

Sobre os Pseudo-protozoários dos tecidos da Canna atacada de Mosaico

Prof. AGESILAU H. BITANCOURT
Cathedrático interino de Botânica Agrícola da E. A. P.

Em o numero de maio-junho prometti aos leitores da REVISTA DE AGRICULTURA communicar-lhes os resultados dos estudos que tencionava fazer para verificar, em cannas atacadas de Mosaico, um protozoario assignalado pelo Professor Averna Saccà, em uma serie de artigos publicados no Boletim de Agricultura, edictado pela Secretaria de Agricultura e Obras Publicas do Estado de São Paulo, artigos esses recentemente reunidos num folheto da mesma Secretaria (1).

Devo dizer desde já que o resultado dessas pesquisas me obrigam a negar a existencia desse protozoario. Não tivesse a descoberta do professor Saccà numerosas e importantes consequencias praticas para a prophylaxia do Mosaico, consequencias estas por elle proprio apontadas, e nunca me abalaria a repetir os seus extensos estudos e muito menos a publicar os resultados a que cheguei. Mas elle mesmo levanta, baseado nos resultados que pensou ter alcançado, um certo numero de problemas de diversas ordens que propõe aos que, por profissão ou por gosto proprio, são chamados a se interessar por estas questões. Além disso, tira varias conclusões relativas ao tratamento do Mosaico. Nestas condições não hesito em publicar os meus estudos, com o fito de poupar muitos esforços inuteis e pesquisas desnecessarias, até que fique definitivamente esclarecida a momentosa questão.

Antes de analysar o trabalho do professor Averna Saccà, e relatar uma por uma as verificações que fiz de suas affirmações, devo dizer que só procurei controlar tudo o que se referia ao protozoario e ás alterações anatomicas por elle provocadas, deixando de verificar tudo o que já foi perfeitamente descripto por autores anteriores, como os differentes caracteres externos da doença, tanto na folha como no colmo e no systema radicular — muitos dos quaes, convem dizer, não são especificos do Mosaico, sendo tão somente consequencias do enfraquecimento geral da planta — e no unico caracter interno assignalado pela unanimidade dos que estudaram a questão, isto é, a diminuição em numero e a alteração dos grãos de chlorophylla (2).

Antes de abordar a questão do protozoario propriamente dito, veja-mos o resultado dos meus estudos referentes ás innumerables e profundas alterações anatomicas relatadas pelo dr. Averna Saccá. A questão tinha um interesse capital porque nenhum autor até hoje, dos muitos que têm estudado a questão desde o seculo passado, verificou semelhantes alterações.

Para poder apreciar devidamente a parte que cabia ao Mosaico nas modificações assignaladas, procurei comparar cannas extremamente atacadas com plantas reputadas sãs.

Sollicitei ao dr. José Vizioli, especialista em cultura da canna, alguns pés de canna completamente idemnes de Mosaico. O distincto especialista forneceu-me uma touceira de canna da variedade Kasscer, reputada completamente immune. De facto, nos exemplares que me foram fornecidos não havia vestigios da doença. A gentileza do professor Carlos Mendes devo ter podido estudar a canna Ubá, que o professor Saccá aconselha para a substituição das cannas atacadas de mosaico. Na medida em que se pode affirmar em questões de biologia, as plantas que estudei estavam perfeitamente sãs.

Eis agora o resultado das minhas verificações: começando pelas folhas e bainhas, diz o professor Saccá:

“... os tubos crivosos e as cellulas annexas, mostram o nucleo primeiro hypertrophico, deformado depois irregularmente inciso e, finalmente desfeito” (loc. cit. p. 32)



Fig. 1 — Parte de uma figura de Prantl, mostrando os tubos crivados do caule de *Helianthus*, dilatados na altura do crivo. (in Warming Johansen; Lehrbuch der allgemeinen Botanik).

Semelhantes alterações do nucleo são assignaladas nos outros tecidos da planta no decorrer do trabalho em apreço. Verifiquei a hypertrophia e deformação dos nucleos velhos tanto nas plantas doentes como nas plantas sãs. Nunca observei incisões.

“A's vezes os tubos crivosos mostram sensivel degeneração, que se manifesta com uma hypertrophia do tubo á altura do crivo e com um engrossamento irregular deste”. (p. 38)

De facto pude verificar que na altura do crivo o vaso liberiano tem frequentemente diametro ligeiramente maior do que no resto da sua extensão. Mas esta particularidade tambem se encontra nas plantas sãs e em grande numero de outros vegetaes como mostra a fig. 1 extrahida do tratado classico de Warming e Johansen. Quanto ao crivo encontro-o sempre perfeitamente normal,

sem nenhum engrossamento irregular, tanto na planta doente como na planta sã.

“Este (o flagellado), porém, é frequente nas cellulas estomaticas. O nucleo destas desaparece, os chloroplastes são irregulares ou defeitos”. (p. 38)

“Falta a chlorophylla nas cellulas estomaticas, que são menores do que as normaes e com paredes, mais ou menos contrahidas”. (p. 42)

Estas afirmações do dr. Averna Saccá são difficilmente explicaveis: a estrutura do estomato da canna de assucar, como aliás de todas as Graminaeas, é muito particular. A fig. 2 mostra um desses estomatos sob diversos aspectos. Examinando-se o estomato por cima da epiderme (A, fig. 2), verifica-se que elle é formado de 4 cellulas, as duas cellulas estomaticas propriamente ditas (s), e as duas cellulas annexas (a). As outras figura B, C e D são

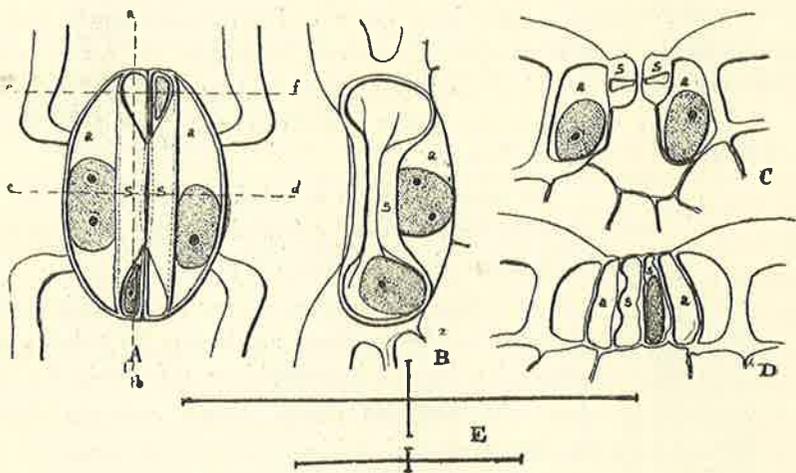


Fig. 2 — Estomato da folha da canna de assucar: A visto de cima da epiderme; B corte longitudinal segundo a b; C corte transversal segundo c d; D corte transversal segundo e f. Em todas as figuras s representa as cellulas estomaticas e as cellulas annexas. Em quasi todas as cellulas vêm-se os nucleos com os nucleolos. Em baixo (E) estão representadas na escala do desenho as dimensões maximas e minimas da largura e do comprimento do pseudoprotzoario. (X 1,500)

cortes do estomato longitudinal e transversaes, e são necessarias para comprehender a estrutura um tanto complicada destes estomatos. Para bem interpretar a forma das cellulas estomaticas é indispensavel fazer cortes longitudinalinaes na folha. Vê se então, como na fig. 2 B, que a cellula estomatica tem duas vesiculas polares com membrana relativamente fina, reunidas por um pequeno canal com periclinas grossas e cuja secção tem frequentemente menos de um micro de diametro. O nucleo, relativamente volumoso,



Fig. 3 — Parte de uma secção transversal de uma folha normal de canna de açúcar. Em torno de cada feixe vê-se primeiramente o endoderma ou bainha, constituído por uma camada de células mais ou menos arredondadas, e por fora o parenchyma chlorophylliano, sempre reduzido a uma única camada de células com membranas delgadas e mais ou menos irregulares. (Cf. Av. Saccá, loc. cit. fig. 8-A p. 41)

occupa quasi todo o interior de uma das vesículas. *Nenhum grão de chlorophylla é visível nas cellulas estomaticas, das plantas sãs* ou das plantas doentes, ao inverso do que se verifica na maioria das outras Phanerogamas. Nestas condições não posso explicar como o professor Saccá pôde ter visto grãos de chlorophylla "irregulares e defeitos". Para esses, alias pouco lugar haveria nas cellulas estomaticas. Quanto ao protozoario, representei na escala da figura com dois traços cruzados as dimensões maximas e minimas do comprimento e da largura de accordo com as indicações do professor Averna Saccá, isto é 2,5—9—27—54. E' facil vêr que para semelhante volume não ha espaço no interior das cellulas estomaticas, a não ser que se trate de uma forma differente do protozoario, com dimensões menores, a que o professor Saccá não se refere, entretanto. Nas cellulas annexas, é verdade, o espaço é maior e nellas caberiam os menores protozoarios, uma vez desaparecido o nucleo que occupa um largo espaço. Mas o dr. Averna Saccá só menciona as cellulas estomaticas e nem sequer cita as cellulas annexas. Quanto á diminuição do tamanho das cellulas estomaticas e á contracção de suas paredes, não me foi dado observar.

Nas areas brancas das folhas... "Os elementos anatomicos mostram todos um diametro menor que o normal" (p. 40)

"Os espaços intercellulares são reduzidos de volume.

O parenchyma chlorophyllado é reduzido a poucas camadas. Os feixes embora mostrem a forma propria, são menos volumosos que os das folhas sãs, e até menos que aquelles observados nas manchas verdes ou amarello esverdeadas da mesma folha." (p. 41)

Estas affirmações do professor Saccá não são exactas. Na folha de canna de assucar não existem "*camadas de parenchyma chlorophyllado*" como succede em outras plantas. Na canna, como na maioria das Gramineas, o parenchyma chlorophyllado constitue um estojo em torno de cada feixe libero-lenhoso, estojo este constituido por *uma unica camada de cellulas*, por fóra do endoderma ou bainha dos feixes o que se observa tanto das cannas doentes como nas sãs. E' o que facilmente se verifica fazendo-se um corte transversal numa folha de canna.

"As secções transversaes mostram o epibrama ora normal, ora mais ou menos desagregado por infiltrações mycelicas. O parenchyma cortical é quasi totalmente destruido ou reduzido a pequenas tiras irregulares, sinuosas que irradiam do endoderma".

"Quando falta a vegetação mycelica, as cellulas do parenchyma cortical conservam a forma propria, mas o conteúdo primeiramente é contrahido, sob a forma de cordões irregulares,

centraes ou parietaes, e, depois desaparece com os ultimos restos do nucleo. E' a principio, mais ou menos deformado, depois irregularmente inciso e, finalmente se dissolve". (p. 48)

O professor Saccá não nos diz o que representa este mycelio em relação ao Mosaico. Tratar-se-hia de algum parasita secundario, cuja produção foi permittida pelo enfraquecimento da planta devido ao Mosaico? Isto, aliás, tem pouca importancia para o presente estudo. O que se nota sobretudo nas afirmações acima transcriptas é que o dr. Averno-Saccá, equivocou-se completamente sobre a natureza das lacunas corticaes da raiz da canna de assucar. O que elle acreditou ser produzido pela acção parasitaria de algum fungo é perfeitamente normal, tão normal, por exemplo, quanto á formação da grande lacuna central dos entrenós dos colmos ócos da maioria das Graminaceas. Estas lacunas corticaes que apparecem sempre, mais tarde ou mais cedo, nas raizes normaes das Graminaceas e de innumeras monocotyledoneas como por exemplo a bananeira e o abacaxi, estão, aliás, muito bem descriptas pello professor Saccá. Ellas se observam tanto nas plantas sãs quanto nas plantas doentes, de modo que, alem de um equivoco, ha uma inexactidão quando elle diz:

"Quando falta a vegetação mycelica as cellulas do parenchyma cortical conservam a forma propria..."

Quanto ás alterações cellulares que descreve em seguida, são as que todos os tratados classicos dão para qualquer cellula vegetal, a medida que envelhece.

Emfim ha duas figuras do trabalho interpretadas de um modo que recebe explicação no texto. A primeira fig. 8-A pagina 41 tem a seguinte legenda:

"Fig. 8-A -- *Mosaico da canna de assucar*. Corte transversal feito sobre uma macula inteiramente branca, transparente, mostrando a degeneração e a fusão dos feixes fibrovasculares (a). Não sendo a secção colorido não se vê o prozootario. (original)"

Diminuindo os elementos cellulares, os espaços intercellulares e os feixes, deve diminuir forçosamente, e em grandes proporções, a espessura do limbo. Apesar das afirmações do professor Saccá, não observei alterações sensiveis neste sentido.

"As cellulas epidermicas conservam a forma propria, mas a cuticula é menos desenvolvida que nas partes verdes, amarello-esverdeadas ou amarellas." (p. 42)

Constato, de facto, a não alteração das cellulas epidermicas; quanto á cuticula, é facil vêr-se como auxilio de reagentes apropriados (Sudan III, Alkanna, etc.) que varia muito numa folha sã, desde um micro, nas cellulas

epidermicas communs, até dois micros ou mais por cima das cellulas aquiferas ou das cellulas estomaticas. Variações menores devem existir em diferentes pontos, mas são difficilmente apreciadas devido ás refrações que se effectuam nestas membranas muito refringentes, refrações estas que impedem completamente, com os grandes augmentos necessarios para estas observações, apreciar devidamente o limite, aliás muito indeciso, entre a cuticula e a cellulose propriamente dita. Nestas condições, para se poder constatar differenças devidas ao Mosaico, na cuticula, seria preciso que estas differenças fossem superiores ao que se verifica normalmente em diferentes pontos de uma mesma folha sã.

“De facto, a parede das cellulas da bainha dos feixes e do parenchyma chlorophyllado, surprehendida durante o periodo de differenciação, não attinge, nestas manchas, o estado definitivo. Tratado com o iodo, toma coloração que não é propria da cellulose mas do amiloide; portanto ella conserva a estructura primaria.” (p. 40)

Debalde tentei realizar a reacção indicada. Com a tintura de iodo ou com o lugol, as bainhas e o parenchyma chlorophylliano permanecem perfeitamente incolores.

Vejamos agora as alterações observadas no colmo:

“A's vezes, entre os feixes compostos, observa-se uma formação de lenho secundario ou a suberificação das paredes dos raios medulares, mas, a despeito dessa transformação, não escapam á acção do protozoario.” (p. 44)

Como formações secundarias só foram até hoje observadas, nas Monocotyledoneas, em numero muito restricto de plantas, a Dracaena, por exemplo, mas nunca em Graminaceas, a formação, embora pathologica, de lenho secundario na canna de assucar constitue um facto excepcional. O mesmo se dá com relação á suberificação de tecidos internos que até hoje só foi verificada no endoderma de certas plantas, e em alguns tecidos secretores. Devo dizer que, infelizmente, é-me impossivel confirmar estas asserções. Em cannas fortemente atacadas observei estructura anatomica perfeitamente igual á estructura anatomica de cannas sãs. Quanto á suberificação, observei no seu lugar “lignificação”, o que é bem differente. E isto tanto nos tecidos sãos como nos tecidos doentes.

“As priminas crivosas ora são, accentuadamente desenvolvidas formando varias camadas juxtapostas, ora são reduzidas a uma camada irregular. Esta alteração é, porém, frequente mais nos feixes secundarios do que nos primarios”. (p. 45)

Conforme já disse em nota, não posso interpretar a significação da

expressão "primina crivosa" e não vi feixes secundarios no colmo de cannas atacadas de mosaico. Devo notar, entretanto, que existe normalmente, uma grande differença entre a estrutura de um feixe na parte inferior do seu percurso, na periphèria do colmo, e a estrutura do mesmo na parte superior, isto é, no centro do colmo. Isto talvez explique as divergencias observadas pelo professor Saccà.

"Alguns feixes mostram o vaso lymphatico e poucas fibras, mas, por necrose, faltam os outros elementos do lenho e aquelles do floema". (p. 46).

Deixando de lado a questão do vaso lymphatico cujo significado desconheço, devo dizer que não observei estas alterações assim como outras assinaladas e cuja transcripção dispense para não tornar muito longo este estudo. A necrose dos feixes do colmo não é, ao meu vêr, característica do mosaico e sim da "gommose", outra doença da canna. Ella está muito bem descripta no tratado classico de Delacroix e de facto origina-se no phloemo. Não a tenho observado em innumerous pés de canna atacada de Mosaico. Tenho observado, porém, necrose das manchas das folhas. Em todos os casos, esta necrose *nunca alcança os elementos dos feixes e sim o parenchyma folhar*.

Para terminar este estudo das modificações anatomicas veremos agora as raizes:

"As alterações do systema radicular são graves". (p. 47)

"Este estado pathologico da raiz é, frequentemente agravado pela presença de um mycelio que se desenvolve, intensamente, no epiblema e no parenchyma cortical".

A micro-photographia não é boa, mas assim mesmo pode-se ver que os feixes não parecem ter degeneração alguma. Quanto á "fusão" dos feixes, trata-se de uma anastomose perfeitamente normal em todas as folhas de Graminaceas, embora não muito frequente na folha de canna de assucar. Semelhantes anastomoses são visiveis até a olho nú na "palha" do milho.

A legenda da seguinte fig. p. 73 diz:

Fig. 21 — *Mosaico da canna de assucar*. Corte transversal na base da bainha da folha mais nova do apice da canna, mostrando todos os elementos anatomicos cheios de protozoarios, e os feixes sensivelmente alterados em sua estrutura. (Original).

Em uma canna que examinei, medi successivamente as diferentes folhas e suas bainhas, de fora para dentro, a começar de uma folha muito nova que media 36 centimetros. Eis em millimetros, os comprimentos das folhas (à esquerda) e de suas respectivas bainhas (à direita).

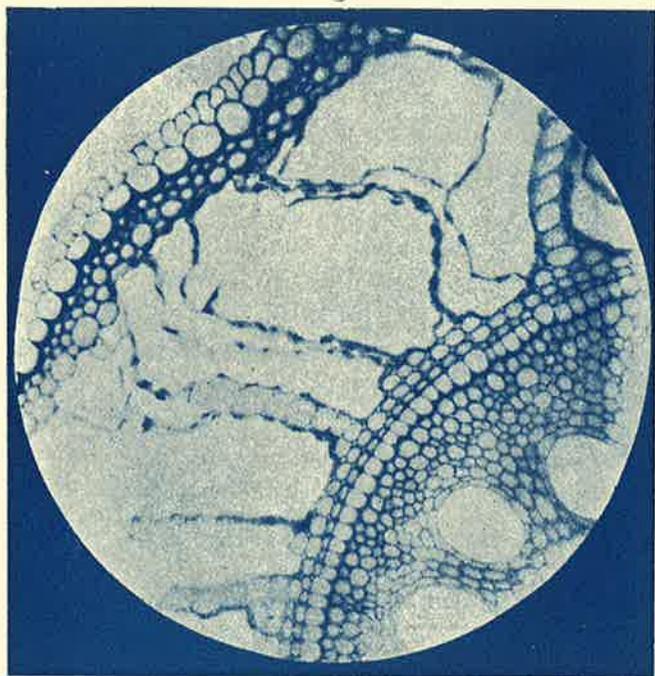


Fig. 4 — Parte de uma secção transversal de raiz normal de canna de assucar mostrando a periphéria da raiz com as grandes lacunas corticais (Cf. Av. Saccá, loc. cit, fig. 13, p. 67).

360	25
315	20
185	15
30	5
5	
2	
0,8	
0,3	
0,1	

A penultima folha mencionada mostrava uma extremidade pontuda como as folhas mais crescidas. A ultima era um massiço cellular com extremidade arredonda, o que, botanicamente, tem o nome de "primordio". Este primordio é feito de centenas de cellulas. Por dentro encontram-se ainda alguns primordios com numero menor de cellulas. Finalmente pode-se dizer que a folha mais nova é reduzida a uma cellula unica. Fiquei assim muito embaraçado para saber o que o professor Saccà entende por "folha mais nova do apice da canna". A folha que media 30 millimetros tinha uma bainha de 5 millimetros. Na folha de 5 millimetros já não era mais possivel distinguir-se a bainha do limbo. O dr. Aversa-Saccà, entretanto, falla de um corte "na base da bainha da folha mais nova". Se o corte foi praticado na base de uma dessas folhas muito novas, talvez seja possivel explicar as "sensíveis alterações" da estructura dos feixes. Nesta região os feixes se incurvam para entrar na bainha e logo em seguida (porque a bainha é pequenissima) no caule. Um corte nesse ponto secciona obliquamente os feixes que parecem esmagados na preparação. De qualquer modo nunca observei alterações dos feixes, e, convem dizer, alterações, mesmo insignificantes, em semelhantes tecidos novos, transformar-se-hiam em verdadeiras deformações na bainha completamente crescida.

Feita esta relação do que observei a respeito das alterações anatomicas dos tecidos da canna, resta-me analysar o que se refere especialmente ao protozoario.

O mesmo reparo que fiz relativamente ás modificações anatomicas cabe perfeitamente aqui. Innumeros pesquisadores estudaram o Mosaico da canna de assucar desde o fim do seculo passado. Muitos, evidentemente, empregaram nas suas preparações a technica preconizada pelo professor Saccà e que consiste numa fixação com os reagentes commumente usados para este mister, e coloração com corantes quasi todos elles de uso corrente em technica de histologia e cytologia vegetal. Nenhum delles, entretanto, observou este microorganismo de dimensões relativamente grandes, e que, segun-

do o seu descobridor, existe em quasi todos os tecidos da planta atacada e isto em grande abundancia, podendo ser visto tanto em cortes transversaes como em cortes longitudinaes. O professor Saccá não se preoccupou em nos fornecer uma explicação plausivel para um caso tão extraordinario. Ray Nelson, que pensou igualmente ter descoberto um protozoario em plantas atacadas de Mosaico (4), teve o cuidado de salientar que o microorganismo, que dizia ter encontrado, não tinha sido visto pelos pesquisadores anteriores porque só podia ser observado em secções longitudinaes, só existia no tecido liberiano, e só se revelava com a technica propria á protistologia, technica esta não empregada em histologia vegetal. Não foi, entretanto, difficil a muitos scientistas provar que Nelson se tinha inteiramente equivocado.

Eis agora como o professor Saccá descreve o "protozoario":

"Na cavidade cellular... vê-se um ou diversos flagellados (4-6), em geral fusiformes rectos ou um tanto curvados, tendo 2 flagellos, um em cada polo opposto". (p. 33)

"Nas preparações tratadas com Giemsa, o cytoplasma ora toma uma coloração azul uniforme, ora roseo-violeta, ao passo que, nas outras, coloridas com solução aquosa de Vesuvina, mostra uma estrutura esponjosa tendo áreas sem cor, misturadas com áreas coloridas. No cytoplasma sobresaem duas massas chromaticas, uma posterior que representa o centrosoma, outra anterior que representa o nucleo.

A posição do blepharoplasto, porém, não é constante, porque, em alguns casos, é mais, em outros menos avizinhado ao nucleo e, ás vezes, nucleo e blepharoplasto são quasi situados no mesmo plano transversal". (p. 259)

"Nucleo e centrosoma são arredondados, perfeitamente visíveis. Colorem-se intensamente, com os colorantes e mostram estrutura granulosa" (p. 34)

Esta descrição do flagellado merece as mesmas criticas que foram levantadas contra o flagellado de Ray Nelson, criticas estas que relatei resumidamente no artigo já citado. Vê-se facilmente pelos desenhos do professor Saccá, que as duas extremidades dos corpos fusiformes representados nenhuma relação têm com flagellos. O blepharoplasto, que nada distingue dos nucleos não está em relação com os dois flagellos como nos verdadeiros flagellados, e esses mais parecem ser constituídos pelo afinamento das extremidades do corpo do organismo. Semelhantes afinamentos existem em verdadeiros flagellados sem que por isso sejam considerados flagellos. Não fosse isto, e o genero *Leptomonas* representado na figura 6 seria um bi-flagellado; todo mundo sabe, entretanto, que este genero só possui um flagello.

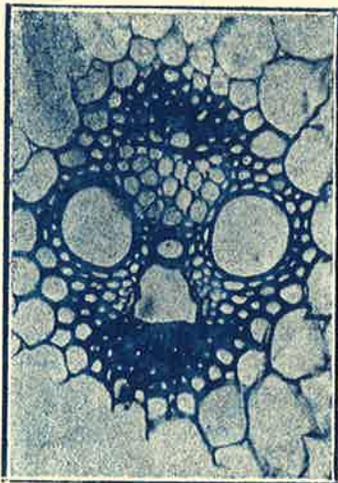


Fig. 5 — Secções praticadas em feixes libero-lenhosos normaes de caule de canna de assucar. A esquerda a secção perfeitamente transversal, mostrando o feixe com o seu aspecto habitual. A direita o corte ligeiramente obliquo, dando á preparação o aspecto de um feixe alterado, (Cf. Av. Saccá loc. cit. fig. 21 p. 73).

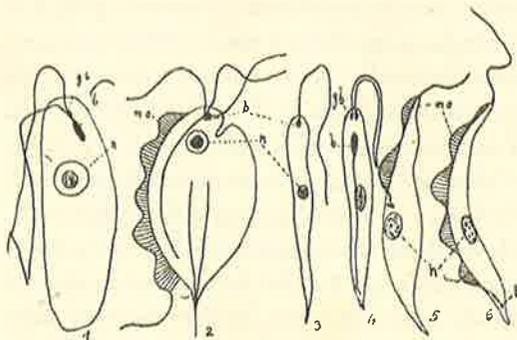


Fig. 6 -- Alguns Flagellados verdadeiros : da esquerda para a direita : Bodo, Trichomonas, Leptomonas, Herpetomonas, Crithidia, Trypanosoma. n nucleo, b blepharoplasto, m. o. membrana ondulante, g. b. grão basal (In E. Brampt-Précis de Parasitologie).

que determina uma dupla coloração, são corantes básicos, próprios dos núcleos e em nenhum ponto do trabalho que estou analysando está mencionada uma diferença de coloração entre núcleo e blepharoplasto do flagellado e o seu protoplasma. Com o Giemsa por exemplo deveriam os dois primeiros ter coloração vermelha e o protoplasma coloração azul.

"Esta é a forma negativa do parasita. Falta a bainha ondulatoria e, portanto, não pode ser incluso em nenhum dos generos conhecidos" (p. 34)

Como se vê, o professor Saccá considera a bainha ondulatoria como existente em todos os generos de flagellados. Consultando o tratado classico de Zoologia de Edmond Perrier, verifiquei que nos sessenta e tantos generos citados quatro somente apresentam bainha ondulatoria: *Undulina*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* e *Hexamitus*. Generos conhecidissimos como *Leptomonas*, *Bodo* e muitos outros não têm membrana ondulatoria. (cf. fig. 6)

Tive-se o professor Saccá tido a feliz lembrança de consultar ou de mandar simplesmente as suas preparações a algum especialista em protistologia e provavelmente eu não estaria agora commentando o seu trabalho. Por minha parte, lembrei-me que na epoca em que os trabalhos de Ray Nelson ainda estavam agitando a opinião dos phytopathologistas, o eminente parasitologista de Manguinhos, dr. Gomes de Faria, tinha estado no Serviço de Phytopathologia do Instituto Biologico de Defesa Agricola, onde sou assistente, solicitando-me lhe mostrasse as cannas atacadas de Mosaico que tinhamos nos canteiros do Instituto. O conhecido cientista destacou fragmentos das cannas atacadas, collocando-os em diversos fixadores para o estudo ulterior dos tecidos, com o fim de verificar se nelles havia igualmente pro-

Como bem mostra a fig. 6 todos os flagellados possuem um núcleo maior do que o blepharoplasto. No pseudoprotzoario nada distingue o blepharoplasto do núcleo e não sei mesmo como o seu autor pode differencial-os um do outro e fallar de extremidade posterior e anterior.

Os corantes empregados pelo professor Saccá, com excepção do Giemsa

básicos, próprios dos núcleos e em nenhum ponto do trabalho que estou analysando está mencionada uma diferença de coloração entre núcleo e blepharoplasto do flagellado e o seu protoplasma. Com o Giemsa por exemplo deveriam os dois primeiros ter coloração vermelha e o protoplasma coloração azul.

"Esta é a forma negativa do parasita. Falta a bainha ondulatoria e, portanto, não pode ser incluso em nenhum dos generos conhecidos" (p. 34)

Como se vê, o professor Saccá considera a bainha ondulatoria como existente em todos os generos de flagellados. Consultando o tratado classico de Zoologia de Edmond Perrier, verifiquei que nos sessenta e tantos generos citados quatro somente apresentam bainha ondulatoria: *Undulina*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* e *Hexamitus*. Generos conhecidissimos como *Leptomonas*, *Bodo* e muitos outros não têm membrana ondulatoria. (cf. fig. 6)

Tive-se o professor Saccá tido a feliz lembrança de consultar ou de mandar simplesmente as suas preparações a algum especialista em protistologia e provavelmente eu não estaria agora commentando o seu trabalho. Por minha parte, lembrei-me que na epoca em que os trabalhos de Ray Nelson ainda estavam agitando a opinião dos phytopathologistas, o eminente parasitologista de Manguinhos, dr. Gomes de Faria, tinha estado no Serviço de Phytopathologia do Instituto Biologico de Defesa Agricola, onde sou assistente, solicitando-me lhe mostrasse as cannas atacadas de Mosaico que tinhamos nos canteiros do Instituto. O conhecido cientista destacou fragmentos das cannas atacadas, collocando-os em diversos fixadores para o estudo ulterior dos tecidos, com o fim de verificar se nelles havia igualmente pro-

tozoarios, como Nelson assignalara para outras plantas. Não tendo o dr. Gomes de Faria publicado os resultados a que tenha chegado, lembrei-me, quando iniciei os estudos que estou relatando, de consultal-o sobre se tinha effectivamente encontrado algum protozoario. Com a *resposta negativa*, recebi, por intermedio do conhecido entomologo de Manguinhos, dr. Costa Lima, as bellas preparações do dr. Gomes de Faria, coradas por diferentes processos, onde de facto pude verificar a completa ausencia de protozoarios.

Repetindo os estudos do professor Saccá, encontrei com muita facilidade nos tecidos completamente desenvolvidos das folhas, caules, raizes e principalmente bainhas os corpos descriptos pelo dr. Avena Saccá como sen doprotozoarios. Estes corpos foram igualmente encontrados em tecidos de plantas sãs e de plantas atacadas de Mosaico, sendo talvez um pouco mais frequentes nas ultimas. A figura 7 representa alguns dos mais caracteristicos que observei em cannas Kassoer e Ubá, perfeitamente sãs. E' interessante

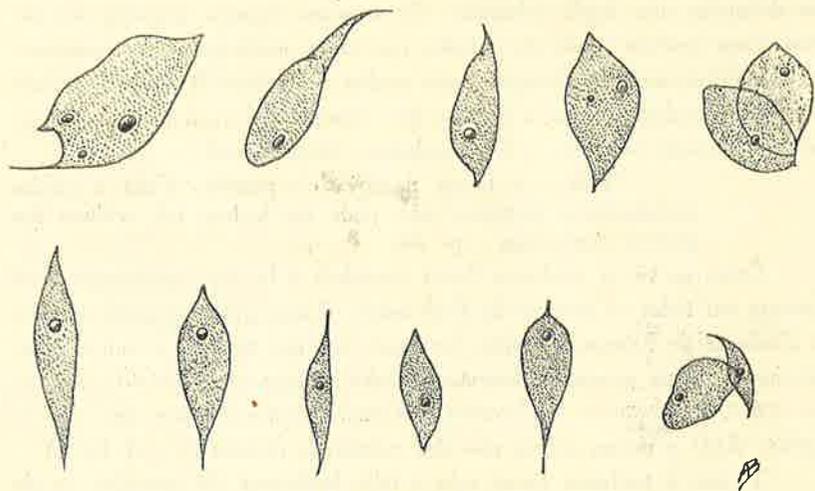


Fig. 7 — Alguns nucleos fusiformes encontrados no parenchyma da bainha de cannas de assucar sãs. Em cima canna Kassoer, em baixo canna Ubá. Notar á esquerda, em cima, um nucleo aparentemente em começo de divisão. A direita vêm-se nucleos superpostos apparentando formas de divisão. Em torno dos nucleolos distingue-se uma zona hyalina. (Cf. Av. Saccá loc. Cit. fig. 7 e 8, p. 37 e 39).

comparar este desenho com os desenhos do trabalho do professor Saccá.

Não tive dificuldade de identificar estes corpos com nucleos fusiformes velhos no interior de cellulas completamente cheias de succo cellular, e onde o protoplasma parece ter completamente desaparecido. De facto estes corpos coram-se com corantes basicos como o verde de methyl e a vesuvina. Existem muitas cellulas sem nucleo visivel, mas outras ha em que se encon-

tram dois ou tres nucleos, sendo bastante raro este ultimo caso. Nunca logrei ver 4 a 6 corpos como assignala o dr. Saccá, para o seu protozario. Estes nucleos velhos são quasi sempre fusiformes ou ellipticos. A estrutura é finamente granulosa e os corantes fixam-se com pouca intensidade devido, evidentemente, á predominancia do succo nuclear sobre a chromatina. Pelas dimensões destes nucleos e a fraca coloração pelos reagentes, é licito concluir que, pelo envelhecimento, os mesmos absorvem grande quantidade d'agua, dilatando-se e tornando-se irregulares, ás vezes fusiformes. No interior vêm-se um ou dois nucleolos que o professor Saccá considerou centrosoma e nucleo. Assim se explica como estes dois elementos de dimensões muito differentes nos flagellados têm mesma dimensão no pseudo-protozoario. A zona hyalina que envolve os nucleolos é, aliás, visivel nos desenhos do professor Saccá.

A presença de nucleos fusiformes velhos nos tecidos vegetaes é um facto bem conhecido dos botanicos. No meu primeiro trabalho reproduzi varias figuras dos mesmos, tiradas do trabalho de Mikio Kasai. A figura 8 representa alguns outros encontrados em alguns trabalhos de Botanica. O pro-

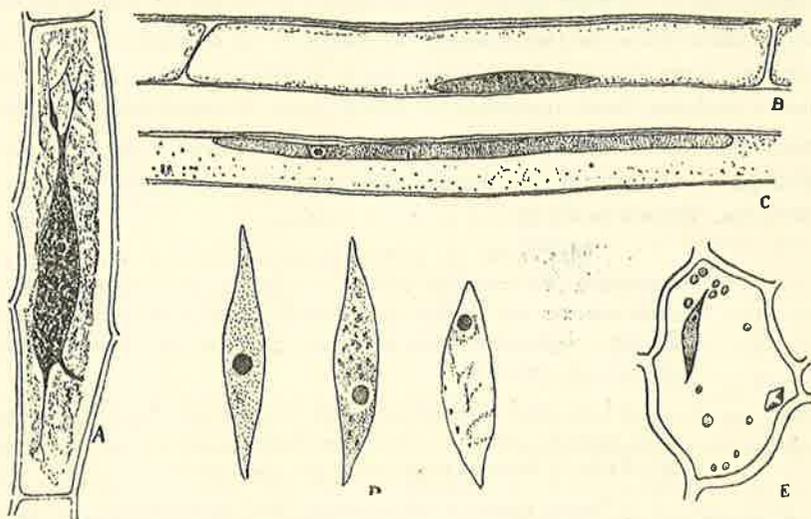


Fig. 8 — Nucleos fusiformes nos vegetaes. A Cellula epidermica de *Hyacinthus* (fig. de Mielie in Warming Johansen, loc. cit.) B Cellula epidermica de *Galanthus nivalis* (in Chodat, Principes de Botanique) C Cellula do feixe de *Galanthus nivalis* (id.) D Nucleos das glandulas digestivas de *Drosera rotundifolia* em estado de desnutrição. (id.) E Cellula epidermica de *Polypodium irroleoides* (Schneider-Zimmermann, Botanische Mikrotechnik) (Cf. fig. 9 e Aversa Saccá loc. cit. fig. 7 e 8).

fessor Saccá equivooca-se completamente quando ensa que nucleos fusiformes só se encontram no liber:

“Estes protozoarios não podem, tambem, ser confundidos com os nucleos fusiformes reunidos á camada peripherica do cytoplasma por meio de filamentos protoplasmicos, tendo o aspecto de flagellos que, ás vezes, mostram os tubos crivosos e as cellulas annexas... porque os mesmos micro-organismos se encontram, tambem, nos mais differentes elementos anatomicos da planta e faltam absolutamente em alguns”. (p. 36)

E' exactamente isso que acontece tambem com os nucleos fusiformes.

Mas o professor Saccá refere-se egualmente ao nucleo que, segundo relata, apparece inciso e finalmente desfeito sob a acção do protozoario. Existe realmente uma differença notavel entre estes nucleos? Uma figura do trabalho do professor Avena Saccá permite levantar serias duvidas a este respeito. Nesta fig. 6-A, pagina 260, vêem-se as transformações successivas do nucleo. Quem não lê a legenda pode facilmente concluir que o nucleo, a principio redondo I fig. 6-A, vae se tornando progressivamente alongado II e III até ficar completamente fusiforme e curvo IV. Pela legenda, entretanto, vê-se que o nucleo, depois de se ter tornado quasi fusiforme em III, voltou, não se sabe porque, á forma redonda em IV. O que logicamente parece ser a ultima phase da transformação do nucleo, é na realidade o protozoario. Esta figura é ainda muito interessante a considerar porque nella se vê que o professor Saccá representa da mesma forma o cytoplasma do protozoario e o conteudo do nucleo da canna, o nucleolo deste e nucleo e blepharoplasto do primeiro. No desenho, nenhuma differença existe, a não ser na forma, entre o protozoario e o nucleo visinho.

“Mas, além da forma descripta, notam-se com relativa frequencia, na cavidade dos tubos crivosos das respectivas bainhas annexas, na bainha dos feixes, e até nos elementos do Xylemo, individuos ovato-ellipticos, providos de dois flagellos differentes, curtos.

Um sulco longitudinal, que começa do flagello anterior e se estende, mais ou menos rapidamente, até o flagello opposito, divide a massa cytoplasmica em duas partes.

Nestes casos, é relativamente facil surprehender, na massa cytoplasmica em via de divisão, dois nucleos e dois centrosomas provenientes da divisão do nucleo e do centrosoma primitivo. Nestes casos, as cellulas atacadas mostram dois ou varios (4-6) protozoarios reunidos em grupos irregulares, ou irregularmente estratificados.

Quem não acompanha a multiplicação do protozoario, observando a profunda modificação morphologica que elle offe-

rece durante a divisão, pensa na presença de varias formas autonomas.

As partes provenientes da divisão, crescendo, tornam-se fusiformes". (p. 34).

O professor Saccá não nos explica como elle pôde observar esta maior ou menor rapidez de divisão e acompanhar a multiplicação de um protozoario fixado, e sem nunca ter realizado culturas do mesmo. Nos casos que encontrei verifiquei que dois nucleos superpostos podiam dar a illusão de se estarem dividindo. (cf. fig. 8) Na figura 8 vê-se igualmente um nucleos que encontrei em canna Kassoer que aparentemente está começando uma divisão segundo o processo descripto pelo professor Saccá. Em nenhum caso, porém, foi-me possivel ter a certeza de que havia realmente divisão. Mas não duvido que haja esta divisão dos nucleos velhos dos tecidos da canna de assucar porque semelhante phenomeno é perfeitamente conhecido. Nos tecidos velhos de algumas plantas, a trapoeiraba, por exemplo, os nucleos não se dividem por caryocinese e sim por amitose ou divisão directa. Neste caso o estrangulamento do nucleos não se faz regularmente em torno da parte mediana do nucleos e sim em determinada face do mesmo, accentuando-se em seguida até separar o nucleos em duas novas partes. E' o que representa a figura 9 extrahida do manual de technica de botanica microscopica de Strasburger.

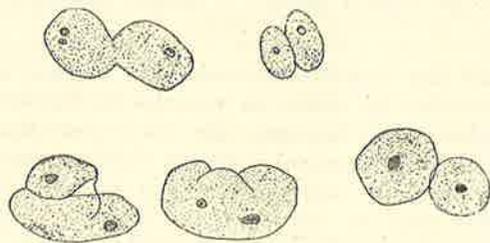


Fig. 9 — Divisão directa dos nucleos dos entrenós velhos de trapoeiraba (*Tradescantia virginica*) (in E. Strasburger, Das botanische Praktikum).

nucleos são perfeitamente redondos os ellipticos. E' a forma habitual dos nucleos activos que todo o mundo conhece. O protozoario do dr. Avena Saccá tambem tem esta forma nas mesmas localidades:

"Aqui (no apice do caule) o protozoario mostra-se sobre a fórma de corpusculos arredondados ou ellipsoidaes, com parede visivel e sem cilios". (p. 43)

O professor Saccá nos promette demonstrar que estes corpusculos arredondados são kystos do protozoario:

...como demonstrarei, o protozoario encontra-se enkystado nos tecidos de rolete..." (p. 40)

Infelizmente, elle não cumpriu a promessa, pois que adeante, diz:

"Estes corpusculos devem ser considerados como fórma kystica do protozoario". (p. 43)

Por mais convincente que seja este "devem", não pode absolutamente substituir a demonstração prometida. O dr. Avena Saccà, porém, embora sem fornecer a demonstração, acertou; ha realmente relação entre estes corpos e os outros, ambos são exclusivamente nucleos proprios da canna de assucar. Tivesse tido o professor Saccà a curiosidade de procural-os tambem em plantas sãs e elle certamente não teria proseguido no seu extenso trabalho.

Terminarei aqui a analyse do trabalho que tinha por objecto controlar. Acredito ter demonstrado que o professor Saccà equivocou-se quando pensou ter encontrado um protozoario nos tecidos da canna de assucar atacada de Mosaico. A descoberta do professor Saccà só podia *a priori*, trazer scepticismo no espirito dos que têm uma noção exacta da pathologia vegetal. Estes, com effeito, difficilmente podem admittir que um organismo de muitos micros de largura e comprimento possa se espalhar no seio de tecidos vegetaes com a facilidade com que os flagellados se dispersam em tecidos animaes. E' que existe entre a pathologia vegetal e a pathologia animal uma profunda differença. Eis o que disse a respeito o grande phytopathologista francez Delacroix:

"La présence dans la membrane végétale de cellulose et d'autres matières ternaires lui donne un caractère de rigidité, d'imperméabilité relative, chez la plante, elle établit pour chaque cellule, vis à vis de ses congénères un état d'indépendance et d'individualité propre, au sujet duquel il n'y a guère de comparaison à établir avec les animaux et qui *imprime aux maladies une allure particulière*". (5) (O grypho é meu)

Estas palavras do scientista francez são notavelmente demonstradas nas doenças bacterianas das plantas. Quem estudou estas ultimas ou simplesmente teve occasião de examinar as bellissimas gravuras que illustram os livros do grande phytobacteriologista americano Erwin Smith, bem sabe como nos vegetaes as doenças de origem bacteriana differem do que se observa com as mesmas nos organismos animaes. Ao passo que nestes a disseminação no seio de determinado tecido é relativamente rapida e total, nas plantas as bacterias só se podem espalhar pelos vasos conductores (doenças vasculares) ou pela destruição das membranas cellulosicas (podridões humidas). As Bacteriaceas, entretanto, são de dimensões muito inferiores ás dimensões do

pseudoprotozorio da canna. Como então explicar que semelhantes organismos pudessem se espalhar em toda a planta e em tal abundancia sem deixar o menor vestigio da destruição das membranas cellulasicas e consequente deformação do corpo da planta.

Os unicos protozoarios cuja existencia em vegetaes está perfeitamente comprovada se localizam unicamente nos vasos laticiferos, tubos continuos, sem septos, que se estendem em todos os membros de determinadas plantas. Estes organismos estão completamente impossibilitados de passar dos laticiferos para os tecidos vizinhos devido às membranas cellulasicas.

Outro ponto do trabalho do dr. Saccá que não pode deixar de levantar scepticismo é a presença de kystos de um protozoario em tecidos em estado de multiplicação cellular intensa como seja o apice vegetativo do colmo da canna. E' geralmente em tecidos mortos ou fezes de animais contaminados que estes corpos são encontrados, como os kystos de *Leptomonas davidi* nas fezes de *Stenocephalus*. E' praticamente uma lei de biologia geral que as formas de resistencias se differenciam em meios desprovidos de actividade vital. Se em determinado momento um certo numero de protozoarios viessem enkistar-se nos meristemas, no fim de poucas horas centenas de novas cellulas recém formadas deveriam estar sem protozoario, de modo que para que todas tivessem protozoarios enkistados, necessario seria um affluxo constante de novos microorganismos em estado activo, que se tornassem kistos nas novas cellulas formadas. Como tambem admitir com o professor Saccá, que semelhantes corpos volumosos em cellulas novas, ficam sem effeito na actividade do apice vegetativo na formação dos novos tecidos?

Mas estas considerações, comquanto muito serias, não seriam sufficientes para mostrar o equivoco do professor Saccá. Quiz retomar uma por uma as suas affirmações e submetel-as a uma verificação rigorosa. O resultado do meu estudo está aqui exposto. Espero que elle contribuirá para evitar que muitos cientistas, cuja actividade deve ser orientada em trabalhos uteis para o nosso paiz, desviem a sua attenção em pesquisas estereis, baseadas sobre uma descoberta inexacta.

Piracicaba, Outubro de 1927.

(1) Agesilau Bitancourt. — "Os protozoarios e o Mosaico" — in *Revista de Agricultura*. Vol. 1. n. 4, 1927.

(2) Rosario Aversa Saccá. — "Sobre a presença de um protozoario nos tecidos da canna de assucar atacada pelo "Mosaico". Secretaria da Agricultura do E. de S. Paulo 1927. — S. Paulo.

(3) Deixei igualmente de controlar as affirmações cujo sentido não pude interpretar perfeitamente. O professor Saccá emprega uma nomenclatura botanica toda especial e certamente pouco usada, ou então geralmente empregada em Botanica com sentido completamente diverso. Procurei em vão em grande numero de tratados de Botanica a significação de vocabulos como: vasos lymphaticos, priminas crivosas, epiblema, rachis (quando applicado á bainha foliar), etc.

(4) Cf. Agesilau Bitancourt loc. cit.

(5) Delacroix. *Maladies des plantes cultivées*, Vol. I p. 10