

**Estudos em Híbridos F₁ Artificiais de Orquídeas
(Orchidaceae) com Vistas à Esterilidade.**

MARIA NEYSA SILVA STORT

Licenciada em História Natural - Instrutora da Cadeira
de Biologia da F. F. C. L. de Rio Claro

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiróz" de Piracicaba, para obtenção
do título de Doutor.

PIRACICABA - SÃO PAULO
BRASIL

Trabalho executado nos laboratórios da Cadeira de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro e nos laboratórios do Departamento de Genética da Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Sociedade Brasileira de Genética.

1970

A meus pais

A meu esposo

A meus irmãos:

Nilze

Maria José

Benê e Celi.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, cientista
enérito, a quem devo minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Antonio Buschinelli, a quem, re-
conhecimento, devo o estímulo necessário à
realização desse trabalho.

Agradecimentos

Não poderíamos deixar de manifestar nossos agradecimentos a todos aqueles que nos auxiliaram na realização desse trabalho em especial às seguintes pessoas e instituições:

Ao Prof. Dr. Almiro Blumenschein, Diretor do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela excelente orientação dada ao trabalho, pelas críticas e constantes sugestões e, inclusive, pelas facilidades criadas permitindo-nos o uso dos laboratórios, da biblioteca e de exemplares de orquídeas pertencentes ao referido Departamento.

Ao Prof. Dr. F.G. Brieger pela orientação inicial, o estímulo dado e pelas facilidades concedidas quando dirigia o atual Departamento de Genética.

Ao Prof. Dr. Antonio Buschinelli, pelo incentivo e auxílio constantemente dados; pela paciência e dedicação sempre demonstrados durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. J.T.A. Gurgel pelas críticas construtivas, pelas sugestões e pela dedicada atenção que deu à leitura do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Warwick E. Kerr pelo interesse demonstrado pela realização desse trabalho e pelas sugestões dadas.

Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani pela colaboração dada na versão do resumo para o inglês.

Ao Prof. Dr. Paulo Sawaya, Diretor da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro que nos forneceu condições para a realização desse trabalho.

À Dra. Carminda da Cruz Landin pela colaboração e incentivo, muitas vezes, dados.

Aos meus colegas, Dr. Amilton Ferreira e Dr. Darwin Beig pelas sugestões emitidas.

Ao Dr. Paulo Scedero Martins, pelas importantes informações que nos forneceu, notadamente, sobre a distribuição geográfica das orquídeas.

Ao Dr. Paulo Milton B. Landin que colocou à nossa disposição sua máquina de calcular emprestando-nos com isso valiosa colaboração.

À Cadeira de Estatística, na pessoa do Prof. José Furtado Pisani, por nos permitir também o uso de suas máquinas de cálculo.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, notadamente, à srta. Lorena Villa Nova da Conceição, pela colaboração constantemente dada e pelos serviços de datilografia. Ao Sr. João Miguel Valencise pelos serviços de datilografia ; ao Sr. Ary Vanzelli pelo auxílio prestado na execução de tabelas, desenho e ilustração de fotografias.

Aos funcionários do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, em especial aos Srs. Alaor de Cliveira pela incansável colaboração dada durante a realização deste trabalho; ao Sr. José Bróglie pela dedicação na confecção das fotografias e ao Sr. Lelo Sbrissa pelos auxílios técnicos de laboratório.

À Administração da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro que nos forneceu condições necessárias à realização desta tese. Aos funcionários da referida Faculdade que, de uma maneira ou de outra, também colaboraram conosco.

Aos Srs. Caetano Pezzotti e Luiz Bicudo pelos serviços de datilografia.

Ao meu esposo sem cuja compreensão a realização dessa tese seria impossível.

A meus pais pelo carinho e incentivo constantemente dados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Sociedade Brasileira de Genética pelos auxílios financeiros dados.

INDICE

	Página
1- Introdução	9
2- Revisão Bibliográfica	11
2.1- A taxonomia das orquídeas	12
2.2- O conceito de espécie	13
2.3- Mecanismos de isolamento em orquídeas	14
3- Material	21
4- Métodos	23
4.1- Determinação da esterilidade das plantas híbri - das F_1	23
4.1.1- Porcentagem de esterilidade das sementes F_2 ..	24
4.1.2- Germinação das sementes	24
4.2- Determinação da fertilidade do pólen das plantas híbridas F_1	26
4.2.1- Microsporogênese	26
4.2.2- Germinação do pólen	26
4.2.3- Reconhecimento dos tubos polínicos	28
4.2.4- Porcentagem de polinizações que levaram à for- mação de cápsulas	28
4.3- Macrosporogênese, fertilização e formação do en- brião	28
5- Resultados obtidos	29
5.1- Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si e dos retracruzamentos	29
5.1.1- Híbrido 442	30
5.1.2- Híbrido 7	40
5.1.3- Híbrido 508	44
5.1.4- Híbrido 516	47
5.1.5- Híbrido 567	53

5.1.6- Híbrido 404	55
5.1.7- Híbrido 31	57
5.1.8- Híbrido 435	59
5.1.9- Híbrido 370	60
5.1.10- Híbrido 1525	62
5.1.11- Híbrido 339	67
5.1.12- Híbrido 337	69
5.1.13- Híbrido 336	72
5.1.14- Híbrido 338	77
5.1.15- Híbrido 610	79
5.1.16- Híbrido 501	84
5.1.17- Híbrido 456	86
5.1.18- Híbrido 436	89
5.1.19- Híbrido 487	92
5.1.20- Híbrido 340	94
5.1.21- Híbrido 369	97
5.1.22- Híbrido 497	99
5.1.23- Híbrido 368	103
5.1.24- Híbrido 365	105
5.2- Microsporogênese	109
5.3- Germinação das sementes	122
5.4- Cruzamentos intra-específicos	125
6- Discussão	125
6.1- "Fertilidade" das sementes F_2	127
6.2- Comparação da "esterilidade" de sementes F_2 e se- mentes resultantes de cruzamentos intra-específi- cos	130
6.3- Isolamento nas orquídeas	131
6.4- Variabilidade da fertilidade	132
6.5- Retrocruzamentos	132
6.6- Esterilidade dos micrósporos	134

6.7- Esterilidade dos macrósporos	140
6.8- Esterilidade na formação do zigoto	141
6.9- Esterilidade na formação do embrião	142
6.10- Germinação das sementes	143
7- Resumo e conclusões	148
7- Summary and Conclusions	154
8- Bibliografia	158

1. INTRODUÇÃO

Como plantas ornamentais talvez sejam as orquídeas, entre as fanegóramas, os vegetais que têm atraído um maior número de aficionados que normalmente as utiliza em pesquisas, no comércio ou simplesmente como passatempo.

São plantas que se adaptam bem em culturas de ripados e que permitem a realização, com relativa facilidade, de cruzamentos controlados.

Parece que em nenhuma outra família de plantas se têm colocado juntas tantas espécies diferentes, numa tentativa de reunir, através da hibridação, caracteres diferentes, como se faz em orquídeas. As Podostemonaceae, como lembram muito bem ADAMS e ANDERSON (1958), apresentam também, muitas flôres e inflorescências diversas e fascinantes, mas pouco são estudadas e nunca se fêz com elas tentativas de hibridação.

Já em orquídeas, em condições artificiais, indivíduos pertencentes a espécies e gêneros diferentes têm sido constantemente cruzados. Híbridos F_1 e de gerações mais avançadas têm sido produzidos em grande escala. Isto, pode nos dar a impressão que, vencendo as barreiras que impedem o cruzamento entre indivíduos pertencentes a grupos taxonômicos diferentes nada há que impeça a produção de híbridos inter-genéricos e inter-específicos nêsses vegetais.

Entretanto, de acôrdo com BRIEGER (1966), essa união entre indivíduos pertencentes a espécies e gêneros diferentes com produção de híbridos F_1 e de gerações mais avançadas, só evidencia em condições artificiais. Essa aparente fertilidade dos híbridos está, provàvelmente, relacionada ao grande número de sementes produzidas em cada cápsula e à sementeira de muitas sementes ao mesmo tempo. Usualmente não se faz uma comparação entre o número de sementes semeadas e o número de indivíduos obtidos.

A verdade é que não se tem, até o momento, dados concretos a respeito do grau de fertilidade dos híbridos naturais ou artificiais de orquídeas.

O Departamento de Génética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de Piracicaba, possui uma coleção

muito ampla de orquídeas, com representação de híbridos artificiais rigorosamente controlados. Entre êsses exemplares encontramos muitos híbridos F_1 artificiais vigorosos e aparentemente férteis.

De acôrdo com DOBZHANSKY (1957) a esterilidade dos híbridos pode estar ou não associada a sua fraqueza constitucional. Em muitos casos os híbridos são tão vigorosos quanto os pais, sendo, entretanto, parcial ou totalmente estéreis.

Não sabemos se os híbridos artificiais de que dispomos são realmente férteis, ou não, e qual o grau de fertilidade dessas plantas. Se são estéreis, em que fase do desenvolvimento se manifesta a esterilidade?

Dessa forma desenvolvemos o presente trabalho com o propósito de verificar o seguinte:

1. Ocorrência ou não de esterilidade em híbridos artificiais inter-genéricos e inter-específicos F_1 de orquídeas.

2. Nos casos de esterilidade, quais as causas possíveis dessa esterilidade. Para isto fizemos observações na:

- a.) Formação dos gametas masculinos e femininos.
- b.) Fertilização, formação do zigoto e do embrião.
- c.) Germinação das sementes F_2 .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As primeiras dificuldades que os orquidocultores tiveram para a hibridação das orquídeas se relacionaram com o desconhecimento da estrutura da flôr, notadamente de sua coluna (LENZ, 1956), além das dificuldades inerentes à germinação das sementes e cultivo das plantinhas.

Em 1847, o rev. Herbert, de Manchester, em seu trabalho "On hybridization among vegetables", sugeriu a possibilidade da produção de híbridos em orquídeas. Em 1856, John Dominy conseguiu o primeiro híbrido que levou à produção de flôres. Em 1873, Seden o sucedeu no Royal Exotic Nursery tendo, então conseguido cêrca de quinhentos híbridos entre espécies e gêneros diferentes (ROLFE, 1893) e ROLFE e HURST (1909).

Entusiasmados com êstes primeiros resultados os orquidocultores intensificaram seus trabalhos, procurando através da hibridação, obter novos tipos recombinantes. Dessa forma, foram e continuam sendo feitos frequentemente, cruzamentos artificiais entre plantas pertencentes a espécies e gêneros diferentes.

Por outro lado, a ocorrência de híbridos naturais em orquídeas tem sido relatada desde há muito tempo. Entretanto, de acôrdo com BRIEGER (1966) não se tem evidências da existência de híbridos de gerações que ultrapassem F_1 . Igualmente, não se tem evidências da infiltração gênica de uma espécie para outra, desde que na natureza existem vários mecanismos que impedem ou dificultam o cruzamento de indivíduos pertencentes a espécies diferentes.

Além dessas informações não encontramos na literatura dados concisos sôbre o comportamento dos híbridos de orquídeas. As informações de que dispomos são referentes a híbridos entre espécies com diferentes graus de ploidia, como se pode ver nos trabalhos de STOREY (1955, 1956) e KAMEMOTO (1969). Encontramos também interessantes relatos de observações feitas por estudiosos de orquídeas sôbre os mecanismos que, na natureza, limitam o cruzamento entre indivíduos pertencentes a espécies diferentes. Assim, antes de entrarmos em considerações sôbre estas barreiras de isolamento reprodutivo, achamos oportuno dar uma idéia sôbre a taxonomia das orquídeas e

sobre o conceito de espécies.

2.1. A taxonomia das orquídeas

A taxonomia das orquídeas começou praticamente com J. LINDLEY (1830) no trabalho "The Genera and Species of Orchidaceous Plants".

Posteriormente novos sistemas foram propostos ou simplesmente modificados e atualizados por outros autores, como BENTHAM (1881), BENTHAM e HOOKER (1883), PFITZER (1889), SCHLECHTER (1927), MANSFELD (1937), BRIEGER (1957), HAWKES e HELLER (1959) e DRESSLER e DODSON (1960).

O sistema taxonômico de uso mais comum atualmente é o proposto por Schlechter que é o próprio sistema de Lindley com algumas modificações. Lindley por sua vez, usou o mesmo critério de SWARTZ (1800) que foi sem dúvida, o primeiro a propor duas grandes divisões nesses vegetais.

Nesse sistema encontramos a família Orchidaceae separada em duas sub-famílias, de acordo com seus órgãos florais, notadamente a antera e a polínia.

1. Sub-família Diandrae com dois estames férteis e desenvolvidos;

2. Sub-família Monandrae cujos membros apresentam uma antera fértil e desenvolvida.

LINDLEY (1830) e BENTHAM e HOOKER (1883) separam as orquídeas em cinco grupos que BRIEGER (1957), tendo como base a provável filogenia dentro da família, considera como cinco sub-famílias a saber:

Cypripedioideae (que corresponde às Diandrae), Ophrydoidea, Neottioideae, Epidendroideae e Vandoideae (que correspondem às Monandrae).

Em nossos trabalhos adotamos essa classificação proposta por BRIEGER.

Essas sub-famílias são sub-divididas em categorias taxonômicas inferiores como tribo, sub-tribo, gênero e espécie.

A base subjetiva de todo o critério de classificação faz com que, também em orquídeas, a denominação das várias categorias taxonômicas varie muito de autor para autor.

Esta subjetividade, até certo ponto, se estende ao nível de espécie e das unidades infra-específicas.

2.2. O conceito de espécie

O conceito de espécie tem oferecido divergências quando considerado por sistematas e evolucionistas ou por zoólogos e botânicos.

Para o sistemata, espécie é útil no sentido de reunir o grande número de seres vivos a uma sistemática compreensível.

DOBZHANSKY (1944) e MAYR (1949) destacam o aspecto dinâmico da especiação, salientando que tôdas as espécies estão sujeitas a mudanças evolutivas, constituindo-se meros estágios num processo de evolução.

DOBZHANSKY (1957) define espécie como grupos de populações entre os quais a troca de genes é limitada na natureza por um ou por diversos mecanismos de isolamento reprodutivo.

MAYR (1959) define o isolamento reprodutivo em termos de um artifício protetor de um conjunto de genes bem integrados contra a infiltração de outros genes. Considera a especiação completada quando o isolamento geográfico pode ser removido, sem resultar no aparecimento de novos tipos através das espécies paternas.

MAYR (1963) considera as espécies como grupos de populações naturais, em atual e potencial inter-cruzamento e isoladas reprodutivamente de outros grupos, BIGELOW (1965) não refuta a definição proposta por Mayr, mas faz questão de delimitar o conceito de hibridação. Hibridação seria o cruzamento entre duas populações suficientemente divergentes para produzirem os efeitos da incompatibilidade genética claramente reconhecíveis e não indiscriminadamente, como considera Mayr. Salienta que a ocorrência fortuíta de inter-cruzamentos não indica necessariamente ausência de isolamento reprodutivo. Duas espécies podem permanecer reprodutivamente isoladas, mesmo que entre elas alguns híbridos estéreis sejam produzidos. Isolamento reprodutivo deve ser considerado em termos de fluxo gênico e não em termos de inter-cruzamento. Em geral, a seleção impede a troca de genes entre dois conjuntos gênicos bem integrados mesmo que entre eles ocorra inter-cruzamento.

Segundo BRIEGER (1966) a definição de espécie deve conter dois elementos importantes: a) os membros de uma espécie podem ser reconhecidos por suas características; b) estas características da espécie devem ser constantes.

A especiação deve incluir dois processos: a diversificação e a fixação dos caracteres distintivos através de barreiras de isolamento.

2.3. Mecanismos de isolamento em orquídeas.

Em orquídeas os isolamentos reprodutivos são de vários tipos os quais funcionam ora separadamente, ora simultaneamente.

Um fator muito importante na especiação é o isolamento geográfico ou espacial, enfatizado e defendido por MAYR (1947)

Alguns autores como STRESSMANN (1942) e THORPE (1945), acreditam que, além da especiação geográfica, há no processo de diversificação, a atuação das diferenças de habitat, como ponto de partida para a evolução de novas espécies.

A teoria da especiação geográfica postula que, durante um longo período de isolamento geográfico, as populações acumulam caracteres diferenciais, os quais serão mantidos quando as barreiras externas deixarem de existir.

A distribuição disjunta pode originar conforme BRIEGER (1966), por um dos seguintes processos: a) aparecimento de uma barreira geográfica qualquer numa área simpátrica de distribuição; b) elementos de uma zona passam para outra, atravessando uma barreira pré-existente.

A alopatria pode, em alguns casos, não ter um papel muito importante na especiação de alguns grupos de orquídeas. Tem sido verificado que, em orquídeas, a dispersão a grandes distâncias é facilitada pela falta de endosperma na semente, que a torna mais leve, pela produção de sementes em grande quantidade e pela sua dispersão pelo vento.

A capacidade de vôo das abelhas, adicionada ao forte poder atrativo das flôres e a capacidade de dispersão das sementes, parecem favorecer o cruzamento a grandes distâncias, mesmo quando as populações são descontínuas. Para salientar a capacidade de vôo das abelhas DRESSLER (1968) cita que Dodson (comunicação pessoal) encontrou Eulaema polycroma cruzando os Andes, perto da Loja, (Equador), a uma elevação de 2700 metros acima das regiões onde era encontrada naturalmente.

Por outro lado, BRIEGER (1960), mostra que em orquídeas também ocorre especiação simpátrica, como foi verificada em Hormidium.

Fator muito importante na especiação simpátrica é o florescimento das plantas em épocas diferentes, o que é muito característico nas plantas tropicais. Nas Orchidaceae, pode se encontrar, com frequência, espécies isoladas pelo florescimento.

Espécies do sub-gênero Cyrtolaëlia, como a Laelia flava e a Laelia rupestris que ocorrem na mesma área não se cruzam na natureza por não coincidirem na época do florescimento (BLUMENSCHNEIN, 1960b).

GRANT (1949), divide os mecanismos florais de isolamento em: a) "isolamento mecânico", termo proposto por DOBZHANSKY (1937) devido à diferenças estruturais das flôres; b) "isolamento etológico" (este termo foi proposto por MAYR (1948), para se referir a cruzamentos preferenciais entre animais. Grant sugere a aplicação do termo "isolamento etológico" também a vegetais nos quais os cruzamentos entre indivíduos pertencentes a diferentes populações são impedidos pela atuação de polinizadores específicos.

O tamanho das flôres tem sido apontado como fator importante no isolamento de orquídeas. DRESSLER (1968) cita vários casos onde observou esse fenômeno. Assim, no gênero Stanhopea verificou que S. connata e S. florida são visitadas por Euglossa nigropilosa, mas esta abelha é muito pequena para efetuar polinização em S. connata, só o fazendo em S. florida.

Outra dificuldade física, capaz de interferir em certas hibridações, possivelmente seja o comprimento diferente da coluna e ovário das espécies envolvidas nos cruzamentos. Quando a planta de coluna curta é usada como doadora de pólen à planta de coluna longa, os tubos polínicos podem não ser capazes de atravessar a coluna longa. As polinizações entre Cymbidium pumilum e qualquer Cymbidium de flor grande só foram bem sucedidas quando se utilizou a planta maior como doadora de pólen (LENZ e WIMBER, 1959).

DARWIN (1882) (apud WIRTH e WITHNER, 1959), já havia verificado a marcada adaptação que as orquídeas apresentam para a polinização por animais.

Trabalhos de DODSON (1962 e 1965) apontam o beija-flor certos himenópteros (como abelhas e vespas), lepidópteros (borboletas e mariposas) como polinizadores de orquídeas.

Salientam, entretanto, que nem sempre a presença de um inseto sobre uma flor significa que êle a esteja polinizando. Só deve ser considerado um polinizador efetivo se estiver carregando a polínia. Besouros, formigas, rãs e caracóis têm sido vistos sobre as flôres de orquídeas, mas Dodson, apesar de repetidas observações, não encontrou evidências que comprovassem o papel de polinizadores desses animais.

Papel destacado têm os insetos nas polinizações de orquídeas. Em geral os insetos são altamente específicos nas suas visitas às flôres, fenômeno já observado por FRISCH (1914) em abelhas.

As abelhas são atraídas pela forma, cor e odor específicos das flôres. Essa especificidade de polinizador provê uma base teórica importante na especiação e isolamento genético, embora BAKER (1963), tivesse verificado serem êsses fenômenos relativamente pouco frequente nas Angiospermas.

A fonte de alimento tem um papel destacado na especiação das abelhas (LINSLEY e MAC SWAIN, 1958). Além disso, a relação das abelhas com as flores não é apenas uma questão alimentar. As abelhas se associam a determinados vegetais não só para coletar o néctar e pólen, mas também porque as flôres constituem um lugar de acasalamento para algumas das espécies e lugar de repouso para outras, já que de muitas flôres emanam substâncias inebriantes.

O gênero Ophrys é encontrado na região Mediterrânea, na região Sul da Europa, sudoeste da Ásia e norte da África. Contém muitas espécies que se assemelham por seus caracteres vegetativos, habitat geral, mas que diferem notadamente pela forma do labelo. É êsse caráter diferente que assegura a polinização cruzada, praticada principalmente por machos de Hymenoptera através do processo de pseudo-copulação (STEBBINS e FERLAN, 1956). As abelhas são atraídas pela forma, cor da flor e pelo odor emanado, que é bastante semelhante ao cheiro da fêmea. Estimulados pelos pêlos existentes na superfície labelar, iniciam a ação copulatória (AMES, 1937) e durante essa atividade, polinizam a flor. Também KERR e LOPES (1962) encontraram fenômenos semelhantes ocorrendo em Trigonidium obtusum. Os machos de Trigona (Plebeia) droriana procuram essas orquídeas e com elas tentam copulação atraídos pelo odor semelhante ao da rainha virgem. Os autores citam vários casos semelhan

tes que foram registrados por HOEHNE (1930), RAYMENT (1948) e KULLENBERG (1950, 1952, 1956 a, b).

Em alguns casos têm-se verificado que as abelhas podem visitar duas ou mais espécies de plantas simpátricas que são estreitamente relacionadas.

Como lembram LENZ e WIMBER (1959), se os insetos fossem completamente específicos nas suas visitas às flôres, encontraríamos poucos ou nenhum híbrido ocorrendo naturalmente. Nas orquídeas encontramos muitos híbridos naturais, o que sugere ocasional inespecificidade de polinizadores. Nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram registrados vários híbridos naturais ocorrendo entre: Cattleya intermédia e Laelia purpurata (Laeliocattleya schilleriana); entre C. intermédia e C. guttata (C. interguttata), além de outros tipos de cruzamentos (EWALD, 1949 e BRIEGER, 1966). Também no Estado do Espírito Santo, vários híbridos naturais foram encontrados (RUSCHI, 1950).

Em Ophrys, apesar da especificidade de polinizadores, KELLER e SOO (1930, 1938 apud STEBBINS e FERLIAN, 1956), encontraram evidências de cruzamentos inter-específicos, embora aqui, como em muitos outros casos, não se tenham evidências de descendentes de gerações a partir de F_1 .

Pensamos que uma possível explicação para o aparecimento casual de híbridos inter-específicos e mesmo inter-genéricos possa ser encontrada nos trabalhos experimentais feitos em Gilia (Polemoniacea) por GRANT (1949). Este autor verificou em três sub-espécies de Gilia capitata, estudadas experimentalmente, marcada especificidade de polinizadores, (abelhas) notadamente na primavera, quando a quantidade de pólen era grande. No verão quando a quantidade de pólen diminui devido à diminuição da quantidade de flôres as abelhas se tornaram menos específicas em suas visitas às flôres. Embora esse fenômeno não se tenha constituído num comportamento constante, a diminuição do pólen propiciou o aparecimento de híbridos em Gilia. É possível que fenômenos semelhantes ocorram também em orquídeas.

Nestas plantas, casos de vetores de polinização, comuns a mais de uma espécie simpátrica, são esporádicos. DRESSLER (1968) verificou que de trinta e oito espécies de orquídeas analisadas no Panamá e Costa Rica, 26,0 a 68,4% delas eram

polinizadas por uma só espécie de polinizador.

Espécies simpátricas altamente relacionadas usualmente não são polinizadas pela mesma espécie de abelhas. Quando, entretanto, apresentam polinizadores comuns, a hibridação ocorre a menos que mecanismos físicos impeçam que isto aconteça.

DRESSLER (1968) verificou que espécies de orquídeas que são geograficamente isoladas tendem a ser menos específicas na sua relação com o polinizador, que aquelas que ocorrem junto a outras espécies mais relacionadas. É possível que a seleção tenha favorecido a especificidade nas espécies simpátricas. Essa especificidade parece ser importante para a evolução dos animais e vegetais.

GRANT (1949), verificou que espécies de Angiospermas, que apresentam polinizadores comuns, mostram diferenças morfológicas que nem sempre, envolvem as peças florais. Diferenças na morfologia floral, geralmente são encontradas em vegetais relacionados e que dispõem de polinizadores específicos.

Baseado ainda na especificidade de polinizadores, Grant apresentou um modelo de especiação simpátrica. Segundo o autor uma mutação recessiva afetando a cor e a forma da flor poderia aparecer numa população. Após várias gerações de cruzamentos os mutantes recessivos poderiam se estabelecer na população resultando numa nova espécie isolada das demais pela ação de polinizadores específicos. Para que estes tipos se estabeleçam na população é necessário a existência de um polinizador pré-adaptado.

De acordo com ANDERSON e STEBBINS (1954) a hibridação é o fator que propicia a realização de uma evolução mais acelerada nos vegetais.

Em orquídeas, segundo BRINK e COOPER (1947) e LENZ (1956) (apud LENZ e WIMBER, 1959) a falta de endosperma das sementes pode favorecer a produção de sementes híbridas viáveis. Tem sido demonstrado que em muitos cruzamentos o desenvolvimento anormal do endosperma das sementes pode ser a causa da inviabilidade da semente.

Conforme LENZ e WIMBER (1959), a produção de híbridos é favorecida nos sistemas de cruzamentos, como os de orquídeas onde a massa total de pólen é transferida globalmente para a superfície estigmática de uma flor.

Também de acordo com WALLBRUNN (1966) o grande número

de óvulos e tubos polínicos encontrados num ovário de orquí -
dea em desenvolvimento, aumenta a probabilidade de ocorrência
de alguma fertilização.

BLUMENSCHNEIN (1960) verificou que em Cyrtolaelia a hi-
bridação desempenha um papel muito importante na sua evolução.

A hibridação, entretanto, não terá efeito evolutivo
quando: a) não houver um nicho ecológico favorável à planta
híbrida; b) apresentar o F_1 baixa fertilidade; c) houver au-
sência de um polinizador pré-adaptado.

Os tipos híbridos que não são totalmente estéreis e
que dispõem de polinizadores pré-adaptados podem se manter na
população através de:

- a) mudança no ambiente, onde tipos recombinantes se
adaptariam e que em condições normais seriam elimi-
nados. SIMPSON (1944 e 1953) e ANDERSON e STEBBINS
(1954) verificaram alta incidência de híbridos em
ambientes naturalmente modificados ou que sofreram
alterações pela ação do homem ou de animais. BRIEGER
(1960a) considera este surto evolutivo independente
do ambiente mostrando que Oncidium, apesar de tro-
car de ambiente nos campos do Estado de Minas Gerais
não apresenta surto de evolução.
- b) Multiplicação do número de cromossomos dando origem
aos poliploides. STEBBINS (1950) considera a poli-
ploidia como um processo evolutivo rápido que per-
mite a adaptação vegetal imediata a ambientes em
mudança. De modo geral a poliploidia é tida como um
processo capaz de isolar populações simpátricas.
HAGERUP (1932) e TISCHLER (1935), (apud BLUMENSCHNEIN
1960a) verificaram que os poliploides são mais adap-
tados às condições climáticas extremas que os di-
ploides. Sobre este fato não estão inteiramente de
acôrdo com GUSTAFSON (1948) e STEBBINS (1950), em-
bora este último saliente que os indivíduos diploi-
des têm realmente capacidade de adaptação diferente
das poliplóides. Com referência à fertilidade dos
poliplóides, sabe-se que os autopoliplóides são me-
nos férteis que os diplóides. A fertilidade dos po-
liplóides é em parte aumentada quando ocorre alo-
poliploidia.

- c) Ocorrência de introgressão: ANDERSON (1953) atribuiu grande importância à hibridação introgressiva, que segundo ANDERSON e HUBRICHT (1938) significa a infiltração de genes de uma espécie ao conjunto gênico de outra, através da hibridação e retrocruzamento. Este fenômeno foi bem exemplificado por RILEY (1938) em Iris fulva e Iris hexagona var gigantecae rulea. Se duas espécies capazes de cruzar se encontram, elas usualmente se hibridizam. Os híbridos tendem a se cruzar com as espécies mais abundantes. Para isto é necessário que o híbrido F_1 não seja totalmente estéril. Fertilidade mesmo em frequência baixa já permitirá novos cruzamentos. A progênie de híbridos de 2ª geração são novamente retrocruzados e assim isto tende a se repetir por muito tempo dentro da população. Em alguns casos a infiltração gênica se dá numa única direção enquanto que em outros em ambas as direções, o que é chamado de "introgressão recíproca". ANDERSON (1953) estabelece ainda dois tipos de introgressão: simpátrica e alopátrica dependendo se os genótipos ocorrem ou não na mesma área que as espécies paternas.
- d) Produção de tipos com variação transgressiva: Neste caso os tipos recombinantes apresentam caracteres não encontrados dentro do limite de variação dos pais.

Do exposto podemos ver que quase sempre em orquídeas, os diversos grupos taxonômicos existentes, acham-se isolados pela atuação de vários mecanismos de isolamentos reprodutivos. A ocorrência casual de alguns híbridos naturais tem sido registrada, não sendo, contudo encontrados híbridos de gerações mais avançadas. Entretanto, em condições de cultura, espécies diferentes têm sido colocadas juntas e constantemente cruzadas. Não se tem até o momento, dados referentes ao comportamento dos híbridos de orquídeas.

3. MATERIAL

Os híbridos F_1 , que utilizamos neste trabalho, foram obtidos de cruzamentos feitos no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba.

As espécies envolvidas na produção desses híbridos fazem parte da sub-família Epidendroideae, tribu Epidendreae.

Na tabela 1, estão relacionados os híbridos F_1 que usamos. Nessa tabela constam ainda o número de cromossomos, tipo de distribuição geográfica e informações sobre a coincidência ou não da época de florescimento das espécies paternas.

Os números de cromossomos das espécies paternas foram obtidos através de consultas feitas aos trabalhos de BLUMENSCHNEIN (1957; 1960a, b, 1961); KAMEMOTO (1950); KAMEMOTO E RANDOLPH (1949) e SHIMOYA (1956).

As informações a respeito da distribuição geográfica das espécies paternas foram encontradas nas publicações de BLUMENSCHNEIN (1967); BRIEGER (1969); HOEHNE (1949); LEINIG (1966; 1968); POST Jr. (1965 a,b,c). Contamos ainda com informações pessoais fornecidas pelo Dr. Paulo Sodero Martins e Sr. Alaor de Oliveira do Departamento de Genética de Piracicaba.

Os dados sobre a época de florescimento das espécies paternas se restringem a observações feitas em condições de ripado.

As informações referentes ao registro dos híbridos foram encontradas nas publicações de Sander's Orchid (1946; 1949 e 1952) além da consulta que fizemos diretamente para "The Royal Horticultural Society" - "The International Authority for the Registration of Orchid Hybrids".

As sementes F_2 que analisamos foram obtidas através de cruzamentos que fizemos entre plantas híbridas F_1 irmãs entre si, ou através de retrocruzamentos. As sementes resultantes de cruzamentos intra-específicos provieram de cruzamentos que fizemos usando algumas das espécies envolvidas na produção dos híbridos estudados. As espécies que usamos nos cruzamentos intra-específicos, foram as seguintes:

Cattleya aurantiaca Rolfe
Cattleya bicolor Lindl ...

Tabela 1

Relação dos híbridos F₁ artificiais estudados. Número haploide de cromossomos, época de florescimento e tipo de distribuição geográfica das espécies paternas.

Híbrido	Espécies Cruzadas	Espécies Paternas			
		N. cro- mossom	Flores.	Distrb.	
<u>Cattleya x Cattleya</u>					
7	<u>C. guttata</u> Lindl x <u>C. bicolor</u> Lindl	20	20	C.	Al.
404	<u>C. labiata</u> Lindl x <u>C. bicolor</u> Lindl	20	20	C.	Al,
442	<u>C. leopoldii</u> Verschf x <u>C. aclandiae</u> Ld	20	20	C.	Al.
487	<u>C. bicolor</u> Lindl x <u>C. bowringheana</u> Veit	20	20	C.	Al.
501	<u>C. intermedia</u> Graham x <u>C. aurantiaca</u> "Roffe" Lindl.	20,21	20	C.	Al.
516	<u>C. harrisoniana</u> Batem x <u>C. aclandiae</u> Lindl.	20	20	N.C.	Al.
<u>Cattleya x Laelia</u>					
31	<u>L. crispa</u> Reichb x <u>C. mossiae</u> Park ex. Hook	20	20	N.C.	Al.
370	<u>C. intermedia</u> Graham x <u>L. crispa</u> Reichb. F	20,21	20	N.C.	Al.
508	<u>C. harrisoniana</u> Batem x <u>L. tenebrosa</u> "Roffe"	20	20	C.	Al.
567	<u>L. purpurata</u> Lindl x <u>C. ametistoglossa</u> Linden & Reichb.	20	20	N.C.	Al.
610	<u>C. intermedia</u> Graham x <u>L. flava</u> Lindl	20,21	20	C.	Al.
1525	<u>C. loddigesii</u> Lindl x <u>L. cinnabarina</u> Batem.	20	20,24	C.	Al.
<u>Brassavola x Cattleya</u>					
336	<u>B. perrinii</u> Lindl x <u>C. forbesii</u> Lindl	20	20	C.	S.
337	<u>B. perrinii</u> Lindlx <u>C. leopoldii</u>	20	20	N.C,	S.
338	<u>B. perrinii</u> Lindl x <u>C. harrisoniana</u>	20	20	C.	Al.
339	<u>B. perrinii</u> Lindlx <u>C. harrisoniana</u> Batem	20	20	C.	Al.
497	<u>B. perrinii</u> Lindlx <u>C. dowiana</u> Batem	20	20	N.C.	Al.
<u>Outros cruzamentos</u>					
340	<u>L. purpurata</u> Lindlx <u>B. perrinii</u> Lindl	20	20	C.	S.
365	<u>B. perrinii</u> Lindlx <u>Epidendrum ciliare</u> L.	20	20	N.C.	Al.
368	<u>L. flava</u> Lindlx <u>Schomburgkia crispa</u> Lindl	20	20	C.	Al.
369	<u>S. crispa</u> Lindlx <u>Sophranites cernua</u> Lindl	20	20	C.	S.
435	<u>C. walkeriana</u> Gardnx <u>S. crispa</u> Lindl	20	20	C.	S.
436	<u>C. harrisoniana</u> Batemx <u>S. crispa</u> Lindl	20	20	N.C.	Al.
456	<u>B. perrinii</u> Lindl x <u>S. crispa</u> Lindl	20	20	N.C.	S.

C. =Florescimento coincidente

N.C. =Florescimento não coincidente

Observações: Al. =Alopátrica

S. =Simpátrica

Distrb.=Tipo de distribuição geográfica

Flores.=Época de florescimento

Cattleya bicolor Lindl. (2n=40 cromossomos) sin. Cattleya measuresiana Blumens.

Cattleya forbesii Lindl
Cattleya harrisoniana Batem
Cattleya intermedia Graham
Cattleya leopoldii Verschaf
Laelia crispa Reichb. F.
Laelia flava Lindl
Schomburgkia crispa Lindl

Também fizemos cruzamentos entre Cattleya harrisoniana e Brassavola perrinii nos quais acompanhamos a macrosporogênese e embriogênese para verificar se a barreira encontrada no momento da fertilização, após cruzamentos de F_1 com F_1 , ocorria também em cruzamentos inter-específicos.

4. MÉTODOS

4.1. Determinação da esterilidade das plantas híbridas F_1 .

Para a determinação da esterilidade dos híbridos F_1 procedemos a cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Quando possível, fizemos retrocruzamentos usando o híbrido como fêmea e como macho. Assim pudemos ter indicações se a esterilidade observada no híbrido era só masculina ou também feminina. Não fizemos retrocruzamentos nos casos em que o híbrido floresceu em épocas muito diferente dos pais.

O número de cruzamentos que fizemos não foi uniforme ; variou notadamente de acôrdo com o número de plantas híbridas disponíveis e de acôrdo com o número de flôres produzidas em cada floração.

Fizemos os cruzamentos artificialmente transportando , por meio de um estilete de madeira, tôdas as polínias de uma flor para a superfície estigmática da outra.

Também fizemos cruzamentos intra-específicos usando dez das espécies envolvidas na produção dos híbridos para podermos avaliar a esterilidade encontrada nos híbridos F_1 .

Âchamos oportuno frisar que nosso trabalho se prendeu principalmente ao estudo das plantas híbridas F_1 . Os dados sôbre a fertilidade das sementes resultantes de cruzamentos intra-específicos foram coletados sômente para nos servir como

contrôle a fim de podermos estimar a esterilidade encontrada nas sementes F_2 estudadas. As causas da esterilidade das sementes F_1 não foram analisadas.

4.1.1. Porcentagem de esterilidade das sementes F_2 .

Nos casos em que as polinizações foram bem sucedidas deixamos as cápsulas se formarem normalmente até o amadurecimento.

Quando o fruto estava maduro, colhemos as suas sementes e as embalamos em saquinhos de papel. A seguir as colocamos em um dissecador contendo cloreto de cálcio onde deixamos guardadas em geladeira à temperatura de 4°C , até sua utilização.

Para a verificação da frequência de esterilidade tomamos, de cada cápsula, amostras de sementes com as quais fizemos cinco lâminas tendo cada uma, aproximadamente, a mesma quantidade de sementes bem espalhadas. Usamos sempre lâminas de 24 x 24 mm. e carmin acético a 1% como corante.

Contamos, em cada lâmina as sementes de nove campos microscópicos, o que nos deu um total de quarenta e cinco campos contados para cada cápsula.

Consideramos três tipos de sementes: sementes sem embrião ou estéreis; sementes com embrião morfológicamente bem formado e sementes com embrião que se mostra ou pequeno ou pouco desenvolvido.

4.1.2. Germinação das sementes

Uma parte das sementes produzidas pelos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si, ou resultantes de retrocruzamentos foi utilizada para sementeiras, a fim de verificarmos o poder de germinação dessas sementes. Para nosso controle também testamos a capacidade de germinação de algumas sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos.

Como sabemos, as sementes de orquídeas são muito pequenas e destituídas de endosperma. Apresentam embrião rudimentar, com células não diferenciadas e contendo reservas nutritivas em quantidades insignificantes. Em condições naturais vivem em simbiose com micorrizas, que desdobram a matéria orgânica do substrato em produtos solúveis e assimiláveis pelo

embrião (BURGEFF, 1959).

Para cultivar artificialmente as sementes precisamos fornecer-lhes as substâncias que necessitam para seu crescimento.

Em nosso caso fizemos uso da solução "C" de Knudson cuja composição é a seguintes:

Solução estoque:

50,0g de nitrato de cálcio em 950cc de água.
12,5g de fosfato de potássio em 988cc de água.
12,5g de sulfato de magnésio em 988cc de água.
25,0g de sulfato de amônia em 975cc de água.

Estas soluções foram autoclavadas durante 20 minutos a 1/2 atmosfera e conservadas em estoque para preparação do meio.

A uma mistura de 20cc de cada uma das soluções estoque juntamos:

Sulfato de manganês 0,0075 g.
Sulfato ferroso 0,025 g.
Sacarose 20,0 g.
Agar 18,0 g.

Completamos o volume de um litro com água destilada.

Antes da sementeira, as sementes foram desinfectadas em solução de hipoclorito de cálcio. Usamos 10g de hipoclorito em 140cc de água. Deixamos as sementes nessa solução durante 10 minutos agitando sem interrupção.

Após a desinfecção, as sementes foram semeadas em frascos apropriados contendo o meio nutritivo, esterilizado em autoclave, durante 30 minutos a uma pressão de meia atmosfera.

Os frascos foram colocados em lugares arejados, com temperatura não superior a 21°C e nem inferior a 7°C, com umidade ambiente de aproximadamente 75%.

Cêrca de dois meses após à sementeira retiramos as sementes do frasco para verificação da porcentagem de germinação das mesmas.

Para retirar as sementes introduzimos no frasco uma certa quantidade de água. Com auxílio de conta-gôtas retiramos a água misturada com sementes e preparamos lâminas para os exames microscópicos. Colocamos uma gotas de mistura, água e sementes, sôbre a lâmina, cobrimos com a lamínula e examinamos

ao microscópio. Pudemos dessa forma distinguir as sementes que germinaram, as sementes sem embrião ou estéreis e as sementes que, tendo embrião, todavia, não germinaram.

As sementes estéreis mostravam-se vazias, sem embrião no interior; as que germinaram exibiram uma plântula, enquanto que, as que não germinaram mostraram embrião no sua interior tal como havíamos visto antes da sementeira, sem quaisquer indícios de modificações.

4.2. Determinação da fertilidade do pólen das plantas híbridas F₁.

4.2.1. Microsporogênese

Em último lugar procedemos aos estudos citológicos para observação da formação do grão de pólen. Assim procedemos porque o período entre a polinização e a produção de sementes é longo e preferimos, para ganhar tempo, primeiro usar as flôres para cruzamentos.

Para observação da microsporogênese utilizamos botões florais que coletamos entre 14 e 16 horas, ocasião onde as fases da meiose facilitavam melhores observações cromossômicas. O tamanho dos botões florais, que nos permitiram melhores análises, variou muito de híbrido para híbrido. Nossa experiência no caso, é que nos ajudou a coletar botões em tamanhos apropriados.

Fixamos os botões em Carnoy 6:3:1 por 12 horas e transferimos para o álcool 70% para sua conservação. As lâminas foram preparadas pelo método comum de esmagamento com carmin ou orceína acética a 1%. As lâminas foram lutadas e de preferência observadas no dia seguinte após a sua preparação quando o material se mostrava melhor corado.

4.2.2. Germinação do pólen

Observamos a germinação do pólen deixando-o germinar diretamente no estigma da flor ou colocando-o em meios artificiais.

Verificamos a germinação do pólen na flor fazendo uma raspagem sobre o estigma, cerca de três a sete dias após a polinização. Colocamos o material colhido sobre uma lâmina e sobre ele, algumas gotas de carmin acético a 1%. Cobrimos com

lamínula e observamos ao microscópio óptico.

No desenrolar do trabalho, verificamos que podíamos acompanhar o crescimento dos tubos polínicos fazendo análise diretamente no ovário cortando-o com navalha, transversalmente ou longitudinalmente. Foi assim que, na maioria dos híbridos, verificamos o crescimento dos tubos polínicos. Para confirmar nossas observações fizemos, em todos os casos, lâminas conforme técnica descrita atrás.

Nos híbridos F_1 , que mostraram esterilidade completa, (365 e 368) e, baseando-se no trabalho de BROWN (1966) feito com hormônio de crescimento, preparamos uma pasta de lanolina com concentração de 0,1; 0,5; e 1% de ácido 3 indol acético e aplicamos nas paredes do ovário e sobre o estigma da flor (com e sem pólen). A finalidade dessa nossa observação foi a de verificar se somente a falta de auxina seria a responsável pela parada no desenvolvimento do fruto.

Observações da germinação do pólen também foram feitas nesses dois híbridos em condições artificiais, usando-se os seguintes meios: água pura (destilada), substância estigmática e solução de agar mais sacarose.

Técnicas usadas: a) água destilada - colocamos algumas gotas de água destilada sobre uma lâmina escavada e sobre ela o pólen a ser ensaiado; b) substância estigmática - com uma pequena espátula retiramos a substância estigmática da flor híbrida e colocamos sobre uma lâmina com algumas gotas de água destilada. Sobre ela colocamos o pólen do mesmo híbrido; c) meio com agar e sacarose - MIWA (1937) verificou que a concentração de açúcar necessário à germinação das polínias de orquídeas varia muito de espécie para espécie. Em geral pólen das orquídeas epífitas germinaram em concentração de 0,3 M, enquanto, que as terrestres em solução 0,1 M de açúcar. Nos híbridos obtivemos bons resultados nas concentrações de 0,5 e 1%. O agar foi utilizado em quantidade suficiente a dar ao meio uma certa consistência gelatinosa. Dessa forma preparamos o meio da seguinte maneira: agar- 7,5g; sacarose- 1 ou 5g; água- 100cc. Misturamos o agar e a sacarose com a água e levamos ao fogo até a fervura. Deixamos o meio esfriar e colocamos um pouco no centro de uma lâmina, na qual, logo a seguir, colocamos o pólen.

4.2.3. Reconhecimento dos tubos polínicos:

Inicialmente, quando não tínhamos facilidade para reconhecer os tubos polínicos, utilizamos a presença de calose, comum nos tubos polínicos, para a sua identificação no material retirado do ovário. Usamos o método da luz fluorescente, sugerido e utilizado por ARENS (1948), CURRIER (1957) e MARTIN (1959). Tratada com solução aquosa de azul de anilina, a calose, sob a luz ultra-violeta, emite uma fluorescência amarelada sobre o fundo escuro do microscópio.

Para nossas observações retiramos do ovário em desenvolvimento, o material que nos parecia ser tubos polínicos e fixamos por 24 horas na seguinte solução:

Formalina 1 parte .
Álcool 80% 8 partes.
Ácido acético 1 parte .

Após a fixação transferimos o material para uma solução contendo 0,1% de azul de anilina em K_3PO_4 a 0,1N onde ficaram por quatro horas. Os supostos tubos polínicos foram então montados em lâmina com algumas gotas do corante. Após cobertura com uma lamínula foram esmagados com pressão manual exercida sobre a lamínula e a seguir observados ao microscópio com luz ultra-violeta.

4.2.4. Porcentagem de polinizações que levaram à formação de cápsulas;

Registramos todos os cruzamentos feitos em cada grupo de híbridos. Todas as semanas, após a realização dos cruzamentos percorremos os ripados de orquídeas para anotar os cruzamentos que não foram bem sucedidos.

Por razões que esclareceremos no desenrolar do trabalho foram êsses dados que, na maioria dos híbridos, nos deram as melhores indicações sobre a fertilidade do pólen (polínias) dos híbridos.

4.3. Macrosporogênese, fertilização e formação do embrião.

Após a polinização, ovários em diferentes estágios de

desenvolvimento foram coletados para observação da macrosporo-rogênese.

O material coletado foi cortado transversalmente em dis fixado em Carnoy 6:3:1 por 12 horas e transferido para o álcool 70%, aí ficando até sua utilização. Para análise retiramos uma amostra do interior do ovário, colocamos sôbre uma lâmina contendo algumas gotas de carmin acético a 1% e esmagamos ligeiramente. Após a lutagen a lâmina foi examinada e quando boa, fotografada.

Para identificação de uma formação encontrada nos óvulos de alguns híbridos fizemos também coloração com azul toludina, com azul de Alcian, reação de Feulgen e P.A.S. conforme técnica de Mc Manus.

5. RESULTADOS OBTIDOS

Para a apresentação dos resultados que colhemos e para sua melhor apreciação, consideramos oportuno ordená-los na seguinte seqüência: 1) dados sôbre os cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si e dos retrocruzamentos, com apreciação individual de cada híbrido; 2) Microsporangênese; 3) Germinação das sementes; 4) Análise da fertilidade das sementes resultantes de cruzamentos intra-específicos.

5.1. Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si e dos retrocruzamentos.

A ordem que seguimos na apresentação dêsses resultados está baseada na porcentagem média de sementes sem embrião que encontramos entre aquelas oriúndas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Considerando, que o híbrido 442 revelou-se mais fértil com um desenvolvimento de pós-polinização mais completo, consideramos aconselhável tomá-lo como ponto de referência para a descrição de todos os outros 23 híbridos observados.

Nos retrocruzamentos em que usamos o híbrido como mãe, o tempo entre a polinização e a ocorrência de cada fase de desenvolvimento mostrou-se semelhante aos cruzamentos de F_1 irmãos entre si. Quando porém, o híbrido funcionou como doador de pólen o tempo de ocorrência de cada uma dessas fases

dependeu da espécie paternal utilizada. Por esta razão vamos descrever somente os cruzamentos de F_1 com F_1 .

As fotografias que utilizaremos para ilustrar nossa apresentação nem sempre se referem ao híbrido descrito. Isto porque, em muitos casos as lâminas preparadas com material de um determinado híbrido não foram suficientemente claras para obtermos boas fotografias.

5.1.1. Híbrido 442

- a) Espécies paternas: Cattleya leopoldii Verschaf
Cattleya aclandiae Lindl
- b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Rod Mc Lellan Co. em 1966 com o nome de Cattleya landate.
- c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 31. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi de 93,54%. Analisamos as sementes que retiramos de vinte e uma cápsulas. Os valores de sementes sem embrião variaram entre 7,30% e 75,52%, conforme se pode ver na tabela 2. A porcentagem média de sementes sem embrião foi de 37,97%. A porcentagem média de sementes com embrião bem formado foi de 59,95% e a porcentagem média de sementes com embrião mal formado foi igual a 2,08%.

Cortando o ovário transversalmente antes da polinização pudemos ver na sua parede interna três saliências dicotômicas (fig. 1). Nessas saliências encontramos células que só começaram a se dividir iniciando a formação de óvulos, após a realização dos cruzamentos.

Coletando ovários periodicamente após a polinização verificamos que os grãos de pólen que normalmente se organizavam em tétrades, germinaram no estigma, conservando essa disposição (fig. 2). Os tubos polínicos formados penetraram na coluna, constituindo um feixe único. Ao atingir a cavidade ovariana, êsse feixe dividiu-se em seis ramos. Mesmo à vista desarmada, pudemos ver, quando cortamos o ovário transversalmente, os feixes de tubos polínicos que apareciam como seis pontos claros e translúcidos junto às três projeções placentárias dicotômicas do ovário onde são formados os óvulos (fig. 3).

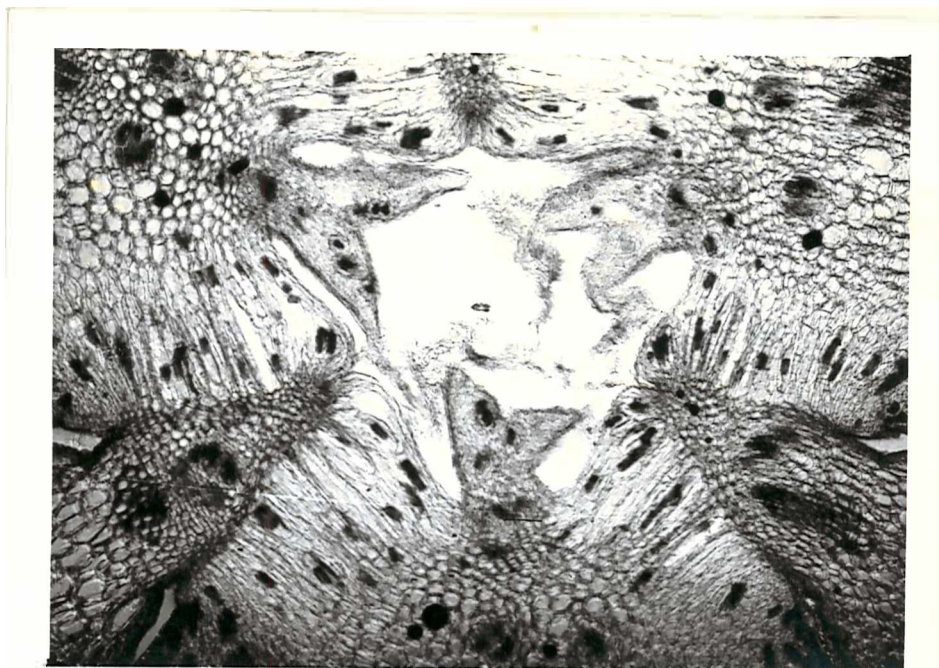
Vinte e cinco dias após a polinização os tubos polínicos atingiram todo o comprimento do ovário.

Híbrido 442 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãs entre si.

Tabela 2

Plantas híbridas cruzadas.	% de sementes s/ em embrião.	% de sementes com embrião.		Total de sementes contadas	Dias entre polinização e as colheitas.
		Bem formado	Mal formado		
442-30 x 442 - 34	7,30	88,76	3,93	178	180
442-29 x 442 - 33	10,43	88,69	0,86	115	180
442-30 x 442 - 18	11,52	86,63	1,84	181	170
442-11 x 442 - 30	13,80	84,33	1,80	166	180
442-30 x 442 - 27	18,81	77,41	3,77	186	150
442-34 x 442 - 30	22,75	76,55	0,70	135	180
442-29 x 442 - 34	24,19	73,38	2,43	124	195
442-10 x 442 - 4	27,68	72,32	0,00	177	150
442-11 x 442 - 6	34,05	65,95	0,00	138	180
442-1 x 442 - 35	38,37	61,63	0,00	173	165
442-4 x 442 - 17	38,67	56,35	4,97	217	150
442-34 x 442 - 23	41,41	56,06	2,52	198	150
442-6 x 442 - 30	44,60	55,40	0,00	204	165
442-29 x 442 - 18	48,86	51,14	0,00	221	165
442-8 x 442 - 11	49,75	50,25	0,00	207	165
442-35 x 442 - 6	51,11	48,89	0,00	90	180
442-26 x 442 - 36	55,94	33,92	10,13	227	150
442-26 x 442 - 4	57,31	39,83	2,84	246	150
442-6 x 442 - 1	59,57	40,43	0,00	188	165
442-11 x 442 - 1	65,78	26,31	7,89	228	165
442-36 x 442 - 4	75,52	24,48	0,00	143	180
	$\bar{x}=37,97$	$\bar{x}=59,93$	$\bar{x}=2,08$	$T=3702$	$\bar{x} = 167$

Figura 1



Saliências dicotômicas da parede interna do ovário
(Híbrido 337) - 32x

Figura 2



Tétrades de grãos de pólen germinado 500x
(Híbrido 368)

Durante êsse período as células nucelares começaram a se dividir, organizando-se em colunas de sete e nove células, delimitadas por uma única camada de células epidérmicas. À medida que se formavam, essas colunas tornaram-se inclinadas (fig. 4), levando à formação do óvulo tipicamente anátropo das orquídeas.

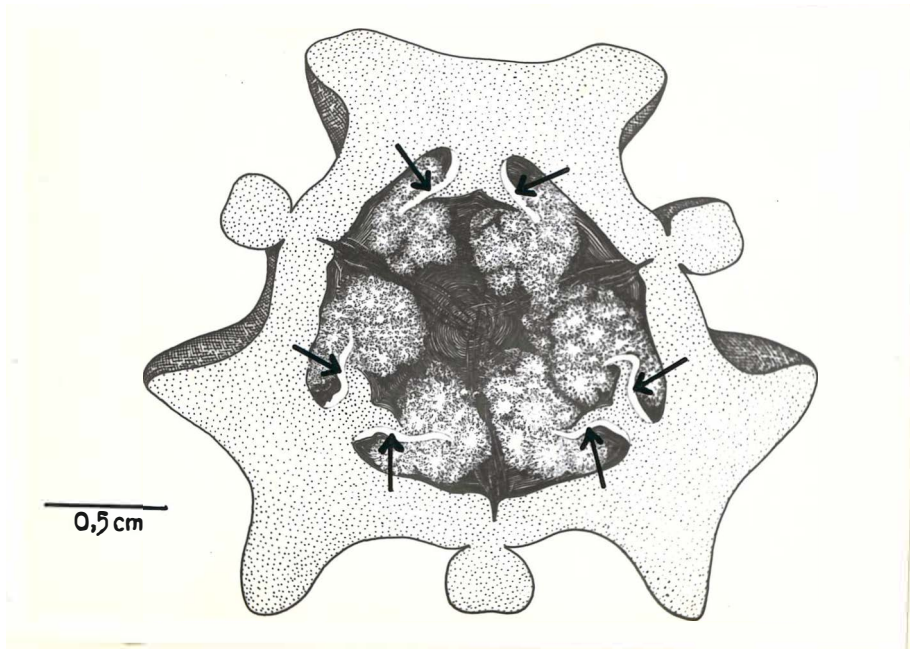
Trinta dias após a polinização a célula-mãe do macrósporo, na extremidade terminal dessa fileira de células, salientou-se das demais por seu maior tamanho e, notadamente, por apresentar um núcleo mais desenvolvido (fig. 5). Três células localizadas inferiormente nessa coluna persistiram até mesmo após a fertilização. Essas células possivelmente, como afirmam PASTRANA e SANTOS (1931) (apud WIRTH e WITHNER, 1959), tenham função haustorial. Logo abaixo da célula mãe, formaram lateralmente duas saliências correspondentes aos primórdios dos tegumentos interno e externo. Essa célula mãe tornou-se alongada, permanecendo, entretanto, em contacto com a epiderme nucelar celular (fig. 6), como já havia sido observada em outras orquídeas por WIRTH e WITHNER (1959).

Os tegumentos formados por duas camadas de células envolveram-na deixando superiormente um pequeno espaço micropilar.

Em alguns casos verificamos que, neste estágio, o núcleo da célula-mãe se atrofiou e se degenerou (fig. 7). Os tegumentos que a envolviam cresceram normalmente. Assim, formase no final "um óvulo" sem saco embrionário.

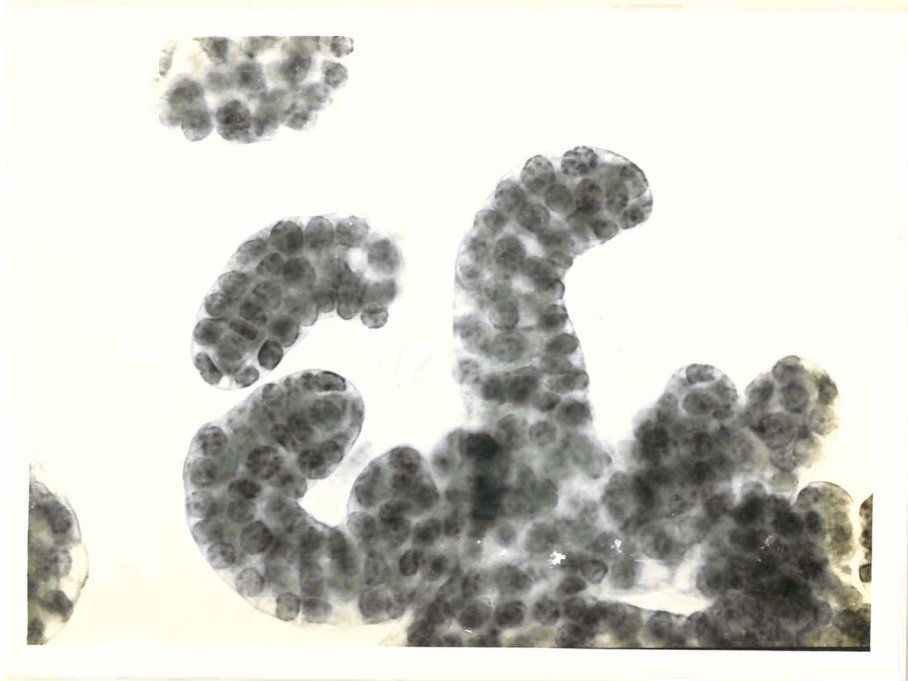
Na maioria dos casos, porém, trinta e cinco dias após a polinização a célula mãe entrou em meiose (fig. 8). Como o processo meiótico não ocorreu simultaneamente em todos os macrósporócitos pudemos encontrar células em divisão meiótica até cinquenta dias após a polinização. Após a meiose, encontramos quatro células haplóides (fig. 9), três das quais se degeneraram logo a seguir. Verificamos que a célula localizada mais inferiormente ou célula chalazal persistiu e aumentou de tamanho. O núcleo dessa célula sofreu três divisões mitóticas dando origem aos oito núcleos do saco embrionário. Nesta fase pudemos ver os óvulos, cujos sacos embrionários mostraram diferente número de núcleos no seu interior, como se pode ver nas figs. 10, 11, 12 e 13. Em muitos casos verificamos a entrada de tubos polínicos através da micrópila dos óvulos (fig. 14) e a ocorrência de fertilização.

Figura 3



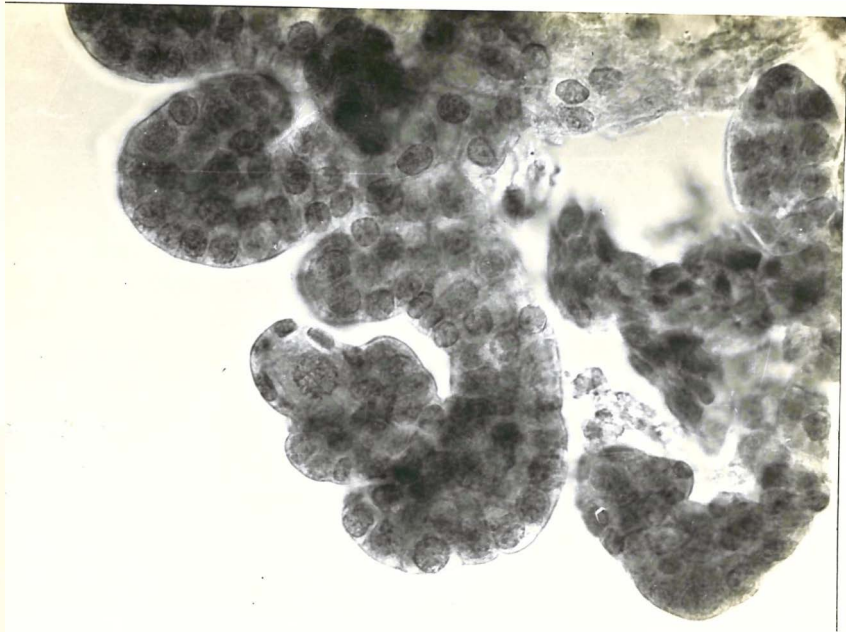
Esquema de um corte transversal do ovário. As setas indicam os feixes de tubos polínicos (Híbrido 442).

Figura 4



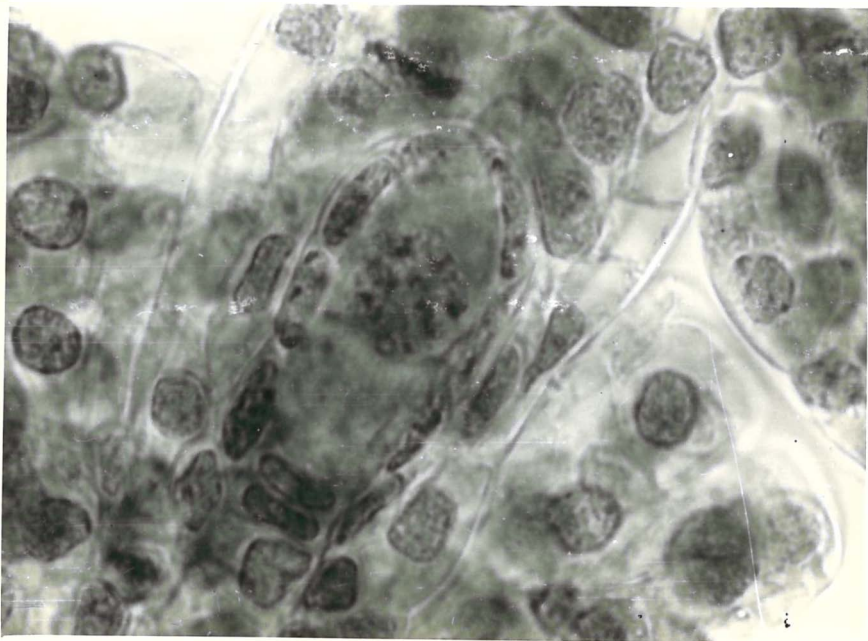
Coluna de células nucelares, delimitadas por uma epiderme unicelular. 520x (Híbrido 339).

Figura 5



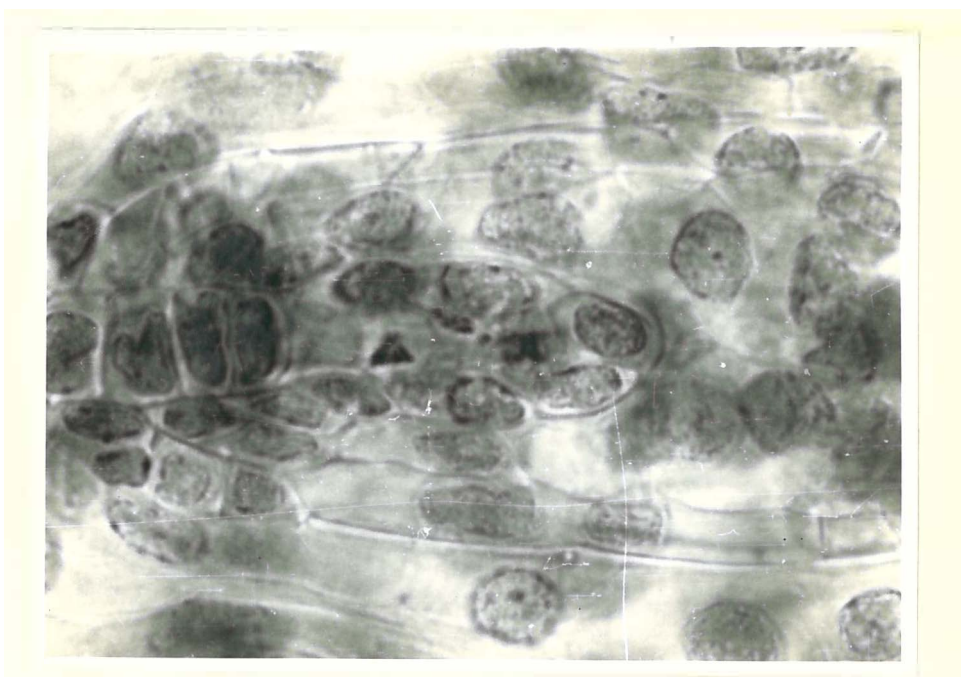
Célula mãe do macrospóro visível na extremidade de uma coluna de células nucelares. 520x (Híbrido 339).

Figura 6



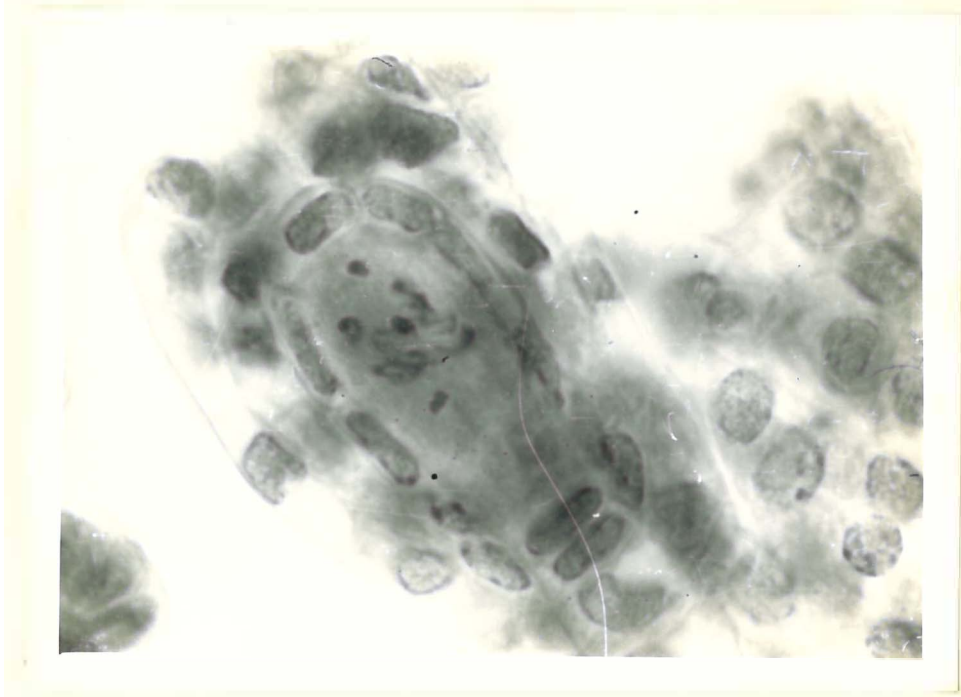
Célula mãe do macrospóro desenvolvida e limitada pelos tegumentos. 1240x (Híbrido 516).

Figura 7



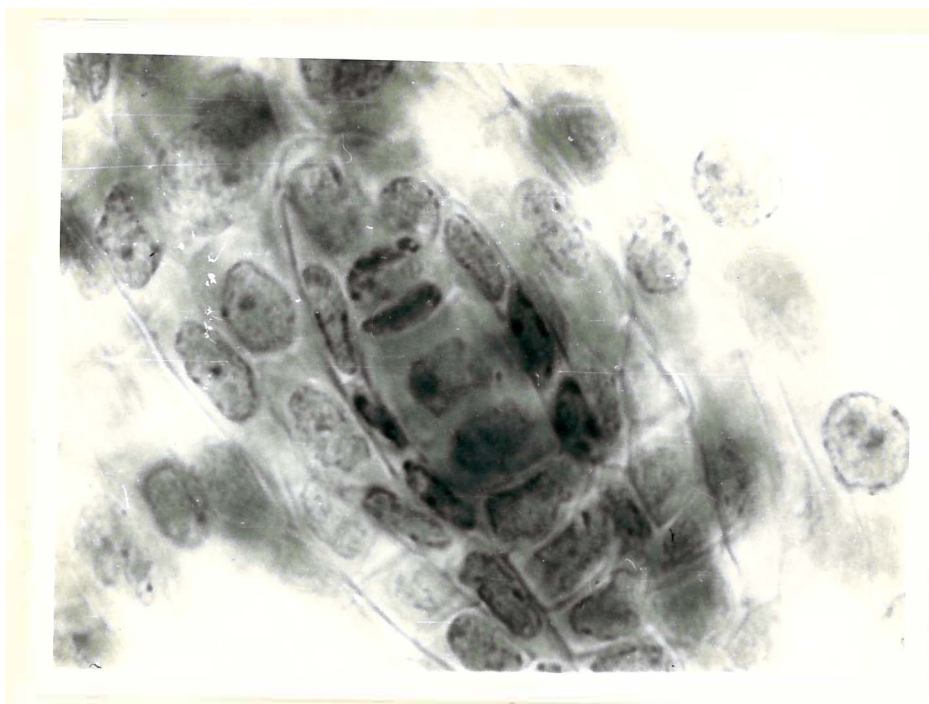
Célula mãe do macrósporo com seu núcleo degenerado
1280x. (Híbrido 442).

Figura 8



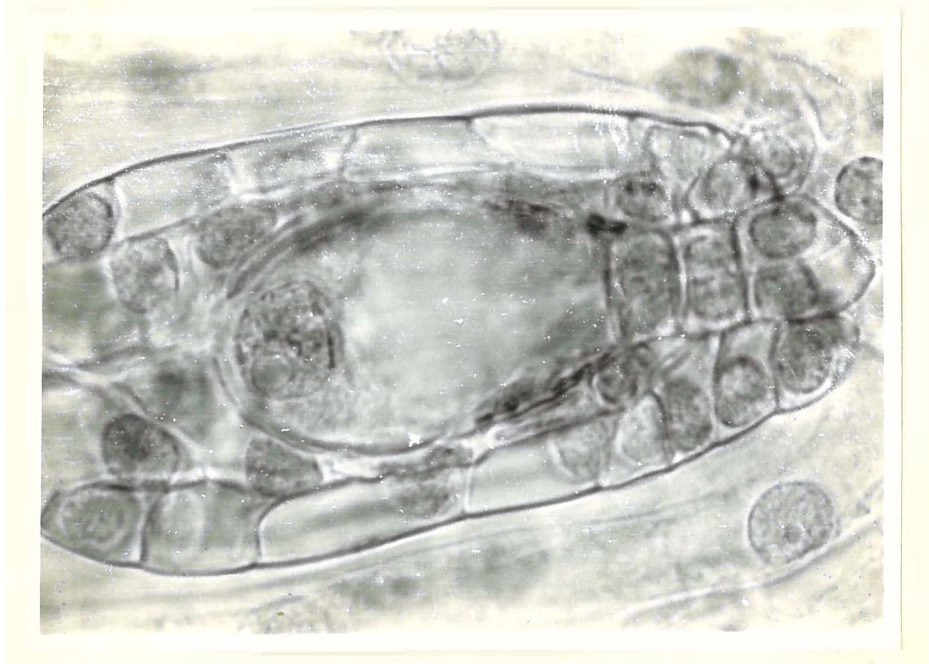
Célula mãe do macrósporo em início de divisão meiótica
1240x. (Híbrido 442).

Figura 9



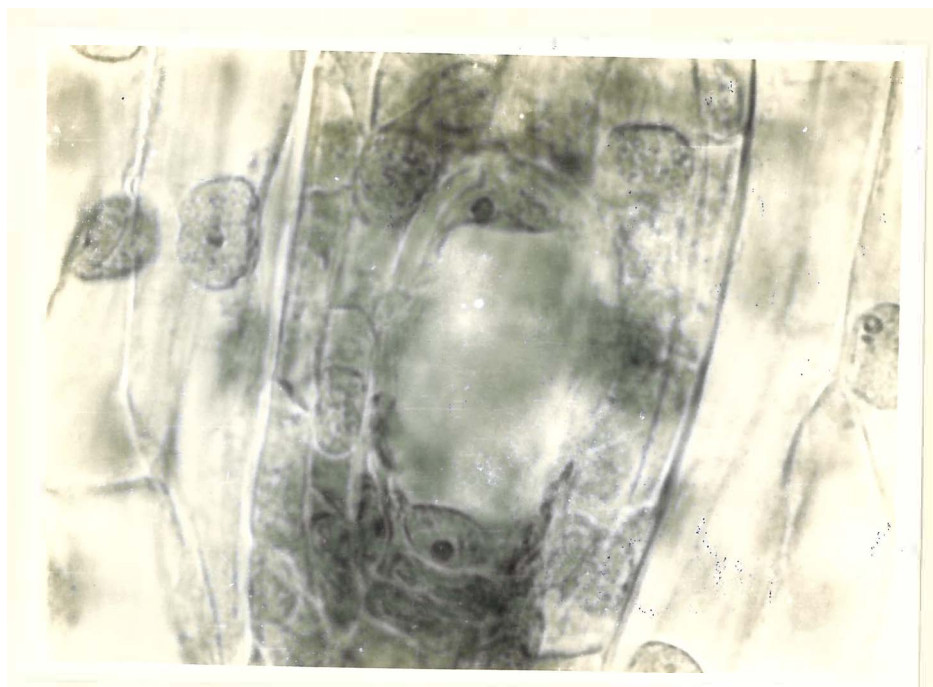
Fase final da meiose. 1280x. (Híbrido 442).

Figura 10



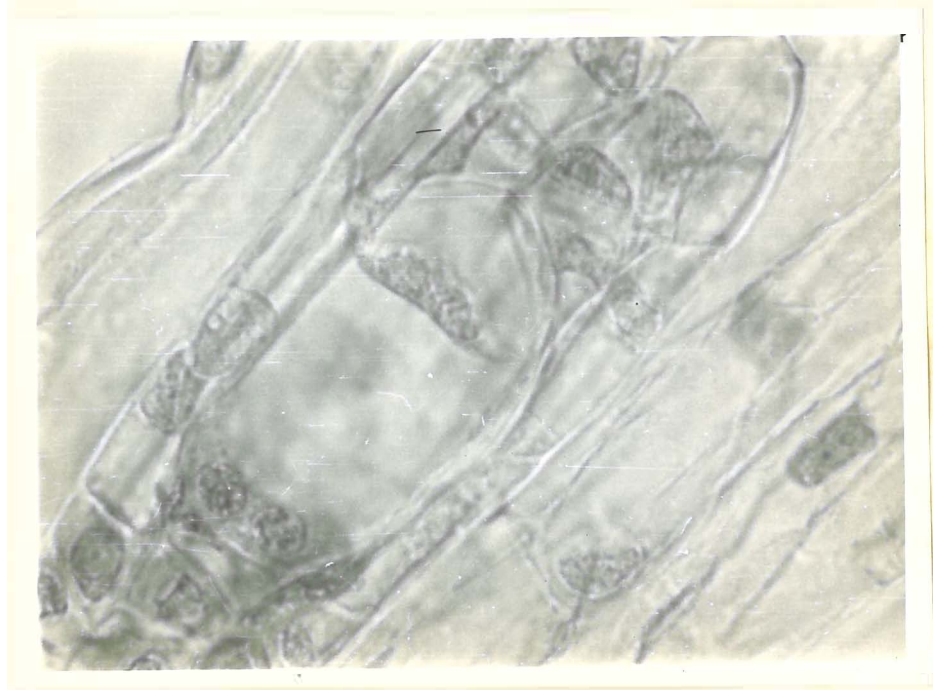
Óvulo com um núcleo no interior do saco embrionário. 1280x. (Híbrido 338).

Figura 11



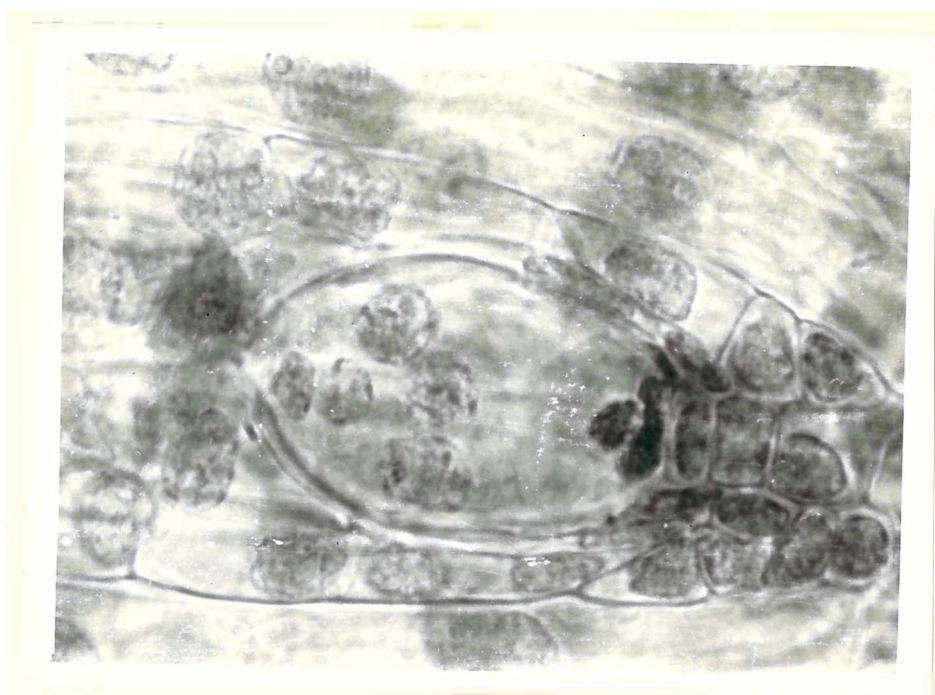
Óvulo cujo saco embrionário focalizado mostra dois núcleos no seu interior. 1280x. (Híbrido 442).

Figura 12



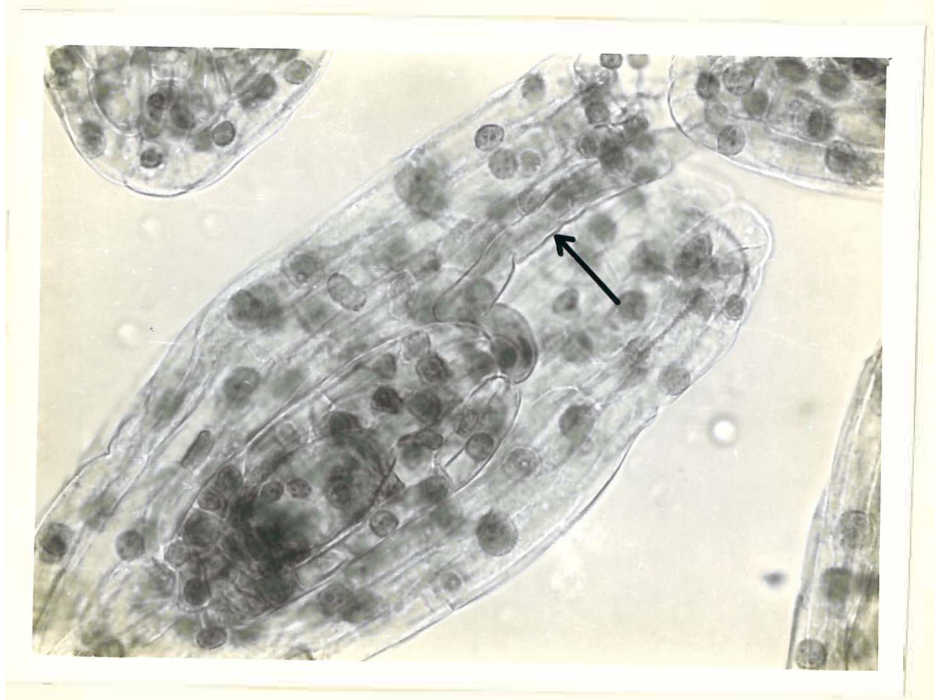
Óvulo cujo saco embrionário mostra quatro núcleos no seu interior. 1280x. (Híbrido 336).

Figura 13



Óvulo cujo saco embrionário focalizado mostra sete núcleos no seu interior. 1280x. (Híbrido 516).

Figura 14



Fertilização: tubo polínico penetrando no óvulo. 520x. (Híbrido 442).

Em alguns óvulos, encontramos, desde a micrópila, até o saco embrionário, gotículas de aspecto gelatinoso não coráveis com carmin acético a 1% (fig. 15). Não conhecemos a origem nem a função dessa substância. Sobre sua composição trataremos quando nos referirmos ao híbrido 516.

No híbrido descrito a fertilização não ocorreu em todos os óvulos. Quando ela não ocorreu o saco embrionário se degenerou (fig. 16) levando à formação de sementes sem embrião ou estéreis (fig. 17). Nos casos onde a fertilização se processou, formou-se o zigoto (fig. 18) que, por sucessivas divisões mitóticas, deu origem ao embrião. Nem todos os embriões mostraram-se bem formados, como se pode ver na figura 19.

Todo o processo de desenvolvimento intra-ovariano foi acompanhado pelo crescimento total do ovário, como já havia sido verificado por DUNCAN e CURTIS (1942), em algumas espécies de orquídeas.

No híbrido descrito as cápsulas amadureceram entre cento e cinquenta e oitenta dias após a polinização, como se pode ver tabela 2.

d) Em virtude da baixa porcentagem média de esterilidade apresentada pelo híbrido 442 não fizemos retrocruzamentos.

5.1.2. Híbrido 7

a) Espécies paternas: Cattleya guttata Lindl.
Cattleya bicolor Lindl.

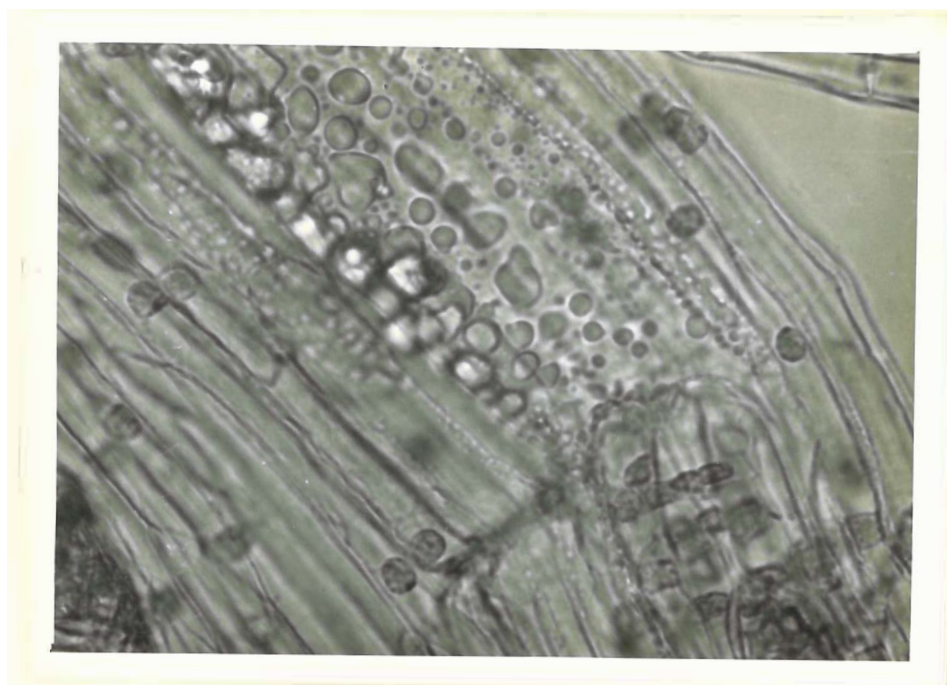
b) Híbrido registrado no Sander's Orchid, em 1901, por R.H. Measures, sob a denominação de Cattleya Mrs. Mahler.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:-

O número de cruzamentos feitos foi 14. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos atingiu a 100%.

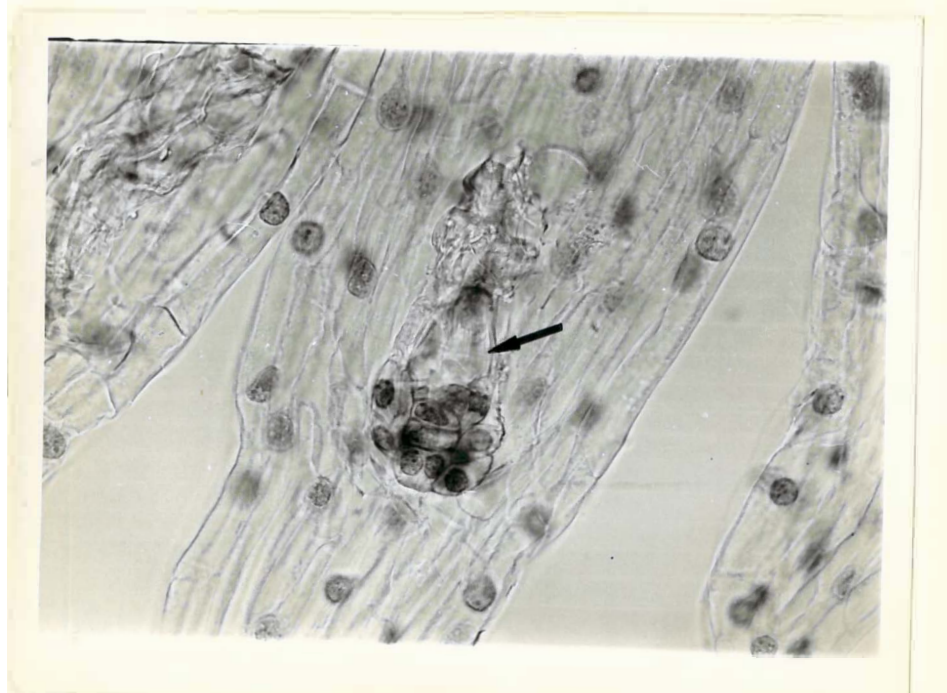
As porcentagens de sementes com e sem embrião que encontramos nesse híbrido estão relacionadas na tabela 3. Como se pode ver, em sete cápsulas analisadas a porcentagem média de sementes sem embrião foi de 57,20%, enquanto que a de sementes com embrião bem formado foi de 37,70%, e a de sementes com embrião mal formado foi de 5,08%.

Figura 15



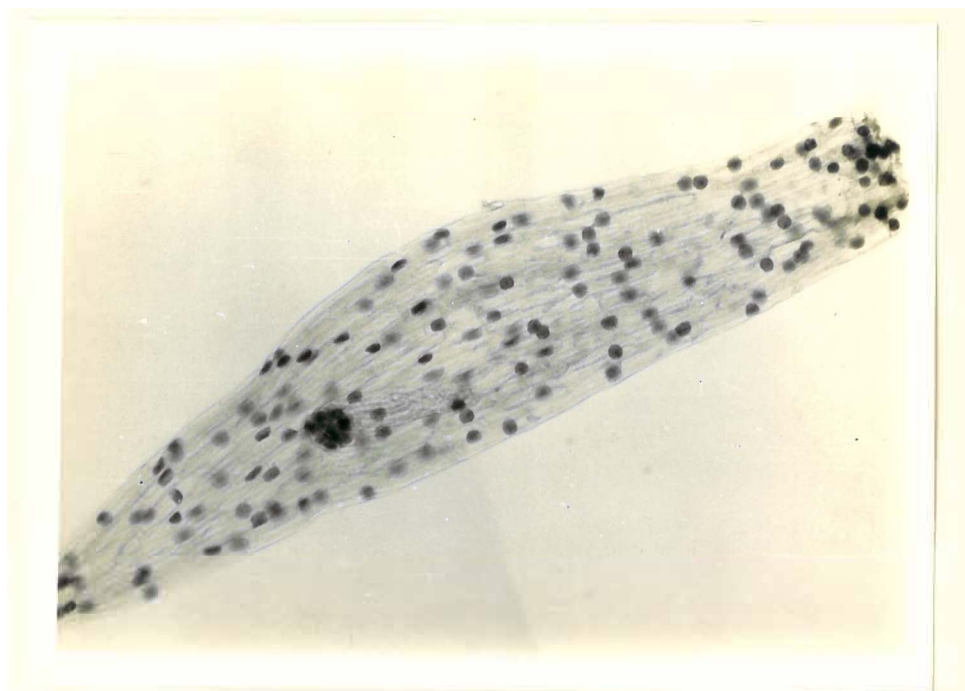
Óvulo mostrando no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos, gotículas de muco. 520x. (Híbrido 404).

Figura 16



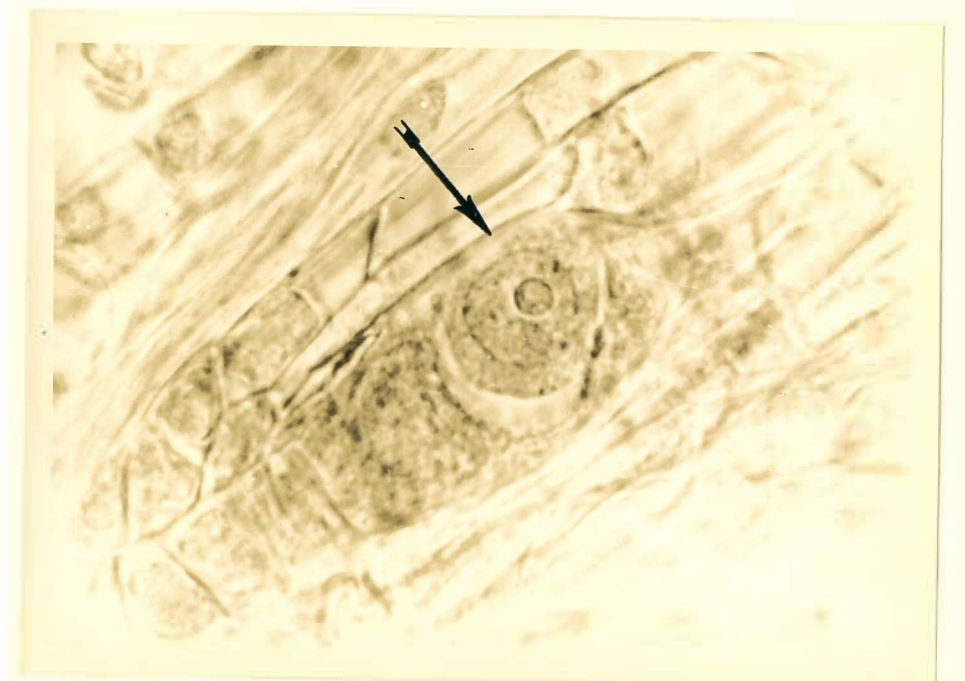
Óvulo com saco embrionário degenerado. 520x. (Híbrido 339).

Figura 17



Semente estéril. 200x. (Híbrido 487).

Figura 18



Zigoto formado após a fertilização. 1280x. (Híbrido 442).

TABELA 3

Híbrido 7 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de sementes sem embrião.	% de sementes com embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
7-3 x 7-2	36,38	46,73	16,89	229	160
7-28 x 7-2	42,70	46,71	10,59	192	160
7-2 x 7-3	48,10	43,80	8,10	185	160
7-28 x 7-1	52,17	47,83	0,00	185	160
7-1 x 7-28	67,77	32,23	0,00	202	150
7-1 x 7-3	72,31	27,69	0,00	202	150
7-6 x 7-5	81,03	18,97	0,00	174	180
	$\bar{x}=57,20$	$\bar{x}=37,70$	$\bar{x}=5,08$	T= 1369	$\bar{x}= 160$

Após a polinização, pudemos verificar, que os tubos polínicos levaram cêrca de trinta dias para crescer por todo o comprimento do ovário. Nêsse tempo, e até sessenta e cinco dias após a polinização, encontramos a célula mãe do macrós - poro saliente na extremidade de algumas colunas de células nucelares.

O processo meiótico iniciou-se, aproximadamente, trinta e cinco dias após a polinização. Coletando ovários periódicamente pudemos ver que a meiose continuou se processando até sessenta dias após a realização dos cruzamentos. Como o processo da macrosporogênese normalmente não se dá simultaneamente em todos os macrosporócitos de um ovário e nem entre macrosporócitos de diferentes ovários de um mesmo híbrido pudemos observar, nêsse tempo, óvulos com saco embrionário já formado ou em adiantada fase de formação. Encontramos, entre o material examinado, células-mãe que não entraram em meiose não levando à formação de saco embrionário, como vimos no híbrido 442.

Setenta dias após a polinização encontramos a maioria dos óvulos já formados. Nêsse período pudemos verificar, facilmente, a penetração dos tubos polínicos nos óvulos. Em alguns óvulos encontramos na abertura micropilar gotículas semelhantes às descritas no híbrido 442. Em alguns óvulos os tubos polínicos não penetraram e os sacos embrionários, nêsses casos, degeneraram.

Noventa dias após a polinização pudemos observar zigos se dividindo, ou pequenos embriões formados, assim como sementes destituídas de embrião.

As cápsulas se abriram entre cento e cinquenta e cento e oitenta dias após a polinização, como se pode ver na tatlata 3.

d) Também não fizemos retrocruzamentos pela mesma razão apresentada para o híbrido 442.

5.1.3. Híbrido 508

a) Espécies paternas: Cattleya harrisoniana Batem.
Laelia tenebrosa Rolfe.

b) Híbrido registrado no Sander's Orchid, em 1899, por Cranstoun, sob a denominação de Laeliocattleya cranstouniae.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:-

O número de cruzamentos feitos foi 32. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas foi 96,87%. Analisamos sementes de quinze cápsulas. Como podemos ver na tabela 4, a variação que observamos na porcentagem de sementes sem embrião foi de 45,06% a 93,54%. A porcentagem média de sementes sem embrião atingiu 68,25%. Entre as sementes contadas encontramos 30,37% com embrião de aspecto normal e 1,37% cujos embriões se mostraram pouco desenvolvidos.

Em observações que fizemos no material do ovário peridicamente, após a polinização, verificamos que cinquenta dias após a realização dos cruzamentos, a célula-mãe do macrósporo se mostrou visível na parte apical de algumas colunas de células nucelares. Encontramos também outras colunas de células nucelares que ainda não apresentavam a célula-mãe distinta. Tubos polínicos com dois e três núcleos foram vistos, neste período, entre essas estruturas examinadas.

Sete a dez depois; verificamos que algumas células-mãe do saco embrionário entraram em divisão meiótica.

Setenta a ~~setenta~~ e cinco dias após a polinização, verificamos que a meiose ainda se processava, ao mesmo tempo que óvulos com saco embrionário formado já podiam ser vistos. Em muitos casos verificamos que a célula mãe se degenerou, não sofrendo meiose, dando origem a "óvulos" sem saco embrionário.

Notamos também neste híbrido, como em outros já descritos, degenerescência do saco embrionário, em decorrência da não fertilização.

Noventa dias após a polinização encontramos óvulos onde a fertilização estava ocorrendo, ao lado de outros que apresentavam zigoto já formado ou um embrião pequeno.

Observações que fizemos em amostras retiradas de ovários colhidos nos dias subsequentes nos mostraram sementes sem embrião e sementes onde o processo de embriogênese estava ocorrendo.

Os frutos se abriram entre cento e noventa e cinco dias e duzentos e sessenta dias após a polinização.

d) Não obstante, a menor porcentagem média de esterilidade, não fizemos retrocruzamentos para o híbrido 508, pelo fato de começarmos a trabalhar, relativamente tarde, com este híbrido.

Tabela 4

Híbrido 508 - Resultados das contagens de sementes provenientes de cruzamentos entre plantas F₁ irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de sementes sem embrião	% de sementes c/ embrião		Total de sementes contadas	Dias en- tre a po- linização e a colheita
		Bem formado	Mal formado.		
508-26 x 508-23	45,06	54,94	0,00	233	260
508-25 x 508-23	46,24	52,02	1,74	220	170
508-26 x 508-23	48,57	51,43	0,00	210	210
508-23 x 508-25	50,63	44,94	4,43	158	240
508-25 x 508-22	60,36	39,64	0,00	164	210
508-23 x 508-26	67,52	28,63	3,85	225	210
508-23 x 508-25	69,23	29,23	1,54	195	240
508-26 x 508-30	69,71	24,03	6,26	208	240
508-12 x 508-20	75,87	24,13	0,00	257	225
508-12 x 508-20	75,97	24,03	0,00	179	195
508-27 x 508-21	76,00	24,00	0,00	175	240
508-12 x 508-20	76,82	23,18	0,00	233	225
508-13 x 508-11	82,46	17,54	0,00	154	240
508- 2 x 508-18	85,86	11,41	2,73	184	210
508-21 x 508-22	93,54	6,46	0,00	155	220
	$\bar{x}=68,25$	$\bar{x}=30,37$	$\bar{x}=1,37$	T= 2850	$\bar{x}= 222$

5.1.4. Híbrido 516.

- a) Espécies paternais: Cattleya harrisoniana Batem e Cattleya aclandiae Lindl.
- b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Doin, em 1904, com o nome de Cattleya Olenus.
- c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:-

O número de cruzamentos feito foi 28. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi 89,28%. Na tabela 5 estão os resultados obtidos em dez cápsulas analisadas. A porcentagem de sementes sem embrião variou entre 40,35% a 95,58%, o que nos deu um valor médio de sementes sem embrião igual a 71,79%. A porcentagem média de sementes com embrião bem formado foi de 25,89% e a porcentagem média de sementes com embrião mal formado foi de 2,30%.

Em observações que fizemos, periodicamente, após a polinização, verificamos que os tubos polínicos levaram trinta dias para atingir todo o comprimento do ovário. Células nucleares em colunas mostraram, em algumas delas, a célula-mãe do macrósporo já visível.

O processo meiótico iniciou-se aproximadamente quarenta dias após a polinização, prolongando-se por vinte e cinco dias. Sessenta dias após a realização dos cruzamentos muitos óvulos mostraram saco embrionário já formado.

Verificamos em vários óvulos, no espaço entre os tegumentos, desde à micrópila até o saco embrionário, a presença de uma formação especial que parecia obstruir a passagem dos tubos polínicos. Em alguns casos essa formação preenchia todo o espaço existente entre a micrópila e saco embrionário chegando mesmo, nos casos extremos, a sair fora da micrópila. (fig. 20). Em outros casos ela foi encontrada somente na porção mais próxima do saco embrionário não chegando até à micrópila (fig. 21).

Vista ao microscópio essa formação mostrou-se constituída de gotículas semelhantes às encontradas, em pequena quantidade nos híbridos já descritos. Com pequeno aumento ela nos pareceu uma massa homogênea que, quando não corada, apresentava aspecto gelatinoso. Não se corou com carmin acético a 1% e

Tabela 5

Híbrido 516 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãs entre si.

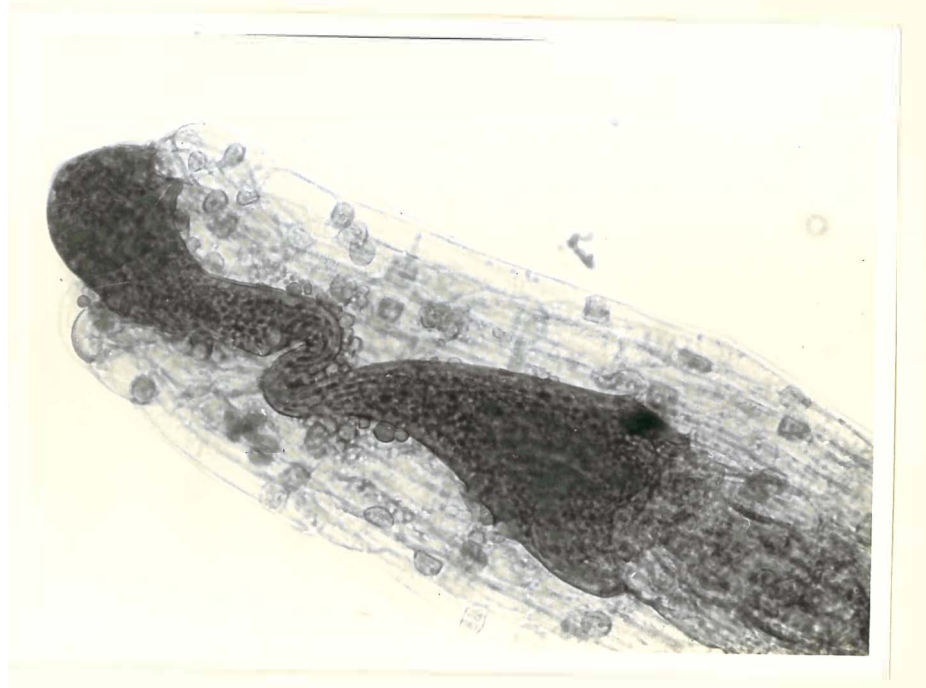
Plantas híbridas cruzadas	% de sementes sem embrião.	% de sementes c/ embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a polinização e colheita
		Bem formado	Mal formado		
516-19 x 516-9	40,35	59,65	0,00	114	240
516-19 x 516-17	49,15	47,45	3,40	118	240
516- 9 x 516-19	57,04	33,80	9,16	142	270
516- 9 x 516-17	58,11	33,88	8,01	234	240
516- 9 x 516-18	75,14	24,30	0,56	177	240
516-17 x 516-9	78,83	20,43	0,74	137	240
516-16 x 516-17	86,45	13,55	0,00	192	200
516- 9 x 516-10	86,88	13,12	0,00	122	180
516-19 x 516-10	90,41	8,38	1,21	167	240
516-14 x 516-10	95,58	4,42	0,00	249	195
	$\bar{x}=71,79$	$\bar{x}=25,89$	$\bar{x}= 2,30$	T= 1652	$\bar{x}= 227$

Figura 19



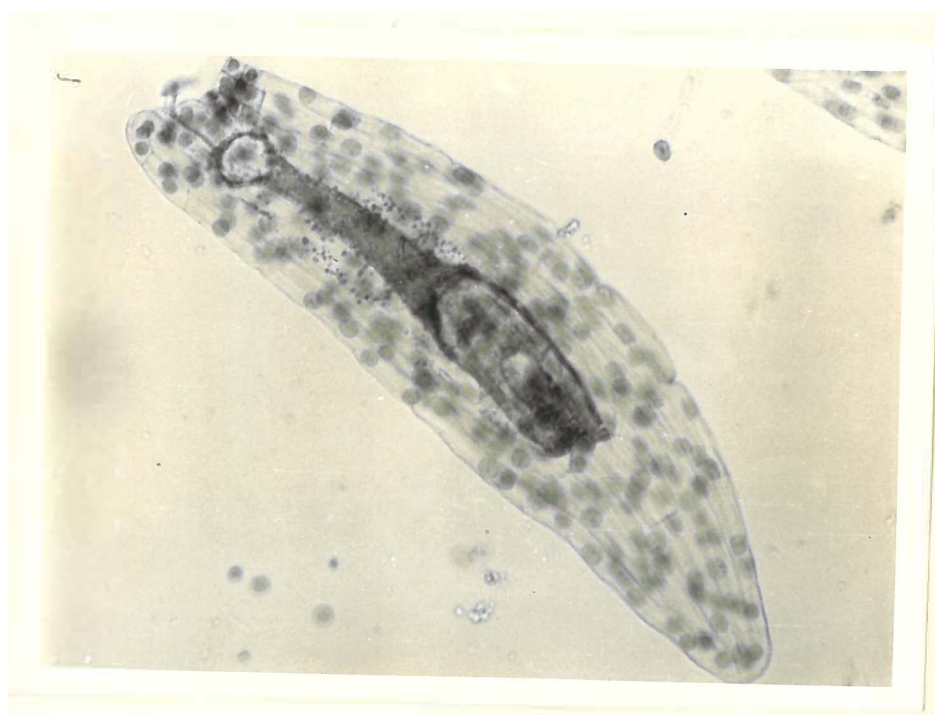
Sementes com embrião bem e mal desenvolvido. 120x.
(Híbrido 338).

Figura 20



Óvulo com formação mucosa no trajeto a ser percorri
do pelos tubos polínicos. 520x. (Híbrido 340).

Figura 21



Óvulo com formação mucosa entre a micrópila e o saco embrionário. 220x. (Híbrido 501).

nem com orceína a 1%. Mostrou-se Feulgen negativa e PAS (reação com ácido periódico Schiff) negativa. Também não deu reação positiva para os testes para calose. Tratada com azul de toluidina a 1%, corou-se muito bem em azul. Com azul de Alcian também corou-se mostrando cor azul esverdeada. Os resultados desses testes nos indicam que essa formação é constituída de mucopolissacarídeos ácidos.

Nos óvulos onde essa formação se mostrou acentuada e a fertilização não ocorreu, o saco embrionário se degenerou, sem produção de zigoto.

Quando a referida formação não se mostrou muito característica, encontramos tubos polínicos penetrando na micrópila e a ocorrência de fertilização.

Em muitos óvulos não encontramos essa formação mucosa e a fertilização ocorreu normalmente. Examinando amostras retiradas de ovários colhidos periodicamente até noventa dias após a polinização pudemos ver a ocorrência dos fenômenos descritos: fertilização, formação do zigoto, óvulos com formação mucosa e óvulos com saco embrionário em degeneração.

Tôdas as observações feitas posteriormente já nos mostraram sementes com saco embrionário degenerado, ao lado de sementes com zigoto e diferentes fases do desenvolvimento do embrião.

Os frutos amadureceram entre cento e noventa e cinco a duzentos e setenta dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:-

Fizemos retrocruzamentos para as duas espécies paternas. Os resultados obtidos constam da Tabela 6.

A porcentagem média de sementes sem embrião verificada nos retrocruzamentos do híbrido com C. harrisoniana (56,76%) foi menor do que aquela obtida no cruzamento de plantas F₁ entre si (71,79%). Só obtivemos uma cápsula nos retrocruzamentos feitos com C. aclandiae. Nesse caso o valor de sementes sem embrião foi alto (93,16%), devendo, entretanto, ser considerado que as polínias usadas estiveram guardadas por um período de doze meses.

Nos cruzamentos onde usamos a C. harrisoniana como mãe e o pólen do híbrido verificamos uma porcentagem de sementes sem embrião mais baixa (42,77%).

Tabela 6

Híbrido 516 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de sementes sem embrião	% de sementes c/ embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Ben formado	Mal formado		
516-7 x C.har241	15,89	82,75	1,36	145	240
516-14 x C.har244	59,11	40,89	0,00	203	220
516-23 x C.har244	60,00	40,00	0,00	168	270
516-3 x C.har244	72,57	27,43	0,00	237	150
516-5 x C.har237	76,23	23,77	0,00	201	200
	$\bar{x}=56,76$	$\bar{x}=42,96$	$\bar{x}= 0,27$	T = 954	$\bar{x}= 216$
516-14xC.acil.830	96,13	6,84	0,00	278	225
C.har. 242x516-8	15,17	82,75	2,08	145	240
C.har. 240x516-7	43,60	56,40	0,00	133	270
C.har. 240x516-4	46,66	53,34	0,00	135	270
C.har. 242x516-9	51,92	47,43	0,65	156	270
C.har. 242x516-6	56,52	42,99	0,49	207	220
	$\bar{x}=42,77$	$\bar{x}=56,58$	$\bar{x}= 0,64$	T = 776	$\bar{x}= 254$

A julgar por êsses dados parece-nos que a esterilidade masculina mostrou-se ligeiramente mais baixa que a feminina.

5.1.5. Híbrido 567

- a) Espécies paternas: Laelia purpurata Ldl.
Cattleya amethystoglossa Linden
& Reichb.
- b) Híbrido registrado no Sander's Orchid, em 1915, por Evans, com o nome de Lc. evansiae.
- c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 29. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas atingiu a 96,55%. Analisamos sementes de vinte e uma cápsulas e encontramos uma variação grande na frequência de sementes sem embrião, (61,66% a 100,00%). O valor médio obtido foi de 83,02%. A porcentagem média de sementes com embrião bem formado foi de 15,68% e a porcentagem média de sementes contendo embrião mal formado foi de 1,29%. Os resultados obtidos constam da tabela 7.

As observações que fizemos nos mostraram que quarenta e cinco dias após a polinização a célula-mãe do macrósporo tornou-se visível na parte superior da coluna de células nucleares. Cinco a sete dias depois a meiose teve início na célula-mãe do macrósporo.

Sessenta dias após a polinização pudemos ver a meiose ainda se processando em alguns macrósporos. Nesse mesmo tempo pudemos ver óvulos com saco embrionário em diversas fases de formação.

Os tubos polínicos foram vistos circundando os macrósporos. Em alguns casos encontramos tubos polínicos penetrando na micrópila dos óvulos e a ocorrência de fertilização. Alguns óvulos, das amostras examinadas, mostraram, no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos, a formação mucosa descrita no híbrido anterior. Em alguns óvulos ela se apresentou bem característica enquanto que em outros ela se mostrou pouco acentuada.

Análises feitas em material colhido oitenta e oitenta e cinco dias após a polinização nos mostraram óvulos com zigoto

Tabela 7

Híbrido 567 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de sementes s/ embrião.	% de sementes com embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a colheita e a linhaça
		Bem formado	Mal formado		
567 - 7 x 567-2	61,66	35,83	2,51	120	210
567 -14 x 567-6	61,75	38,25	0,00	224	135
567 - 1 x 567-6	62,12	30,30	7,58	132	135
567 - 1 x 567-19	63,05	33,75	3,20	157	135
567 -27 x 567-2	67,47	29,26	3,27	123	150
567 - 2 x 567-19	70,89	25,39	3,72	189	150
567 - 9 x 567-12	75,34	24,66	0,00	146	130
567 - 2 x 567-6	81,53	16,92	1,55	130	150
567 - 9 x 567-2	83,75	14,21	2,04	197	150
567 - 6 x 567-5	85,29	14,71	0,00	170	150
567 - 2 x 567-23	86,40	13,60	0,00	125	150
567 - 9 x 567-6	86,41	12,34	1,25	162	150
567 -12 x 567-13	89,25	10,75	0,00	149	150
567 - 9 x 567-1	89,55	8,45	2,00	201	150
567 -13 x 567-14	89,87	10,13	0,00	158	150
567 -13 x 567-12	94,31	5,69	0,00	211	150
567 - 6 x 567-13	96,07	3,93	0,00	153	150
567 - 6 x 567-14	98,85	1,15	0,00	174	150
567 - 5 x 567-13	100,00	0,00	0,00	235	150
567 - 5 x 567-13	100,00	0,00	0,00	205	150
567 - 5 x 567-13	100,00	0,00	0,00	220	150
	$\bar{x}=83,02$	$\bar{x}=15,68$	$\bar{x}=1,29$	T= 3581	$\bar{x}= 149$

formado ao lado de óvulos cujo saco embrionário se degenerou.

As observações que fizemos desde êste período até a abertura das cápsulas, que se realizou entre cento e trinta e duzentos e dez dias após a polinização, nos mostraram sementes sem embrião, ao lado de sementes com embriões, em diferentes fases do seu desenvolvimento embrionário.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos

Só fizemos retrocruzamentos com C. amethystoglossa funcionando como doadora de pólen. A porcentagem de sementes sem embrião que encontramos nas amostras examinadas, variou entre 71,65% a 100,00%. O valor médio obtido foi igual a 91,30%, isto é, um pouco maior do que o observado nos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si. Entre as sementes restantes encontramos 8,19% com embrião bem formado e 0,50% com embrião mal formado, como se pode ver na tabela 8.

5.1.6. Híbrido 404

a) Espécies paternas: Cattleya labiata Lindl

. Cattleya bicolor Lindl

b) Híbrido registrado no Snader's Orchid por E.F. Clark em 1900, como o nome de Cattleya clarkiae.

c) Resultados obtidos nos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:-

O número de cruzamentos feitos foi 27. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas foi de 92,60%. Os valores de sementes sem embrião encontrados em oito cápsulas analisadas variaram entre 63,23% a 96,27% e o valor médio de sementes sem embrião foi 85,45%. A porcentagem de sementes com embrião mal formado foi de 1,14% e a porcentagem média de sementes com embrião bem formado foi de 13,40% (tabela 9).

As observações que fizemos após a polinização nos permitiram verificar que os tubos polínicos levaram sessenta dias para crescer ao longo de todo o comprimento do ovário.

Cerca de quarenta dias após a polinização, algumas colunas de células nucelares exibiram a célula mãe do macrósporo.

Quinze a vinte dias depois encontramos, no material do ovário que examinamos, óvulos com saco embrionário já formado e outros ainda em formação. Tubos polínicos penetrando na

Tabela 8

Híbrido 567 - Resultados das contagens de sementes provenientes de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de sementes/ embrião.	% de sementes com embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a polinização e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
567 -17xC.amet.95	71,65	26,35	2,00	187	130
567 -5 xC.amet.95	95,21	4,79	0,00	146	130
567 -5 xC.amet.95	98,35	1,65	0,00	182	130
567 -4 xC.amet.95	100,00	0,00	0,00	188	130
	$\bar{x}=91,30$	$\bar{x}=8,19$	$\bar{x}= 0,50$	T = 703	$\bar{x}= 130$

Tabela 9

Híbrido 404 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de sementes/ embrião.	% de sementes com embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a polinização e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
404 - 7 x 404- 11	63,23	36,77	0,00	291	250
404 -11 x 404- 7	77,58	22,42	0,00	232	260
404 - 8 x 404- 15	83,82	9,78	6,40	235	210
404 - 8 x 404- 21	86,66	13,34	0,00	120	255
404 -18 x 404- 25	89,94	10,06	0,00	179	210
404 -18 x 404- 22	90,00	8,86	1,14	150	225
404 -26 x 404- 22	96,10	3,90	0,00	154	225
404 -18 x 404- 15	96,27	2,12	1,61	188	210
	$\bar{x}=85,45$	$\bar{x}=13,40$	$\bar{x}= 1,14$	T= 1549	$\bar{x}= 230$

na micrópila dos óvulos também puderam ser vistos nêsse período. Ao mesmo tempo, encontramos colunas de células nucelares onde a célula mãe do macrósporo ainda não havia entrado em divisão meiótica. Em alguns casos, a célula-mãe se degenerou antes de entrar em meiose.

Nos óvulos onde o saco embrionário se formou, pudemos ver o processo de fertilização ocorrendo até, aproximadamente cem dias após a polinização. Nos óvulos não fertilizados o saco embrionário se degenerou, o que levou à formação de sementes estéreis, sem embrião. As cápsulas se abriram entre duzentos e dez a duzentos e sessenta dias após a realização dos cruzamentos.

5.1.7. Híbrido 31

a) Espécies paternas: Laelia crispata Reichb

Cattleya mossiae Park ex Hook

b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Veitch e Sons, em 1863, sob a denominação de Laeliocattleya exoniensis.

c) Resultados obtidos nos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 29. A porcentagem de polinizações bem sucedidas foi 93,10%. A variação na porcentagem de sementes sem embrião, em dezenove frutos que analisamos, foi de 70,94% a 100,00%, como se pode ver na tabela 10. O valor médio de sementes sem embrião atingiu a 87,05%. Entre as sementes com embrião, encontramos 10,61% de sementes com embrião bem formado e 2,32% de sementes com embrião mal formado.

Nêsse híbrido, verificamos que os tubos polínicos levaram trinta dias para atingir todo o ovário. Durante êsse período as mudanças que ocorreram na parte interna do ovário estavam relacionadas unicamente as divisões das células nucelares que se organizavam em colunas.

Foi aproximadamente aos cinquenta dias após a polinização que a célula-mãe do saco embrionário começou a se salientar nas colunas nucelares.

Cêrca de cinquenta e cinco dias após a polinização a meiose se iniciou em algumas células-mãe do saco embrionário.

Tabela 10

Híbrido 31 - Resultados das contagens feitas oriundas de cruzamentos entre plantas F₁ irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de se- mentes sem embrião	% de sementes com embrião		Total de sementes contadas	Dias en- tre a polimiza- ção e a colheita
		Ben formado	Mal formado		
31 - 3 x 31 - 6	70,94	29,06	0,00	148	175
31 -17 x 31 - 1	73,21	26,79	0,00	224	255
31 - 8 x 31 - 2	82,44	13,29	4,25	188	150
31 -33 x 31 - 6	83,95	12,83	3,22	187	270
31 -37 x 31 -18	84,18	10,23	5,59	215	180
31 -24 x 31 - 9	84,39	13,47	2,14	141	210
31 -37 x 31 -18	84,86	12,43	2,74	185	180
31 -21 x 31 -24	85,21	10,00	4,79	230	180
31 - 6 x 31 - 5	85,41	10,00	4,59	240	195
31 - 8 x 31 -12	85,71	11,53	2,76	182	150
31 -21 x 31 - 9	87,50	12,50	0,00	104	210
31 -30 x 31 -21	87,50	8,75	3,75	160	150
31 -24 x 31 -33	87,82	7,38	4,80	271	195
31 -17 x 31 -10	88,31	11,69	0,00	231	255
30 - 4 x 31 - 1	93,42	6,58	0,00	213	150
31 -33 x 31 -24	94,61	0,59	4,80	167	210
31 -10 x 31 - 9	95,39	4,61	0,00	152	230
31 - 5 x 31 - 6	99,25	0,00	0,75	135	210
31 -21 x 31 -30	100,00	0,00	0,00	215	210
	$\bar{x}=87,05$	$\bar{x}=10,61$	$\bar{x}=2,32$	T=3588	$\bar{x}=198$

As observações que fizemos em dias subsequentes nos mostraram que setenta dias após a realização dos cruzamentos a meiose continuava se processando. Óvulos com saco embrionário formado já eram vistos junto a êsses macrosporócitos. Encontramos ainda sacos embrionários em diferentes fases de formação, mostrando diferente número de núcleos no seu interior.

Também encontramos nêsse híbrido, desde à micrópila do óvulo até o saco embrionário, formação semelhante à descrita no híbrido 516. Êsse processo foi encontrado com frequências variadas em óvulos resultantes de diferentes cruzamentos feitos com êsse híbrido.

Nos óvulos onde essa formação não foi muito acentuada e naqueles onde ela não ocorreu, pudemos verificar a ocorrência de fertilização.

Noventa dias após a polinização, as amostras que retiramos do ovário em desenvolvimento nos mostraram óvulos com zigoto formado e com restos de tubos polínicos na micrópila. Ao lado dêsses óvulos encontramos óvulos com saco embrionário degenerado.

O tempo gasto entre a polinização e o amadurecimento dos frutos foi de cento e cinquenta a duzentos e setenta dias.

5.1.8. Híbrido 435

- a) Espécies paternas: Cattleya walkeriana Gardn.
Schomburgkia crispa Lindl.
- b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.
- c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:-

O número de cruzamentos feitos foi 46. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi de 10,65%. Na única cápsula que obtivemos a porcentagem de sementes sem embrião foi de 90,35%.

Fazendo observações no material retirado do ovário, após a polinização, verificamos que os tubos polínicos levaram cerca de trinta dias para atingir todo o comprimento do ovário.

Cinco dias depois já encontramos a célula-mãe do microporo na extremidade de algumas colunas de células nucelares.

Quarenta dias após a polinização encontramos macrósporo - rócitos em meiose, ao lado de outros em que êste processo não havia ainda se iniciado.

Sessenta dias após a realização dos cruzamentos, encontramos óvulos com saco embrionário em várias fases de formação. Também nêsse híbrido encontramos óvulos com formação mucosa desde a entrada da micrópila até o saco embrionário.

Observações que fizemos em amostras retiradas de ovários colhidos em dias subsequentes mostraram óvulos com saco embrionário degenerado e uma mincria com zigoto formado.

O único fruto obtido levou cento e oitenta dias para amadurecer.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:-

Os retrocruzamentos do híbrido com Schomburgkia crispa nos deram porcentagens de sementes sem embrião entre 92,44% e 100/00% ou 95,72 de porcentagem média, como se pode ver na tabela 11.

Os retrocruzamentos do híbrido com C. walkeriana nos deram uma porcentagem média de sementes sem embrião igual a 95,22%.

Fizemos três cruzamentos de C. walkeriana usando pólen do híbrido. Obtivemos, entretanto, uma só cápsula, na qual a porcentagem de sementes sem embrião foi de 98,73%. Portanto, tantos óvulos como pólenes do híbrido mostraram-se bastante férteis. A esterilidade masculina mostrou-se superior à esterilidade feminina.

5.19. Híbrido 370

a) Espécies paternas: Cattleya intermedia Graham
Laelia crispa Reichb. f.

b) Híbrido registrado no Sander's Orchid pelo orquidário Catarinense em 1965, sob a denominação Laelio-cattleya Henrique Fuck.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 36. A porcentagem de cruzamentos que levou à produção de frutos foi de 87,80%. Analisamos sementes retiradas de 19 cápsulas e encontramos uma variação na porcentagem de sementes sem embrião entre 80,48%.

Tabela 11

Híbrido 435 - Resultados das contagens de sementes ---
oriúndas de retrocruzamentos

Retrocruzamen-	% de se- mentes - sem em-- brião	% de sementes com embrião		Total de sementes contadas	Dias en- tre a poliniza- ção e colheita
		Bem formado	Mal formado		
435-21xS.crispal304	92,44	7,56	0,00	278	180
435-21xS.crispal304	94,17	5,83	0,00	206	180
435-21xS.crispal304	96,30	3,32	0,38	271	180
436-6xS.crispa 1304	100,00	0,00	0,00	268	75
	$\bar{x} = 95,72$	$\bar{x} = 4,17$	$\bar{x} = 0,09$	T=1023	$\bar{x} = 153$
435-15xC.walk.86	94,25	5,75	0,00	209	190
435-23xC.walk.86	96,19	3,81	0,00	271	180
	$\bar{x} = 95,22$	$\bar{x} = 4,78$	$\bar{x} = 0,00$	T= 480	$\bar{x} = 185$
C.walk.86x435-11	98,73	1,27	0,00	960	180

e 100,00%, como se pode ver na tabela 12. O valor médio de sementes sem embrião atingiu a 91,92%. A porcentagem média de sementes com embrião bem formado foi de 7,17% enquanto que a porcentagem de sementes com embrião mal formado foi mais baixa (0,89%).

Verificamos, neste híbrido, que um mês após a polinização a célula-mãe do macrósporo já se mostrava visível em algumas colunas de células nucleares.

Trinta e cinco a quarenta dias após a polinização verificamos que a meiose se iniciou em muitas dessas células. Cinquenta e cinco dias após a polinização já distinguimos óvulos contendo saco embrionário com diferente número de núcleos no seu interior. A formação mucosa começou a se evidenciar em muitos óvulos.

Observações em dias subsequentes nos mostraram óvulos com zigoto formado, embriões em várias fases de desenvolvimento e óvulos cujos sacos embrionários se degeneraram. As cápsulas começaram a se abrir noventa a duzentos e setenta dias após a realização dos cruzamentos.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Os resultados que obtivemos nos retrocruzamentos estão registrados na tabela 13.

Os retrocruzamentos para Laelia crispa (macho), nos deram 100,00% de sementes sem embrião. Já os retrocruzamentos para Cattleya intermedia (macho) nos deram valores mais baixos de sementes sem embrião. O valor médio obtido neste caso foi de 82,93%. Quando L. crispa recebeu pólen do híbrido o valor médio de sementes sem embrião foi de 81,88%, portanto, mais alto que o valor obtido com os cruzamentos com C. intermedia que foi de 78,97%.

De um modo geral, os dados indicam que tanto o pólen como os óvulos do híbrido são altamente estéreis.

5.1.10. Híbrido 1525

a) Espécies paternas: Cattleya loddigesii Lindl.
Laelia cinnabarina Batem.

b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Fournier, em 1901 sob a denominação de Laeliocattleya Gladys.

TABELA 12

Híbrido 370 - Resultados de contagens de sementes oriundas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de Sementes - sem embrião.	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
370-15x370-11	80,48	19,52	0,00	82	180
370-11x370- 8	83,47	14,04	2,49	121	270
370- 1x370-17	84,61	15,39	0,00	130	180
370- 4x370- 2	86,22	12,24	1,54	196	180
370-17x370-21	87,07	12,93	0,00	147	170
370- 1x370- 9	88,64	9,18	2,18	185	180
370-15x370- 8	89,75	7,22	3,03	166	165
370-17x370- 1	90,34	8,27	1,39	145	180
370- 9x370-17	90,97	8,33	0,70	144	190
370-28x370- 8	92,66	4,58	2,76	109	165
370-28x370- 2	92,77	6,42	0,81	249	180
370-11x370-15	95,36	3,97	0,67	151	180
370- 9x370- 1	96,02	3,31	0,67	151	150
370- 8x370-11	96,37	3,63	0,00	138	120
370-22x370-21	96,59	3,41	0,00	169	120
370- 8x370-11	97,36	2,64	0,00	152	120
370- 8x370- 7	98,60	0,69	0,71	143	90
370- 6x370- 5	99,37	0,63	0,00	159	130
370- 6x370- 5	100,00	0,00	0,00	179	130
	$\bar{x}=91,92$	$\bar{x}= 7,17$	$\bar{x}= 0,89$	T=2916	$\bar{x}= 162$

TABELA 13

Híbrido 370 - Resultados das contagens de sementes -- oriúndas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes - sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias entre a semente e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
370-38xL.crispa 3955	100,00	0,00	0,00	240	150
370-4xL.crispa 3955	100,00	0,00	0,00	161	90
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}=0,00$	$\bar{x}=0,00$	T=401	$\bar{x}=120$
370-31xC.int.231	66,45	29,03	4,52	155	225
370-25xC.int.231	99,41	0,59	0,00	171	150
	$\bar{x}=82,93$	$\bar{x}=14,81$	$\bar{x}=2,26$	T=326	$\bar{x}=187$
C.int.231x370-11	66,45	33,55	0,00	873	240
C.int.231x370-8	91,50	8,50	0,00	200	240
	$\bar{x}=78,97$	$\bar{x}=21,02$	$\bar{x}=0,00$	T=1073	$\bar{x}=240$
L.crispa 105x370-8	76,82	23,18	0,00	151	225
L.crispa 105x370-1	86,95	13,05	0,00	115	225
	$\bar{x}=81,88$	$\bar{x}=18,11$	$\bar{x}=0,00$	T=266	$\bar{x}=225$

c) Resultados obtidos nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 31. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi de 93,54%. As sementes analisadas após retirarmos amostras de nove cápsulas, nos deram valores de sementes sem embrião que variaram entre 67,32% e 100,00%. Os resultados obtidos estão registrados na tabela 14. Como se pode ver, a frequência de sementes contendo embrião mal formado, nesse híbrido, não foi alta, tendo atingido 0,81%. A frequência de sementes contendo embrião bem formado foi de 7,23%. O valor média de sementes sem embrião atingiu a 91,95%.

Dez dias após a polinização verificamos que os tubos polínicos já haviam atingido toda a coluna. Na porção ovariana propriamente dita, encontramos células nucelares organizando-se em colunas. Somente quarenta dias após a polinização é que encontramos tubos polínicos em toda a extensão do ovário. Sessenta dias após a polinização, a célula-mãe do macrósporo era visível na extremidade de algumas colunas de células nucelares. A meiose começou dez dias depois. Como nos outros híbridos, verificamos também que, algumas células-mãe se degeneraram, sem levar à produção de saco embrionário. Oitenta dias após a polinização pudemos ver alguns óvulos com saco embrionário formando-se ao lado de macrósporócitos em meiose. Entre noventa e cento e cinquenta dias após a polinização, encontramos óvulos onde a fertilização se processava, ao lado de óvulos que mostravam formação mucosa. Também nesse híbrido os óvulos não fecundados degeneraram. Observações posteriores nos mostraram sementes sem embrião e outras, onde a embriogênese estava se processando. As cápsulas começaram a se abrir entre setenta e duzentos e quarenta dias após a polinização. Em um único caso, como se pode ver na tabela 14, o tempo entre a polinização e abertura do fruto atingiu a quatrocentos e dez dias.

d) Pela dificuldade encontrada, também não fizemos retrocruzamentos com este híbrido.

TABELA 14

Híbrido 1525 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas híbridas cruzadas	% de Sementes sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias entre a aplicação e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
1525-6x1525-11	67,32	32,68	0,00	101	410
1525-3x1525-6	80,83	17,50	1,67	120	240
1525-14x1525-12	89,52	10,48	0,00	186	210
1525-14x1525-13	94,89	0,00	5,11	196	150
1525-24x1525-24	97,31	2,15	0,54	186	240
1525-11x1525-8	98,16	1,84	0,00	218	75
1525-8x1525-1	99,54	0,46	0,00	221	150
1525-1x1525-8	100,00	0,00	0,00	146	150
1525-8x1525-1	100,00	0,00	0,00	206	150
	$\bar{x} = 91,95$	$\bar{x} = 7,23$	$\bar{x} = 0,81$	$T \hat{=} 1580$	$\bar{x} = 197$

5.1.11. Híbrido 339

- a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl.
Cattleya harrisoniana Batem.
- b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.
- c) Resultados obtidos nos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 57. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas foi de 85,96%. Como se pode ver na tabela 15 as porcentagens de sementes sem embrião foram altas, acima de 95,45%. A porcentagem média de sementes sem embrião atingiu a 98,72%. Entre as sementes com embrião encontramos 0,52% com embrião bem constituído e 0,74% com embrião pouco desenvolvido.

Trinta dias após a polinização encontramos tubos polínicos em todo o comprimento do ovário. Encontramos também, no ovário, células da placenta em divisão e se organizando em colunas de células.

Trinta e cinco dias após a realização dos cruzamentos pudemos ver a célula-mãe do macrósporo salientando-se das demais na extremidade das colunas de células nucelares. Quarenta dias após a polinização a meiose se iniciou. Também neste híbrido algumas células-mãe do macrósporo não entraram em meiose não levando portanto, à formação de saco embrionário. Sessenta dias após a polinização verificamos que a meiose continuava se processando em alguns macrósporócitos. Nesse tempo, já encontramos óvulos contendo saco embrionário formado. Uma semana depois pudemos ver em alguns óvulos a formação mucosa, enquanto que em outros essa formação não ocorreu e a fertilização se processou. Noventa dias após a polinização a grande maioria de sacos embrionários já havia se degenerado dentro dos óvulos. Nos outros óvulos, contendo saco embrionário, encontramos zigoto formado ou pequeno embrião. As cápsulas amadureceram entre setenta e cinco a cento e cinquenta dias após a polinização, como se pode ver na tabela 15.

- d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Os retrocruzamentos com C. harrisoniana (macho) nos deram uma média de 98,03% de sementes sem embrião. Com Brassavola

TABELA 15

Híbrido 339 - Resultados das análises de sementes -- oriúndas de cruzamentos entre plantas F₁ irmãs entre si.

Plantas F ₁ Cruzadas	% de Se- mentes -- sem em- brião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias en- tre a po- linização e a co- lheita
		Bem formado	Mal formado		
339-19x339-27	95,45	3,40	1,15	176	150
339-13x339-15	96,25	0,00	3,75	160	150
339-15x339- 4	96,78	3,22	0,00	249	150
339-32x339-20	97,46	0,00	2,54	158	120
339- 1x339- 3	98,15	0,00	1,85	163	130
339-16x339-20	98,42	1,04	0,54	191	120
339- 1x339-9	98,73	1,27	0,00	316	170
339-16x339-11	98,88	0,55	0,57	180	120
339-30x339-32	99,06	0,54	0,40	250	105
339-31x339-37	99,26	0,00	0,74	273	75
339-37x339-11	99,27	0,00	0,73	277	105
339-32x339-30	99,44	0,00	0,56	180	120
339-21x339-37	99,51	0,00	0,49	207	120
339-14x339-10	99,56	0,00	0,44	232	120
339- 4x339- 8	99,60	0,00	0,40	230	120
339- 4x339-30	100,00	0,00	0,00	142	120
339-10x339-30	100,00	0,00	0,00	219	120
339-20x339-15	100,00	0,00	0,00	204	120
339-30x339-10	100,00	0,00	0,00	219	120
	\bar{x} = 98,72	\bar{x} = 0,52	\bar{x} = 0,74	T = 4096	\bar{x} = 123

perrinii (macho) o valor médio encontrado atingiu a 99,69%. (tabela 16). O valor médio encontrado nas sementes formadas nas polinizações de C. harrisoniana com pólen do híbrido foi de 93,61%; enquanto que nas polinizações de B. perrinii com pólen do híbrido o valor médio obtido foi de 94,89%. Portanto a esterilidade parece existir tanto no pólen como no óvulo do híbrido. No pólen a esterilidade nos pareceu ser um pouco menor.

5.1.12. Híbrido 337

- a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl.
Cattleya leopolddi Verschaf.
- b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Martin, em 1898, como o nome de Brassocattleya belairenses.
- c) Resultados obtidos nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 46. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas foi de 58,69%.

Na tabela 17 constam os resultados obtidos de análises que fizemos em sementes F_2 retiradas de doze frutos. As frequências de sementes sem embrião que encontramos foram altas, superiores a 96,82%. A porcentagem média de sementes sem embrião extraída dos valores encontrados atingiu a 99,20%. Entre o restante encontramos 0,43% de sementes com embrião bem formado e 0,36% com embrião pequeno ou mal formado.

Verificamos que trinta dias após a polinização os tubos polínicos atingiram todo o comprimento do ovário.

A célula-mãe do macrósporo já se mostrou visível em algumas colunas de células nucleares.

Uma semana depois a meiose se iniciou em algumas células-mãe. Esse processo prolongou-se por dez a quinze dias, quando já pudemos ver óvulos com saco embrionário formado, ou em fase de formação. Também encontramos muitos óvulos que mostravam a formação mucosa. Tivemos oportunidade de ver também essa formação em alguns macrósporócitos onde a célula-mãe do macrósporo estava em divisão meiótica. Nesses casos os macrósporócitos se degeneraram sem concluir a meiose.

TABELA 16

Híbrido 339 - Resultados das contagens de sementes --- oriúndas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes - sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a produção e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
339-11xC.harr.241	94,94	0,00	5,06	277	120
339-13xC.harr.241	95,92	0,00	4,08	221	120
339-15xC.harr.241	96,02	3,98	0,00	277	120
339-16xC.harr.241	96,03	0,99	2,98	202	120
339-13xC.harr.241	96,72	0,00	3,28	214	120
339-16xC.harr.241	96,81	3,19	0,00	251	120
339- 4xC.harr.241	97,68	0,46	1,86	216	120
339-20xC.harr.241	98,83	1,17	0,00	171	120
339-20xC.harr.241	99,57	0,43	0,00	235	120
339- 3xC.harr.241	100,00	0,00	0,00	172	120
339- 9xC.harr.241	100,00	0,00	0,00	183	120
339-30xC.harr.241	100,00	0,00	0,00	189	100
339-26xC.harr.241	100,00	0,00	0,00	191	120
339-29xC.harr.241	100,00	0,00	0,00	154	120
	$\bar{x} = 98,03$	$\bar{x} = 0,73$	$\bar{x} = 1,23$	T=2953	$\bar{x}=118$
339-25xB.perr.155	97,02	0,00	2,98	202	120
339-25xB.perr.155	99,59	0,00	0,41	249	120
339- 3xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	185	120
339-11xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	202	120
339-16xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	179	120
339-22xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	227	120
339-29xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	146	120
339-26xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	221	120
339-30xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	218	120
339-30xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	225	120
339-37xB.perr.155	100,00	0,00	0,00	251	120
	$\bar{x} = 99,69$	$\bar{x} = 0,00$	$\bar{x} = 0,30$	T=2305	$\bar{x}=120$
C.harr.241x339-22	91,91	8,09	0,00	223	270
C.harr.241x339-10	92,88	7,12	0,00	281	300
C.harr.241x339-23	96,04	3,96	0,00	177	270
	$\bar{x} = 93,61$	$\bar{x} = 6,39$	$\bar{x} = 0,00$	T= 681	$\bar{x}=280$
B.perr.155x339-32	93,50	3,89	2,61	154	120
B.perr.155x339-32	94,01	2,99	3,00	167	120
B.perr.155x339-22	94,76	5,24	0,00	172	130
B.perr.155x339-11	97,31	2,69	0,00	186	130
	$\bar{x} = 94,89$	$\bar{x} = 3,70$	$\bar{x} = 1,40$	T= 679	$\bar{x}=125$

TABELA 17

Híbrido 337 - Resultados das contagens de sementes -- oriúndas de cruzamentos entre plantas F_1 irmãos entre si.

Plantas F_1 Cruzadas	% de Se- mentes - sem em- brião	% de Sementes com Embrião		Total - de semen- tes con- tadas	Dias en- tre a po- linização e a co- lheita
		Bem formado	Mal formado		
337-35x337-32	96,82	3,18	0,00	126	120
337-12x337-20	97,94	0,00	2,06	146	150
337-27x337-26	98,00	2,00	0,00	153	120
337-30x370-31	98,71	0,00	1,29	156	150
337-30x370-20	98,97	0,00	1,03	95	150
337-27x337-30	100,00	0,00	0,00	153	120
337-27x337-26	100,00	0,00	0,00	153	120
337-22x337-33	100,00	0,00	0,00	128	105
337-26x337-12	100,00	0,00	0,00	100	120
337- 8x337- 7	100,00	0,00	0,00	248	120
337-18x337-21	100,00	0,00	0,00	227	150
337- 2x337-11	100,00	0,00	0,00	290	120
	\bar{x} = 99,20	\bar{x} = 0,43	\bar{x} = 0,36	T=1975	\bar{x} = 128

As observações que fizemos em dias subsequentes nos mostraram poucas variações no material intra-ovariano.

Aos setenta dias após a polinização encontramos óvulos com zigoto e uma grande maioria de óvulos cujos sacos embriônicos se degeneraram. As cápsulas amadureceram entre cento e cinco e cento e cinquenta dias após a realização dos cruzamentos; como se pode ver na tabela 17.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Registramos na tabela 18 os valores que encontramos nos retrocruzamentos:

Os retrocruzamentos do híbrido com Cattleya leopoldii (macho), nos deram um valor médio de sementes sem embrião igual a 100,00%. Também quando o retrocruzamento foi feito com Brassavola perrinii (macho), na única cápsula obtida, não encontramos sementes com embrião.

Os cruzamentos de Brassavola perrinii com pólen do híbrido, nos deram uma frequência média de sementes sem embrião igual a 98,37%.

De cinco polinizações que fizemos em C. leopoldii usando pólen do híbrido obtivemos somente uma cápsula onde a porcentagem de sementes sem embrião foi de 97,31%. Também neste híbrido, a esterilidade aparentemente mostrou-se alta no pólen e no óvulo.

5.1.13. Híbrido 336

a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl
Cattleya forbesii Lindl

b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 69. A porcentagem de sucesso nas polinizações foi 60,86%.

Sementes F_2 analisadas nos deram um valor médio de esterilidade igual a 99,29%. Como se pode ver na tabela 19, onde constam os resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si, os valores de sementes sem embrião obtidos oscilam entre 93,37% e 100,00%. O valor médio de sementes com embrião

TABELA 18

Híbrido 337 - Resultados das contagens de sementes -- oriúndas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes - sem embrião.	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias em que a semente se aprofundou e colheita
		Bem formado	Mal formado		
337-22xC.leop. 59	100,00	0,00	0,00	198	120
337-22xC.leop. 59	100,00	0,00	0,00	285	105
337-22xC.leop. 59	100,00	0,00	0,00	215	105
337-25xC.leop. 59	100,00	0,00	0,00	203	105
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}=0,00$	$\bar{x} = 0,00$	T= 901	$\bar{x}= 108$
337-36xB. perr. 153	100,00	0,00	0,00	197	120
B. perr. 154x337-5	96,84	3,16	0,00	222	130
B. perr. 154x337-8	99,06	0,47	0,47	213	230
B. perr. 154x337-12	99,21	0,38	0,41	632	230
	$\bar{x}= 98,37$	$\bar{x}=1,33$	$\bar{x}= 0,29$	T=1067	$\bar{x}= 196$
C.leop. 59x337-8	97,31	2,69	0,00	186	120

TABELA 19

Híbrido 336 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F₁ irmãs entre si.

Plantas F ₁ Cruzadas	% de Sementes - sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de sementes - contadas	Dias entre a colheita e a linização
		Bem formado	Mal formado		
336-23x336-21	93,37	6,	0,00	166	135
336-19x336-25	98,22	1,33	0,45	225	120
336-29x336-23	99,02	0,00	0,98	205	105
336-34x336-12	99,30	0,00	0,70	143	150
336-25x336-19	99,45	0,00	0,55	183	120
336-19x336-20	99,45	0,00	0,55	185	120
336- 1x336-19	99,46	0,00	0,54	188	120
336-26x336-25	99,48	0,00	0,52	193	150
336-10x336-17	99,56	0,00	0,44	232	120
336-23x336-25	100,00	0,00	0,00	90	198
336-23x336-25	100,00	0,00	0,00	120	184
336-13x336-19	100,00	0,00	0,00	120	172
336- 1x336-13	100,00	0,00	0,00	90	240
336-10x336- 1	100,00	0,00	0,00	100	224
336- 1x336-17	100,00	0,00	0,00	120	207
336-4 x336-25	100,00	0,00	0,00	120	146
336-17x336-23	100,00	0,00	0,00	120	230
336-27x336-23	100,00	0,00	0,00	120	201
	\bar{x} = 99,29	\bar{x} = 0,44	\bar{x} = 0,26	T=2720	\bar{x} = 163

ben formado foi de 0,44%, enquanto que a porcentagem média de sementes com embrião mal formado foi de 0,26%.

As observações realizadas periodicamente depois da realização dos cruzamentos, nos mostraram que trinta dias após a polinização os tubos polínicos não cresceram o suficiente para atingir todo o ovário, alcançando somente metade do seu comprimento.

Quarenta dias após a polinização a meiose se iniciou em algumas células-mãe do macrósporo. As células nucelares em colunas foram vistas ainda nesta fase ao lado de colunas de células nucelares onde a célula-mãe do macrósporo se mostrava visível.

As observações que fizemos em material colhido após quinze dias nos mostraram poucos tubos polínicos chegando à parte final do ovário. A meiose continuou se processando ao lado de células-mãe que não entraram ainda nesse processo. Encontramos também alguns casos de degeneração da célula-mãe do saco embrionário.

Sessenta dias após a polinização encontramos óvulos em diferentes fases de formação, mostrando no interior do saco embrionário de um até oito núcleos. A formação mucosa foi vista nesse período. Em alguns óvulos onde esse processo não se mostrou muito acentuado e em outros nos quais ele não se formou, pudemos ver a fertilização ocorrer.

As observações que fizemos nos dias subsequentes nos mostraram que aproximadamente oitenta dias após a polinização o ovário apresentava óvulos contendo saco embrionário degenerado, sementes totalmente vazias ou estéreis e sementes com zigoto ou com pequeno embrião.

As cápsulas começaram a se abrir entre noventa e cinco a duzentos e trinta e dois dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Os resultados de retrocruzamentos que fizemos com esse híbrido podem ser encontrados na tabela 20. Os retrocruzamentos do híbrido com B. perrinii (macho) nos deram valores de sementes sem embrião, que oscilaram entre 92,45% e 100,00%, sendo o valor médio igual a 98,38%. Os retrocruzamentos com C. forbesii (macho) nos deram valores de sementes sem embrião acima de 96,69% como se pode ver na tabela 20. A porcentagem

TABELA 20

Híbrido 336 - Resultados de contagens efetuadas em sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes - sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total - de Sementes - contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
336-8xB. perr.153	92,45	7,55	0,00	212	240
336-7xB. perr.153	99,45	0,55	0,00	183	180
336-22xB. perr.151	100,00	0,00	0,00	244	120
336-4xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	286	120
336-23xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	201	120
	$\bar{x} = 98,38$	$\bar{x} = 1,62$	$\bar{x} = 0,00$	T=1126	$\bar{x} = 156$
336-24xC. forb. 34	96,69	3,31	0,00	272	200
336-24xC. forb. 34	97,09	2,91	0,00	344	200
336- 8xC. forb. 34	97,76	2,24	0,00	244	200
336-30xC. forb. 34	99,37	0,31	0,32	318	140
336-22xC. forb. 34	100,00	0,00	0,00	213	120
336-34xC. forb. 34	100,00	0,00	0,00	262	120
336-25xC. forb. 34	100,00	0,00	0,00	258	120
336- 8xC. forb. 34	100,00	0,00	0,00	300	120
	$\bar{x} = 98,86$	$\bar{x} = 1,09$	$\bar{x} = 0,04$	T=2211	$\bar{x} = 152$
C. forb. 33x336-14	92,95	7,05	0,00	227	240
C. forb. 33x336-5	97,89	2,11	0,00	237	200
C. forb. 34x336-20	100,00	0,00	0,00	203	75
	$\bar{x} = 96,94$	$\bar{x} = 3,05$	$\bar{x} = 0,00$	T= 667	$\bar{x} = 171$
B. perr.154x336-9	95,60	3,66	0,74	273	200

média de sementes sem embrião, nêsse caso atingiu 98,86%.

Plantas de C. forbesii polinizadas com pólen do híbrido 336, nos deram três cápsulas dos cinco cruzamentos feitos. O valor médio de sementes sem embrião foi de 96,94%.

Embora tenhamos feito cinco cruzamentos de B. perrinii usando polínias do híbrido, obtivemos uma única cápsula, onde a porcentagem de sementes sem embrião foi de 95,60%.

Como nos outros híbridos tanto óvulos como pólen mostraram-se altamente estéreis.

5.1.14. Híbrido 338

- a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl.
Cattleya harrisoniana Batem.

Êste híbrido é resultante do cruzamento das mesmas espécies paternas que originaram o híbrido 339. As plantas usadas na produção dos híbridos, entretanto não foram as mesmas.

- b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.
c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 47. A porcentagem de cruzamentos que levou à produção de frutos foi 74,46%.

As sementes F_2 analisadas foram retiradas de 25 cápsulas. Como se pode ver na tabela 21, a variação na porcentagem de sementes sem embrião foi de 95,94% a 100,00%, o que deu um valor médio de 99,33%.

A porcentagem média de sementes com embrião bem formado foi de 0,12%; a porcentagem média de sementes com embrião mal formado foi de 0,54%.

Nêste híbrido os tubos polínicos levaram trinta dias para atingir todo o comprimento do ovário.

As amostras de material intra-ovariano que analisamos periodicamente, nos mostraram que as modificações ocorridas estavam relacionadas à divisão das células nucelares e na sua disposição em colunas as quais gradativamente foram se tornando inclinadas.

Nas observações que fizemos trinta e cinco dias após a polinização pudemos ver a célula-mãe do macrósporo na extremidade

TABELA 21

Híbrido 338 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos entre plantas F₁ irmãs entre si.

Plantas F ₁ Cruzadas	% de Sementes sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de sementes contadas	Dias entre a polinização e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
338-13 x 338-9	95,94	2,03	2,03	148	130
338-13 x 338-5	98,18	0,60	1,22	165	130
338-22 x 338-5	98,31	0,00	1,69	178	120
338-10 x 338-9	98,57	0,00	1,43	140	120
338-26 x 338-22	98,60	0,00	1,40	215	150
338-19 x 338-9	98,80	0,00	1,20	177	130
338-22 x 338-5	99,11	0,00	0,89	227	120
338-16 x 338-13	99,13	0,00	0,87	116	120
338- 3 x 338-13	99,16	0,45	0,39	260	120
338-22 x 338-12	99,34	0,00	0,66	152	120
338-27 x 338-13	99,40	0,00	0,60	168	150
338-27 x 338-13	99,41	0,00	0,59	171	130
338-12 x 338-22	99,45	0,00	0,55	185	130
338-13 x 338-14	100,00	0,00	0,00	235	130
338- 9 x 338-18	100,00	0,00	0,00	281	120
338-10 x 338-5	100,00	0,00	0,00	318	120
338- 5 x 338-22	100,00	0,00	0,00	231	130
338- 9 x 338-25	100,00	0,00	0,00	177	130
338- 9 x 338-5	100,00	0,00	0,00	206	120
338- 3 x 338-13	100,00	0,00	0,00	170	120
338- 4 x 338-22	100,00	0,00	0,00	192	130
338-10 x 338-27	100,00	0,00	0,00	207	130
338- 9 x 338-5	100,00	0,00	0,00	201	130
338-25 x 338-13	100,00	0,00	0,00	235	130
338-13 x 338-15	100,00	0,00	0,00	246	130
	$\bar{x} = 99,33$	$\bar{x} = 0,12$	$\bar{x} = 0,54$	$\Sigma = 5001$	$\bar{x} = 127$

de algumas colunas de células nucelares. A meiose iniciou-se após cinco dias prolongando-se até sessenta dias depois da polinização ter sido realizada.

Sessenta dias após a realização dos cruzamentos já vimos alguns óvulos com saco embrionário formado e, ao lado, macrosporócitos em processo meiótico. A formação mucosa foi vista em muitos óvulos, enquanto que, em poucos dias pudemos observar a entrada dos tubos polínicos e a realização da fertilização.

Observações posteriores nos evidenciaram óvulos com sacos embrionários degenerados e óvulos com zigoto se dividindo. A maioria dos embriões formados, como se pode ver na tabela 21. mostraram-se pequenos e mal formados.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Só fizemos retrocruzamentos com B. perrinii. Os valores em porcentagem, de sementes sem embrião foram inferiores aos obtidos nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si, como se pode ver na tabela 22.

As porcentagens de sementes sem embrião oscilaram entre 91,66% a 100,00% o que nos deu um valor médio de sementes sem embrião igual a 98,08%. Encontramos também 0,41% de sementes com embrião bem formado e 1,50% de sementes cujos embriões mostraram pouco desenvolvimento.

5.1.15. Híbrido 610

a) Espécies paternas: Cattleya intermedia Graham,
Laelia flava Lindl.

b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Fournier, em 1896, sob a denominação de Laeliocattleya intermedioflava.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 27. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi 82,14%.

As porcentagens de sementes F_2 sem embrião, em oito cápsulas analisadas, variaram entre 96,80% e 100,00%, como se pode ver na tabela 23.

A porcentagem média de sementes sem embrião foi de 99,44%. A porcentagem média de sementes com embrião bem constituído

TABELA 22

Híbrido 338 - Resultados das contagens de sementes --
oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Se- mentes -- sem em- brião.	% de Sementes com Embrião		Total - de Se- mentes- Contadas	Dias en- tre a no- lização e a co- lheita.
		Bem formado	Mal formado		
338-13xB. perr.153	91,66	1,28	7,06	156	130
338-13xB. perr.153	92,48	3,28	4,24	213	130
338-12xB. perr.153	94,96	0,62	4,42	159	150
338-12xB. perr.153	95,51	0,00	4,49	156	130
338-27xB. perr.153	96,91	0,61	2,48	162	130
338-27xB. perr.153	98,20	0,44	1,36	223	150
338-10xB. perr.153	99,57	0,43	0,00	233	130
338-24xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	252	130
338-13xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	305	130
338- 4xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	295	130
338- 9xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	183	130
338-18xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	214	130
338- 6xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	211	150
338-26xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	286	130
338- 3xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	225	120
338-4 xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	221	130
	$\bar{x}=98,08$	$\bar{x}=0,41$	$\bar{x}= 1,50$	T=3494	$\bar{x}= 133$

TABELA 23

Híbrido 610 - Resultados das contagens de sementes--
oriúndas de cruzamentos das plantas F₁ entre si.

Plantas F ₁ Cruzadas	% de Sementes sem - embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias em que a semente foi colhida
		Bem formado	Mal formado		
610-5 x 610-2	96,80	1,60	1,60	125	120
610-2 x 610-1	99,29	0,71	0,00	142	150
610-7 x 610-2	99,50	0,50	0,00	202	120
610-1 x 610-2	100,00	0,00	0,00	160	150
610-2 x 610-7	100,00	0,00	0,00	154	120
610-1 x 610-19	100,00	0,00	0,00	149	145
610-19 x 610-25	100,00	0,00	0,00	291	120
610-25 x 610-2	100,00	0,00	0,00	184	120
	\bar{x} = 99,44	\bar{x} = 0,35	\bar{x} = 0,20	T=1407	\bar{x} = 130

foi 0,35% e a porcentagem média de sementes com embrião mal formado foi de 0,20%.

Vinte dias após a polinização os tubos polínicos já atingiram todo o comprimento do ovário. As células nucelares mostraram-se organizadas em colunas de células. Trinta e cinco dias após a polinização encontramos, além dessas colunas nucelares, casos onde a célula-mãe do saco embrionário já se mostrava bem visível. Quarenta dias após a realização dos cruzamentos iniciou-se a meiose. Cinquenta dias após a polinização encontramos a célula-mãe do saco embrionário sofrendo meiose, ao lado de macrosporócitos em fases anteriores a este estágio. Dez dias depois encontramos óvulos com saco embrionário contendo número variado de núcleos no seu interior. Verificamos que a formação mucosa, já havia se iniciado. Setenta dias após a realização dos cruzamentos verificamos que essa formação se estendeu a um grande número de óvulos. Também nesta fase os sacos embrionários começaram a se degenerar, sem ocorrência de fertilização. Somente em alguns óvulos notamos formação de zigoto.

Observações em dias subsequentes nos mostraram sementes sem embrião, ao lado de sementes onde os embriões estavam se formando.

Os frutos amadureceram entre cento e vinte a cento e cinquenta dias após a realização dos cruzamentos.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Os retrocruzamentos do híbrido para C. intermedia (macho) constantes da tabela 24 nos deram valores de sementes sem embrião entre 60,93% e 84,87%, portanto, bem mais baixos que os obtidos nos cruzamentos de plantas F_1 entre si. O valor médio de esterilidade neste caso foi de 75,80%.

Os valores de sementes sem embrião encontrados nos retrocruzamentos com Laelia flava (macho) foram mais altos, entre 89,37% e 90,34%. A porcentagem média de sementes sem embrião foi igual a 89,85%.

As polinizações de C. intermedia com o pólen do híbrido nos deram os valores mais altos de sementes sem embrião entre 90,39% e 96,57%. O valor médio de sementes sem embrião encontrado foi de 92,16%. Portanto, a esterilidade foi maior no lado masculino.

TABELA 24

Híbrido 610 - Resultados das contagens de sementes --- oriúndas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de se- mentes -- sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total -- de Se-- mentes-- contadas	Dias en- tre a p- linizaçã- o e a co- lheita
		Bem formado	Mal formado		
610-8 x C.int.71	60,93	39,07	0,00	192	260
610-15 x C.int.71	77,23	17,07	5,70	123	240
610-11 x C.int.71	80,20	17,18	2,62	205	270
610-17 x C.int.71	84,87	8,29	6,84	205	270
	$\bar{x}=75,80$	$\bar{x}=20,40$	$\bar{x}= 3,79$	T= 725	$\bar{x}=260$
610-16xL.flava 844	89,37	10,63	0,00	207	360
610-16xL.flava 844	90,34	7,95	1,71	176	360
	$\bar{x}=89,85$	$\bar{x}= 9,29$	$\bar{x}= 0,85$	T= 383	$\bar{x}=360$
C.int.71 x 610-7	90,39	8,47	1,14	176	250
C.int.71 x 610-9	90,62	9,38	0,00	224	270
C.int.71 x 610-16	91,00	9,00	0,00	278	270
C.int.71 x 610-10	92,22	7,78	0,00	175	165
C.int.71 x 610-8	96,57	3,43	0,00	175	165
	$\bar{x}=92,16$	$\bar{x} 7,61$	$\bar{x}= 0,22$	T= 1028	$\bar{x}=224$

5.1316. Híbrido 501

- a) Espécies paternas: Cattleya intermedia Graham.
Cattleya aurantiaca Rolfe.
- b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Thayer, s/d/, com o nome de Cattleya aurantimedia.
- c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 27. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas foi 92,59%.

A variação na porcentagem de sementes F_2 sem embrião foi de 96,91% a 100,00%, como mostra a tabela 25. A porcentagem média de sementes sem embrião obtida desses valores atingiu 99,53%. Entre as sementes restantes encontramos: 0,19% de sementes com embrião bem constituído e 0,26% de sementes com embrião mal formado.

Um mês após a polinização os tubos polínicos cresceram por toda a coluna, começando a penetrar no ovário.

Dez dias depois encontramos, em toda a extensão do ovário, tubos polínicos com dois e três núcleos. Células nucelares organizadas em colunas foram vistas ao lado de colunas de células nucelares onde a célula-mãe do macrósporo se mostrava visível.

Material colhido sete dias depois nos mostrou situação bastante semelhante à já descrita. Encontramos, entretanto, um número maior de colunas celulares com a célula-mãe do macrósporo visível.

Cinquenta a cinquenta e cinco dias após a polinização a meiose começou a se processar em algumas células-mãe do macrósporo.

As análises que fizemos dez dias depois nos mostraram várias fases de macrosporogênese. Assim, em amostras retiradas do ovário encontramos macrosporócitos em início de divisão meiótica, macrosporócitos no fim da divisão meiótica e óvulos com saco embrionário contendo de um a oito núcleos. Em muitos óvulos, encontramos no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos, a formação mucosa.

As amostras retiradas de ovário coletados em dias subsequentes nos mostraram que com exceção dos vários casos onde

TABELA 25

Híbrido 501 - Resultados das contagens de sementes --- oriúndes de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas F_1 Cruzadas	% de Se- mentes -- sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias em tre a po liniza- ção e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
501-7 x 501-2	96,91	1,85	1,24	148	150
501-5 x 501-15	99,67	0,33	0,00	308	170
501-19 x 501-20	98,79	0,00	0,00	85	225
501-8 x 501-6	99,51	0,00	1,21	208	150
501-5 x 501-15	100,00	0,00	0,49	214	170
501-8 x 501-7	100,00	0,00	0,00	208	150
501-2 x 501-14	100,00	0,00	0,00	262	195
501-3 x 501-20	100,00	0,00	0,00	123	180
501-5 x 501-15	100,00	0,00	0,00	308	200
501-15 x 501-5	100,00	0,00	0,00	267	180
501-15 x 501-5	100,00	0,00	0,00	212	180
	\bar{x} = 99,53	\bar{x} = 0,19	\bar{x} = 0,26	T=2343	\bar{x} = 177

a fertilização ocorreu, os sacos embrionários se degeneraram, sem haver formação de zigoto.

Os frutos amadureceram entre cento e cinquenta e duzentos e vinte e cinco dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

A porcentagem média de sementes sem embrião que obtivemos nos retrocruzamentos do híbrido com C. aurantiaca foi de 99,81%. Nos retrocruzamentos com C. intermedia, os híbridos F₁ nos deram 99,88% de sementes sem embrião.

Nas polinizações de C. intermedia com polen do híbrido do 501 essa porcentagem foi de 97,80%.

Encontram-se na tabela 26 os resultados dos retrocruzamentos operados com o híbrido 501.

5.1.17 Híbrido 456

a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl.
Schomburgkia crispa Lindl.

b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F₁ mães entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 40. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi de 72,50%.

Analisamos nesse híbrido amostras de sementes F₂ que retiramos de 20 cápsulas. Os valores de sementes sem embrião foram altos, acima de 98,56%, como se pode ver na tabela 27. A porcentagem média de sementes sem embrião foi de 99,60%. O valor médio de sementes com embrião bem formado foi de 0,23%, enquanto que o valor médio de sementes com embrião mal formado foi de 0,17%.

Verificamos nesse híbrido, que, uma semana após a polinização, os tubos polínicos já atingiram toda a coluna e a parte superior do ovário.

Em amostras retiradas do ovário nesse período, encontramos células nucleares em divisões mitóticas.

Entre quinze e vinte dias após a polinização encontramos a célula-mãe do macrósporo, visível na extremidade de algumas colunas de células nucleares. Encontramos também células mãe do macrósporo em divisão meiótica.

TABELA 26

Híbrido 501 - Resultados das contagens de sementes --- oriúndas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes sem Embrião	% de Sementes com Embrião		Total de sementes contadas	Dias em que se realizou a colheita
		Bem formado	Mal formado		
501-19xC.aur.708	98,87	0,00	1,13	178	165
501-19xC.aur.708	100,00	0,00	0,00	178	165
501-3 xC.aur.708	100,00	0,00	0,00	264	240
501-10xC.aur.708	100,00	0,00	0,00	226	150
501-4 xC.aur.708	100,00	0,00	0,00	227	165
501-30xC.aur.708	100,00	0,00	0,00	251	165
	\bar{x} = 99,81	\bar{x} = 0,00	\bar{x} = 0,18	T=1324	\bar{x} = 175
501-8 xC.int.231	99,54	0,46	0,00	255	240
501-5 xC.int.231	100,00	0,00	0,00	258	150
501-6 xC.int.231	100,00	0,00	0,00	267	150
501-8 xC.int.3030	100,00	0,00	0,00	250	150
	\bar{x} = 99,88	\bar{x} = 0,11	\bar{x} = 0,00	T=1030	\bar{x} = 172
C.int.231x501-7	96,01	3,53	0,44	226	260
C.int.231x501-8	99,60	0,40	0,00	256	260
	\bar{x} = 97,80	\bar{x} = 1,96	\bar{x} = 0,22	T=482	\bar{x} = 260

TABELA 27

Híbrido 456 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas F_1 Cruzadas	% de Sementes - sem embrião	% de sementes com embrião		Total- de se- mentes contadas	Dias en- tre apo- liniza- ção e colhei- ta
		Bem formados	Mai formados		
456-5x456-6	98,56	0,72	0,72	139	105
456-6x456-3	98,81	1,19	0,00	253	90
456-3x456-5	98,97	1,03	0,00	195	100
456-1x456-3	99,01	0,00	0,99	203	95
456-4x456-1	99,02	0,98	0,00	206	105
456-3x456-4	99,34	0,00	0,66	152	110
456-5x456-4	99,39	0,00	0,61	166	90
456-1x456-2	99,52	0,00	0,48	211	90
456-4x456-1	99,55	0,45	0,00	175	90
456-4x456-5	100,00	0,00	0,00	161	100
456-1x456-4	100,00	0,00	0,00	274	100
456-1x456-5	100,00	0,00	0,00	163	100
456-5x456-3	100,00	0,00	0,00	156	100
456-3x456-1	100,00	0,00	0,00	134	100
456-5x456-1	100,00	0,00	0,00	160	90
456-1x456-2	100,00	0,00	0,00	263	75
456-5x456-2	100,00	0,00	0,00	271	75
456-5x456-4	100,00	0,00	0,00	211	90
456-2x456-5	100,00	0,00	0,00	212	90
456-2x456-3	100,00	0,00	0,00	186	100
	\bar{x} = 99,60	\bar{x} = 0,23	\bar{x} = 0,17	T=3891	\bar{x} = 94,7

As observações que fizemos vinte e cinco dias após a polinização nos mostraram óvulos com saco embrionário em fase de formação, ao lado de macrosporócitos sofrendo o processo meiótico.

Trinta a trinta e cinco dias depois da realização dos cruzamentos pudemos ver óvulos com formação mucosa e óvulos com saco embrionário degenerado, ao lado de óvulos com zigoto ou pequeno embrião.

As cápsulas se abriram entre setenta e cinco e cento e dez dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Só fizemos retrocruzamentos com Schomburgkia crispa. Todos os valores de sementes sem embrião que encontramos foram iguais a 100,00%, como se pode ver na tabela 28.

5.1.18. Híbrido 436

a) Espécies paternas: Cattleya harrisoniana Batem.
Schomburgkia crispa Lindl.

b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.

Porcentagem de sementes sem embrião em F_1 = 99,30%.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 25. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de cápsulas foi de 72,00%.

As análises que fizemos em amostras de sementes F_2 retiradas de sete cápsulas nos deram valores de sementes sem embrião bem altos, como se pode ver na tabela 29. A porcentagem média de sementes sem embrião foi de 99,80%. Todos os embriões encontrados mostraram-se pequenos e mal formados.

Nêste híbrido os tubos polínicos levaram cerca de vinte e cinco dias para alcançar todo o comprimento do ovário. Durante êsse período encontramos no ovário células se dividindo e formando colunas de células nucelares.

Trinta e cinco dias após a polinização já encontramos, a célula-mãe do macrósporo, em algumas dessas colunas de células.

Quarenta dias após a realização dos cruzamentos, encontramos a célula-mãe do macrósporo em divisão meiótica.

TABELA 28

Híbrido 456 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes sem Embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
456-5xS. crispa 1304	100,00	0,00	0,00	204	90
456-5xS. crispal304	100,00	0,00	0,00	167	90
456-3xS. crispal304	100,00	0,00	0,00	182	90
456-2xS. crispal304	100,00	0,00	0,00	202	90
456-3xS. crispal304	100,00	0,00	0,00	271	90
	$\bar{x} = 100,00$	$\bar{x} = 0,00$	$\bar{x} = 0,00$	T=1026	$\bar{x} = 90$

TABELA 29

Híbrido 436 - Resultados das contagens de sementes oriundas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas F_1 Cruzadas	% de Sementes - sem embrião	% de Sementes com embrião		total de sementes contadas	Dias em que se iniciou a colheita
		Bem formado	Mal formado		
436-9 x 436-5	99,47	0,00	0,53	192	105
436-1 x 436-5	99,56	0,00	0,44	232	120
436-3 x 436-7	99,60	0,00	0,40	253	105
436-4 x 436-9	100,00	0,00	0,00	196	105
436-5 x 436-1	100,00	0,00	0,00	224	120
436-1 x 436-7	100,00	0,00	0,00	293	120
436-22 x 436-19	100,00	0,00	0,00	256	150
	$\bar{x} = 99,80$	$\bar{x} = 0,00$	$\bar{x} = 0,19$	T=1646	$\bar{x} = 117$

Dez dias depois, ao mesmo tempo em que a meiose se processava em alguns macrósporos, já encontramos óvulos com saco embrionário formado ou em vias de formação. Na maioria dos óvulos pudemos verificar a ocorrência da formação mucosa. Em poucos óvulos notamos a ocorrência de fertilização. Tivemos a oportunidade de verificar a presença de dois e três tubos polínicos penetrando nos óvulos.

Ovários coletados nas duas semanas subsequentes não nos mostraram muitas modificações intra-ovarianas. A formação mucosa se estendeu a um número maior de óvulos.

Nêste híbrido os frutos amadureceram entre cento e cinco a cento e cinquenta dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Fizemos três retrocruzamentos com C. harrisoniana, mas obtivemos somente um fruto. A porcentagem de sementes sem embrião que encontramos foi de 98,35%.

Dado que só temos um resultado, êste não será apresentado em tabela.

5.1.19. Híbrido 487

a) Espécies paternas: Cattleya bicolor Lindl.
Cattleya bowringheana Veitch.

b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Veitch and Sons, em 1896, com o nome de Cattleya chloe.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 32. A porcentagem de cruzamentos que levou à formação de frutos foi de 43,75%.

Como se pode ver na tabela 30, onde os resultados obtidos estão registrados, as porcentagens de sementes sem embrião foram na maioria dos casos, iguais a 100,00%. O valor médio de sementes sem embrião atingiu a 99,82%. Todos os embriões encontrados mostraram-se bem formados.

As análises que fizemos, periodicamente após a polinização, nos mostraram que um mês após a realização dos cruzamentos a célula-mãe do macrósporo se mostrou evidente na extremidade de algumas colunas de células nucleares. Dez dias depois já encontramos células-mãe em divisão meiótica.

TABELA 30

Híbrido 487 - Resultados das contagens de sementes --- oriúndas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas F_1 cru- zadas	% de se- mentes - sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de sementes contadas	Dias en- tre apon- tamento e colheita
		Bem formado	Mal formado		
487-17x487-15	99,13	0,87	0,00	232	120
487-24x487-19	100,00	0,00	0,00	120	180
487-21x487- 9	100,00	0,00	0,00	151	120
487-21x487-11	100,00	0,00	0,00	237	140
487-18x487-15	100,00	0,00	0,00	237	145
487-18x487-15	$\bar{x}=99,82$	$\bar{x}=0,17$	$\bar{x}=0,00$	T=977	$\bar{x}=143$

Sòmente cinquenta dias apòs a polinizaçaõ é que encontramos tubos polínicos em todo o comprimento do ovário.

Sessenta dias apòs os cruzamentos, encontramos óvulos com saco embrionário formado, ao lado de óvulos com saco embrionário se degenerando, devido a não ocorrênciã de fertilizaçaõ.

Em muitos casos a meiose não ocorreu na célula-mãe e tivemos "óvulos" destituídos de saco embrionário.

Em raros casos verificamos a ocorrênciã de fertilizaçaõ. Também neste híbrido, encontramos óvulos que apresentaram, no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos a ~~formaçaõ~~ ~~muca~~. Os zigotos formados levaram à formaçaõ de embrião.

Os frutos começaram a se abrir entre cento e vinte a cento e oitenta dias apòs a polinizaçaõ, como se pode ver na tabela 30.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Os retrocruzamentos, usando-se as espécies paternas como doadoras de pólen, nos deram valores médios de sementes sem embrião bastante próximos: 97,15% para os retrocruzamentos com C. bowringheana e 97,17% para os retrocruzamentos efetuados com C. bicolor. Quando polinizamos C. bowringheana com pólen do híbrido obtivemos um valor médio de sementes sem embrião, mais baixo (73,50%), como se pode ver tabela 31. Portanto a esterilidade do pólen foi mais baixa que a apresentada pelos óvulos.

5.1.20. Híbrido 340

a) Espécies paternas: Laelia purpurata Lindl.

Brassavola perrinii Lindl.

b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 24. A porcentagem de sucesso nas polinizações foi de 33,33%.

Como se pode ver na tabela 32, onde constam os resultados obtidos, não encontramos sementes com embrião em amostas retiradas de oito cápsulas dêsse híbrido.

TABELA 31

Híbrido 487 - Resultados de contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes - sem embrião.	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
487-22xC. bowring.706	94,31	4,26	1,43	211	200
487-22xC. bowring.706	100,00	0,00	0,00	171	245
	\bar{x} = 97,15	\bar{x} = 2,13	\bar{x} = 0,71	T=382	\bar{x} = 222
487-22xC. bicolor 889	95,96	2,82	1,22	248	200
487- 8xC. bicolor 889	96,94	2,18	0,88	229	180
487- 9xC. bicolor 889	98,61	0,92	0,47	216	180
	\bar{x} = 97,17	\bar{x} = 1,97	\bar{x} = 0,85	T=693	\bar{x} = 190
C. bowring.706x487-6	60,67	39,31	0,02	206	240
C. bowring.706x487-5	86,34	13,66	0,00	227	240
	\bar{x} = 73,50	\bar{x} = 26,48	\bar{x} = 0,01	T=433	\bar{x} = 240

TABELA 32

Híbrido 340 - Resultados de contagens efetuadas em sementes oriundas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas F_1 Cruzadas	% de Sementes Sem Embrião	Total de Sementes Contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
340-4 x 340-11	100,00	222	120
340-9 x 340-12	100,00	180	120
340-10 x 340-23	100,00	240	120
340-11 x 340-4	100,00	220	120
340-12 x 340-19	100,00	169	120
340-20 x 340-23	100,00	171	120
340-22 x 340-18	100,00	180	120
340-23 x 340-20	100,00	225	120
	$\bar{x} = 100,00$	T = 1607	$\bar{x} = 120$

Verificamos neste híbrido, que trinta e cinco dias após a polinização os tubos polínicos alcançaram todo o comprimento do ovário.

O material intra-ovariano que examinamos nos mostrou células nucelares organizadas em colunas.

Quinze dias depois encontramos a célula-mãe do macrósporo formada na extremidade de algumas colunas de células nucelares.

Sessenta dias após a polinização a meiose estava ocorrendo em algumas células-mae do macrósporo, enquanto que outras não se desenvolveram o suficiente para entrar em meiose.

Setenta e oitenta dias após a realização dos cruzamentos encontramos, em alguns óvulos, a formação mucosa no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos. Nêstes casos os sacos embrionários se degeneraram, sem haver formação de embrião.

As análises que fizemos noventa dias após a polinização já nos mostraram sementes sem embrião.

As cápsulas amadureceram cento e vinte dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Os retrocruzamentos para B. perrinii funcionando como receptora de pólen do híbrido nos deram valores de sementes sem embrião entre 69,43% e 86,47%. A porcentagem média extraída desses valores foi de 79,18%.

Fizemos três cruzamentos de L. purpurata com plantas híbridas F_1 funcionando como doadoras de pólen. Na única cápsula que obtivemos a porcentagem de sementes sem embrião foi de 86,06%.

Os retrocruzamentos de L. purpurata e B. perrinii funcionando como doadoras de pólen nos deram, todos êles, sementes sem embrião, como se pode ver na tabela 33.

Através desses resultados apresentados parece-nos que a esterilidade se manifestou principalmente do lado feminino.

5.1.21. Híbrido 369

a) Espécies paternas: Schomburgkia crispa Lindl.
Sophronites cernua Lindl.

TABELA 33

Híbrido 340 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes sem embrião.	% de Sementes Com Embrião		Total de Sementes-Contadas	Dias entre a polinização e colheita.
		Bem formado	Mal formado		
B. perr.155x340-6	69,43	30,13	0,44	229	255
B. perr.155x340-5	71,85	28,15	0,00	199	255
B. perr.155x340-8	82,88	17,12	0,00	263	200
B. perr.155x340-11	85,29	14,71	0,00	238	200
B. perr.155x340-9	86,47	13,53	0,00	281	200
	$\bar{x}= 79,18$	$\bar{x}=20,72$	$\bar{x}= 0,08$	T=1210	$\bar{x}= 220$
L. purp.99x340-8	86,06	13,94	0,00	244	180
340-4xB. perr.155	100,00	0,00	0,00	203	130
340-5xB. perr.155	100,00	0,00	0,00	204	120
340-8xB. perr.155	100,00	0,00	0,00	217	130
340-13xB. perr.154	100,00	0,00	0,00	243	120
340-21xB. perr.154	100,00	0,00	0,00	254	130
340-24xB. perr.154	100,00	0,00	0,00	205	130
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}= 0,00$	$\bar{x}= 0,00$	T=1326	$\bar{x}= 126$
340-4xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	257	130
340-4xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	154	60
340-5xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	247	180
340-5xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	181	100
340-6xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	176	120
340-9xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	167	120
340-17xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	189	100
340-24xL. purp.132	100,00	0,00	0,00	185	120
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}= 0,00$	$\bar{x}= 0,00$	T=1556	$\bar{x}= 116$

- b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.
- c) Resultados dos cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 27. A porcentagem de sucesso nas polinizações foi de 66,66%.

Em quatro cápsulas analisadas não encontramos nêsse híbrido sementes com embrião (tabela 34).

Nêste híbrido vinte dias após a polinização os tubos polínicos já atingiram todo o ovário onde havia células organizando-se em colunas.

Dez dias depois a célula-mãe do macrósporo já estava saliente em algumas dessas colunas, enquanto que em outras isso ainda não havia ocorrido.

Verificamos que trinta e cinco dias após a polinização a meiose estava se processando em alguns macrosporócitos.

Dez a quinze dias depois encontramos óvulos com diferente número de núcleos no saco embrionário.

Cinquenta dias depois da polinização encontramos óvulos com a formação mucosa no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos.

Uma semana depois encontramos óvulos com saco embrionário degenerado, ao lado de outros onde a formação mucosa podia ser vista.

As cápsulas amadureceram 90 dias após a realização dos cruzamentos.

- d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Só fizemos retrocruzamentos com Schomburgkia crispa. Os resultados das contagens de sementes retiradas de três cápsulas, estão na tabela 35.

As porcentagens de sementes sem embrião, oscilaram entre 77,85% e 100,00% e que nos deu um valor médio igual a 86,66%.

5.1.22. Híbrido 497

- a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl.
Cattleya dowiana Batem.
- b) Híbrido registrado no Sander's Orchid por Furstenberg, s/d, com o nome de Brassocattleya Paulae.

TABELA 34

Plantas F ₁ Cruza- das	% de Se- mentes - sem em- brião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias en- tre a po- linização e a co- lheita.
		Bem formado	Mal formado		
369-16 x 369-21	100,00	0,00	0,00	184	90
369-25 x 369- 7	100,00	0,00	0,00	186	90
369-19 x 369-20	100,00	0,00	0,00	155	90
369-20 x 369-19	100,00	0,00	0,00	171	90
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}= 0,00$	$\bar{x}= 0,00$	T= 696	$\bar{x}= 90$

TABELA 35

Híbrido 369 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos

Retrocruzamentos	% de Se- mentes - sem em- brião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias en- tre a po- liniza- ção e a colheita
		Bem formado	Mal formado		
369-17xS. crispal304	77,85	21,14	1,01	298	90
369-15xS. crispal304	82,14	17,86	0,00	252	90
369-16xS. crispal304	100,00	0,00	0,00	274	90
	$\bar{x}= 86,66$	$\bar{x}=13,00$	$\bar{x}= 0,33$	T= 824	$\bar{x}=90$

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 43. A porcentagem de sucesso nas polinizações foi de 11,62%.

Obtivemos só duas cápsulas dêsse híbrido. Não encontramos sementes com embrião, entre as analisadas, como se pode ver na tabela 36.

Nêste híbrido tivemos duas grandes dificuldades na obtenção de frutos:

a) Dificuldade de sucesso nas polinizações. De 43 cruzamentos feitos, somente 5 ou 11,62% levaram à produção de frutos.

b) Dificuldades físicas na separação das polínias. Muitas flores dêsse híbrido, mostraram polínias mal desenvolvidas e fortemente aderidas aos tecidos da antera. Êste fato nos dificultou a realização das polinizações. Em alguns casos a aderência foi tão forte que não conseguimos mesmo retirá-las. Essas polínias irregulares apresentaram tons castanhos diferindo do amarelo típico daquelas de todo o grupo estudado.

Ao microscópio verificamos que essas polínias apresentavam muitos grãos de pólen degenerados e que não germinaram.

Dada a dificuldade de obtenção de frutos nêsse híbrido nossas observações de desenvolvimento efetuado após a polinização, não foram muito pormenorizadas.

Nos casos de cruzamentos bem sucedidos verificamos que os tubos polínicos atingiram todo o comprimento do ovário.

Noventa dias após a polinização verificamos, em material retirado do ovário, que a meiose estava se realizando na célula-mãe do saco embrionário. Notamos também que nem tôdas as células-mãe entraram em meiose; a maioria se degenerou antes de entrar em divisão.

As cápsulas formadas amadureceram cento e oitenta dias após a polinização.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

Só fizemos retrocruzamentos com B. perrinii. Tôdas as polinizações feitas levaram à formação de frutos. Em seis cápsulas obtidas não encontramos, nas amostras analisadas, sementes com embrião. Os resultados obtidos constam da tabela 37.

TABELA 36

Híbrido 497 - Resultado das contagens de sementes oriundas de cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Plantas F_1 Cruzadas	% de Sementes - sem em- brião.	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias en- tre apó- liniza- ção e a colhei- ta
		Bem formado	Mal formado		
497-9x497-13	100,00	0,00	0,00	264	180
497-13x497-9	100,00	0,00	0,00	250	180
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}= 0,00$	$\bar{x}= 0,00$	T= 514	$\bar{x}=180$

TABELA 37

Híbrido 497 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Se- mentes - sem em- brião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias en- tre apó- liniza- ção e a colhei- ta
		Bem formado	Mal formado		
497-10xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	319	180
497-13xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	224	150
497- 5xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	200	180
497-20xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	265	180
497-20xB. perr.153	100,00	0,00	0,00	148	180
	$\bar{x}=100,00$	$\bar{x}= 0,00$	$\bar{x}= 0,00$	T= 1156	$\bar{x}=174$

5.1.23. Híbrido 368

a) Espécies paternas: Laelia flava Lindl.
Schomburgkia crispa Lindl.

b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 130, sendo que nenhum deles levou à formação de frutos.

Verificamos, nêsse híbrido, que em tôdas as polinizações feitas, a flor não persistiu na planta por mais de dez a doze dias.

Nêste tempo o ovário começou a se desenvolver externamente dando-me a impressão de que o cruzamento tinha sido bem sucedido. Verificamos que quase a totalidade das polínias colocadas sôbre o estigma do híbrido germinaram (fig. 22). Os tubos polínicos cresceram por tôda a extensão da coluna não chegando, entretanto, a penetrar no ovário. Em alguns casos verificamos que os tubos polínicos formados mostraram bifurcação na sua extremidade. (fig. 23).

Para verificar se sômente a falta de uma auxina era responsável pela parada do desenvolvimento do ovário, fizemos conforme o método descrito, aplicação sôbre o estigma da flor e sôbre a parede externa do ovário de uma pasta de lanolina contendo ácido 3 indol-acético. Em alguns casos colocamos no estigma a mistura sem pólen e em outros casos junto com pólen do híbrido.

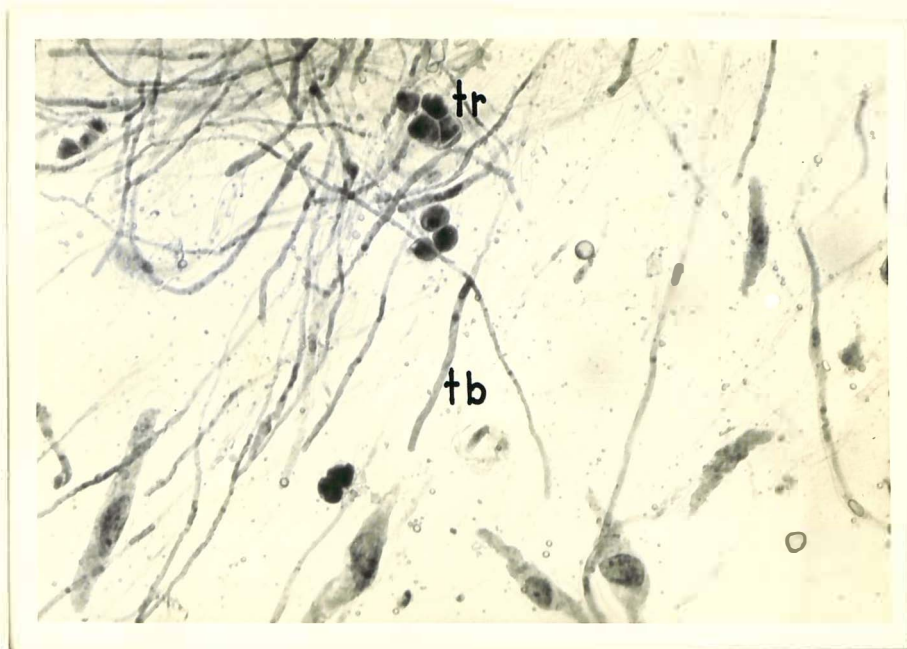
Não conseguimos, entretanto, em nenhum caso, fazer com que o ovário se desenvolvesse mais do que se desenvolveu nas polinizações de plantas F_1 com pólen F_1 .

Procuramos, também, nêsse híbrido, verificar a germinação do pólen em condições artificiais. Conseguimos boa germinação nos três meios já descritos; água, substância estigmática e meio com sacarose e agar.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

As polinizações das plantas paternas com pólen do híbrido F_1 nos deram os mesmos resultados que encontramos nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si. Os cruzamentos não levaram à formação de frutos, ao contrário do ocorrido com as

Figura 22



Tubos polínicos do híbrido 368. 200x. tr=tétrade;
tb.= tubo polínico.

Figura 23



Bifurcação na extremidade do tubo polínico do híbrido
368. 520x.

polinizações do híbrido com pólen das espécies paternas. Os retrocruzamentos com Schomburgkia crispa nos deram 99,17% de sementes sem embrião.

O retrocruzamento com Laelia flava não nos deu sementes com embrião, como se pode ver na tabela 38.

5.1.24. Híbrido 365

a) Espécies paternas: Brassavola perrinii Lindl.
Epidendrum ciliare L.

b) Híbrido não registrado no Sander's Orchid.

c) Resultados dos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si:

O número de cruzamentos feitos foi 100, sendo que nenhum deles levou à produção de cápsulas.

Este híbrido mostrou um comportamento bastante semelhante ao híbrido 368. Também aqui o órgão floral persistiu, após a polinização, por cerca de dez dias. Os grãos de pólen germinaram, mas os tubos polínicos formados não chegaram a penetrar no ovário.

Os experimentos que fizemos com hormônio de crescimento também, como no híbrido 368, não deram resultados positivos.

d) Resultados obtidos nos retrocruzamentos:

As polinizações do híbrido com pólen das espécies paternas levaram à formação das cápsulas. Quando o híbrido foi retrocruzado com Epidendrum ciliare, a porcentagem média de sementes sem embrião foi igual a 99,73%. Fizemos cinco retrocruzamentos com Brassavola perrinii. Utilizamos quatro cápsulas para análises do desenvolvimento pós-polinização e uma para observações das sementes formadas. Encontramos, nesse caso, 99,64% de sementes sem embrião.

Em observações que fizemos após a polinização do híbrido com pólen de B. perrinii verificamos que as polínias germinaram bem sobre o estigma.

Em amostras retiradas do ovário colhido sessenta dias após a polinização verificamos que, na grande maioria dos casos, não houve formação do saco embrionário. A célula-mãe se degenerou ao entrar em meiose.

TABELA 38

Híbrido 368 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes - sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
368-8xS. crispa1304	98,82	1,18	0,00	256	120
368-9xS. crispa1304	99,53	0,47	0,00	215	120
	$\bar{x} = 99,17$	$\bar{x} = 0,82$	$\bar{x} = 0,00$	$T = 471$	$\bar{x} = 120$
368-36xL. flava844	100,00	0,00	0,00	310	210

TABELA 39

Híbrido 365 - Resultados das contagens de sementes oriundas de retrocruzamentos.

Retrocruzamentos	% de Sementes sem embrião	% de Sementes com Embrião		Total de Sementes Contadas	Dias entre a polinização e a colheita.
		Bem formado	Mal formado		
365-8xE. ciliare	99,21	0,79	0,00	254	180
365-21xE. ciliare	100,00	0,00	0,00	269	180
365-23xE. ciliare	100,00	0,00	0,00	278	180
	\bar{x} = 99,73	\bar{x} = 0,26	\bar{x} = 0,00	T = 801	\bar{x} = 180
365-7xB. perr.	99,64	0,36	0,00	283	120

Verificamos que embora tivéssemos encontrado muitos tubos polínicos junto aos óvulos, o processo de fertilização não ocorreu. Em muitos óvulos encontramos, no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos, o processo de formação mucosa. Cruzamentos de Schomburgkia crispa e Brassavola perrinii usando pólen desse híbrido não levaram à produção de frutos. Aqui o comportamento das polínias do híbrido foi igual ao observado nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si. Os resultados correspondentes aos retrocruzamentos com o híbrido 365 encontram-se na tabela 39.

5.2. Microsporogênese

Na tabela 40, estão registrados, em números e, em porcentagens, os resultados das contagens que fizemos, dos produtos de microsporogênese dos híbridos.

Facilitou-nos essa observação o fato de em orquídeas as paredes divisórias das células só se formarem após a conclusão das divisões meióticas. Na figura 24 podemos ver a segunda divisão concluindo, sem que nenhuma membrana celular tenha separado os núcleos resultantes da meiose.

Como se pode ver na citada tabela 40 encontramos nos híbridos além de tétrades sem micronúcleos (fig. 25), tétrades com 1 e até 8 micronúcleos, como está ilustrado nas figuras 26, 27, 28, 29 e 30. Encontramos também díades com e sem micronúcleos (figs. 31, 32 e 33); tríades com e sem micronúcleos (figs. 34, 35 e 36) e mônades (fig. 37). As mônades ocorreram em frequências baixas e em geral, mostraram núcleos bastante condensado, picnótico. Interessante que em certos casos todos os núcleos resultantes da meiose mostraram tamanho reduzido como se pode ver na fig. 38. Os núcleos das díades, em muitos casos, mostraram aspectos anormais. Em alguns casos mostraram-se condensados como os núcleos das mônades. Em outras circunstâncias mostraram-se grandes, disformes tomando quase todo o citoplasma da célula (fig. 39). O tamanho dos núcleos das díades nem sempre foi semelhante; em alguns casos apresentou-se bem diferente (fig. 40) aliás o mesmo acontecendo com os núcleos de outros produtos meióticos encontrados. Também o tamanho dos micronúcleos apresentou-se muito variado; em alguns casos os micronúcleos mostraram-se muito pequenos, enquanto que em outros quase não diferiram do tamanho dos outros núcleos resultantes da meiose. Os micronúcleos foram encontrados constituindo pequenas células junto às células resultantes da meiose ou incluídos em uma dessas células (Comparar figs. 26 com 27 e 32 com 33).

Observando-se a tabela 40 podemos ver que, em todos os híbridos a frequência de tétrades foi alta. De todos os híbridos estudados o híbrido 497 foi o que apresentou a mais baixa frequência de tétrades (42,55%). Todos os outros híbridos apresentaram frequências de tétrades superiores a 75,90%. Dêsses os que mostraram os valores mais baixos de tétrades foram os

híbridos 368 (75,90%) e 365 (82,58). A frequência mais alta de tétrades foi exibida pelo híbrido 404 (99,85%).

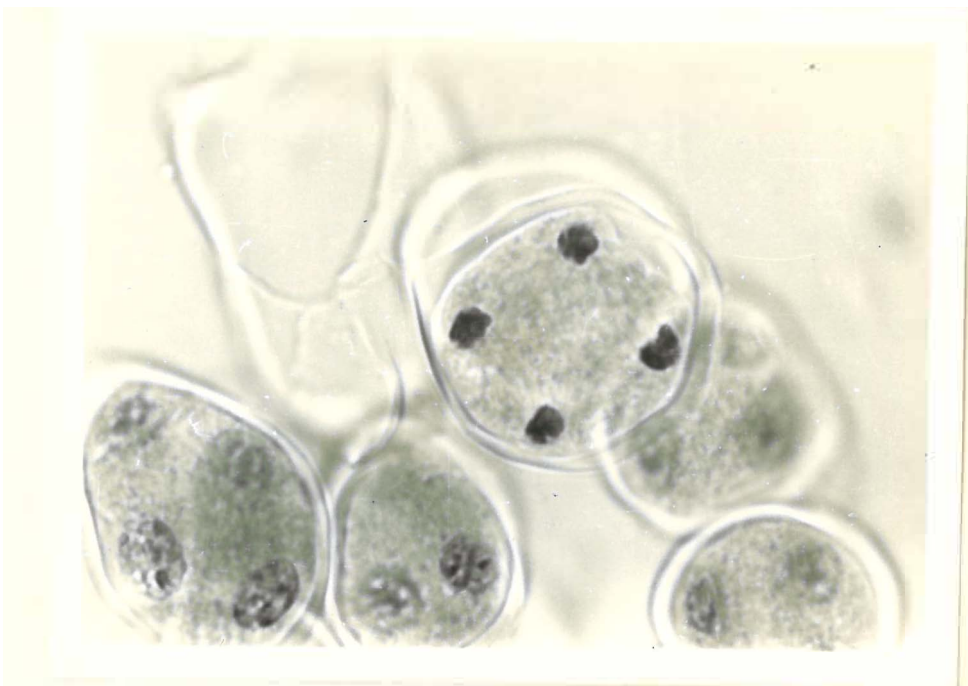
Os resultados das contagens dos números de cromossomos que fizemos nos microsporócitos haplóides dos híbridos, estão registrados na tabela 41. Dada a dificuldade que tivemos para contar o número de cromossomas apresentado por alguns micro-núcleos, estes números não constam da referida tabela. Nos casos em que as contagens foram realizadas os números de cromossomos encontrados oscilaram entre 1 e 5.

Embora a variação do número de cromossomos, tenha sido grande (tabela 41) os valores se concentraram ao redor do número 20. Em geral os números mais encontrados estão entre 18 e 22. As maiores variações foram mostradas pelos híbridos 338, 365 e 497.

A frequência de células com 20 cromossomos variou entre 4,00% (híbrido 365) e 87,09% (híbrido 516). O híbrido 516 está entre os que mostraram altas frequências de sementes férteis (com embrião), enquanto que o híbrido 365 não produziu frutos apesar de têmos feito 100 cruzamentos entre plantas F_1 imãs entre si.

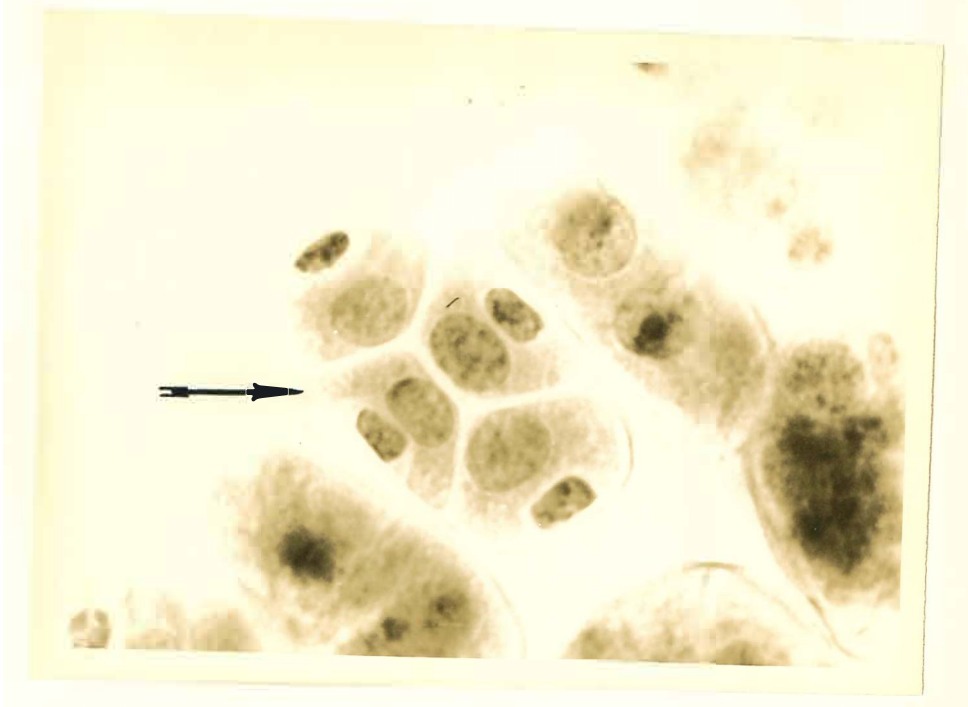
O híbrido 497 também mostrou microsporogênese bastante irregular. Como se pode ver na tabela 41, em dezessete células contadas somente 11,76% mostraram 20 cromossomos. O número mais encontrado foi 16 (29,41%). Neste híbrido e em algumas flôres dos demais, as polínias apresentaram muitos microsporócitos degenerados (fig. 41). Essas polínias mostraram coloração amarelo ferrugem contrastando com o amarelo típico das polínias de plantas estudadas. Em muitos casos mostraram-se fortemente ligadas aos tecidos da antera sendo muito difícil retirá-las da flor na ocasião da polinização.

Figura 24



Microsporogênese: 2ª divisão meiótica. 1240x.
(Híbrido 369).

Figura 25



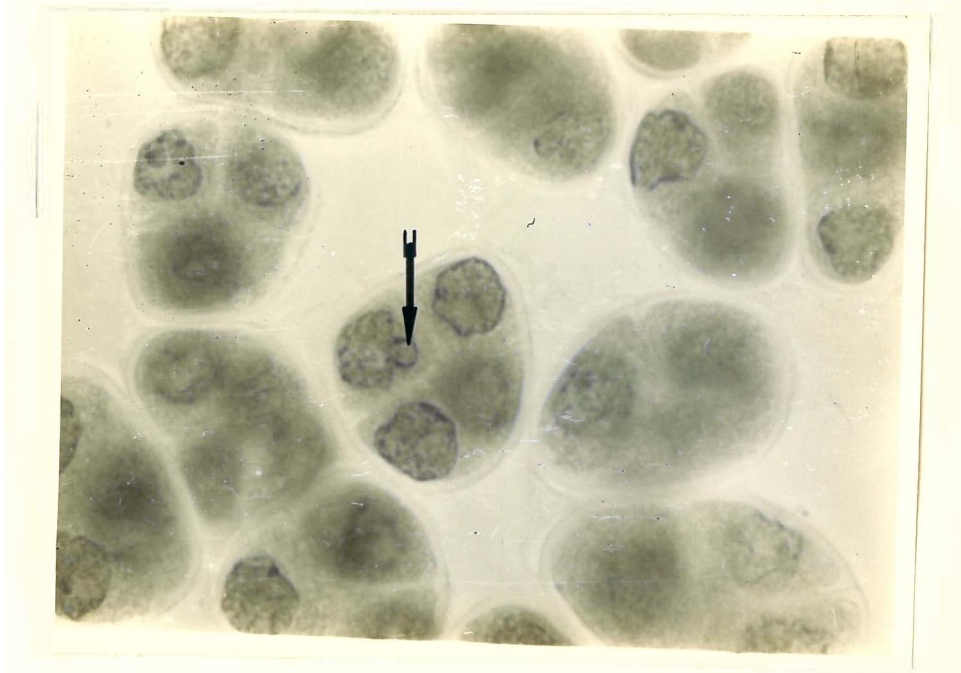
Tétrade típica. 1280x. (Híbrido 338).

Figura 26



Tétrades com um micronúcleo. 1240x. (Híbrido 516).

Figura 27



Tétrade com um micronúcleo. 1240x. (Híbrido 368).

Figura 28



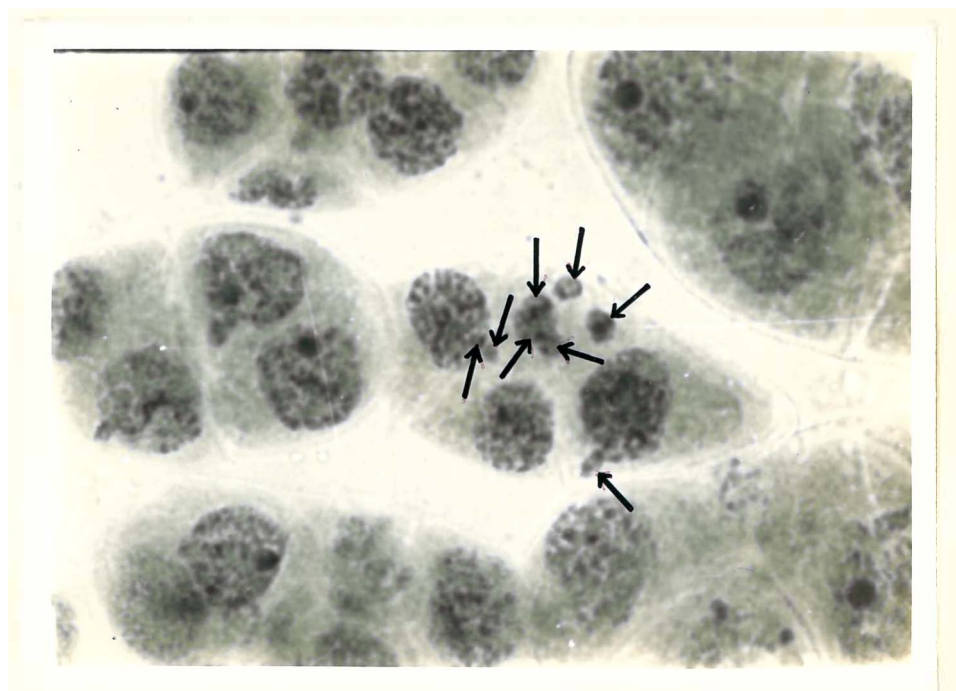
Tétrade com dois micronúcleos. 1240x. (Híbrido 368).

Figura 29



Tétrade com quatro micronúcleos. 1240x. (Híbrido 442).

Figura 30



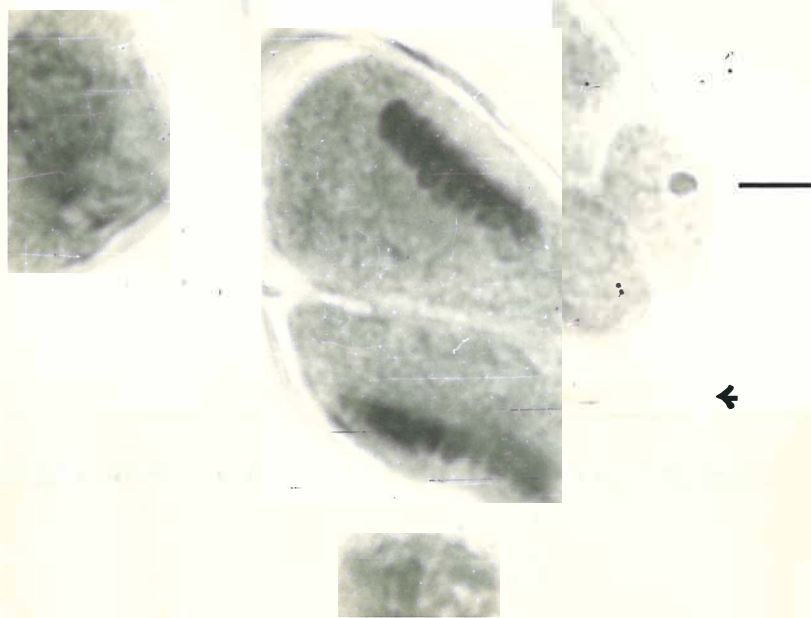
Tétrade com oito micronúcleos. 1240x. (Híbrido 339).

Figura 31



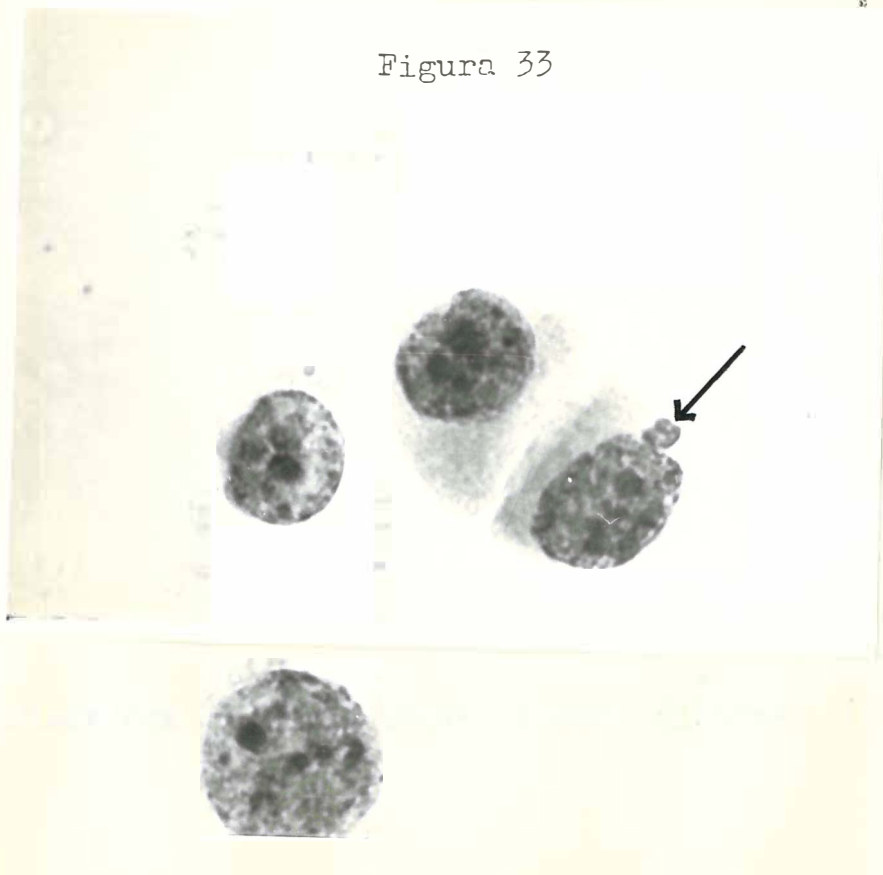
Díade e tétrade de microsporócitos. 1280x. (Híbrido 339).

Figura 32



Díade com um micronúcleo. 1280x. (Híbrido 365).

Figura 33



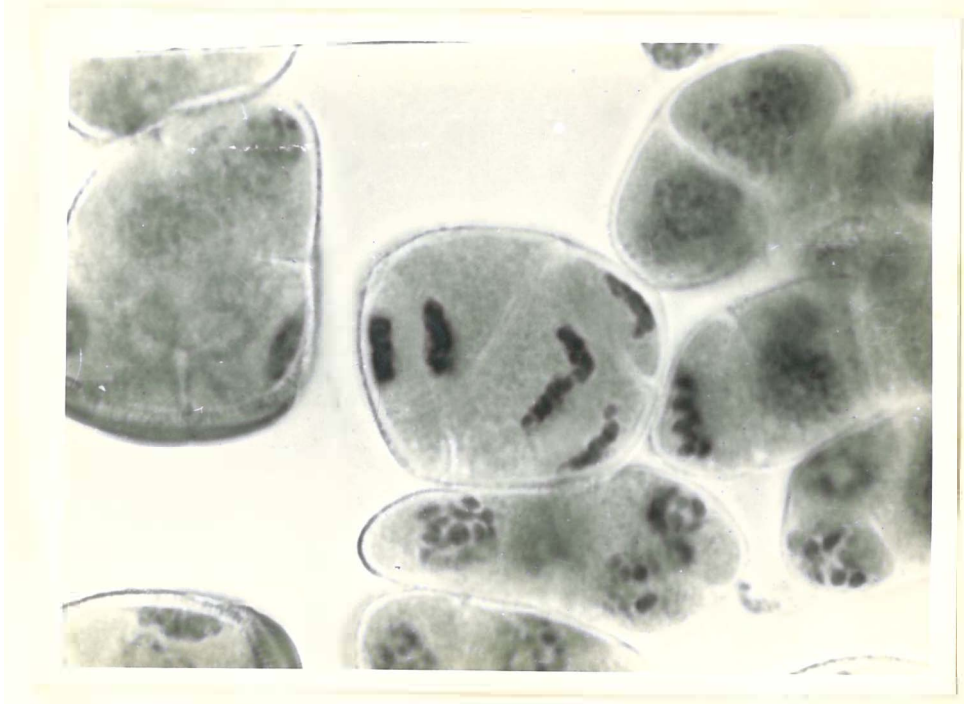
Díade com um micronúcleo. 1240x. (Híbrido 337).

Figura 34



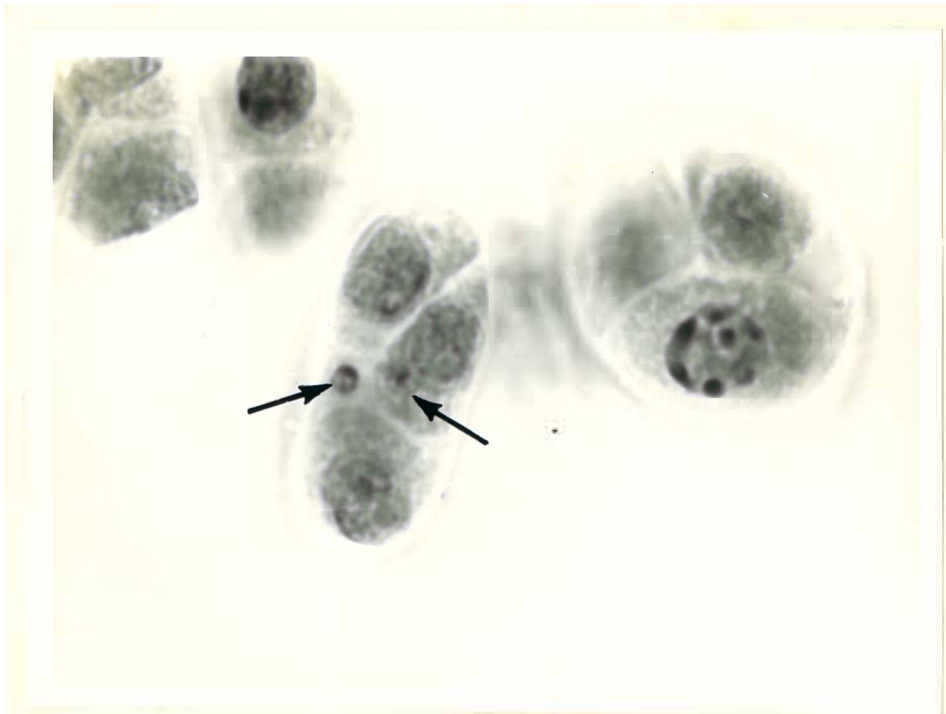
Triade de microsporócitos. 1240x. (Híbrido 339).

Figura 35



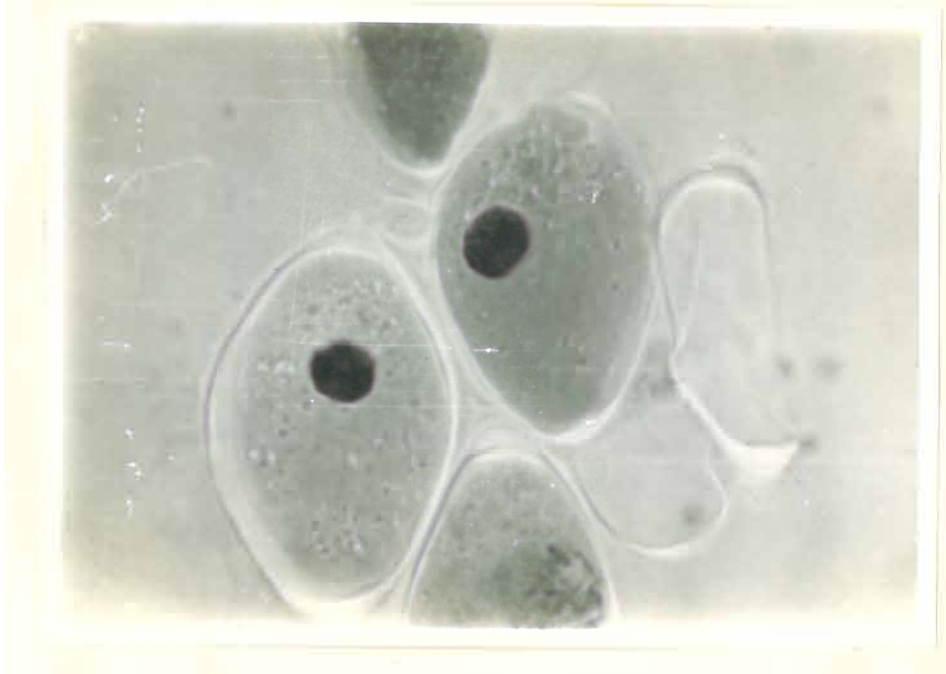
Triade em divisão mitótica. 1280x. (Híbrido 339).

Figura 36



Triade com dois micronúcleos. 1240x. (Híbrido 368).

Figura 37



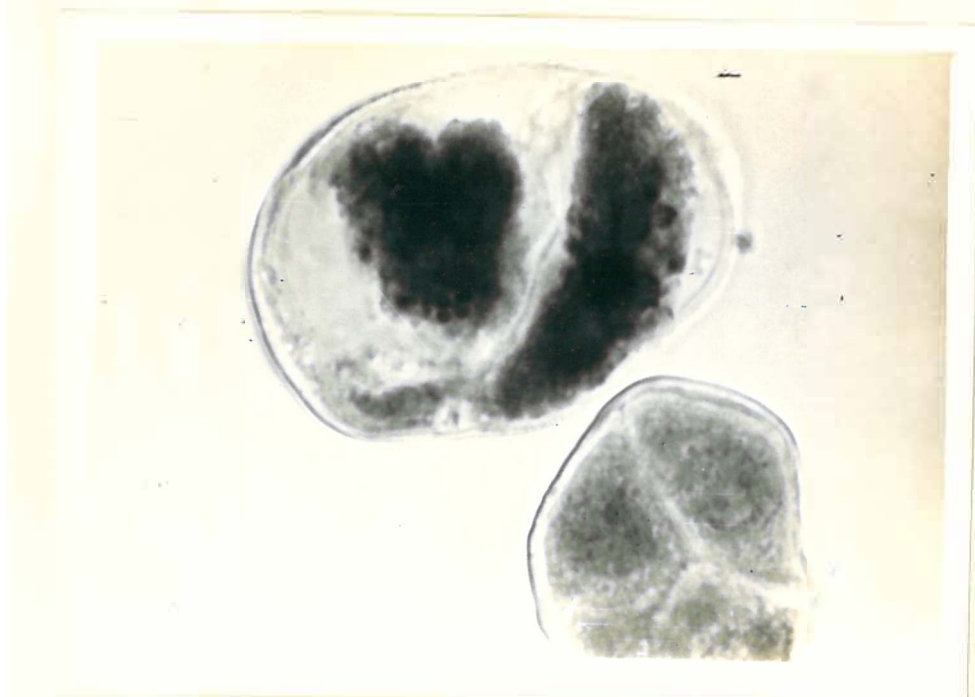
Mônades. 1280x. (Híbrido 436).

Figura 38



Microsporócitos com núcleos reduzidos. 520x.
(Híbrido 516).

Figura 39



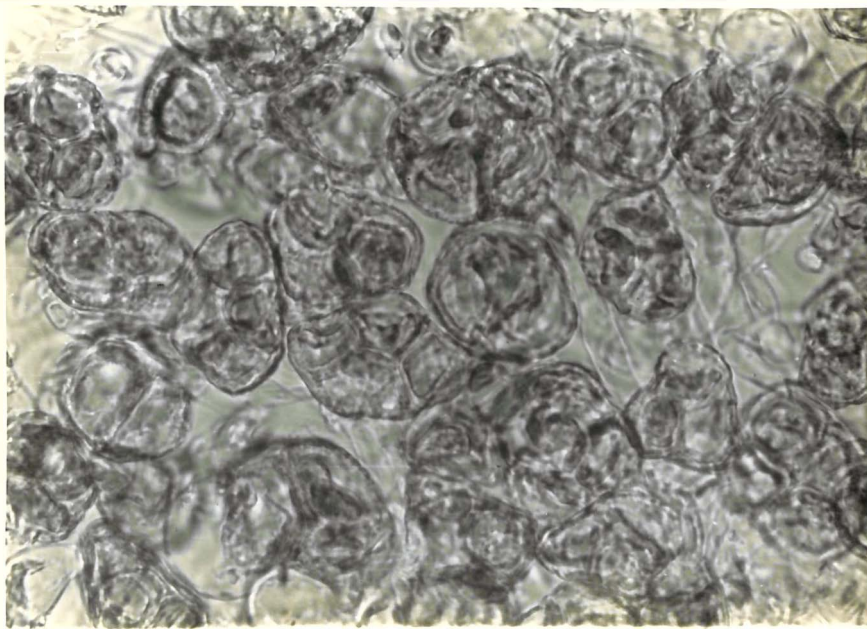
Díade com núcleos irregulares. 1280x. (Híbrido 368).

Figura 40



Díade: núcleos de tamanhos diferentes. 1280x.
(Híbrido 436).

Figura 41



Microsporócytos degenerados. 200x. (Híbrido 497).

TABELA 40

Produtos de microporosidade das híbridas

Resultados das análises HP	Tétradas		Tétradas		Tétradas		Tétradas		Tétradas		Tétradas		Tétradas		Tétradas		Tétradas		Número total
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
7	1920	59,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1921
33	595	60	21	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	698
	85,24	0,58	3,00	0,42	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
337	1144	150	37	6	3	2	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1366
	03,48	11,75	2,75	0,44	0,22	0,14	0,22	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
338	1050	31	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1743
	95,12	1,77	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
339	2168	222	26	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2561
	04,65	0,66	1,01	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
340	488	50	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	574
	04,49	5,22	0,87	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
365	1375	429	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1665
	02,58	7,74	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
368	1692	345	106	27	10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2229
	75,90	15,47	4,75	1,21	0,44	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
369	2721	21	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2757
	55,55	0,76	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
404	1413	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1415
	92,85	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
435	720	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	779
	92,42	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
436	1663	26	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1696
	98,05	1,53	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
442	1298	21	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1327
	97,81	1,58	0,15	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
456	572	37	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	640
	89,37	5,78	0,78	0,15	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
487	313	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	316
	99,05	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
497	163	116	56	22	12	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	383
	42,55	30,28	14,62	5,74	3,13	1,82	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
501	3329	121	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3527
	94,38	3,43	0,59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
508	419	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	435
	96,32	1,14	0,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
516	388	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400
	97,00	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
610	489	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	491
	99,59	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1525	455	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	483
	99,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

N.º Células contadas; % = Porcentagem sobre o total contado; - = Não encontrado

TABELA 41

Resultado das contagens do número de cromossomos (n) dos híbridos.

Resultado das contagens do número de cromossomos (n) dos híbridos	Número de cromossomos encontrados nos microsporocitos haploides dos híbridos																																				Total
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	28	29	30	31	32	33	35	36	38	40							
336	n	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	4	1	4	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12		
	%	-	-	-	-	0,33	-	-	-	0,33	-	33,33	6,33	33,33	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
337	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	7	9	4	2	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,16	28,16	37,50	16,66	6,33	4,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
338	n	1	-	-	-	-	-	-	-	-	19	17	24	21	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90			
	%	1,11	-	-	-	-	-	-	-	-	15,55	10,03	26,66	23,33	5,55	4,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
339	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	3	19	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,20	8,57	54,28	11,42	2,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
340	n	-	-	-	-	-	2	-	-	1	2	3	5	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	34			
	%	-	-	-	-	-	9,09	-	-	5,45	2,94	5,79	14,70	29,82	5,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
365	n	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25			
	%	-	-	-	-	4,00	-	-	-	-	12,00	4,00	-	12,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
368	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	10	23	17	8	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	72			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,77	5,55	13,89	21,24	23,61	11,11	2,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
369	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	11	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	12,50	43,03	20,03	12,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
370	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42,03	23,57	29,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
404	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,55	44,44	38,88	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
435	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	14	9	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,55	6,33	39,60	25,00	11,11	0,33	2,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
436	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,36	9,09	36,36	9,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
442	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,55	43,41	38,88	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
456	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,09	27,27	29,55	9,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
497	n	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17			
	%	5,00	-	-	-	-	-	-	-	5,00	-	-	11,76	29,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
501	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	3	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,22	16,65	59,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
516	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,45	27,59	6,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
610	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	19	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,63	11,53	7,30	3,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
1525	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	15	9	0,57	5,7	12,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33			
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,15	15,15	9,09	0,57	5,7	12,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

N.º Células contadas: % = porcentagens sobre o total contado; -- = não encontrado.

5.3. Germinação das sementes

Dado o grande número de cruzamentos feitos não nos seria possível fazer testes de germinação com sementes provenientes de todos êles. Dessa forma, para simplificar nosso trabalho, fizemos somente algumas sementeiras a fim de verificarmos o poder de germinação de sementes F_2 provenientes de alguns cruzamentos.

Procuramos usar para nossos testes sementes retiradas de cápsulas nas quais nossas observações preliminares revelaram frequências altas de sementes sem embrião, cápsulas com valores baixos de sementes sem embrião e cápsulas com valores intermediários a êsses. Como contrôle, semeamos sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos de L. crispa e de C. forbesii.

Poderá parecer estranho que tenhamos semeado sementes provenientes de híbridos nos quais nosso exames anteriores haviam mostrado 100,00% de sementes sem embrião. Assim procedemos para confirmar nossas observações, já que, em geral semeamos um número maior de sementes do que aquelas analisadas em cinco amostras dos frutos, conforme método descrito.

Os resultados obtidos nos testes de germinação estão registrados nas tabelas 42 e 43. Na primeira colocamos todos os casos de não germinação e na segunda os casos que mostram certa porcentagem de germinação.

Não fizemos contagens das sementes retiradas do frasco naqueles casos onde não verificamos germinação de sementes. Para maior clareza registramos, nêsse caso (tabela 42), os valores de sementes sem embrião encontrados em nossas contagens preliminares e que já constam de tabelas anteriores. Na tabela 43 registramos as frequências de sementes com e sem embrião semeadas e as frequências de germinação das sementes. As porcentagens de germinação foram calculadas levando-se em consideração somente as sementes com embrião semeadas. Os valores estão colocados em ordem crescente das frequências de germinação das sementes.

Tôdas as sementes com embrião mal formado não germinaram.

Tabela 42

Relação dos cruzamentos cujas sementes não germinaram.

Plantas F, cruzadas cujas sementes foram semeadas	% de sementes sem embrião ⁺ -
404-7 x 404-11	63,23
31-3 x 31-6	70,94
435-33 x 435-21	90,35
338-13 x B. perrinii 155	92,48
487-22 x C. bowringheana-707	94,31
567-6 x 567-13	96,07
C. intermédia 71 x 610-8	96,57
610-5 x 610-2	98,60
456-6 x 456-3	98,81
B. perrinii 154 x 337-5	96,84
1525-8 x 1525-1	99,54
365-7 x B. perrinii	99,64
436-4 x 436-9	100,00
456-2 x Schomburgkia crispa 1304	100,00
339-4 x 339-30	100,00
501-5 x 501-15	100,00
337-22 x 337-33	100,00
338-26 x B. perrinii 153	100,00
501-2 x 610-7	100,00
601-1 x 601-19	100,00

⁺ - Refere-se à contagens feitas antes da semeadura e cujos dados já se encontram registrados em tabelas anteriores.

Tabela 43

Resultados dos testes de germinação efetuados em sementes F_2

Cruzamentos cujas sementes foram semeadas.	Sementes semeadas			% de Germinação.
	% de sementes sem embrião	% de sementes com embrião	Total semeado	
404-11 x 404-7	76,85	23,15	2307	0,74
516-7xC.harrissoniana 241	36,20	63,80	3447	0,81
610-16 x L. flava	75,41	24,59	1534	1,84
516-23xC.harrissoniana 244	27,70	72,30	2396	2,10
31-17 x 31-1	30,90	69,40	1883	3,05
370-28 x 370-2	89,60	10,40	2693	6,11
368-9xSchomburgkia crispa	98,54	1,46	5247	10,30
Laelia crispa 105x370-8	40,27	59,73	909	11,40
369-15xSchom.crispa 1304	81,90	18,10	1352	13,90
508-23 x 508-26	47,00	53,00	769	22,20
56-1 x 456-4	99,82	0,18	2125	25,00
508-26 x 508-23	38,60	71,14	3143	34,10
C.harrissoniana 241x339-23	96,50	3,50	1993	36,30
C.harrissoniana 241x339-10	79,05	20,90	1590	45,60
508-26 x 508-30	78,60	21,40	6884	51,30
368-9xSchom.crispa 1304	96,90	3,10	3072	51,50
B.perrinii 155 x 340-5	77,32	22,63	1279	72,20
L.crispa 390xL.crispa 3903	7,80	92,10	2131	75,40
C.forbesii x C.forbesii 99	18,87	88,13	1671	92,92
C.harrissoniana 242x516	0,00	100,00	838	100,00

5.4. Cruzamentos intra-específicos

Na literatura consultada não encontramos dados sobre a frequência de fertilidade apresentada pelas sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos.

Para avaliarmos os dados obtidos em sementes F_2 dos híbridos estudados, realizamos cruzamentos intra-específicos com algumas espécies envolvidas na produção dos híbridos.

Usamos dez espécies de orquídeas com as quais fizemos dez cruzamentos intra-específicos.

Os resultados médios de sementes sem e com embrião que encontramos, estão registrados na tabela 44.

Todos os cruzamentos que fizemos levaram à formação de frutos.

Em todos os casos observados, os tubos polínicos formados atingiram todo o comprimento do ovário. Como em geral ocorre nas orquídeas a macrosporogênese só se iniciou após a realização da polinização. Encontramos, em frequências baixas em alguns cruzamentos células-mãe que se degeneraram levando à formação de "óvulos" destituídos de saco embrionário. Na maioria dos casos a meiose se processou normalmente levando à produção de óvulos contendo saco embrionário com 8 núcleos no seu interior. Em muitos casos, apesar de encontrarmos junto aos óvulos muitos tubos polínicos, a fertilização não ocorreu e o saco embrionário se degenerou sem haver formação de zigoto. Em todos os casos observados os óvulos não apresentaram a formação mucosa no momento da fertilização. Os zigotos formados levaram à produção de embriões. Em alguns cruzamentos encontramos, em frequências baixas, sementes com embrião pequeno ao lado de sementes com embrião bem formado como se pode ver na tabela 44.

6. DISCUSSÃO

Nossos principais objetivos, ao desenvolvermos o presente trabalho foram os de procurar e verificar a ocorrência ou não de esterilidade em híbridos artificiais inter-gêneros e inter-específicos em orquídeas, investigando as possíveis causas da esterilidade que viesse a ser encontrada. Nesse sentido

Tabela 44

Resultados das contagens efetuadas em sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos.

Espécies cruzadas	% x sementes sem embrião.	% x sementes com embrião		Número total.
		Bem formado	Mal formado	
<u>C. aurantiaca</u>	14,96	84,90	0,13	1300
<u>L. crispa</u>	17,20	82,78	0,00	238
<u>C. leopoldii</u>	39,24	60,75	0,00	875
<u>C. intermedia</u>	39,47	60,52	0,00	685
<u>C. forbesii</u>	40,70	59,29	0,00	1405
<u>L. purpurata</u>	47,17	52,82	0,00	1128
<u>Schomb. crispa</u>	48,53	51,46	0,00	1817
<u>C. harrisoniana</u>	49,17	50,82	0,00	632
<u>L. flava</u>	53,09	46,71	0,19	651
<u>C. bicolor</u>	57,15	42,46	0,37	1158

procuramos estudar os mecanismos de formação dos gametas, tanto masculinos como femininos, a fertilização, com a formação do zigoto e do embrião, completando êsses nossos trabalhos com a observação da germinação das sementes.

As principais etapas de nossos trabalhos, bem como a importância dos resultados alcançados, podem ser, assim considerados:

6.1. "Fertilidade das sementes F₂"

Três tipos de sementes F₂ morfològicamente distintas foram encontrados: sem embrião; com embrião pequeno, mal constituido e com embrião bem constituido. A frequência de sementes com embrião pequeno foi sempre relativamente baixa e com pouca influência no exame dos resultados. Do ponto de vista morfològico consideramos as sementes sem embrião como estêreis e aquelas com embrião bem constituido como férteis.

Os dados expostos no capítulo de resultados e o resumo apresentado na tabela 45, nos mostram que a frequência das três classes de sementes é variável conforme o híbrido considerado.

De vinte e quatro híbridos F₁ artificiais estudados, dezessete apresentaram valores médios de sementes sem embrião superiores a 90,00%. Em cinco dêles a esterilidade foi completa.

Nas cápsulas onde encontramos muitas sementes sem embrião as sementes mostraram, em conjunto, uma coloração esbranquiçada, contrastando com a côr amarelo-areia apresentada pelo conjunto contendo muitas sementes com embrião.

Observando os resultados apresentados pode-se verificar que não existe uma relação direta entre a frequência de sementes sem embrião encontrada numa cápsula e o tempo gasto entre a polinização e a abertura dos frutos. Poderíamos pensar que as cápsulas que apresentam maior número de sementes sem embrião apresentassem deiscência precoce; entretanto, esta relação não foi verificada.

Segundo STEBBINS (1958) a causa exata da esterilidade existente na maioria dos híbrido não é conhecida. Em muitos casos ela devido à combinação desarmônica entre o material genético das espécies paternas cruzadas. Ela pode estar ou não associada à fraqueza constitucional do híbrido (DOBZHANSKY, 1957). Se o desequilíbrio afeta primariamente o processo metabólico,

TABELA 45

Resumo dos resultados obtidos nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Nº do híbrido.	Nº de cruzamentos feitos	% de sucesso nas polinizações.	Variação na % de sementes sem embrião.	% média		
				Sementes Sem Embrião	com embrião formado	Mal formado
442 Cc	31	93,54	7,30---75,52	37,91	59,93	2,08
7 Cc	14	100,00	36,68---81,03	57,20	37,70	5,08
508 Lc	32	96,87	45,06---93,54	68,25	30,37	1,37
516 Cc	28	89,28	40,35---95,58	71,79	25,89	2,30
567 Lc	29	96,55	61,66---100,00	83,02	15,68	1,29
404 Cc	27	92,60	63,23---96,27	85,45	13,40	1,14
31 Lc	29	93,10	70,94---100,00	87,05	10,61	2,32
435 Cs	46	10,65	----	90,35	9,65	0,00
370 Lc	36	87,80	80,48---100,00	91,92	7,17	0,89
525 Lc	31	93,54	67,32---100,00	91,95	7,23	0,81
339 Bc	57	85,96	95,45---100,00	98,72	0,52	0,74
337 Bc	46	58,69	96,82---100,00	99,20	0,43	0,36
336 Bc	69	60,86	93,37---100,00	99,29	0,44	0,26
338 Bc	47	74,46	95,94---100,00	99,33	0,12	0,54
610 Lc	27	82,14	96,80---100,00	99,44	0,35	0,20
501 Cc	27	92,59	96,91---100,00	99,53	0,19	0,26
456 Bs	40	72,50	98,56---100,00	99,60	0,23	0,17
436 Cs	25	72,00	99,47---100,00	99,80	0,00	0,19
487 Cc	32	43,75	99,13---100,00	99,82	0,17	0,00
340 Lb	24	33,33	- ----	100,00	0,00	0,00
369 Sso	27	66,66	-----	100,00	0,00	0,00
497 Bc	43	11,62	-----	100,00	0,00	0,00
368 Ls	130	00,00	-----	-	-	-
365 Be	100	00,00	-----	-	-	-

Bc = Cruzamentos de Brassavola com Cattleya
 Be = Cruzamento de Brassavola com Epidendrum
 Es = Cruzamento de Brassavola com Schomburgkia
 Cc = Cruzamento de Cattleya com Cattleya
 Cs = Cruzamento de Cattleya com Schomburgkia
 Lb = Cruzamento de Laelia com Brassavola
 Lc = Cruzamento de Laelia com Cattleya
 Ls = Cruzamento de Laelia com Schomburgkia
 Sso = Cruzamento de Schomburgkia com Sonchroites

que se dá nas primeiras fases do desenvolvimento do zigoto, do embrião ou do organismo jovem, resulta na inviabilidade do híbrido. Se o efeito primário do desequilíbrio afeta os gametas, temos então a esterilidade, do híbrido.

De um modo geral nas orquídeas, como acontece em outras plantas, cruzamentos entre grupos taxonômicos mais próximos dão menor esterilidade do que entre grupos taxonômicamente mais distantes. Como se pode observar na tabela 45, os híbridos genéricos de Cattleya foram os que deram, em média, as menores frequências de sementes sem embrião. Depois seguiram os híbridos em que estão envolvidos os gêneros Laelia e Cattleya. Depois aqueles em que estão envolvidos os gêneros Brassavola e Cattleya e Cattleya x Schomburgkia. Os híbridos com menor frequência de sementes com embrião foram aqueles entre gêneros mais distantes taxonômicamente ou seja entre Laelia e Brassavola; Sophranites e Schomburgkia; Epidendrum e Brassavola e entre Laelia e Schomburgkia. A correlação não é perfeita mas possivelmente as suas explicações estejam relacionadas também com níveis de parentesco.

Os híbrido 7 (= C. guttata x C. bicolor) e 442 (= C. leopoldii x C. aelandiae) apresentaram os valores médios mais baixos de sementes sem embrião de todos os híbridos estudados.

TOSELO (1969), estudando os pigmentos florais das orquídeas através da cromatografia, verificou que plantas de secção Aelandiae (que inclui entre outras espécies a C. aelandiae e a C. bicolor) e as plantas da secção Guttatae (que inclui a C. leopoldii e C. guttata, além de outras espécies) apresentam considerável afinidade. A afinidade dessas secções foi maior que a encontrada pelo autor entre orquídeas das secções Guttatae e Intermedia (que inclui entre outras espécies a C. harrisoniana e a C. intermedia) e entre orquídeas das secções Aelandiae e Intermedia. Possivelmente este fato explique o valor médio de sementes sem embrião mais alto que encontramos no híbrido 516 (= C. harrisoniana x C. aelandiae), quando comparado com os híbridos 7 e 442.

O híbrido 487 é uma das exceções, pois mostrou frequências relativamente alta de sementes sem embrião. Porém, segundo TOSELO (1969) na verdade as espécies envolvidas C. bicolor e C. bowringheana são relativamente distantes quanto ao seu parentesco.

O híbrido 501 resultou do cruzamento de C. intermedia e C. aurantiaca. Esta última espécie foi considerada por BRIEGER (1960) e TOSELO (1969) bem separada das outras espécies do gênero, quase que justificando sua inclusão em um novo gênero.

O híbrido 435 (= Schonburgkia crispa e C. walkeriana) apresentou porcentagem relativamente alta de sementes com embrião em relação aos outros híbridos envolvendo Schonburgkia. Porém, é preciso considerar que a frequência de sucesso nas polinizações foi bem baixa (10,65%) e as sementes contadas pertencem a um único fruto obtido.

Outro híbrido que apresentou resultados excepcionais foi o 610 (= C. intermedia X L. flava). O número médio de sementes sem embrião foi relativamente alto (99,44%). Deve-se lembrar, entretanto, que ambas as espécies envolvidas na produção desse híbrido apresentam, conforme BLUMENSCHHEIN (1957) irregularidades na meiose.

6.2. Comparação da "esterilidade" de sementes F₂ e sementes resultantes de cruzamentos intra-específicos

Para podermos estimar a "esterilidade" encontrada nas sementes híbridas F₂ precisávamos de informações sobre a "esterilidade" de sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos de orquídeas. Como já dissemos, não encontramos nenhuma referência a esse respeito na literatura que consultamos. Dessa forma, fizemos cruzamentos intra-específicos usando algumas das espécies envolvidas na produção dos híbridos. Infelizmente não nos foi possível efetuar cruzamentos usando todas as espécies paternas dos híbridos que estudamos.

Os dados obtidos, em dez espécies cruzadas, também apresentaram-se variáveis de acordo com espécie cruzada. Em quase todos os casos esses valores foram inferiores aos valores médios de "esterilidade" encontrados nas sementes F₂ que examinamos. Estes dados indicam uma tendência no aumento da esterilidade à medida que o parentesco entre as plantas cruzadas diminui.

6.3. Isclamento nas orquídeas

Embora a esterilidade ou a inviabilidade do híbrido não seja o mecanismo de isclamento mais eficiente (DCBZHANSKY, 1957), devemos admitir que também em orquídeas, como aliás ocorre em muitos vegetais, a hibridação leva à produção de indivíduos estéreis ou parcialmente estéreis.

A facilidade de se fazer em orquídeas, em condições de cultura artificiais, cruzamentos inter-específicos e inter-genéricos e de se obter híbridos tem levado a maioria dos autores a acreditar que nestas plantas ou existe algoes -pecial com relação às barreiras de isclamento ou a sua taxa -nomia é defeituosa. Entretanto, a simples obtenção de descendentes, como indicado pelos nossos resultados, não deve ser tomado como conclusivo.

Concordamos com BRIEGER (1966) quando êle diz que em orquídeas a esterilidade existente pode ser mascarada pelo grande número de sementes que se pode obter em um único fruto e pela grande quantidade de sementes que, se seneia em um frasco de cultura.

Por outro lado, nêsses vegetais a obtenção de um ou de alguns descendentes F_2 ou de gerações mais avançadas pode ser aumentada através da propagação vegetativa.

Dessa forma o orquidocultor pode obter um número suficiente de descendentes mesmo dos híbridos que apresentam baixa fertilidade. Na natureza, entretanto, o número de descendentes obtidos pode não ser suficiente para sua manutenção ou para a produção de descendentes de gerações mais avançadas. É o que foi verificado por exemplo com Cattleya leopoldii Verch e L. purpurata Lindl, no Rio Grande do Sul, segundo BRIEGER (1966) Os híbridos F_1 ocorrem numa frequência de um por mil exemplares da espécie pura, mas não há evidências da existência de híbridos de gerações mais avançadas além de F_1 nem de qualquer infiltração gênica de uma para outra espécie.

Por outro lado a fixação do híbrido na natureza, em muitos casos, torna-se difícil já que deve contar com a existência de um polinizador pré-adaptado e com um ambiente favorável à sua sobrevivência que muitas vezês podem não existir.

6.4. Variabilidade de fertilidade

Observando-se os resultados de sementes sem embrião exibidos pelos híbridos, podemos verificar que essas frequências foram variáveis num mesmo híbrido, (tabela 45).

Em alguns casos essa variação foi pequena como nos híbridos (456, 436 e 487). Já no híbrido 442 a variação encontrada foi grande.

Tôdas essas variações na frequência de sementes F_2 sem embrião deveriam ser esperadas na hipótese da esterilidade dos híbridos ter causa genética.

Em alguns casos foi possível repetir os cruzamentos usando-se as mesmas plantas F_1 de maneira que pudemos observar a variação dentro da mesma planta. No geral esta variação foi pequena, como se pode ver na tabela 46, que resume os dados já constantes na parte referente aos resultados. Somente nos cruzamentos 508 - 23 x 508 - 25 e 508 - 26 x 508 - 23 as variações foram maiores.

Estas variações provavelmente sejam devidas a "anostragem" ou erros naturais na contagem. Esses valores, entretanto são muito baixos e que demonstra uma certa precisão da metodologia que usamos.

6.5. Retrocruzamentos

Embora não tenhamos feito retrocruzamentos para todos os híbridos estudados, nos casos em que foram feitos procuramos estabelecer uma comparação entre os dados resultantes desses cruzamentos e os obtidos nos cruzamentos de plantas F_1 irmãos entre si.

Em nossos trabalhos demos maior ênfase aos cruzamentos de plantas F_1 x F_1 , do que aos retrocruzamentos. Reconhecemos, entretanto, que na natureza os retrocruzamentos podem ganhar maior importância, como nos casos de hibridação introgressiva. Podemos justificar os cruzamentos F_1 x F_1 que usamos porque quem coleta orquídeas sabe que elas são encontradas em grupos de plantas muito semelhantes, dando indicação de que elas têm origem semelhante. Sendo isto verdadeiro é de se acreditar que produzimos os híbridos F_1 , aqueles originários de uma mesma cápsula, permaneçam em grupos e os cruzamentos entre eles se dê frequentemente, apesar de que isto não indique impossibilidade

Tabela 46

Variação na frequência de sementes sem embrião encontrada nos cruzamentos de mesmas plantas híbridas.

Plantas híbridas cruzadas	Nº de cruzamentos feitos	% de sementes sem embrião encontradas
508-26x508- 23	2	45,06-48,57
508-23x508-25	2	50,63-69,63
508-12x508-20	3	75,87- 75,97 -76,82
370- 6 x370-5	2	99,37-100,00
370-8x370-11	2	96,37-97,36
338-22x338-5	2	98,31-99,11
338- 27 x338-13	2	99,40-99,41
338-3x338-13	2	99,16-100,00
567-5x567-13	3	100,00-100,00-100,00
1525-8x1525-1	2	99,54-100,00
337-27x337-26	2	98,00-100,00
336-23x336-25	2	100,00-100,00
456-5x456-4	2	99,39-100,00

da ocorrência de retrocruzamento, Por outro lado, dado que em condições de ripado os híbridos florescem ao mesmo tempo, mas, em muitos casos, em épocas diferentes dos pais, achamos preferível cruzá-los entre si a ter que usar polínias conservadas.

Quando utilizamos o híbrido como fêmea, de um modo geral, a frequência de sementes sem embrião não diferiu muito da frequência observada em sementes F_2 provenientes do cruzamento de F_1 com F_1 . Isto seria mesmo de se esperar se as espécies paternas fôsses normais na sua microsporogênese.

Também, no geral, os resultados foram semelhantes quando usamos ambas as espécies paternas como polinizadoras. Somente em três casos (híbridos 516, 370 e 610) encontramos diferenças quando usamos uma ou outra espécie como polinizadora. É interessante que nos híbridos 370 e 610 está envolvida a espécie C. intermedia. Nesta espécie, BLUMENSCHNEIN (1957) encontrou irregularidades meióticas que levaram à produção de grãos de pólen com 21 cromossomos ao lado de outros normais com 20. O alto valor de sementes sem embrião encontrado nas polinizações do híbrido 516 com pólen de C. aelandiae provavelmente seja devido ao uso de polínias guardadas por um ano.

A outra espécie paterna do híbrido 610 é a L. flava, que segundo BLUMENSCHNEIN (1957) também mostra irregularidades citológicas na formação do pólen.

De um modo geral, quando os híbridos F_1 foram usados como polinizadores e as espécies paternas como fêmeas a frequência de sementes sem embrião foi relativamente menor que no cruzamento recíproco. Em alguns a diferença foi marcante como nos híbridos 516, 487 e 370 (tabela 47).

Estas observações, talvez possam ser tomadas como indícios de que os híbridos mostram uma maior esterilidade feminina do que masculina.

6.6. Esterilidade dos micrósporos

Embora a maioria das espécies envolvidas na produção dos híbridos que estudamos apresentem um mesmo número de cromossomos, encontramos irregularidades no processo meiótico dos referidos híbridos.

Tabela 47

Valores médios (%) de sementes sem embrião encontrados em sementes provenientes de cruzamentos de plantas F₁ irmãs entre si e de retrocruzamentos.

Nº do híbrido	F ₁ x F ₁	Retrocruzamentos	Retrocruzamentos
516	71,79	516 x C.harr.=56,76 516 x C.achrd.=93,16	C.harr.x516=42,17
567	83,02	567 x C.amet.=91,30	-
404	85,45	-	-
31	87,05	-	-
435	90,35	435 x C.crispa =95,72 435 x C.walk. = 95,32	C.walk.x435=98,73
370	91,92	370 x L.crispa=100,00 370 x C.interm.=82,93	C.interm.x370=78,97 L.crispa x370=81,88
1525	91,95	-	-
339	98,72	339 x C.harr.=98,03 339 x B.perr.=99,69	C.harr.x339=93,61 B.perr.x339=94,89
337	99,20	337 x C.leop.=100,00 337 x B.perr.=100,00	C.leop.x337=97,31 B.perr.x337=98,37
336	99,29	336 x B.perr.=98,38 336 x C.forb.=98,86	C.forb.x336=96,94 B.perr.x336=95,60
338	99,33	338 x B.perr.=98,08	-
610	99,44	610 x C.intam.=75,80 610 x L.flava =89,85	C.intam.x610=92,16
501	99,53	501 x C.aur. =99,81 501 x C.interm. =99,88	C.intem.x501=97,80
456	99,60	456 x S.crispa=100,00	-
436	99,80	436 x C.harr.=98,35	-
487	99,82	487 x C.bowr.=97,15 487 x C.bicolor=97,17	C.bowr. x 487 = 73,50
340	100,00	340 x B.perr.=100,00 340 x L.purp.=100,00	B.perr.x340=79,18 L.purp.x340=86,06
369	100,00	369 x S.crispa = 86,66	-
497	100,00	497 x B.perr.=100,00	-
368	-	368 x S.crispa =99,17 368 x L.flava=100,00	-
365	-	365 x E.cilare =99,73 365 x B.perr.=99,64	-

A análise da microsporogênese das plantas F_1 , nos mostrou que nem todos os híbridos se comportaram da mesma maneira. Alguns parecem ter exibido microsporogênese mais irregular que os outros.

O número de cromossomos encontrados nos microsporócitos haplóides (entre 7 e 40) evidenciaram anormalidades meióticas na maioria dos híbridos, como se pode ver na parte referente aos resultados. Entretanto, a despeito da distribuição irregular dos cromossomos durante a meiose, as tétrades, aparentemente normais foram encontradas em grandes frequências nos híbridos examinados. Também foram encontrados tétrades com 1 e até 8 micronúcleos. Encontramos ainda díades com e sem micronúcleos e mônades.

A presença desses produtos meióticos anormais refletem irregularidades na microsporogênese.

Embora não tenhamos acompanhado com detalhes os processos meióticos dos híbridos, podemos explicar o aparecimento dos citados produtos meióticos com bases em trabalhos feitos em Vanda por KAMEMOTO (1969).

É provável que em alguns casos, os cromossomos dirijam-se à placa metafásica, mas o fuso não se forma ou o fuso formado é muito deficiente. Dessa forma, os cromossomos permanecem no centro da célula, não se dirigindo aos polos, dando origem às células sem redução do número de cromossomos. Na segunda divisão os cromossomos se dividem longitudinalmente, caminham para os polos, dando no final da divisão meiótica, díades com número de cromossomos não reduzidos.

Na maioria dos casos, entretanto, a distribuição dos cromossomos foi irregular e as díades apresentaram número de cromossomos desiguais, como se pode ver pelo tamanho diferente dos núcleos das díades. (fig. 41). Devido o pareamento irregular dos cromossomos, alguns cromossomos podem se atrasar ao caminhar para os polos como tivemos oportunidade de ver. Esses cromossomos podem permanecer no centro da célula, não sendo incluídos na célula resultante da meiose, sendo então perdidos. Em alguns casos, entretanto, podem constituir os micronúcleos. Daí o aparecimento de díades com 1, 2 e 3 micronúcleos.

Em outras circunstâncias o que parece acontecer é o seguinte: a primeira divisão leva à formação de dois núcleos

reduzidos, mas a segunda divisão ocorre unicamente, em um dos núcleos de maneira a nos dar, no final da meiose, um conjunto de três células ou tríades.

A formação de um fuso tripolar também poderia ser responsável pelo aparecimento de tríades. Em alguns casos parece que os cromossomos não chegam a caninhar para os polos e temos então a formação de uma mônade ou um grão de pólen sem redução do número de cromossomos.

Temos verificado que, em alguns casos, a primeira divisão meiótica se processa, mas a segunda divisão não ocorre, não se formando inclusive uma membrana divisória entre os núcleos resultantes da meiose. Nesses casos formam-se células binucleares, cujos núcleos apresentam como material cromático condensado, picnótico, semelhante ao encontrado também na maioria das mônades.

De acordo com BARBER (1942), nas orquídeas onde há sincronização de divisão entre os grãos de pólen da tétrade, os gametas são viáveis. A interação nuclear entre grãos de pólen de uma mesma tétrade, permite a grãos de pólen deficientes sobreviver quando ligados a grãos de pólen hiperplóides. A fina parede que separa as células da tétrade, permite, segundo o autor, livre difusão de produto nuclear fazendo com que o conjunto celular se comporte como uma unidade.

Este fato, juntamente com a alta frequência de tétrades sem micronúcleos, pode ser uma explicação para uma maior fertilidade do lado masculino do que o feminino dos híbridos.

Embora as orquídeas estudadas apresentem sincronização de divisão nas células da tétrade, verificamos que, em alguns casos, as células se degeneraram logo após a divisão meiótica.

Essas divisões meióticas irregulares, com conseqüente degeneração celular, em alguns casos se deram nas polínias de algumas flores do híbrido, enquanto que em outros casos ocorreram na maioria de suas flores.

Quando a degeneração celular abrangeu muitos conjuntos pós-meióticos de uma polínia esta apresentou coloração anarelo ferrugen, portanto, mais escura que o anarelo típico das polínias dos híbridos estudados. Em alguns casos, as polínias mostraram-se fortemente unidas aos tecidos da antera, sendo muito difícil retirá-las da flor para a realização da polinização.

Todos êsses fatores afetam a fertilidade dos gametas masculinos que pode ser considerada sob dois aspectos:

- a) sob o aspecto da funcionalidade dos gametas no momento da fertilização.

Uma avaliação da funcionabilidade dos gametas masculinos dos híbridos foi feita principalmente através dos resultados obtidos nas polinizações da espécie paternal com o pólen do híbrido.

Como já dissemos atrás, na maioria dos híbridos estudados, a esterilidade masculina mostrou-se inferior à feminina.

b) germinação do pólen. Quanto à germinação do pólen, encontramos nos híbridos de orquídeas três casos: 1) híbridos cujos grãos de pólen não germinaram (ex: plantas do híbrido 497); 2) híbridos cujos grãos de pólen germinaram, mas os tubos polínicos formados não chegaram a penetrar no ovário (ex: híbridos 365 e 368) híbridos cujos grãos de pólen se desenvolveram normalmente (a maioria). Situação semelhante foi encontrada em cruzamentos inter-específicos de Pinus por Mc WILLIAM (1959).

Nos híbridos onde, após a polinização, os grãos de pólen não germinaram e naqueles onde os tubos polínicos formados não chegaram a penetrar no ovário os cruzamentos não levaram à formação de frutos. De modo geral, a não germinação do pólen e o crescimento reduzido dos tubos polínicos foram os fatores principais que, nos híbridos estudados, determinaram o insucesso nas polinizações. Em todos os casos que examinamos o ovário caiu cerca de dez a doze dias após a polinização. Durante êsse tempo os tubos polínicos não chegaram a penetrar no ovário e a macrosporogênese praticamente nem se iniciou.

Dessa maneira, nos híbridos estudados, pudemos de certa forma avaliar a germinação das polínias e principalmente o crescimento dos tubos polínicos pela frequência de sucesso nas polinizações.

Como se pode ver dos resultados apresentados e reunidos na tabela 45, a frequência de sucesso nas polinizações variou muito de híbrido para híbrido. Embora a relação não tenha sido perfeita, de modo geral, os híbridos que mostraram

os valores mais altos de sucesso nos cruzamentos também exibiram os valores mais altos de fertilidade das sementes. Chamam a atenção por afastarem dessa relação os híbridos 1525, 339 e 610. Estes híbridos apesar de mostrarem altas frequências de sementes sem embrião mostraram altos valores de sucesso nas polinizações.

Polínias com muitos grãos de pólen degenerados não levaram à formação de tubos polínicos e conseqüentemente, nestes casos, os cruzamentos não pegaram. Já nos híbridos, onde apesar das irregularidades meióticas, as polínias não apresentaram muitos microsporócitos degenerados, em geral, os tubos polínicos se formaram normalmente.

Como se pode ver na parte referente aos resultados, na maioria dos híbridos, os tubos polínicos cresceram normalmente atingindo todo o comprimento do ovário.

Já nos híbridos 365 e 368 e em algumas plantas dos outros híbridos o crescimento dos tubos polínicos foi reduzido da maneira que eles não chegaram a penetrar no ovário.

É difícil explicar o comportamento diferente desses híbridos onde os tubos polínicos cresceram pouco e naqueles onde os tubos polínicos cresceram por todo o comprimento do ovário já que, em ambos os casos, encontramos irregularidades na microsporogênese.

Uma explicação poderia ser formulada com base nos trabalhos de BROWN (1966). Aplicando o alfa-naftaleno acético (hormônio vegetal) em mistura com lanolina sobre a parede externa do ovário de Dendrobium, Brown conseguiu aumentar em 15% a produção de sementes. O autor verificou que o hormônio mantém por mais tempo o ovário na planta permitindo que a fertilização ocorra. Poderíamos supor que nos híbridos 365 e 368 e em algumas plantas dos outros híbridos, a quantidade de hormônio produzida pelos tubos polínicos fôsse insuficiente para manter o ovário na planta. Daí ele cair entre dez e doze dias após a polinização. Esse tempo não é suficiente para que os tubos polínicos cresçam, além da coluna, para atingir o ovário. Daí os tubos polínicos desses híbridos não atingirem todo o comprimento do ovário como nos outros híbridos.

Uma explicação diferente também poderia ser formulada relacionada à síntese de RNA. Trabalhos de INGLE, KEY, e HOLM (1965), LIN, KEY e BRACHER (1966) e KEY, BARNETT e LIN (1967),

demonstraram que há necessidade de síntese contínua de RNA e proteínas para a alongação celular. A necessidade parece ser restrita a uma classe discreta de RNA-D, uma fração que parece ser RNA mensageiro cuja síntese é regulada pela auxina. A quantidade insuficiente de auxina produzida por êstes híbridos poderia diminuir a síntese de RNA afetando dessa forma a alongação dos tubos polínicos.

Nos experimentos que fizemos com hormônio de crescimento não obtivemos resultados positivos. É provável que não tenhamos acertado com a quantidade exata de hormônio necessário ao híbrido ou que o hormônio usado não seja adequado aos híbridos estudados.

6.7. Esterilidade dos macrósporos

A esterilidade feminina à semelhança da esterilidade masculina também pode ser considerada sob dois aspectos: a) esterilidade que se manifesta pela não formação do saco embrionário nos óvulos; b) esterilidade que se manifesta pela formação de óvulos não funcionais.

Em todos os híbridos examinados verificamos que, mesmo quando poucos tubos polínicos alcançaram o ovário, a macrosporogênese se processou regularmente. Entretanto, quando os tubos polínicos não cresceram o suficiente para atingir o ovário o cruzamento não foi bem sucedido e a macrosporogênese não ocorreu. A necessidade de uma auxina liberada pelos tubos polínicos no ovário, para que a macrosporogênese se processe é fato bem conhecido na literatura (WIRTH e WITHNER, 1959).

Nos híbridos que mostram esterilidade masculina muito acentuada, como nos híbridos 365 e 368, a macrosporogênese não se processou após os cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

Nos cruzamentos bem sucedidos dos outros híbridos a macrosporogênese ocorreu, porém, nem sempre normalmente.

Pelos dados apresentados pode-se ver que em muitos casos a célula-mãe do saco embrionário não sofreu meiose. Ostegumentos que a recobriam se desenvolveram normalmente, de maneira a formar "óvulos" sem saco embrionário. Esta situação foi encontrada, praticamente em todos os híbridos. No entanto observamos a mesma coisa, se bem que em frequências mais baixas em cruzamentos intra-específicos. Isto leva a supor que, se o observado é um mecanismo de esterilidade, êle ocorre em maior frequência nos híbridos.

Ao lado dessas células-mãe, não desenvolvidas, encontramos nos híbridos, em diferentes frequências, células-mãe que se desenvolveram e se dividiram normalmente levando à formação de óvulos com saco embrionário. Nesses casos, entretanto foi difícil verificar se a macrosporogênese estava se processando normalmente, já que não conseguimos contar o número de cromossomos dos macrosporócitos. Também não fizemos um levantamento da frequência de óvulos cujo saco embrionário mostrava no seu interior, número de núcleos diferente de oito. Como a macrosporogênese não ocorre simultaneamente em todos os macrosporócitos do ovário, a ocorrência de saco embrionário com número de núcleos inferior a oito não nos permitiria concluir que, nesses casos, houve irregularidades meióticas. Igualmente não sabemos se a meiose anormal se reflete ou não na divisão mitótica que ocorre nos núcleos do saco embrionário.

As melhores informações que obtivemos do grau de fertilidade dos gametas femininos provieram dos resultados dos retrocruzamentos. A julgar pelos dados, parece-nos que a macrosporogênese, produz junto aos gametas funcionais, gametas defectivos.

6.8. Esterilidade na formação do zigoto

A barreira de esterilidade mais comumente encontrada nos híbridos se manifestou na formação do zigoto, portanto, à época da fertilização.

Em muitos híbridos apesar de encontrarmos muitos tubos polínicos junto aos óvulos a fertilização não ocorreu. À época da fertilização encontramos nos óvulos, no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos, uma formação mucosa.

Em alguns casos, como já dissemos na parte referente aos resultados, ela se mostrou bem característica e em outros apresentou-se como pequenas gotas dispersas no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos. Nos óvulos onde essa formação mucosa (mucopolissacarídeo ácido) se mostrou bem acentuada a fertilização não ocorreu. O saco embrionário se degenerou havendo formação de sementes sem embrião ou estéreis. Em alguns retrocruzamentos também encontramos essa formação.

Não encontramos formações semelhantes nos cruzamentos intra-específicos que analisamos. Trabalhos sobre macrosporogênese e embriogênese realizados em orquídeas por diversos

autores como WIRTH e WITHNER (1959), NIIMOTO e SAGAWA (1961), SAGAWA e ISRAEL (1964) ALVAREZ e SAGAWA (1965) não fazem referências a essa formação nos óvulos no momento da fertilização. Não nos parece provável que essa formação seja resultante da incompatibilidade entre gametas masculinos e femininos, já que, ela não apareceu nos cruzamentos entre Cattleya harrisoniana e Brassavola perrinii que observamos.

Pensamos que provavelmente ela seja resultante de anormalidades funcionais de um dos gametas, ligada à sua formação irregular.

Em alguns híbridos, apesar de não encontrarmos essa formação mucosa nos óvulos a fertilização não ocorreu em todos êles. Deve-se considerar, entretanto, que em orquídeas os tubos polínicos chegam no ovário antes dos óvulos se formarem. Durante a macrosporogênese os tubos polínicos ficam inativos, sendo reativados no momento da fertilização. Não se sabe quantos tubos polínicos são incapazes de reativação e, portanto, quanto deixam de funcionar por êste motivo. Entretanto, êste fato possivelmente explique a falta de fertilização em óvulos aparentemente bem formados como ocorreu em alguns cruzamentos intra-específicos ou mesmo em alguns híbridos.

Em todos os casos onde a fertilização ocorreu os zigotos dividiram levando à formação do embrião. Êstes nossos resultados parecem estar de acôrdo com as idéias de LENZ e WIMBER (1959). Segundo os autores estudados, nas orquídeas são raras as barreiras de isolamento que funcionam por letalidade do zigoto

6.9. Esterilidade na formação do embrião

Praticamente todos os híbridos mostraram, ao lado de sementes com embrião morfológicamente bem constituído, sementes com embrião pequeno, mal formado. Observando-se a tabela 45, aparte referente aos resultados pode-se ver que a frequência de sementes, com embrião mal formado, mostrou-se variável de um híbrido para outro e dentro de um mesmo híbrido de acôrdo com o cruzamento feito. Enquanto a frequência de sementes com embrião bem formado variou de 0,00 à 56,95% a frequência de sementes com embrião mal formado variou de 0,00 à 5,04%. Embora as frequências de sementes com embrião mal formado tenham

sido, em geral, mais baixas que as frequências de sementes com embrião bem formado devemos considerar que nos híbridos 338, 339, 501 e 336 elas foram ligeiramente maiores.

Em todos os casos analisados verificamos que estes embriões não se degeneraram e nem tão pouco foram abortados das sementes.

As sementes que exibiram embrião dêsse tipo apresentaram aspecto aparentemente normal. O tamanho dêsses embriões mostrou-se muito variável, sendo em certos casos muito pequenos.

Em alguns cruzamentos intra-específicos também encontramos, em frequências baixas, embriões pouco desenvolvidos.

6.10. Germinação das sementes

De um modo geral observamos que nem tôdas as sementes com embrião bem formado germinaram. Na verdade foi mesmo pequena a porcentagem daquelas que germinaram. Também não germinaram as sementes com embrião mal formado.

Isto indica que a esterilidade que analisamos até aqui, em função da morfologia das sementes, é parcial. A ela deve ser acrescida aquela que pode ser detectada na germinação das sementes que certamente é de natureza fisiológica.

Infelizmente não pudemos analisar a germinação de tôdas as sementes que estudamos, pois este trabalho é praticamente impossível dado as dificuldades que êle apresenta.

Do exposto podemos concluir que as orquídeas embora de origem recente já apresentam barreiras que evitam o fluxo gênico de uma espécie para outra.

Como se pode ver na tabela 1, em muitas espécies se acham isoladas pela época de florescimento ou pela existência de barreiras geográficas ou, ainda, pela atuação dos dois tipos de barreiras.

Espécies simpátricas foram envolvidas na produção dos híbridos 336, 337, 340, 369, 435 e 456. Em todos os casos os valores médios de sementes sem embrião produzidas, após cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si, foram superiores a 90%.

Nos híbridos 365, 368 e 497 as espécies paternas são alopátricas. Nesses híbridos encontramos 100,00% de esterilidade.

De acordo com BRIEGER (1966) mecanismos de isolamento reprodutivo são de certa forma desnecessários em plantas alopátricas, já que a própria separação geográfica se encarrega de impedir o cruzamento. Deve-se considerar, entretanto, que plantas de áreas geográficas diferentes, ao se adaptarem ao seu habitat particular, desenvolvem características próprias. Durante o processo de evolução a seleção natural trabalha com o sistema gênico para estabelecer o isolamento reprodutivo que pode se manifestar de várias maneiras. Assim se estas plantas de áreas geográficas diferentes forem colocadas juntas o fluxo gênico de uma espécie para outra será impedido pela ação de uma ou de diversas barreiras de isolamento, como já tivemos oportunidade de discutir e como pudemos ver nos híbridos que estudamos.

Finalizando, de acordo com o grau de parentesco existente entre essas plantas de orquídeas cruzadas reunimo-los em cinco grupos a saber:

- a) Um primeiro grupo (O) reunindo as plantas que foram objeto de cruzamentos intra-específicos e que de certa forma serviram para controle das análises feitas em relação aos demais grupos.
- b) Um segundo grupo (A) com espécies de *Cattleya* que serviram nos cruzamentos inter-específicos.
- c) No grupo seguinte (B) com plantas que participaram de cruzamentos inter-gênicos e que apresentam certa afinidade. Este grupo reúne os híbridos entre Cattleya e Laelia.
- d) Um outro grupo podia ser considerado (grupo C) cujas plantas cruzadas apresentam menor afinidade que os outros grupos considerados. Este grupo pode ser subdividido em C₁ reunindo os híbridos entre Cattleya e Schomburgkia e C₂ juntando os híbridos entre Cattleya e Brassavola.
- e) Finalmente um quinto grupo reunindo os híbridos resultantes de cruzamentos de plantas taxonomicamente mais afastadas como Brassavola x Laelia, Brassavola x Epidendrum, Schomburgkia x Sophranites e Brassavola x Schomburgkia.

Analisando os tipos de barreiras de isolamento apresentados pelos cinco grupos considerados podemos verificar:

- a) O grupo O (testemunha) apresenta apenas algumas barreiras de isolamento incipientes. Essas barreiras se manifestam principalmente na gametogênese. Na microsporogênese se evidencia pela formação de micrósporos com número haplóide de cromossomos diferente de 20, como podemos observar na tabela 1. (C. intermedia e L. cinnabarina). Na macrosporogênese manifesta-se pela formação de "óvulos" destituídos de saco embrionário. Estas barreiras, em geral, se apresentam em frequências baixas nas plantas cruzadas e nem todas elas exibem as referidas barreiras. Outro tipo de barreira de isolamento é verificada pela formação de embriões pequenos, pouco desenvolvidos. Como esperado, o grupo O é o que apresenta os valores mais baixos de sementes sem embrião.
- b) O grupo A, que reúne os híbridos inter-específicos de Cattleya, mostra barreiras de isolamento já mais evidentes, manifestando-se na microsporogênese, na macrosporogênese e na formação do zigoto e do embrião. Entretanto, apesar da microsporogênese mostrar-se irregular na maioria dos híbridos desse grupo, não apresentou muita irregularidade. O número haplóide de cromossomos dos microsporócitos oscilou entre 18 a 21. Também os conjuntos celulares pós-meióticos encontrados, de modo geral, se restringiram à tétrades e tétrades com 1 micronúcleo, como nos híbridos 404 e 516, além de tétrades e díades, como no híbrido 7. As maiores variações nos produtos pós-meióticos apresentados foram mostradas pelos híbridos 442 e 501. Em todos eles, entretanto, as frequências de tétrades foram bem altas, superiores a 94,38%. Barreiras de isolamento que se manifestaram no momento da fertilização mostraram-se bem evidentes nos híbridos 516, 501 e 487. Nesses híbridos encontramos nos óvulos, desde a micrópila até o saco embrionário, uma formação mucosa bem característica. Nestes casos os sacos embrionários se degeneraram sem haver

formação do zigoto. Nos híbridos 7, 442 e 404 essa formação mucosa se mostrou incipiente, apresentando-se como pequenas gotas no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos.

- c) O grupo B, que reúne os híbridos entre Laelia e Cattleya (híbridos 31, 370, 508, 567, 610 e 1525), mostrou microsporogênese mais irregular que aquela apresentada pelas plantas do grupo A. A variação do número haplóide de cromossomos foi de 18 a 25. Barreira de isolamento, manifestando-se pela ocorrência da formação mucosa nos óvulos no momento da fertilização, só não foi encontrada no híbrido 508. Em todos os outros mostrou-se bastante característica.
- d) Os híbridos do grupo C₁ (híbridos 435 e 436), já mostraram microsporogênese mais irregular que aquela apresentada pelos híbridos do grupo B. Os números haplóides de cromossomos desses híbridos oscilaram entre 16 e 21 no híbrido 436 e entre 18 e 24 no híbrido 435. Neste híbrido somente 10,15% dos cruzamentos feitos levaram à formação de frutos. Já no híbrido 436 a frequência de sucesso nas polinizações atingiu a 72,00%.

Os híbridos do grupo C₂ (híbridos 336, 337, 338, 339 e 497) apresentaram, de modo geral, microsporogênese mais irregular que a apresentada pelos híbridos do grupo precedente. O híbrido 497 foi, entre todos o que apresentou microsporogênese mais irregular e, mostrou a menor frequência de sucesso nas polinizações (13,96%). Em todos os híbridos os óvulos mostraram formação mucosa bem acentuada no momento da fertilização.

- e) Por último o grupo D que reúne os híbridos entre plantas taxonômicamente mais distantes (híbrido 365, 368, 369, 340 e 465) encontramos as barreiras de isolamento citadas bastante pronunciadas. A microsporogênese nesses híbridos, mostrou-se de maneira geral muito irregular como pode ser visto pelo exame

das tabelas 40 e 41. Com exceção dos híbridos 365 e 368, nos quais as barreiras de isolamento se manifestaram principalmente na germinação do pólen, em todos os outros híbridos elas se manifestaram especialmente no momento da fertilização. Este grupo foi o que apresentou os valores médios mais altos de sementes sem embrião entre todos os grupos estudados; aliás com exceção do híbrido 456, em todos os outros não encontramos sementes com embrião.

Os cinco grupos de híbridos e as respectivas barreiras de isolamento, com seu grau de eficiência são considerados no esquema seguinte para ilustrar nossas conclusões

Grupo consi- dera- do.	B A R R E I R A S D E I S C L A M E N T O				
	Micros- porge- nese	Macros- porge- nese	Germina- ção das polínias	Fertili- zação.	Embrio- gênese.
O	+	+	-	+	+
A	++	++	+	+	++
B	+++	++	++	++	++
C ₁	++++	++	+++	+++	++
C ₂	+++++	++	+++	+++	++
D	+++++	+++	++++	++++	++

(-) = sem a referida barreira de isolamento considerada,

(+) = eficiência das barreiras de isolamento.

7. RÉSUMO E CONCLUSÕES

7.1. No presente trabalho foram estudados os híbridos artificiais F_1 inter-genéricos e inter-específicos de orquídeas. Cruzamentos intra-específicos também foram feitos para se poder estimar a esterilidade nos referidos híbridos.

7.2. Foram usados vinte e quatro híbridos artificiais. Dêsses, seis foram híbridos inter-específicos de Cattleya; seis foram entre Cattleya e Laelia; cinco foram entre Brassavola e Cattleya e os sete restantes foram híbridos inter-genéricos envolvendo outros gêneros de orquídeas.

7.3. Procuramos verificar, através de cruzamentos entre plantas F_1 , irmãs entre si, o grau de fertilidade dos híbridos.

7.4. Análises feitas em amostras de sementes F_2 provenientes dêsses cruzamentos nos mostraram três tipos de sementes: com embrião morfológicamente bem formado, sem embrião, e com embrião pouco desenvolvido, mal formado.

7.5. A frequência dos três tipos de sementes mostrou-se variável de híbrido para híbrido.

7.6. Encontramos também variações nas frequências das três classes de sementes produzidas por um mesmo híbrido, dependendo das plantas envolvidas nos cruzamentos.

7.7. Como em geral ocorre em outras plantas cruzamentos entre grupos taxonômicamente mais próximos nos deram menor porcentagem de esterilidade do que entre grupos taxonômicamente mais distantes.

7.8. Os híbridos inter-específicos da Cattleya foram os que deram, em média, as menores frequências de sementes sem embrião. Depois seguiram os híbridos em que estão envolvidos Laelia e Cattleya e depois os híbridos entre Brassavola e Cattleya.

e Cattleya e Schonburgkia. Os híbridos que apresentaram os valores médios mais baixos de sementes sem embrião foram aqueles entre gêneros taxonômicamente mais distantes ou seja: entre Laelia e Brassavola; Sophranites e Schonburgkia e Schonburgkia Epidendrum e Brassavola e entre Brassavola e Schonburgkia.

7.9. Comparamos os resultados de sementes F_2 sem embrião com as frequências obtidas em sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos. Excluindo-se o híbrido 442, todos os outros mostraram valores médios de sementes sem embrião, superiores aos encontrados em sementes provenientes de cruzamentos intra-específicos.

7.10. Podemos concluir que em orquídeas a hibridação leva à produção de indivíduos estéreis ou parcialmente estéreis. Esporadicamente, em condições artificiais, conseguimos híbridos férteis quando as plantas cruzadas apresentam grande afinidade.

7.11. Nos híbridos que se mostraram estéreis procuramos verificar a causa da esterilidade. Fizemos análise da microsporogênese, germinação de pólen, macrosporogênese, fertilização, formação do embrião e germinação das sementes.

7.12. A macrosporogênese e microsporogênese mostraram-se irregulares. Ao lado de alguns gametas normais encontramos, em frequências variadas nos híbridos, gametas defectivos.

7.13. A microsporogênese levou à produção de tétrades sem micronúcleos; tétrades com um e até oito micronúcleos; díades sem micronúcleos; díades com 1, 2 e 3 micronúcleos; tríades sem micronúcleos; tríades com 1, 2 e 3 micronúcleos e mônades. Em todos os híbridos as tétrades sem micronúcleos apareceram em maior frequência. As mônades ocorreram em baixas frequências.

7.14. Em geral as tétrades sem micronúcleos mostraram aspecto normal. Pelas técnicas usuais não se distinguiram uma tétrade normal de uma anormal.

7.15. Através das contagens do número de cromossomos nos microsporócitos haplóides, verificamos que a distribuição dos cromossomos, durante a meiose, mostrou-se irregular mesmo quando houve formação de tétrades. Meiose muito irregular levou à degeneração dos microsporócitos.

7.16. A macrosporogênese irregular manifestou-se principalmente pela não formação de saco embrionário nos óvulos. Igualmente manifestou-se pela formação de óvulos não funcionais.

7.17. Em alguns híbridos a microsporogênese irregular afetou a germinação de grãos de pólen (polínias). Polínias com muitos grãos de pólen degenerados não germinaram (híbrido 497) e algumas plantas de outros híbridos. Essas polínias mostraram coloração amarelo-ferrugem e apresentaram-se fortemente aderidas às paredes da antera. Nos híbridos 365 e 368, e em algumas plantas dos outros híbridos, os tubos polínicos formados não chegaram a penetrar no ovário. Na maioria dos cruzamentos feitos os tubos polínicos cresceram por todo o comprimento do ovário.

7.18. Em todos os casos de não germinação do pólen e nos casos onde os tubos polínicos não chegaram a penetrar no ovário os cruzamentos não levaram à formação de frutos. Estes fatos comprovam a necessidade de uma auxina liberada pelos tubos polínicos no ovário para que este se desenvolva fato já conhecido na literatura de orquídeas (LENZ e WIMBER, 1959).

7.19. A frequência de sucesso nas polinizações mostrou-se variável de híbrido para híbrido. No híbrido 7 (= C. guttata x C. bicolor) todos os cruzamentos levaram à formação de frutos. Nos híbridos 365 (= Brassavola perrinii x Epidendrum ciliare) e 368 (= L. flava x Schonburgkia crispa), apesar de grande número de cruzamentos feitos, não obtivemos frutos após os cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si.

7.20. A fertilidade dos gametas masculinos e femininos foi testada também através de retrocruzamentos. Quando usamos o híbrido como fêmea, de um modo geral, as frequências de ~~sucesso~~

sem embrião não diferiram muito das frequências encontradas nos cruzamentos de plantas F_1 irmãs entre si. Isto seria de se esperar se as espécies fôsses normais na sua microsporogênese. De um modo geral quando os híbridos F_1 foram usados como polinizadores as frequências de sementes sem embrião foram relativamente menores que nos cruzamentos recíprocos. Provavelmente os híbridos de orquídeas mostram uma maior esterilidade feminina do que masculina.

7.21. Na maioria dos híbridos apesar do ovário apresentar óvulos com saco embrionário formado e ao lado deles muitos tubos polínicos, a polinização não se processou. Não houve formação do zigoto e o saco embrionário se degenerou.

7.22. Na época da fertilização encontramos em muitos óvulos no trajeto a ser percorrido pelos tubos polínicos, uma formação granular, de composição mucosa. Nos casos onde essa formação se mostrou bastante acentuada a fertilização não ocorreu. O saco embrionário se degenerou. Não conseguimos saber qual o papel dessa formação. Pensamos que esteja relacionado à funcionabilidade anormal de um dos gametas do híbrido, ligada provavelmente à sua formação irregular.

7.23. Os zigotos formados levaram à produção de embrião. Não encontramos, nos híbridos estudados, casos de degeneração dos zigotos. Este fato, corrobora as ideias de LENZ e WIMBER (1959) de que em orquídeas não ocorrem barreiras que funcionam por degeneração do zigoto.

7.24. Nem todos os embriões formados mostraram aspecto e tamanhos normais. Em todos os híbridos encontramos, em frequências variadas, ao lado de sementes com embrião morfológicamente bem formado, sementes com embriões pequenos, mal formados. Esses embriões ocorreram sempre em baixas frequências.

7.25. Sementes com embriões pequenos não germinaram. Também não germinaram muitas sementes com embrião de aspecto normal. Por simples análise microscópica não podemos distinguir entre essas últimas sementes as que têm capacidade de germinação das que não a possuem.

7.26. A frequência de germinação das sementes em geral foi baixa.

7.27. A maioria dos híbridos apresentou vários tipos de barreiras de isolamento relacionadas à esterilidade. Com base na maior ou menor afinidade taxonômica existente entre as plantas cruzadas achamos conveniente distribuí-las em grupos a saber: grupo O que reúne as plantas cruzadas a fim de podermos avaliar a esterilidade existente nos híbridos; A que reúne os híbridos inter-gênericos entre Laelia e Cattleya; C₁ que reúne os híbridos entre Cattleya e Schomburgkia; C₂ que reúne os híbridos entre Cattleya e Brassavola; D que reúne os outros híbridos inter-gênericos estudados.

7.28. Embora a maioria dos grupos apresente as várias barreiras de isolamento que encontramos nos híbridos estudados, ficou evidenciado que estas barreiras se tornam mais pronunciadas e mais frequentes à medida que as plantas cruzadas se afastam do grupo O. Realmente, o grupo O (testemunha) apresentou algumas barreiras incipientes que se manifestaram principalmente na microsporogênese, macrosporogênese e na formação do embrião. O grupo A, apresentou estas mesmas barreiras em frequências mais pronunciadas quando comparadas ao grupo O. Em alguns híbridos desse grupo (híbridos 7, 404 e 442) barreiras já começaram a se evidenciar no momento da fertilização. Nos outros híbridos do mesmo grupo (híbridos 516, 501 e 487) essas barreiras já se mostraram bastante características. Manifestou-se pelo aparecimento de formação mucosa bem evidente nos óvulos. No grupo B (híbridos entre Laelia e Cattleya) encontramos os mesmos tipos de barreiras de isolamento apresentadas pelo grupo A, porém com microsporogênese mais irregular. A barreira de isolamento que se manifestou no momento da fertilização abrangeu praticamente todos os híbridos desse grupo, com exceção do híbrido 508, diferentemente do grupo A, no qual apenas poucos híbridos apresentaram essa barreira. O grupo B₁ (híbridos entre Cattleya e Schomburgkia) mostrou microsporogênese ainda mais irregular que o grupo B e todos os seus híbridos apresentaram barreiras de isolamento no momento da fertilização, o que ocorreu com parte dos híbridos de B. O grupo C₂ (híbridos entre Cattleya e Brassavola) mostrou microsporogênese mais irregular que o grupo precedente. O híbrido 497 foi

o que mostrou microsporogênese mais irregular de todos os híbridos desse grupo. Também foi a que apresentou a menor frequência de sucesso nas polinizações. Todos os híbridos mostraram formação mucosa bastante acentuada nos óvulos no momento da fertilização. Finalmente o grupo D apresentou tôdas as barreiras de isolamento detectadas nos híbridos de maneira bastante acentuada o que o fez diferir acentuadamente dos grupos anteriores. Nos híbridos 365, 368 e 497 as barreiras de isolamento manifestaram-se principalmente na germinação das polínias.

7.29. Como conclusões parece-nos lícito considerar pelos resultados alcançados: a) as orquídeas, embora sejam de origen recente, já apresentam mecanismos que impedem ou limitam o fluxo gênico de uma espécie para outra; b) no tocante à esterilidade dos híbridos, êsses mecanismos são evidentes em níveis que se acentuam à medida que as plantas cruzadas se afastam taxonômicamente; c) com base no material utilizado, nos foi possível estabelecer cinco níveis crescentes de isolamento; com diferenças progressivamente acentuadas na microsporogênese e na fertilização, menos acentuadas na macrosporogênese e germinação das polínias e não se evidenciando nítida na embriogênese, na qual, ao que parece, desde que sejam vencidas as barreiras anteriores, a reprodução se completa sem grandes embaraços..

7.1. SUMMARY AND CONCLUSIONS

7.1. The present work deals with studies on F_1 intergeneric and interspecific crosses of orchids which were artificially obtained.

7.2. Twenty-four hybrids were used. Six are interspecific involving the genus Cattleya; the others are intergeneric being six between Cattleya and Laelia; five between Brassavola and Cattleya and the rest involving other orchid genera.

7.3. An attempt to determine the amount of fertility of the hybrids was made employing sib-crosses among F_1 plants.

7.4. Microscopic examinations of samples of F_2 seeds showed three types of seeds: seeds without embryo, seed with small embryo and seeds with embryo morphologically normal.

7.5. The frequencies of the three types of seeds were variable according the hybrid analysed. For the same hybrid the frequencies of seeds were also not uniform according the plants involved.

7.6. As is usual among plants in general, crosses between closed related species produced seeds with a higher degree of fertility than crosses of distantly related species.

7.7. The interspecific hybrids of Cattleya produced, on the average, the lowest frequency of seeds without embryo following by the hybrids between Laelia and Cattleya and then the hybrids between Cattleya and Schomburgkia and between Cat. and Brassavola. The lowest values were presented by the hybrids between Laelia and Brassavola; Sophranites and Schomburgkia; Epidendrum and Brassavola and between Laelia and Schomburgkia.

7.8. Comparisons of the frequencies of seeds without embryo were made in relation to the F_2 generation and the intraspecific crosses. With the exception of the hybrid number 442 (= C. leopoldii x C. adandiae) all the others hybrids showed

higher frequencies of seeds without embryo than in intraspecific crosses. This fact allow to conclude that the hybridization produces partial to complete sterile hybrids. Sometimes, in artificial conditions, fertile hybrids are obtained.

7.10. The causes of the sterility has been investigated on the sterile hybrids. We analysed the microsporogenesis, pollen germination, fertilization, embryogeny and seed germination.

7.11. The microsporogenesis and megasporogenesis exhibited anomalies. The hybrids produced normal gametes and at the same time abnormal gametes with variable frequency.

7.12. The microsporogenesis gave rise to tetrads without micronuclei; tetrads with one, two and up to eight micronuclei; dyads without micronuclei; dyads with one, two and three micronuclei; triads without micronuclei; triads with one, two and three micronuclei and monads. All hybrids yielded a higher degree of tetrads without micronuclei. Relatively few monads are produced.

7.13. Generally, the appearance of the tetrads without micronuclei was normal. By a simple microscopic examination it is impossible to discriminate an abnormal tetrad from a normal one.

7.14. The distribution of the chromosomes at meiosis was irregular in the majority of the hybrids. Also, the tetrads without micronuclei showed abnormal chromosome number.

7.15. The irregular megasporogenesis led to the formation of "ovules" without embryo sac or the formation of sterile ovules.

7.16. In many cases irregular microsporogenesis reduced the germination of pollen grains (pollinia). Pollinia with great quantity of degenerated pollen grains did not germinate (hybrid 497 and some plants of other hybrids). It was difficult to separate the pollinia from the anther tissue. On hybrids 368 (= Laelia flava x Schomburgkia crispa) and 365 (= Brassavola

perrinii x Epidendrum ciliare) the pollen tubes did not reach the entire length of the ovary. In most crosses the pollen tubes reach the entire length of ovary.

7.17. On all crosses where the pollen tubes did not reach the ovary the fruits were not formed. This fact supports that in orchids an auxin delivered into the ovary by the pollen tube is needed for ovary development (LENZ and WIMBER, 1959).

7.18. The frequency of pollination which produced fruits was variable from hybrid to hybrid. On hybrid number 7 (= C. guttata x C. bicolor) all crosses produce fruits. In spite of the great number of crosses made employing sib plants of hybrids 365 e 368 no fruits were obtained.

7.19. The fertility of the male and female gametes were tested through backcrossing. When we used the hybrid as the seed parent the proportion of seeds without embryo were about the same obtained in crosses between F_1 plants. This to be expected if the species presented normal microsporogenesis. When the F_1 hybrids were used as the male parent the frequency of sterile seeds were comparatively lower than the reciprocal crosses. Probably the orchid hybrids show a higher female sterile than male sterility.

7.20. In most hybrids there was no fertilization in spite of the fact that the ovary had ovules with embryo sacs showing also many pollen tube at their sides. No zygote was formed and the embryonic sac degenerated.

7.21. At the ^{time} of fertilization a mucous formation was observed along the way the pollen tubes should travel. In all cases where this formation was more accentuated fertilization was not accomplished. The embryo sac then degenerated.

7.22. It is probable that this formation results from the fusion of irregular gametes.

7.23. On all cases studied the zygote formed divided producing the embryos. We did not find zygote degeneration.

These findings are in good agreement to the suggestions of LENZ and WIMBER (1959) that in orchids isolation mechanisms due to zygotic lethality are seemingly rare.

7.24. All crosses produced seeds with morphologically normal embryo and seeds with small anormal embryo. Seeds with small embryo occurs with low frequency.

7.25. Seeds with small embryo did not germinate. Also many seeds with morphologically normal embryo. By microscopic examination we could not discriminate seeds with viables embryos from seeds with inviable embryo.

7.26. In general the frequency of germination were low.

7.27. According the degree of affinity between the plants crossed we assembled the hybrids in five groups: O - assembles the plants intraspecific crossed; A - assembles the plants of Cattleya interspecific crossed; B - assembles the intergeneric hybrids between Laelia and Cattleya; group C₁ - assembles hybrids between Cattleya and Schomburgkia; C₂ - assembles hybrids between Cattleya and Brassavola; group D - assembles the intergeneric hybrids between distantly related plants.

7.28. The majority of the groups presented all the isolating^{barriers} related to sterility. The crosses between distantly related species present isolating barriers more pronounced than the crosses of closed related species.

7.29. In a general way the results showed that the orchids although of recent origin present efficient barriers to suppress the gene exchange as to maintain the species populations as separate entities.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, H. and E. ANDERSON - 1958 - A conspectus of hibridization in the Orchidaceae, *Evolution*, 12: 512-518.
- AMES, O.-1937- Pollination through pseudo-copulation. *Bot.Mus. Leaflets, Harvard Univer.*, 5: 1-30.
- ALVAREZ, M.R. and Y. SAGAWA - 1965 - A histochemical study of embryo sac development in Vanda (Orchidaceae), *Cariclogia*, 18; 241-249.
- ANDERSON, E. - 1953 - Introgresive hybridization. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 28: 280-307.
- ANDERSON, E. and L. HUBRICHT - 1938 - The evidence of introgresie hibridization. *Am. Jour. Bot.*, 25: 296-388
- ANDERSON, E. and G.L. STEBINS - 1954 - Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*, 8: 378-388
- ARENS, K. - 1948 - Prova de calose por meio da microscopia à luz fluorescente e aplicações de método. *Acta dell II Congresso Sul Americano de Botânica, Tucuman.*
- BAKER, H.G. - 1963 - Evolutionary Mechanisms in Pollination Biology. *Science*, 139: 877-883.
- BARBER, H.N. - 1942 - The pollen grain division in the Orchidaceae. *Journ of Genet*, 43: 97-103.
- BENTHAM, G. - 1881 - Notes on Orchideae, *Jour. Linn. Soc. Bot.*, 18: 281-360.
- BENTHAM, G. and J.D. HOOKER - 1883 - *Genera Plantarum*. 3 . (Orchideae) 460-636.
- BIGELOW, R.S. - 1965 - Hybrid zones and Reproductive Isolation *Evolution*, 19: 449-458.
- BLUMENSCHHEIN, A. - 1957 - Estudos citológicos na família Orchidaceae. Tese de doutoramento apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, S.P., 5-42.
- BLUMENSCHHEIN, A. - 1960a - Número de cromossomos de algumas espécies de orquídeas. Publicação científica do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, 1: 45-60.

- BLUMENSCHNEIN, A. - 1960b - Estudos sôbre a evoluçãõ do sub-gênero Cyrtolaelia (Orchidaceae). Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" para obtençãõ do título de livre docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral.
- BLUMENSCHNEIN, A. - 1961 - Una nova espécie do gênero Cattleya Lindl. Publicaçãõ Científica do Instituto de Genética de Piracicaba, 2: 23-33.
- BRIEGER, F.G. - 1957 - Tendências evolutivas sistemáticas das orquídeas. Reuniãõ da Soc. Bot. do Brasil. Regional de São Paulo. Mineografado.
- BRIEGER, F.G. - 1960a - Contribuiçãõ para a Taxonomia das orquídeas. Publicaçãõ Científica do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, 1: 1-31.
- BRIEGER, F.G. - 1960b - Orchids in Botanical Gardens in Brazil The Report the Third World Orchid Conference.
- BRIEGER, F.G. - 1966 - Evoluçãõ filogenética, com referênciã especial às plantas superiores. In Genética, aspectos modernos pura e aplicada. C. Pavan e A.B. e A.B. da Cunha. 2ª Ediçãõ. Editõra da Universidade de São Paulo 464-515.
- BRIEGER, F.G. - 1969 - Patters of evolutionary and geographical distribution in neotropical orchids. Biol. J. Linn. Soc. 1: 197-217.
- BRINK, R.A. and D.C. COOPER - 1947 - The endosperm in seed development. Bot. Rev., 8: 423-541. (Apud Lenz e Wimber 1959).
- BROWN, J.A. - 1966 - Try a few hormones. Amer. Orch. Soc. Bull 35: 195.
- BURGÉFF, H. - 1959 - Mycorriza of Orchids. In C.L. Withner (ED) The Orchids. The Ronald Press. Co., New York, 361-395.
- CURRIER, H.B. - 1957 - Callose substances in Plants Cells. Amer J. Bot., 44: 478-488.
- DARWIN, C. - 1882 - The variation of animals and plants under domestication. London (Apud Wirth e Withner, 1959).
- DOBZHANSKY - Th. - 1937 - Genetics nature of species differences. Amer. Nat., 71: 404-420.

- DOBZHANSKY, Th. - 1944 - Mecanismo de evolução e origem das espécies. Boletim dos cursos de aperfeiçoamento e especialização. Ministério da Agricultura do Rio de Janeiro.
- DOBZHANSKY, Th - 1957 - Genetics and the origin of species. 3^a Ed. Rev. New York, Columbia Univ. Press., 354 pp.
- DODSON, C.H. - 1962 - The importance of pollination of the orchids of tropical America. Amer. Orch. Soc. Bull., 31: 525-534; 641-649; 731-735.
- DODSON, C.H. - 1965 - Agents de polinization su influencia sobre la evolucion en la familia Orchidaceae. Univ. Nac. de la Amazonia Peruana. Inst. Gen. de Investigacion 1-89.
- DRESSLER, R.L. - 1968 - Pollination by Euglossine bees. Evolution, 22: 202-210.
- DRESSLER, R.L. and C.H. DODSON - 1960 - Classification and phylogeny in Orchidaceae, Annals of the Missouri Botanical Garden, 47: 25-68.
- DUNCAN, R.E. and J.T. CUNTIS - 1942 - Intermittent growth of Phalaenopsis. A correlation of the growth phases of an orchid fruit with internal development. Bull. Torrey Bot. Club., 69, 167-183. (apud Wirth e Withner, 1959).
- EWALD, P. - 1949 - Orquídeas de Santa Catarina. Orquídea, 11: 130-135.
- FRISCH, K. - 1914 - Der Farbensinn und Formensinn der Biene. Zool. Jahrb., 35: 1-182.
- GRANT, V. - 1949 - Pollination systems as isolating mechanisms in angiosperms. Evolution, 3: 82-97.
- GUSTAFSON, A. - 1948 - Polyploidy, life-form, and vegetative reproduction, Hereditas, 34: 1-22.
- HAGERUP, P. - 1932 - Uber Polyploidie in Beziehung zu Klima, Okologie und Philogenie. Chromosomenzahlen aus Timbuku. Hereditas, 16: 19-40 (apud Blumenschein, 1960a).
- HAWKES, A.D. and A.H. HELLER - 1959 - Phylogenetical Lists of the Orchidaceae. Orchid Weekly, 1: 261-265; 271-275.
- HOEHNE, F.C. - 1930 - Album das Orchidaceas brasileiras. Secr. Agric. Estado de São Paulo. (apud Kerr e Lopes, 1962).
- HOEHNE, F.C. - 1949 - Iconografia de Orchidaceas do Brasil. Secr. Agric. Estado de São Paulo, 49-124.

- KELLER, G. and R. See - 1930-38 - Monographie und Iconographie der Orchideen Europas und des Mittelmeergebietes. Kristische Monographie. Report. Spec. Nov. Regn. Veg., Sonderbeih (apud STEBBINS and FERLAN, 1956).
- INGLE, J., J.L. KEY and R.E. HOLM - 1965 - Demonstration and characterization of DNA - like RNA in excised plant tissue. J. Mol. Biol., 11: 730.
- KAMEMOTO, H. - 1950 - Polyploidy in Cattleya. Amer. Orch. Soc. Bull., 19: 366-373.
- KAMEMOTO, H. - 1969 - The origin and significance of polyploidy in Vanda. Pacific Orchid Soc. Bull., 16: 77-95.
- KAMEMOTO, H. and L.F. Randolph - 1949 - Chromosome of the Cattleya tribe. Amer. Orch. Soc. Bull., 18: 336-369.
- KERR, W.E. e C.R. LOPES - 1962 - Biologia da reprodução Tri-gona (Plebeia) droryana Fl. Smith. Revista Brasileira de Biologia, 22: 335-341.
- KEY, J.L., N.M. BARNETT and C.Y. LIN - 1967 - RNA and protein Biosynthesis and the regulation of cell elongation by auxin. Annals of the New York Academy of Sciences, 144: 49.62.
- KULLENBERG, B. - 1950 - Investigations on the pollination of Ophrys species. Oikos, 2: 1-19 (apud Kerr e Lopes, 1962)
- KULLENBERG, B. - 1952 - Ophrys insectifera et les insects. Oikos, 3: 1. (apud Kerr e Lopes, 1962)
- KULLENBERG, B. - 1956a - On the scents and colours of Ophrys flowers and their specific pollinators among the aculeate Hymenoptera. Svensk Bot. Tidskr., 50: 25-46. (apud Kerr e Lopes, 1962).
- KULLENBERG, B. - 1956b - Field experiments with chemical attractants on aculeate Hymenoptera males I. Zool. Bidrag., Uppsala, 31: 253-354, 5 taf.
- LEINIG, M. - 1966 - Distribution of Brazilian Cattleya Species Amer. Orchid Soc. Bull., 35: 836-837.
- LEINIG, M - 1968 - Distribution of Brazilian Laelias. Amer. Orch. Soc. Bull., 37: 1069-1071.
- LENZ, D.E. - 1956 - John Deminy - Pioneer Orchid hybridizer Am. Orch. Soc. Bull., 25: 679-687.
- LENZ, L.W. and D.E. WIMBER - 1959 - Hybridization and inheritance in Orchids. In. C.L. Withner (E.D.), The Orchids., 261-314.

- LIN, C.Y., J.L. KEY and C.E. BRACKER - 1966 - The association of D-RNA with polyribosomes. *Plantas. Physiol.*, 41: 976-982.
- LINDLEY, J. - 1830 - The genera and species of Orchidaceous Plants. London, 553 pp.
- LINSLEY, E.G. and J.W. Mc. SWAIN - 1958 - The significance of floral constancy among bees of the genus Diadasia (Hymenoptera, Anthophoridae). *Evolution*, 12: 219-223.
- MC WILLIAM, J.R. - 1959 - Interspecific Incompatibility in *Pinus*. *Amer. Jour. Bot.*, 46: 425-433.
- MANSFELD, F.W. - 1937 - Uber das System der Orchidaceae. *Blumea, Suppl.*, 1: 25-37.
- MARTIN, F.W. - 1959 - Staining and observing pollen tubes in style by means of fluorescence. *Stain Tech.*, 34: 125-128.
- MAYR, E. - 1947 - Ecological factors in speciation. *Evolution* 1: 263-288.
- MAYR, E. - 1948 - The bearing of the new systematics on genetical problems. *The nature of Species. Adv. in genetics*, 2: 205-237.
- MAYR, E. - 1949 - The species concept: A discussion: Semantic versus semantics. *Evolution*, 3: 369-373.
- MAYR, E. - 1959 - Isolation as an evolutionary factor. *Proc. Phil. Soc.*, 103: 221-230.
- MAYR, E. - 1963 - Animal species and evolution. Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachusetts.
- MIWA, A. - 1937 - Test of germinating power of orchid pollen. *Orchid Review*, 45: 345-349.
- NIIMOTO, D.R. and Y. SAGWA - 1961 - Cvule Development in Dendrobium. *Amer. Soc. Orch. Bull*, 30: 818-819.
- PASTRAMA, M.D. and J.J. SANTOS - 1931 - A contribution on the life history of Dendrobium anosmum. *Lindley. Nat. and Appl. Sci. Bull.*, Philippones Univ., 1: 133-144 (apud Wirth e Withner, 1959).
- PFITZER, E. - 1889 - Orchidaceae. In *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Publicado por Engler & Prantl., 2: 52-220.
- POST, R.E. Jr - 1965a - Cattleya noisiae. Building blocks of the Cattleya genus. *Amer. Orch. Soc. Bull.*, 34: 292-294.
- POST, R.E. Jr - 1965b - Cattleya joddigesii, C. intermedia and their varieties, *Amer. Orch Soc. Bull*, 34:404-406.

- POST, R.E. Jr. - 1965c - Building blocks of Cattleya genus and Cattleya dowiana. Amer. Orch. Soc. Bull., 34: 807-810.
- RAYMENT, R. - 1948 - Notes on remarkable wasps and bees. Austral Zool., 11: 238-254. (apud Kerr e Lopes, 1962).
- RILEY, H.P. - 1938 - A character analysis of colonies of Iris fulva, Iris hexagona var. gigantocaeerulea and natural hybrids. Amer. J. Bot., 2: 727-738.
- ROLFE, R.A. - 1893 - The history of Orchid hybridization. The Orchid Review., 1: 3-6; 35-40; 67-71; 99-103; 131-134; 195-197; 227-229; 259-263; 291-295; 323-328; 356-360.
- ROLFE, R.A. and C. HURST - 1909 - The Orchid Strid. Book London. 327 pp.
- RUSCHI, A. - 1950 - Orchidaceas novas do Estado do Espirito Santo Orquídea, 48-52.
- SAGAWA, Y. and H.W. ISRAEL - 1964 - Post-pollinization ovule development in Dendrobium Orchids. I. Introduction. Caryologia, 17: 53-64.
- SANDER, F.K. (E.D.) - 1946 - Sander's complete list of Orchid hybrids. London.
- SANDER, F.K. (E.D.) - 1949 - Sander's complete list of Orchid hybrids, London.
- SANDER, F.K. (E.D.) - 1952 - Sander's complete list of Orchid hybrids. London.
- SCHLECHTER, R. - 1927 - Die Orchidee. Verlagsbuchhandlung Paul Parey. Berlin., 956 pp.
- SHIMOYA, C. - 1956 - Notas sobre a cariólogia de algumas orquídeas Ceres, 9: 426-431.
- SIMPSON, C.G. - 1944 - Temps and mode of evolution. New York. Columbia, University Press. 237 pp.
- SIMPSON, C.G. - 1953 - The major features of evolution. New York. Columbia New York, Columbia Univ. Press. 454 pp.
- STEBBINS, G.L. Jr. - 1950 - Variation and evolution in Plants. Columbia Univ. Press. New York, 643 pp.
- STEBBINS, G.L. and L. Ferlan - 1956 - Population variability, hybridization, and introgression in some species of Ophrys. Evolution, 10: 32-46.
- STEBBINS, G.L. Jr. - 1958 - The inviability, weakness and sterility of intraspecific hybrids. Advances in genet. 10: 147-215.
- STOREY, W.B. - 1955 - Fertility in Vanda. Na Prea Okika c Hawaii Nei, 5: 160-168.

- STOREY, W.B. - 1956 - Diploid and polyploid gamete formation in orchids. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sc.*, 68: 491-502.
- STRESSMANN, E. - 1942 - Ökologische Sippen-Rassen, und Artunterschiede bei Vögeln. *Journ. für Ornith.*, 91: 305-328. (apud Mayr, 1947).
- SWARTZ, O. - 1800 - Afhandling om Orchidernes Slagter och deras Systematiska indelning. *Jongl. Vetenskaps Academiens Nya Handlingar*, 21: 115-138; 202-254.
- TOSELO, G. - 1969 - Emprêgo de cromatografia em estudos filogenéticos nos gêneros Cattleya Lindl. e Laelia. (Orchidaceae, Epidendrinae). Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba, para obtenção do título de doutor.
- TISCHLER, G. - 1935 - Die Bedeutung der Poliplodie für die Verbreitung der Angiospermen, erlauternd an den Arten Schleswig Holsteins, mit Ausblicken auf andere Florengebiete. *Bot. Jahrb.*, 67: 1-36 (apud Buraschein, 1960a).
- THORPE, W.H. - 1945 - The evolutionary significance of habitat selection. *Jour. Animal. Ecol.*, 14:67-70 (apud Mayr, 1947).
- WALLBRUNN, H.M. - 1966 - Concerning the inability of obtaining hybrids between certain species. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 8: 633-634.
- WIRTH, M. and C.L. WITHNER - 1959 - Embriology and development in the Orchidaceae. In: C.L. Withner (Ed.). *The Orchides*: 165-188. The Ronald Press Co., New York.