

RELATÓRIO TÉCNICO ITV DS

PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya milleri*, ESPÉCIE ENDÊMICA DO QUADRILÁTERO FERRÍFERO CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

Luiz Palhares Neto¹

Leilane Bárbara Gomes²

José Edimar Marangon²

Genilton Santos²

Cecílio Frois Caldeira¹

Belém / PA

Maio / 2022

Título: Protocolo de micropropagação de <i>Cattleya milleri</i> , espécie endêmica do quadrilátero ferrífero criticamente ameaçada de extinção.	
PROD. TEC. ITV DS N012/2022	Revisão 00
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (x) Pública	

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

Nota de capa

1 Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável. – Belém/PA

2 Vale. Centro de Tecnologia de Ferrosos. – Nova Lima/MG

Citar como

PALHARES NETO, Luiz; *et al.*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P161 Palhares Neto, Luiz.

Protocolo de micropropagação de *Cattleya milleri*, espécie endêmica do quadrilátero ferrífero criticamente ameaçada de extinção. / Luiz Palhares Neto ... [et al.] - Belém: ITV, 2022.

17 p. : il.

Relatório Técnico (Instituto Tecnológico Vale) – 2022

PROD.TEC.ITV.DS – N012/2022

DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2022.12.PalharesNeto

1. Rejeitos - Carajás, Serra dos (PA). 2. Flotação - Apatita - Carajás, Serra dos (PA). 3. Sossego, Mina do - Carajás, Serra dos (PA). I. Oliveira, Geovan Olavo Damasio de. II. Gastauer, Markus. III. Ramos, Silvio Junio. IV. Título

CDD 23. ed. 582.98115

RESUMO EXECUTIVO

A minimização dos impactos ambientais é pré-requisito para exploração de recursos naturais não renováveis e pode impactar negócios através do relacionamento de empresas com órgãos governamentais e a sociedade em geral. Ações de conservação ambiental são requeridas sobretudo em ambientes vulneráveis como as áreas de campos rupestres ferruginosos onde predominam as atividades de mineração no Quadrilátero Ferrífero/MG. A espécie *Cattleya milleri* é uma orquídea endêmica dos Campos Rupestres Ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero e atualmente está classificada como criticamente ameaçada de extinção sobretudo devido a restrição geográfica de sua ocorrência, degradação de seu habitat natural e reduzidas populações naturais. O estabelecimento de métodos de propagação e cultivo que possibilitem a rápida multiplicação desta espécie é etapa crucial para a conservação *ex situ* e também para o enriquecimento em áreas naturais e a manutenção da espécie em seu habitat. A micropropagação ou a propagação *in vitro* consiste na multiplicação em larga escala de plantas através do cultivo de células, tecidos, órgãos ou a planta inteira em meio nutritivo sob condições controladas de temperatura e luminosidade. As etapas da micropropagação são constantemente ajustadas de acordo com as necessidades das diferentes espécies. Neste estudo foi estabelecido um protocolo dividido em quatro etapas: (1) coleta e assepsia do material vegetal, (2) estabelecimento e desenvolvimento *in vitro*, (3) aclimatização e rustificação e (4) reintrodução e monitoramento das mudas. Sementes de *C. milleri* foram retiradas de cápsulas maduras e transferidas para seringas. As seringas contendo as sementes foram preenchidas totalmente com a solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,3%. Após 12 minutos, em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 1 mL da solução contendo as sementes foi adicionada em potes contendo 22 mL do meio de cultivo previamente esterilizado. O meio utilizado foi composto de sacarose (15g/L), fertilizante B&G® (3mL/L), carvão ativado (1,5g/L) e ágar nutriente (5g/L). A germinação foi observada em quase todas as sementes inoculadas, tendo início aos 25 dias. O processo de propagação *in vitro* de *C. milleri* teve duração de 18 meses, com dois episódios de repicagem durante esse período. As plantas responderam positivamente as condições *in vitro*, apresentando crescimento satisfatório da parte aérea e de raízes. Na etapa de aclimatização, as plantas enraizadas tiveram suas raízes lavadas e foram transplantadas para embalagens plásticas contendo musgo chileno e fragmentos de isopor. Após 450 dias de cultivo em estufa coberta com sombrite 80 (80% de interceptação) foi observada uma reduzida mortalidade de mudas. Posteriormente, plantas aclimatadas foram transplantadas para recipientes contendo substrato natural (contendo canga granular) e cultivadas em estufa com sombrite 80 e posteriormente em sombrite 50, onde permaneceram por 1.095 dias. Ao final da etapa de rustificação foram obtidas aproximadamente 3.000 mudas de *C. milleri* aptas para o plantio em ambiente natural. A reintrodução destas mudas ocorreu através do plantio das mudas na Serra da Calçada (MG). O monitoramento das plantas ocorre mensalmente com a quantificação das mudas sobreviventes. Após 2 anos de acompanhamento observou-se baixa taxa de mortalidade (-30%) e crescimento satisfatório das plantas. O processo de monitoramento continuará sendo realizado com o objetivo de avaliar os processos de floração e frutificação e recrutamento de novas plantas. Os resultados obtidos evidenciam que a técnica de propagação *in vitro* é uma alternativa viável para a produção em larga escala de mudas de qualidade da espécie *C. milleri*. Uma vez que esta é uma espécie criticamente ameaçada de extinção, a reintrodução de plantas em ambiente natural contribui para o enriquecimento das populações existentes e, consequentemente, a conservação da espécie em seu ambiente natural. Uma próxima etapa importante será avaliar a diversidade genética da espécie para determinação das matrizes prioritárias para propagação.

RESUMO

A espécie *Cattleya milleri* é uma orquídea endêmica dos Campos Rupestres Ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. Esta espécie é atualmente classificada como criticamente ameaçada de extinção sobretudo devido a restrição geográfica de sua ocorrência, degradação de seu habitat natural e reduzidas populações naturais. O estabelecimento de métodos de propagação e cultivo que possibilitem a rápida multiplicação desta espécie é etapa crucial para a conservação *ex situ* e também para o enriquecimento em áreas naturais e a manutenção da espécie em seu habitat. A micropropagação ou a propagação *in vitro* consiste na multiplicação em larga escala de plantas através do cultivo de células, tecidos, órgãos ou a planta inteira em meio nutritivo sob condições controladas de temperatura e luminosidade. As etapas da micropropagação são constantemente ajustadas de acordo com as necessidades das diferentes espécies. Diante disso, o objetivo do relatório foi descrever as etapas desenvolvidas para estabelecer o protocolo de micropropagação de *C. milleri*. O protocolo estabelecido foi dividido em quatro etapas: (1) coleta e assepsia do material vegetal, (2) estabelecimento e desenvolvimento *in vitro*, (3) aclimatização e rustificação e (4) reintrodução e monitoramento das mudas. Sementes de *C. milleri* foram retiradas de cápsulas maduras e transferidas para seringas. As seringas contendo as sementes foram preenchidas totalmente com a solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,3%. Após 12 minutos, em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 1 mL da solução contendo as sementes foi adicionada em potes contendo 22 mL do meio de cultivo previamente esterilizado. O meio utilizado foi composto de sacarose (15g/L), fertilizante B&G® (3mL/L), carvão ativado (1,5g/L) e ágar nutriente (5g/L). A germinação foi observada em quase todas as sementes inoculadas, tendo início aos 25 dias. O processo de propagação *in vitro* de *C. milleri* teve duração de 18 meses, com dois episódios de repicagem durante esse período. As plantas responderam positivamente as condições *in vitro*, apresentando crescimento satisfatório da parte aérea e de raízes. Na etapa de aclimatização, as plantas enraizadas tiveram suas raízes lavadas e foram transplantadas para embalagens plásticas contendo musgo chileno e fragmentos de isopor. Após 450 dias de cultivo em estufa coberta com sombrite 80 (80% de interceptação) foi observada uma reduzida mortalidade de mudas. Posteriormente, plantas aclimatadas foram transplantadas para recipientes contendo substrato natural (contendo canga granular) e cultivadas em estufa com sombrite 80 e posteriormente em sombrite 50, onde permaneceram por 1.095 dias. Ao final da etapa de rustificação foram obtidas aproximadamente 3.000 mudas de *C. milleri* aptas para o plantio em ambiente natural. A reintrodução destas mudas ocorreu através do plantio das mudas na Serra da Calçada (MG). O monitoramento das plantas ocorre mensalmente com a quantificação das mudas sobreviventes. Após 2 anos de acompanhamento observou-se baixa taxa de mortalidade (~30%) e crescimento satisfatório das plantas. O processo de monitoramento continuará sendo realizado com o objetivo de avaliar os processos de floração e frutificação e recrutamento de novas plantas. Os resultados obtidos evidenciam que a técnica de propagação *in vitro* é uma alternativa viável para a produção em larga escala de mudas de qualidade da espécie *C. milleri*. Uma vez que esta é uma espécie criticamente ameaçada de extinção, a reintrodução de plantas em ambiente natural contribui para o enriquecimento das populações existentes e, consequentemente, a conservação da espécie em seu ambiente natural. Uma próxima etapa importante será avaliar a diversidade genética da espécie para determinação das matrizes prioritárias para propagação.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; Orchidaceae; canga; aclimatização; conservação.

ABSTRACT

Cattleya milleri is an endemic species from the canga ecosystemas of Quadrilátero Ferrífero/Minas Gerais that is currently classified as critically endangered species (red list) because of its restricted occurrence and habitat loss and degradation. Here, we describe an *in vitro* propagation protocol able to generate a large number of seedlings and acclimate them. We also started an evaluation of seedling survival in field conditions. The established protocol was divided into four stages: (1) collection and asepsis of plant material, (2) establishment and development *in vitro* propagation, (3) acclimatization and (4) field planting and monitoring. In the first step, seeds of *C. milleri* were taken from mature capsules and transferred to syringes filled of 0.3% sodium hypochlorite (NaClO) solution. After 12 minutes, in a laminar flow chamber, approximately 1 mL of this solution with seeds was added to pots containing 22 mL of the previously sterilized culture medium. The medium used was composed of sucrose (15g/L), B&G® fertilizer (3mL/L), activated charcoal (1.5g/L) and nutrient agar (5g/L). After 25 days since inoculation, germination was observed in almost all inoculated seeds. Seedling were kept growing *in vitro* along 18 months (with two of subculture) and showed pronounced shoot and root growth. To start the acclimatization, rooted seedlings have their roots washed and transferred to plastic dishes with Chilean moss and foam fragments. Such plants were cultivated for 450 days in greenhouse conditions and showed a high rate of seedling survival. In the next step, plants were transplanted to pots containing canga topsoil (natural substrate) and transferred to greenhouse without shade, where they remained to 1,095 days. Approximately 3.000 seedlings of *C. milleri* were obtained with health conditions. These plants were then transferred to natural habitats in Serra da Calçada (MG) during the beginning of wet season in 2021. They have been monthly monitored by quantifying seedlings survival. Eight months later, such plants showed a survival rate close to 90% and satisfactory growth. The monitoring will be continued aiming to evaluate the species development, including flowering, fruiting and recruitment of new plants. Overall, here we presented a viable protocol to *in vitro* propagate *C. milleri* and regenerate a large number of healthy plants. Also, our results indicated a potential adaptation of such plants to the natural environments of Serra da Calçada/MG. Once *C. milleri* is an endangered species, a successful propagation protocol followed by field plant survival will contribute to populations establishment in natural habitats and species conservation. To improve the conservation of such species, it will be important to examine the genetic diversity and determine the 'mother' plants to be used as seed donors to propagation, thereby maximizing the genetic pool conserved.

Keywords: *In vitro* culture; Orchidaceae; canga; acclimatization; conservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Protocolo de micropropagação de *Cattleya milleri*: coleta das cápsulas maduras (A); coleta e transferência para seringas das sementes (B); processo de assepsia das sementes utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,3% (C); Inoculação das sementes em meio de cultivo (D); crescimento, desenvolvimento e multiplicação de mudas *in vitro* (E) germinação, crescimento, desenvolvimento e repicagem de mudas *in vitro*; (F) aclimação de mudas em bandejas em estufa coberta com sombrite; (G) rustificação das mudas em tubetes utilizando substrato natural em estufa com sombrite 80 e posteriormente em sombrite 50; (H) reintrodução e monitoramento das mudas no ambiente natural. Fonte: autores, 2022.....9
- Figura 2.** Cápsula madura (A) e sementes em papel toalha (B) de *Cattleya milleri*10
- Figura 3.** Cultivo *in vitro* de *Cattleya milleri*: Sementes germinadas (A), plantas aos 9 (B) e 13 meses (C) de cultivo.....12
- Figura 4.** Aclimação de plantas de *Cattleya milleri* em embalagem plástica retangular contendo musgo chileno e fragmentos de isopor aos 395 dias de transplante13
- Figura 5.** Rustificação de plantas de *Cattleya milleri* em estufas de aclimação aos 210 dias de transplante para células de bandeja plástica contendo substrato proveniente do ambiente natural da espécie14
- Figura 6.** Plantas de *Cattleya milleri* entre fragmentos de rocha na Serra da Calçada (MG) aos (A) 30 dias e aos (B) 8 meses após plantio.....15

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Cattleya milleri</i>	9
2.1 Coleta e assepsia do material vegetal	10
2.2 Estabelecimento e desenvolvimento <i>in vitro</i>	11
2.3 Aclimatização e rustificação	12
2.4 Reintrodução e acompanhamento	14
3 CONSIDERAÇÕES E PESPECTIVAS	15
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1. INTRODUÇÃO

Ações antrópicas veem proporcionando aumento na degradação de ambientes naturais em todo mundo, acarretando em fortes perdas de biodiversidade e os serviços prestados por ela (SANTOS et al., 2021; SEYMOUR & HARRIS, 2019; SILVEIRA et al., 2016). Ambientes com elevado grau de endemismo são considerados mais sensíveis as perturbações ambientais, visto que esses eventos podem aumentar o risco de extinção de diversas espécies. Os campos rupestres ferruginosos (*cangas*) localizados na região do Quadrilátero Ferrífero (QF) no estado de Minas Gerais (MG) são caracterizados pela atividade de extração de minérios (SKIRYCZ et al., 2014; JACOBI et al., 2011). Apesar das condições edafoclimáticas serem adversas para grande parte das espécies vegetais, as áreas de *cangas* apresentam uma grande diversidade botânica com ampla ocorrência de espécies raras e endêmicas (JACOBI & CARMO, 2012). Dentre as famílias ocorrentes nesses ambientes, a família Orchidaceae se destaca sendo a segunda de maior representatividade nesses ecossistemas (CARMO & JACOBI, 2013).

A orquídea *Cattleya milleri* é endêmica do QF, ocorrendo nos campos rupestres ferruginosos em altitudes que variam de 800 e 1500 metros. Esta espécie é considerada criticamente ameaçada de extinção devido, principalmente, a degradação de seu habitat natural (CNCFLORA, 2022). Aliado a isso, essa espécie apresenta flores pequenas e vermelhas que despertam interesse de colecionadores (VAN DEN BERG, 2020). A biopirataria de espécies como *C. milleri* normalmente desperta o interesse de infratores pelo valor econômico que podem alcançar no mercado. Além da beleza cênica destas espécies, o seu grau de raridade também é elemento que pode agregar valor. Estas condições agem como incentivo à retirada ilegal de espécimes de seu ambiente natural e o consequente agravamento do status de conservação da espécie. A redução drástica no número de indivíduos adultos da população de *C. milleri* e as baixas taxas de germinação comprometem sua sobrevivência no ambiente. Portanto, é crucial a busca de métodos de propagação que proporcionem a produção de mudas em larga escala, sua aclimação e reintrodução em ambiente natural para assegurar sua permanência na natureza.

Nos últimos anos os conhecimentos da biotecnologia vegetal vêm contribuindo para o aperfeiçoamento da produção de mudas, sendo as técnicas de cultivo *in vitro* de plantas utilizadas com muito sucesso (CHOKHELI et al., 2020). Dentre essas técnicas, a micropropagação se destaca por proporcionar a propagação de plantas em larga escala, usando reduzido espaço físico de trabalho em um período relativamente curto

de tempo, comparado com os demais tipos de propagação (CARDOSO et al., 2018). A técnica permite o cultivo de explantes a partir de células, tecidos, órgãos, sementes ou a planta inteira. O processo é executado em recipientes contendo meio nutritivo composto por água, sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento e uma fonte de carboidrato, e cultivados em ambiente com condições controladas de temperatura e luminosidade (NGUYEN et al., 2020).

A técnica de micropropagação para espécies de orquídeas é bem difundida na literatura, visto que apesar das espécies apresentarem alta produção de sementes, são praticamente incapazes de germinar na natureza sem associação com fungos micorrízicos (THAMMASIRI et al., 2020). Portanto, a utilização do cultivo *in vitro* pode promover o aumento da taxa de germinação de orquídeas devido às condições nutricionais favoráveis (PANT et al., 2021). Porém, vale salientar que devido à peculiaridade de cada espécie, as técnicas de micropropagação de orquídeas requerem ajustes específicos, sendo necessário a realização de adequações nas etapas da micropropagação para a obtenção do protocolo adequado, aumentando a eficiência na obtenção de mudas saudáveis que poderão ser reintroduzidas nos ambientes naturais (LI et al., 2018). Diante disso, este estudo objetivou ao desenvolvimento de um protocolo e propagação *in vitro* de *Cattleya milleri*. Todas as etapas desenvolvidas estão descritas sob a forma de um passo a passo para facilitar sua reprodução.

2. PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya milleri*

As etapas para o estabelecimento do protocolo de micropropagação de *C. milleri* foram desenvolvidas na Biofábrica do Centro de Tecnologia de Ferrosos localizada na cidade de Nova Lima/MG e são apresentadas na Figura 1. Os detalhes de cada etapa são apresentados nos tópicos abaixo.

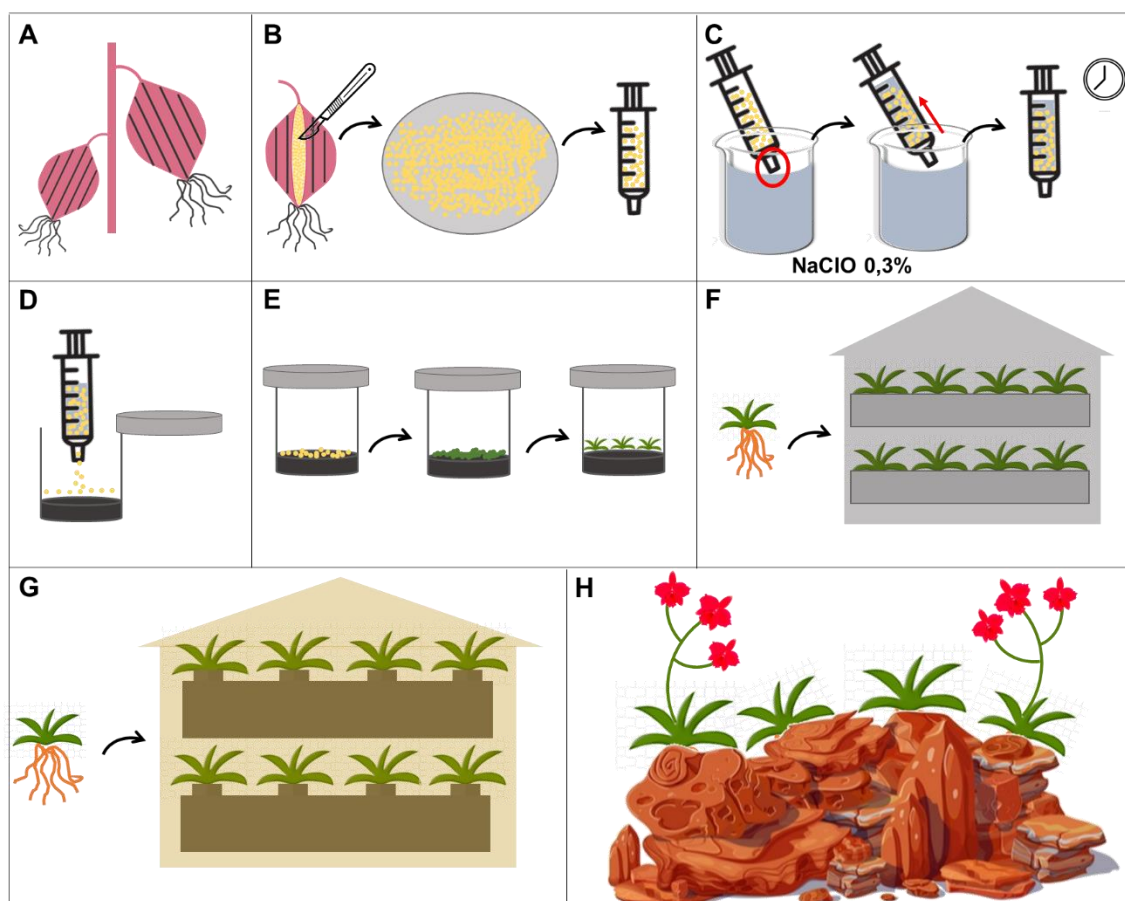


Figura 1. Esquema de protocolo de micropropagação, cultivo e reintrodução de *Cattleya milleri*. (A) coleta das cápsulas maduras em ambiente natural; (B) coleta e transferência das sementes para seringas; (C) processo de assepsia das sementes utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,3%; (D) inoculação das sementes em meio de cultivo; (E) germinação, crescimento, desenvolvimento e repicagem de mudas *in vitro*; (F) aclimação de mudas em bandejas em estufa coberta com sombrite; (G) rustificação das mudas em tubetes utilizando substrato natural em estufa sem sombrite; (H) reintrodução e monitoramento das mudas no ambiente natural. Fonte: autores, 2022.

2.1 Coleta e assepsia do material vegetal

Espécimes de *C. milleri* foram coletadas em área de ocorrência natural da espécie no município de Itabrito/MG e cultivadas em casa de vegetação no Centro de Produção de Mudas de Espécies Nativas da Vale em Nova Lima. Estas plantas são mantidas como matrizes, sendo cultivadas para obtenção de sementes e produção de mudas. Cápsulas maduras (frutos com nervuras escurecidas) contendo as sementes de *C. milleri* (Figura 2A) são coletadas e transferidas para laboratório. Em condições controladas, as capsulas foram abertas sobre papel toalha para a retirada de sementes (Figura 2B) e,

posteriormente, 0,21g de sementes foram transferidas para seringas, conforme mostrado na Figura 1. Para o processo de desinfestação das sementes foi utilizado a solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,3%, sendo primeiramente as pontas das seringas imersas na solução em um béquer, objetivando evitar contaminações cruzadas, e, posteriormente, de outro béquer foi succionado a solução de NaClO até preenchimento completo da seringa (10 mL). As sementes e a solução foram homogeneizadas e o ar sobressalente da seringa foi retirado. As seringas permaneceram por 12 minutos em câmara de fluxo laminar antes da inoculação.

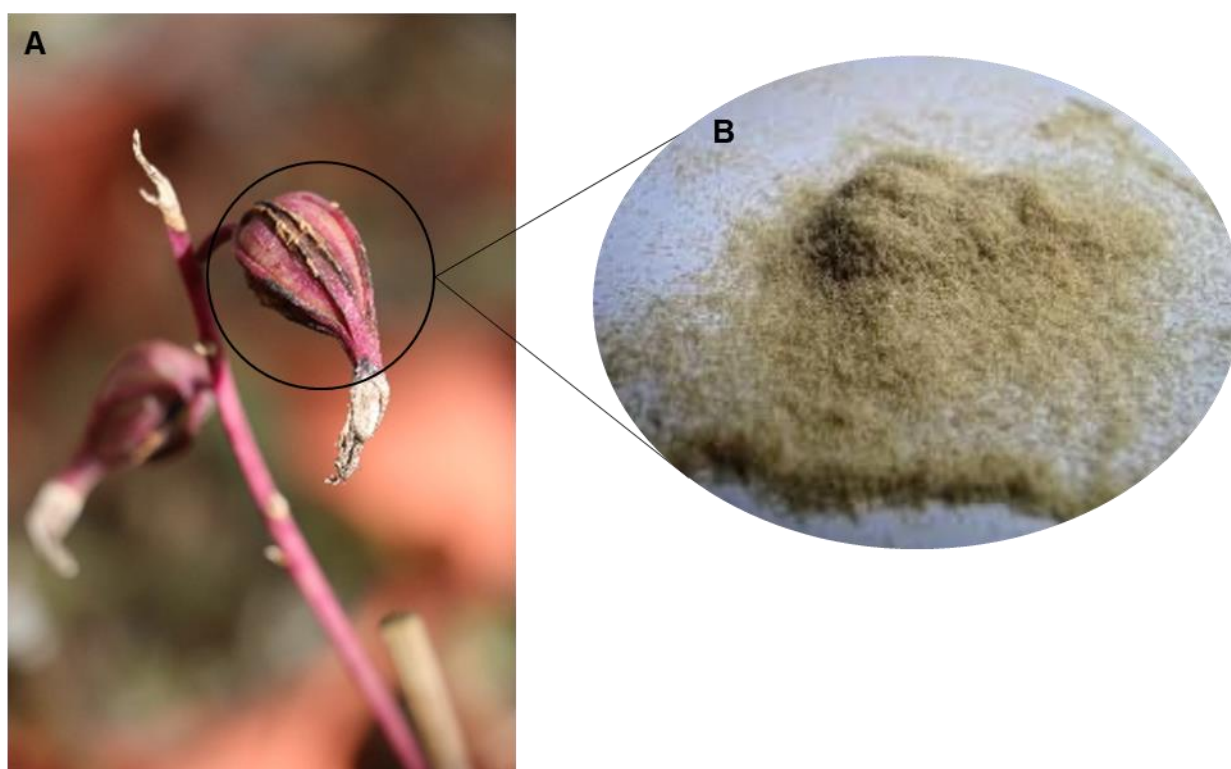


Figura 2. Cápsula madura (A) e sementes em papel toalha (B) de *Cattleya milleri*. Fonte: autores, 2022.

2.2 Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro*

Após o processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 1 mL da solução contendo as sementes de *C. milleri* foi adicionada em potes contendo 22 mL do meio de cultivo composto por sacarose (15g/L) e fertilizante B&G® (3mL/L). O meio de cultura utilizado foi suplementado com carvão ativado (1,5g/L) e ágar nutriente (5g/L), como agente gelificante. Os meios nutritivos tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Após a inoculação, os potes foram fechados, vedados com filme plástico e transferidos para sala de germinação e

crescimento sob condições controladas, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de em torno de 25°C.

Para o sucesso propagativo de plantas *in vitro* se faz necessário que o processo de assepsia seja realizado rigorosamente, porém sem promover danos no material vegetal a ser inoculado. Neste estudo o hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 0,3% mostrou-se eficiente para a assepsia das sementes, pois observou-se uma baixa taxa de contaminação (aproximadamente 1%) e uma elevada germinação, conforme mostrado na Figura 3A. A germinação iniciou cerca de 25 dias após inoculação e foi observada em quase todas as sementes inoculadas.

O período de germinação de crescimento *in vitro* de *C. milleri* teve duração de 18 meses. Durante esse período foram realizados dois processos de repicagem (mudança dos explantes do meio de cultivo), aos 120 e 376 dias. As condições nutricionais *in vitro* proporcionaram o crescimento satisfatório das plantas (Figura 3B), com o desenvolvimento de raízes nas mudas nas etapas finais (Figura 3C), condição essencial para que as mudas possam ser aclimatadas.

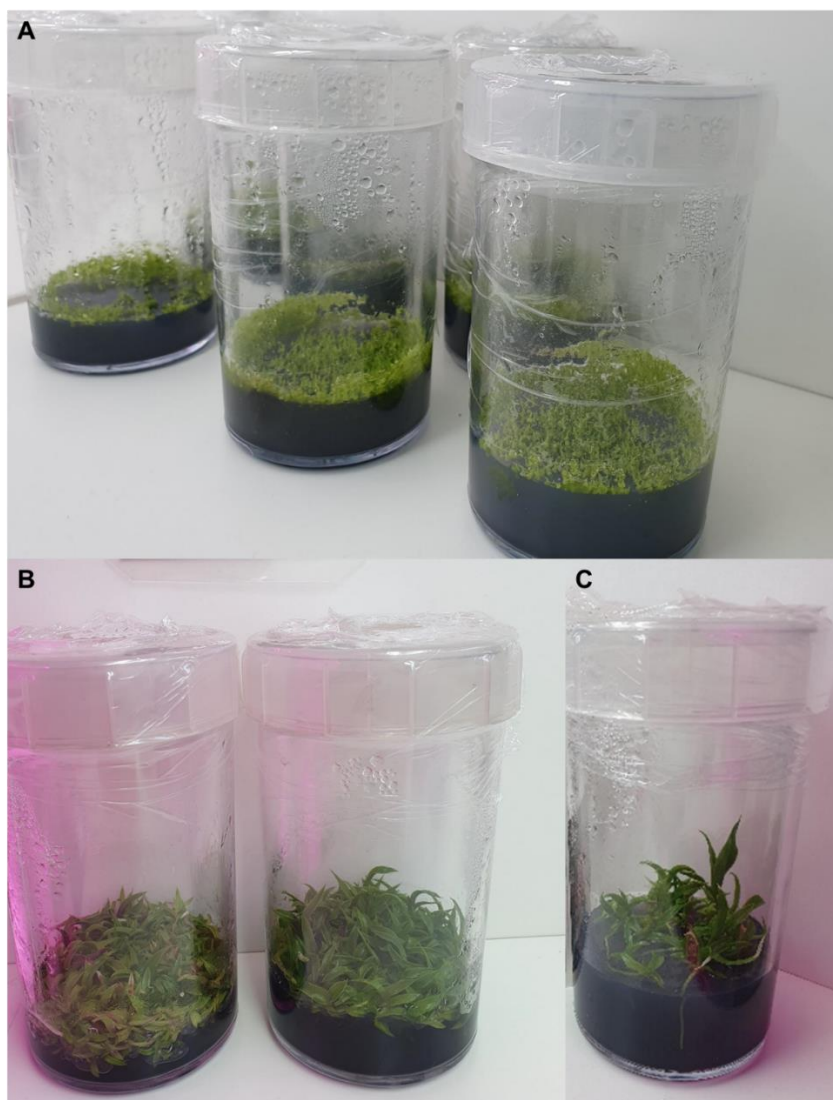


Figura 3. Cultivo *in vitro* de *Cattleya milleri*: Sementes germinadas (A), plantas aos 9 (B) e 13 meses (C) de cultivo. Fonte: autores, 2022.

2.3 Aclimatização e rustificação

Uma das etapas mais sensíveis no processo de micropropagação é a retirada das plantas das condições assépticas do cultivo *in vitro* e exposição à condições ambientais flutuantes, ou seja, exposição externa. Esta etapa de aclimatização deve ser realizada de forma adequada para minimizar a taxa de mortalidade que pode ser elevada. Neste estudo, logo após o desenvolvimento das mudas *in vitro*, aquelas com sistema radicular bem desenvolvido foram retiradas do meio de cultivo, tiveram suas raízes lavadas e foram transplantadas para embalagens plásticas retangulares contendo musgo chileno e fragmentos de isopor como substrato (Figura 4). As mudas permaneceram em estufa coberta com sombrite 80 (tela que reduz a intensidade lumínica em 80%) por 450 dias.

Durante este período foi observada uma baixa mortalidade, sendo a sobrevivência destas mudas de aproximadamente 80%.



Figura 4. Aclimatização de plantas de *Cattleya milleri* em embalagem plástica retangular contendo musgo chileno e fragmentos de isopor aos 395 dias de transplante. Fonte: autores, 2022.

Com o sucesso da aclimatização, as plantas obtidas foram submetidas ao processo de rustificação em estufa com sombrite 50% por 1.095 dias. Aproximadamente 3.500 plantas foram transferidas das embalagens plásticas para células individuais de bandejas contendo substrato natural (constituído por canga granular) provenientes de ambientes de ocorrência natural da espécie (Figura 5). A irrigação foi controlada através de temporizadores, havendo distribuição de água de acordo com a estação do ano. O processo de rustificação morfofisiológica é fundamental para aumentar as chances de sucesso de sobrevivência de plantas ao serem transferidas para o ambiente natural. Ao final da etapa de rustificação foram obtidas aproximadamente 3.000 mudas de *C. milleri* aptas a reintrodução.



Figura 5. Rustificação de plantas de *Cattleya milleri* em estufas de aclimação aos 120 dias de transplante para células de bandeja plástica contendo substrato proveniente do ambiente natural da espécie. Fonte: autores, 2022.

2.4 Reintrodução e monitoramento

As mudas provenientes da etapa de rustificação foram transferidas para áreas de compensação ambiental, as quais desservem à restauração de habitats e ao restabelecimento da espécie em ambiente natural. O plantio das mudas de *C. milleri* foi efetuado em setembro/2021 entre fragmentos de rochas na Serra da Calçada (MG). O monitoramento das plantas é realizado mensalmente, onde o número de plantas sobreviventes é quantificado. Um mês após o plantio em campo (Figura 6A) as plantas apresentaram elevada sobrevivência e aparência de boa adaptação ao ambiente. Aos oito meses de plantio (maio de 2022) foi observada uma baixa taxa de mortalidade (<10%) e as mudas apresentaram crescimento satisfatório (Figura 6B). Vale destacar que o plantio desta espécie em campo enfrenta determinados desafios tais como a adequabilidade de habitat, a competição com outras espécies, tais como espécies ruderais ou nativas de crescimento mais rápido; assim como requer a manutenção de monitoramento por pessoal qualificado. As plantas de orquídeas possuem pequeno porte, são frágeis e podem ser facilmente arrancadas ou danificadas durante manutenção. O treinamento de pessoal para o manejo da espécie em condições naturais

é parte essencial para o sucesso do processo de reintrodução e estabelecimento de *C. milleri*. Portanto, a elevada sobrevivência observada até o momento é também graças ao planejamento e à capacitação da equipe envolvida em todas as etapas do trabalho.

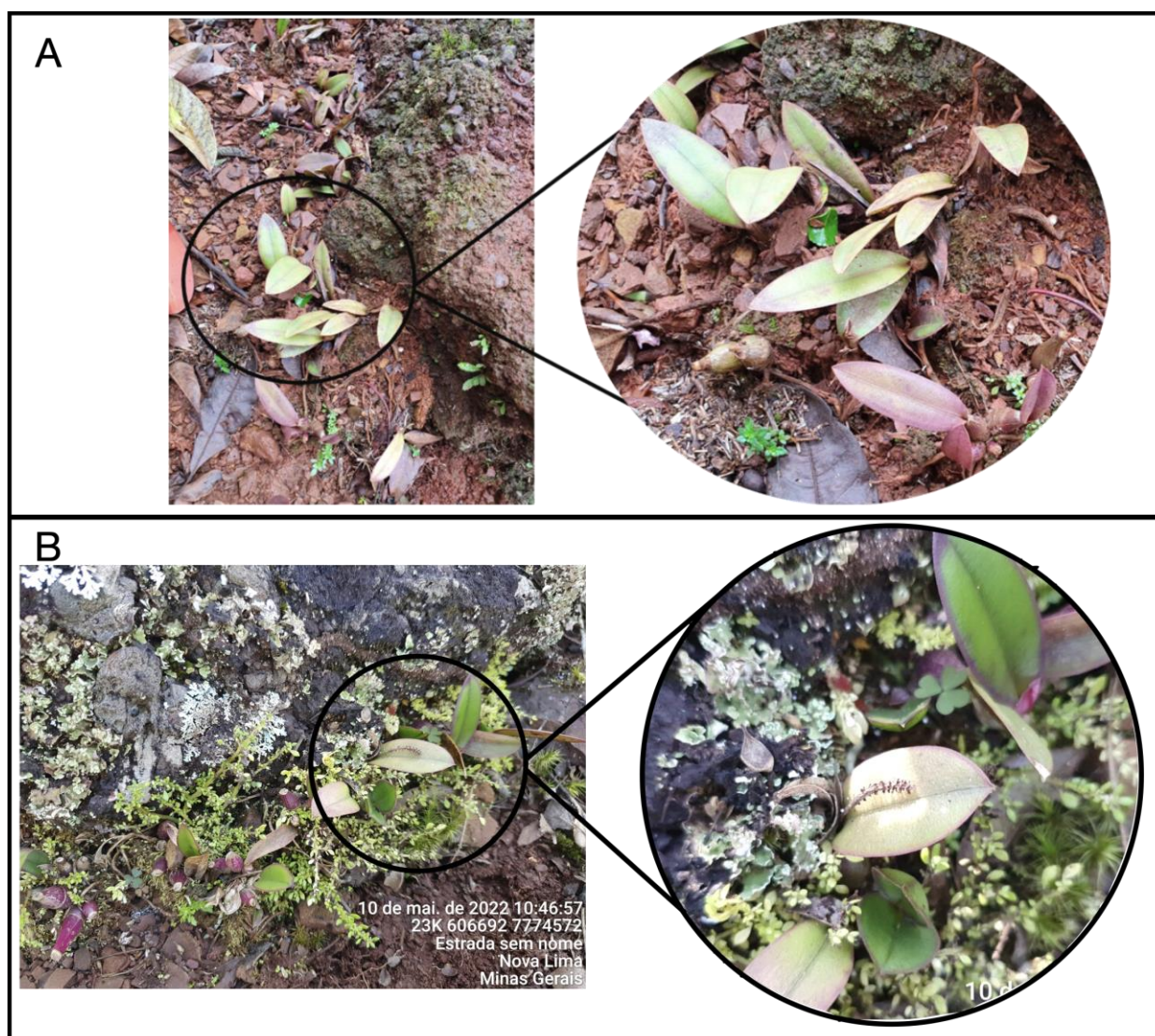


Figura 6. Plantas de *Cattleya milleri* entre fragmentos de rocha na Serra da Calçada (MG) aos (A) 30 dias e aos (B) 8 meses após plantio. Fonte: autores, 2022.

Os resultados obtidos até o momento sugerem que as plantas de *C. milleri* propagadas *in vitro* apresentam elevado potencial de estabelecimento em condições naturais, demarcando o sucesso do processo de propagação e reintrodução. O acompanhamento do desenvolvimento das plantas será continuado para verificação dos processos de floração e frutificação, etapa importante para evidenciar a capacidade da espécie se propagar de forma independente no ambiente natural.

3. CONSIDERAÇÕES E PESPECTIVAS

Este é o primeiro estudo de propagação da espécie *Cattleya milleri*. Nele, a técnica de propagação *in vitro* mostrou-se uma alternativa viável para a produção em larga escala de mudas para esta espécie. Um elevado número de mudas foi gerado, posteriormente estas mudas foram aclimatadas e rustificadas com sucesso, o que possibilitou a reintrodução de plantas em ambiente natural. Os resultados obtidos fornecem os subsídios para programas de conservação e ampliação da produção de mudas e introdução em ambiente natural. Por fim, destaca-se a importância da continuidade da propagação de mudas de *C. milleri* utilizando as técnicas de cultivo *in vitro*, bem como o acompanhamento das plantas transferidas para o ambiente natural. Os resultados possibilitarão a ampliação do conhecimento acerca da espécie e proporcionará o aumento no número de indivíduos em seu habitat. Uma próxima etapa importante será avaliar a diversidade genética da espécie para determinação das matrizes prioritárias para propagação. A propagação e reintrodução de plantas que representam a diversidade genética da espécie aumentam as chances de adaptação e da espécie prosperar no ambiente, permitindo que a mesma possa evoluir e aumentar as chances de se adaptar às variações nas condições ambientais.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, J.C.; SHENG G.; LEE T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. Micropropagation in the twenty-first century. **Plant cell culture protocols**, p. 17-46, 2018.
- CARMO, F. F.; JACOBI, C. M. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 527-541, 2013.
- CHOKHELI, V. A. et al. Recent development in micropropagation techniques for rare plant species. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1733, 2020.
- CNCFlora. *Cattleya milleri* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hoffmannseggella_milleri>. Acesso em 3 fevereiro 2022.

GATTI, L.V. et al. Amazonia as a carbon source linked to deforestation and climate change. **Nature**, v. 595, n. 7867, p. 388-393, 2021.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. Diversidade florística nas cangas do Quadrilátero Ferrífero. **IDM**, Belo Horizonte, 2012.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; CAMPOS, I. C. Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. **Ambio**, v. 40, n. 5, p. 540-543, 2011.

LI, Y. et al. Recent advances in orchid seed germination and micropropagation. **Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols**, p. 497-520, 2018.

NGUYEN, Q.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **Plant factory**, p. 333-346, 2020.

PANT, B. et al. Micropropagation, antioxidant and anticancer activity of pineapple orchid: *Dendrobium densiflorum* Lindl. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-11, 2021.

SANTOS, G.L. et al. Degradation of the Brazilian Cerrado: Interactions with human disturbance and environmental variables. **Forest Ecology and Management**, v. 482, p. 118875, 2021.

SEYMOUR, F.; HARRIS, N.L. Reducing tropical deforestation. **Science**, v. 365, n. 6455, p. 756-757, 2019.

SILVEIRA, F.A.O., NEGREIROS, D., BARBOSA, N.P.U. et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant Soil** V. 403, p. 129–152, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2637-8>

SKIRYCZ, A.; et al. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 653, 2014.

THAMMASIRI, K.; JITSOPAKUL, N.; PRASONGSOM, S. Micropropagation of some orchids and the use of cryopreservation. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*, p. 1-36, 2020.

VAN DEN BERG, C. 2020. *Cattleya* in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB65213>>. Acesso em: 04 fev. 2022