucas exceções, nas *Auriculariales*, *Uredinales* e *Ustilaginales*. Nota da autora.

Os fatos expostos no presente trabalho deixam em suspenso vários problemas, que esperamos poder atacar mais tarde. Resultados interessantes provavelmente obteríamos se pudessemos fazer culturas puras de micélio uninucleado e obter deste micélio basídios e basidiósporos e verificar qual o comportamento dos mesmos. Esperamos encontrar futuramente *Pilacrella delectans* ou formas próximas, de outras proveniências, que permitam obter maiores esclarecimentos sobre o assunto, pois nossas culturas já muito velhas, parecem esgotadas pelas muitas repicagens, não constituindo material favorável a estas pesquisas.

Desejamos deixar aqui nossos agradecimentos ao Professor Félix Rawitscher, pela orientação e auxílio prestados durante a elaboração do presente trabalho.

RESUMO

Pilacrella delectans Möll. (1), um Protobasidiomiceto, foi descoberto por Alfred Möller, em 1891, em Santa Catarina. Apareceu em nosso Departamento em 1939, onde desde então é mantida em cultura pura.

O estudo do ciclo evolutivo sob ponto de vista citológico, até então desconhecido, apresentou os seguintes resultados:

- 1) Os basídios surgem de micélio constituído de células binucleadas. Nos basídios novos, ocorre a fusão dos dois núcleos. O núcleo resultante desta fusão é relativamente grande, permitindo reconhecer cromosomas em número de cinco ou seis pares. Seguem-se dentro do basídio duas divisões e mais uma terceira que, geralmente, ocorre dentro do basidiósporo, constituindo então basidiósporos binucleados.
- 2) Os basidiósporos em germinação podem formar um ou dois tubos germinativos; os pares de núcleos resultantes das divisões, migram para dentro do tubo germinativo.
- 3) A divisão dos pares de núcleos ocorre simultaneamente, não pertencendo porém ao tipo das divisões conjugadas; faltam completamente ganchos (clamp connections).

(1) Sinónimo = *Hoehneliomyces delectans* (Möll.) Weese.

- 4) O micélio novo produz microconídios, já descritos por Möller. Durante a formação dos esterigmas os núcleos dos pares se separam, de maneira que esterigmas e conídios são uninucleados. Os microconídios não germinam, podendo talvez ser interpretados como gametas masculinos fora de função, ou então, gametas que funcionam em condições ainda desconhecidas.
- 5) Logo após a formação dos microconídios, surgem células bem maiores, de membrana reforçada, por nós denominadas preliminarmente "esporos redondos". Estes geralmente são binucleados, podendo porém conter um número maior de núcleos. Não conseguimos obter a germinação dos mesmos. Parece possível também interpretá-los como órgãos rudimentares, talvez células sexuais femininas, fora de função.
- 6) Os basídios desenvolvem-se mais tarde, no mesmo micélio, em pontos completamente sem relação com os que formaram os microconídios ou esporos redondos. Parece que os núcleos que se fundem no basídio novo derivam dos pares observados desde a germinação do basidiósporo. Indícios da migração nuclear sexual não foram encontrados, embora existam anastomoses vegetativas no micélio.
- 7) Culturas feitas a partir de um só esporo evidenciaram que *Pilacrella* é homotática.

SUMMARY

Pilacrella delectans Möll. (syn. *Hoehneliomyces delectans* (Möll.) Weese has been first described by Alfred Möller. This fungus was observed for the second time (in one single strain) and has been cultivated by us, since 1939.

The essential facts of its life history are the following:

1) — The basidia are formed by a dicaryontic mycelium. Fusion of the two nuclei takes place in the young basidium, and is immediately followed by a double division. A third division takes place during or immediately after the formation of the basidiospores which are generally binucleate.

2) — The basidiospores at germination form one or two tubes with cells generally binucleate.

3) — The division of the two nuclei as a rule takes place simultaneously, but they are not of the type of the conjugated division; clamp connections are absent.

4) — The young mycelium soon produces microconidia. During the formation of the sterigmata, the nuclei of the pairs are separated, so that the sterigmata and microconidia become uninucleate. The microconidia do not germinate; perhaps they are to be interpreted as male cells, out of function.

5) — Soon after the formation of the microconidia, larger thick-walled cells are formed, called by us, preliminarily round spores. They are generally binucleate, but also a greater number of nuclei was found. These cells also failed to germinate in our cultures. Perhaps they represent rudimentary organs, possibly female cells out of function.

6) — The basidia develop later, on the same mycelium where microconidia or round spores are formed. Apparently, the nuclei that copulate in the young basidium derive from the pairs which were observed, in the germinating basidiospores. Indications of sexual nuclear migration have not been found although there exist vegetative anastomoses.

7) — Monosporic cultures produced normal basidia; our strain of *Pilacrella* is therefore homothallic.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BREFELD, O. — 1888 — Protobasidiomyceten. Unters. Ges. geb. d. Mycol. 7.
- 2 — BULLER, R. — 1941 — The diploid cell and diploidisation process in plants and animals, with special reference to the higher fungi. Bot. Rev. 7 (7), 335-431.
- 3 — CRAIGIE, J. H. — 1927 — Discovery of the function of the pycnia of the Rust Fungi. Nature 120, 765-767.
- 4 — GÄUMANN, E. — 1926 — Vergleichende Morphologie der Pilze, Jena.
- 5 — GÄUMANN, Dodge — 1928 — Comparative morphology of fungi. Mc Graw Hill Book Company, Inc. New York.
- 6 — GEITLER, L. — 1936 — Vergleichende Untersuchung über den feineren Kern und Chromosomenbau der Cladophoraceen. Planta, Arch. f. Wis. Bot. 25, 530-578.

- 7 — GREIS, H. — 1936 — Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Basidiomyceten. Jahrb. W. Bot. 84, 449-482.
- 8 — HARDER, R. — 1947 — Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Jena. Antigo Strasburgers Lehrbuch der Botanik für Hochschulen.
- 9 — KNIEP, H. — 1913 — Beiträge zur Kenntnis der Hymenomyceten. Zeitschr. f. Bot. 5, 593-637.
- 10 — KNIEP, H. — 1928 — Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena.
- 11 — KNIEP, H. — 1930 — Über den Generationswechsel von *Allomyces javanicus*. Zeitsch. f. Bot. 22, 433-441.
- 12 — KOPP, M. — 1948 — Über das Sauerstoffbedürfnis wachsender Pflanzenzellen. Ber. d. Schweiz. Bot. Ges. 58, 283-318.
- 13 — MÖLLER, A. — 1895 — Protobasidiomyceten. Jena.
- 14 — RAWITSCHER, F. — 1912 — Beiträge zur Kenntnis der Ustilagineen. 1. Zeitschr. f. Bot. 4, 673-706.
- 15 — RAWITSCHER, F. — 1922 — Beiträge zur Kenntnis der Ustilagineen 2. Zeitschr. f. Bot. 14, 274-295.
- 16 — RITCHI, D. — 1941 — Fixation study of *Russula emetica*. Amer. Jour. of Bot. 28 (7), 582-588.
- 17 — RITCHI, D. — 1948 — Nuclei and cytoplasmic inclusions in the basidia of *Amanita*. Bot. Gaz. 109 (4), 521-525.
- 18 — SLEUMER, H. O. — 1932 — Über die Sexualität und Zytologie von *Ustilago zeae*. (Beckm) Unger. Zeitschr. f. Bot. 25, 209-263.
- 19 — WEESE, G. — 1919 — Beitrag zur Morphologie und Systematik einiger Auricularineengattungen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 37, 512-519.
- 20 — WOLF, Frederick A. and WOLF, Frederick T. — 1947 — The fungi — John Wiley and Sons, Inc. New York.