



PROD. TEC. ITV DS – N014/2023
DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2023.14.Gomes

RELATÓRIO TÉCNICO ITV DS

Propagação de *Sinningia rupícola*: espécie endêmica do
Quadrilátero Ferrífero ameaçada de extinção

RELATÓRIO PARCIAL DO PROJETO
Taxonomia e propagação de espécies vegetais do Quadrilátero
Ferrífero/MG

Leilane Bárbara Gomes
Luiz Palhares Neto
Keyvilla Costa Aguiar
José Edimar Marangon
Genilton Santos
Markus Gastauer
Silvio Ramos
Cecilio Frois Caldeira

Belém / PA

Setembro / 2023

Título: Propagação de <i>Sinningia rupicola</i> : espécie endêmica do Quadrilátero Ferrífero ameaçada de extinção	
PROD. TEC. ITV DS N014/2023	Revisão
Classificação: () Confidencial () Restrita (X) Uso Interno () Pública	00

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

Citar como

GOMES, Leilane Barbara *et al.* **Propagação de *Sinningia rupicola*: espécie endêmica do Quadrilátero Ferrífero ameaçada de extinção.** Belém: 2023. (Relatório Técnico N014/2023) DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2023.14.Gomes

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G633 Gomes, Leilane Barbara
 Propagação de *Sinningia rupicola*: espécie endêmica do Quadrilátero Ferrífero ameaçada de extinção. / Leilane Barbara Gomes ... [*et al.*] - Belém: 2023.
 22 p. : il.
 Relatório Técnico (Instituto Tecnológico Vale) – 2023
 PROD.TEC.ITV.DS – N014/2023
 DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2023.14.Gomes
 1. Cultivo – in vitro. 2. Plântulas. 3. Cangas. 4. Gesneriaceae. 5. Bromeliaceae. I. Palhares Neto, Luiz. II. Aguiar, Keyvilla Costa. III. Marangon, José Edimar. IV. Santos, Genilton. V. Gastauer, Markus. VI. Ramos, Silvio Junio. VII. Caldeira Júnior, Cecílio Frois. VIII. Título

Bibliotecário responsável: Eddie Saraiva / CRB 2 – 058P

RESUMO EXECUTIVO

Este estudo é parte do projeto Taxonomia e propagação de espécies vegetais nativas do Quadrilátero Ferrífero/MG, o qual objetiva subsidiar ações de conservação de espécies raras, endêmicas e ameaçadas de extinção nos campos rupestres ferruginosos de Minas Gerais. Os campos rupestres ferruginosos, também conhecidos como cangas, são ecossistemas que abrigam uma vasta diversidade botânica. Devido à redução de hábitat natural, em decorrência da intensa urbanização do Quadrilátero Ferrífero/MG e extração de minérios nestas áreas, diversas espécies entraram para a lista de ameaçadas de extinção, como por exemplo a *Sinningia rupicola*. Devido seu status de conservação e ocorrência em área afetada pelo processo de mineração, foi estabelecida uma condicionante ambiental para o Projeto GAP JANGADA VALE, com referência na ANUÊNCIA Nº 4 2018-NUBIO-MG DITEC-MG SUPES-MG - GAP JANGADA E FEIJAO, processos PA: 118 2000 030 2013 e PA: 254 2004 050 2015. A demanda trata-se de estabelecimento de "Plano de Trabalho para Atendimento à Condicionante Específica 08: Levantamento da ocorrência, distribuição e proposição de ações de conservação para as espécies *Mikania glauca* e *Sinningia rupicola*, em razão de sua condição de ameaçada". O estabelecimento de protocolos de germinação que assegure a produção de mudas de qualidade é etapa crucial para a conservação *ex situ* e também a manutenção das espécies em seu ambiente natural através de introduções ou enriquecimentos de populações. Dentro desse contexto, a germinação e o cultivo *in vitro* constitui importante ferramenta para potencializar a obtenção de propágulos em quantidade e qualidade desejável, visto que proporciona as condições ideais para a germinação e o desenvolvimento da plântula. O objetivo deste estudo foi avaliar a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de *S. rupicola* para estabelecimento de protocolos de propagação. Os estudos de propagação e aclimação de *S. rupicola* foram realizados em duas etapas: i) uma primeira fase para estabelecimento de das condições de germinação, crescimento inicial e aclimação; ii) uma segunda etapa de escalonamento e otimização dos processos para produção de mudas em maior quantidade. Na primeira etapa do estudo, foram realizados testes de germinação em condições controladas, incluindo o cultivo de sementes em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose e em areia. Observou-se que a ausência de sacarose no meio de cultura promoveu uma maior taxa de germinação, embora tenha aumentando o tempo médio de germinação. A presença de sacarose, mesmo em baixas concentrações, estimulou o crescimento das plantas. Após 45 dias, as plantas cultivadas sem sacarose apresentaram melhor desenvolvimento, com maior crescimento em altura, número de folhas e raízes. Durante a fase de aclimação, concentrações mais baixas de sacarose aumentaram a sobrevivência das plântulas. Com estes resultados foram realizadas adequações ao meio de cultura, usando reduzida sacarose e adicionando fertilizante para suprir os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento. Estas condições nutricionais *in vitro* proporcionaram elevada germinação e crescimento satisfatório das plantas, com o desenvolvimento de raízes nas mudas que puderam ser facilmente serem repicadas para a mistura de musgo chileno e isopor, etapa adicional ao processo de aclimação que foi ajustado visando aprimorar o crescimento. Após 105 dias de aclimação, as mudas apresentaram 100% de sobrevivência e crescimento elevado, tendo em média 11 folhas. Este estudo permitiu a elaboração de um protocolo de propagação eficaz para a *S. rupicola*, possibilitando a produção de grandes quantidades de mudas com elevada qualidade fisiológica. Tais resultados são essenciais para a preservação de espécies ameaçadas e, conseqüentemente, para a manutenção da biodiversidade global e a proteção de ecossistemas críticos como os campos rupestres ferruginosos.

RESUMO

Os campos rupestres ferruginosos, também conhecidos como cangas, são ecossistemas que abrigam uma vasta diversidade botânica, incluindo diversas espécies raras e endêmicas. Devido a redução de hábitat natural, em decorrência da intensa urbanização do Quadrilátero Ferrífero/MG e extração de minérios nas áreas de canga desta região, diversas espécies entraram para a lista de ameaçadas de extinção, como por exemplo a *Sinningia rupicola*. O estabelecimento de protocolos de germinação que assegure a produção de mudas de qualidade é etapa crucial para a conservação *ex situ* e também a manutenção das espécies em seu ambiente natural através de introduções ou enriquecimentos de populações. Dentro desse contexto, a germinação e o cultivo *in vitro* constitui importante ferramenta para potencializar a obtenção de propágulos em quantidade e qualidade desejável, visto que proporciona as condições ideais para a germinação e o desenvolvimento da plântula. O objetivo deste estudo foi avaliar a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de *S. rupicola* para estabelecimento de protocolos de propagação. Os estudos de propagação e aclimatação de *S. rupicola* foram realizados em duas etapas: i) uma primeira fase para estabelecimento de das condições de germinação, crescimento inicial e aclimatação; ii) uma segunda etapa de escalonamento e otimização dos processos para produção de mudas em maior quantidade. Na primeira etapa do estudo, foram realizados testes de germinação em condições controladas, incluindo o cultivo de sementes em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose e em areia. Observou-se que a ausência de sacarose no meio de cultura promoveu uma maior taxa de germinação, embora tenha aumentando o tempo médio de germinação. A presença de sacarose, mesmo em baixas concentrações, estimulou o crescimento das plantas. Após 45 dias, as plantas cultivadas sem sacarose apresentaram melhor desenvolvimento, com maior crescimento em altura, número de folhas e raízes. Durante a fase de aclimatação, concentrações mais baixas de sacarose aumentaram a sobrevivência das plântulas. Com estes resultados foram realizadas adequações ao meio de cultura, usando reduzida sacarose e adicionando fertilizante para suprir os nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento. Estas condições nutricionais *in vitro* proporcionaram elevada germinação e crescimento satisfatório das plantas, com o desenvolvimento de raízes nas mudas que puderam ser facilmente serem repicadas para a mistura de musgo chileno e isopor, etapa adicional ao processo de aclimatação que foi ajustado visando aprimorar o crescimento. Após 105 dias de aclimatação, as mudas apresentaram 100% de sobrevivência e crescimento elevado, tendo em média 11 folhas. Este estudo permitiu a elaboração de um protocolo de propagação eficaz para a *S. rupicola*, possibilitando a produção de grandes quantidades de mudas com elevada qualidade fisiológica. Tais resultados são essenciais para a preservação de espécies ameaçadas e, conseqüentemente, para a manutenção da biodiversidade global e a proteção de ecossistemas críticos como os campos rupestres ferruginosos.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; plântulas; cangas; Gesneriaceae.

ABSTRACT

The ferruginous rocky fields, also known as "cangas," are ecosystems that harbor a vast botanical diversity, including numerous rare and endemic species. Due to the reduction of their natural habitat, primarily due to intense urbanization in the Ferriferous Quadrangle in Minas Gerais, Brazil, and mineral extraction in the canga areas of this region, several species have been added to the endangered list. An example is *Sinningia rupicola*. Establishing germination protocols to ensure the production of quality seedlings is a crucial step for ex situ conservation and also for maintaining species in their natural environment through introductions or population enrichment. Within this context, seed germination and in vitro cultivation constitute important tools to enhance the acquisition of propagules in desired quantity and quality, as they provide ideal conditions for seed germination and seedling development. The objective of this study was to evaluate seed germination and seedling growth of *S. rupicola* to establish propagation protocols. Propagation and acclimatization studies of *S. rupicola* were conducted in two stages: i) an initial phase to establish germination conditions, initial growth, and acclimatization; ii) a second stage for scaling up and optimizing processes for mass seedling production. In the first stage of the study, germination tests were conducted under controlled conditions, including seed cultivation in culture medium with different concentrations of sucrose and in sand. It was observed that the absence of sucrose in the culture medium promoted a higher germination rate, although it increased the average germination time. The presence of sucrose, even in low concentrations, stimulated plant growth. After 45 days, plants grown without sucrose exhibited better development, with greater height, more leaves, and a more extensive root system. During the acclimatization phase, lower sucrose concentrations increased seedling survival. Based on these results, adjustments were made to the culture medium, using reduced sucrose and adding fertilizer to supply essential nutrients for growth and development. These in vitro nutritional conditions resulted in high germination and satisfactory plant growth, with the development of roots in the seedlings that could be easily transplanted into a mixture of Chilean moss and Styrofoam, an additional step in the acclimatization process that was refined to enhance growth. After 105 days of acclimatization, the seedlings showed 100% survival and significant growth, with an average of 11 leaves. This study enabled the development of an effective propagation protocol for *S. rupicola*, allowing for the production of large quantities of seedlings with high physiological quality. Such results are essential for the preservation of endangered species and, consequently, for the maintenance of global biodiversity and the protection of critical ecosystems such as ferruginous rocky fields.

Keywords: *In vitro* culture; seedlings, cangas; Gesneriaceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Planta adulta de *Sinningia rupicola* florida durante período de cultivo em casa de vegetação (A) e sementes obtidas após processamento dos frutos (B).

Figura 2. Sementes de *Sinningia rupicola* durante período de germinação em areia e meio nutritivo tipo MS com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30g).

Figura 3. Germinação (A), tempo médio de germinação (TMG) (B) e emissão de folhas (C) em sementes de *Sinningia rupicola* cultivadas em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de sacarose e em areia. Valores representam a média de 6 repetições contendo 50 sementes cada. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p < 0.05$). Barra representa erro padrão da média.

Figura 4. Plantas de *Sinningia rupicola* provenientes da germinação de sementes cultivadas em meio nutritivo com diferentes concentrações de sacarose: 0g (A), 10g (B), 20g (C) e 30g (D) após 45 dias de germinação.

Figura 5. Percentual de sobrevivência de mudas aclimatadas e imagens das plântulas de *Sinningia rupicola* durante período de cultivo *ex vitro* em substrato comercial Carolina Soil. As plântulas correspondem aos meios onde foram cultivadas em diferentes concentrações de sacarose. Valores representam a média de 6 repetições com plantas advindas das 50 sementes inicialmente usadas para germinação. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p < 0.05$). Barra representa erro padrão da média.

Figura 6. Germinação de crescimento *in vitro* de *Sinningia rupicola*. Plântulas de *S. rupicola* após (A) 120 dias de inoculação das sementes em meio de cultura e (B) após repique com 150 dias. Detalhe para a presença de sistema radicular nas plantas após o repique.

Figura 7. Mudas de *Sinningia rupicola* durante aclimação em mistura de musgo chileno e isopor. (A) Muda contida em frasco plástico usado para o cultivo *in vitro*, (B) fechado com tampa perfurada para trocas gasosas com o ambiente natural e (C) detalhe de uma planta de *S. rupicola* com desenvolvimento vigoroso.

Figura 8. Crescimento de plantas de *Sinningia rupicola* durante aclimação em musgo chileno e isopor. (A) Evolução do número de folhas ao longo 105 dias após transferência e (B) percentagem de plantas em cada classe conforme número de folhas após 105 dias de aclimação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1. Testes de germinação, crescimento inicial e aclimatação em condições controladas	10
2.2. Otimização e escalonamento da produção de mudas.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. Testes de germinação, crescimento inicial e aclimatação em condições controladas	13
3.2. Otimização e escalonamento da produção de mudas.....	18
4. CONSIDERAÇÕES E PESPECTIVAS	20
5. REFERÊNCIAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

O aumento da degradação de ambientes naturais em virtude de ações antrópicas tem proporcionado a perda gradativa da biodiversidade em todo mundo (GATTI et al., 2021; SANTOS et al., 2021; SEYMOUR & HARRIS, 2019). A alteração de habitats vem aumentando o risco de extinção de várias espécies, evidenciando a importância do desenvolvimento de ações de conservação ambiental (SAMPER, 2021; MREMA, 2020). A Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) para a agenda de 2030, estabelecendo o compromisso com a restauração de ambientes degradados (ODS 15). É esperado que aproximadamente 12 milhões de hectares de florestas e demais formações vegetacionais nativas degradadas sejam restauradas.

A preocupação com a conservação ambiental é intensificada quando o ambiente em questão apresenta um elevado número de espécies endêmicas e raras, como os campos rupestres ferruginosos. Também conhecidos como áreas de cangas, esses ambientes estão localizados sobretudo na região do Quadrilátero Ferrífero (QF) em Minas Gerais e nas Serras de Carajás no Pará (SKIRYCZ et al, 2014). Esses ambientes se destacam pela composição do solo e características geológicas únicas. A composição mineral do solo, combinada com as condições climáticas específicas, cria um micro-habitat singular que muitas espécies não conseguem encontrar em outros lugares (CARMO & JACOBI, 2013). Essas áreas abrigam uma grande variedade de plantas e organismos adaptados a essas condições extremas (Giuliette et al. 2019). Devido à sua exclusividade, os campos rupestres ferruginosos têm grande importância em termos de biodiversidade e conservação. No entanto, esse endemismo também os torna particularmente vulneráveis a perturbações e degradação de habitat. A mineração, urbanização e outras atividades humanas impactantes representam uma ameaça significativa para esses ambientes únicos (CARMO & JACOBI, 2013; Giuliette et al. 2019). À medida que estas atividades continuam a afetar essas áreas, muitas espécies endêmicas estão enfrentando riscos crescentes de extinção. É crucial entender a ecologia dessas espécies e as interações complexas entre elas e seu ambiente para desenvolver estratégias de conservação eficazes.

A espécie *Sinningia rupicola* pertence à família Gesneriaceae e tem sua ocorrência restrita a região do QF no estado de MG. Trata-se de uma erva de pequeno porte, com altura variando entre 0,2 a 0,4 metros (ARAÚJO et al., 2020). *Sinningia*

rupicola possui características xeromórficas, como caule tuberoso e folhas suculentas, que a ajudam a lidar com condições extremas. A espécie é encontrada principalmente nas Serras da Piedade, dos Inconfidentes, entre outras, em substrato ferrífero acima de 1.200 m de altitude (Araújo et al., 2005). Apesar de produzir sementes leves com morfologia que facilita sua dispersão, a possível restrição de reserva nutritiva das sementes proporciona baixas taxas de germinação, o que compromete a renovação das populações (RANIERI, 2007; 2011). Combinada à influência das atividades humanas, como a urbanização e mineração, a coloca em risco (Drummond et al., 2005). Atualmente, a espécie é classificada como "em perigo" de extinção (CNCFlora, 2021).

A conservação de espécies ameaçadas em ambientes como as cangas é crucial para a manutenção da diversidade e dos processos ecológicos inerentes aos seus ecossistemas (Drummond et al., 2005). Para espécies como *S. rupícola*, é importante ressaltar que há lacunas no conhecimento científico, com poucos estudos dedicados a essa espécie e que subsidiam projetos de conservação (Araújo et al., 2005; Ranieri 2006; Ranieri et al., 2007, 2011). Dada a sua vulnerabilidade e endemismo, é crucial realizar pesquisas detalhadas para compreender melhor os fatores que afetam sua sobrevivência e, assim, desenvolver estratégias eficazes para a sua conservação.

Para espécies que têm suportado a redução de suas populações em ambiente natural, o sucesso de programas de conservação perpassa, dentre outros fatores, da capacidade de propagação, adaptação as mudanças do ambiente e da diversidade genética existente. A propagação sexuada é um dos meios com menor custo para a obtenção de novos indivíduos e manutenção da diversidade genética. Para espécies como *S. rupícola*, onde as sementes possuem reduzida reserva, a germinação *in vitro* pode ser uma alternativa para obtenção de mudas de elevada qualidade fisiológica e em grandes quantidades.

A germinação *in vitro* consiste no cultivo de diásporos, sementes ou embriões previamente esterilizados em meio de cultivo contendo água, sais minerais, vitaminas e uma fonte de carbono, comumente a sacarose (RONI et al., 2017). As condições do ambiente *in vitro* são controladas e através desta técnica é possível obter o máximo do potencial germinativo de diversas espécies, otimizando o processo de propagação e formação de mudas de qualidade (UDOMDEE et al, 2014). Porém o comportamento das plantas no ambiente *in vitro* pode ser genótipo dependente, variando muito de

espécie para espécie (ULISSES et al., 2010). Assim, faz-se necessário o ajuste das condições de cultivo, como a disponibilidade de sacarose no meio, visando adequar as necessidades da espécie e obter altas taxas de germinação e crescimento inicial.

Neste estudo avaliamos a germinação, crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *S. rupícola* para obtenção de um protocolo de propagação que possa ser usado para produção de mudas em larga escala. Foram utilizadas sementes coletadas de matrizes mapeadas em áreas de ocorrência natural, assim como sementes de plantas cultivadas em condições de viveiro, onde foi realizada polinização manual para fecundação e produção de sementes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos de propagação e aclimação de *S. rupícola* foram realizados em duas etapas: i) uma primeira fase para estabelecimento de das condições de germinação, crescimento inicial e aclimação; ii) uma segunda etapa de escalonamento e otimização dos processos para produção de mudas em maior quantidade. A primeira etapa foi realizada no Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITVDS) em Belém/PA, enquanto a segunda etapa no Centro de Biodiversidade da Vale em Nova Lima/MG.

2.1. Testes de germinação, crescimento inicial e aclimação em condições controladas

Para o presente estudo, as sementes de *S. rupícola* foram coletadas no Quadrilátero Ferrífero no município de Ouro Preto/MG. As sementes foram enviadas ao Laboratório de Cultivo de Plantas do ITVDS, onde foram secas e armazenadas em sacões de papel e permaneceram em ambiente com baixa umidade do ar (20%) e temperatura constante (cerca de 5 °C). As sementes foram submetidas ao processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, onde ficaram sob agitação em álcool 70% por 1 minuto e em seguida em solução de hipoclorito de sódio 4% por 5 minutos. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com água deionizada autoclavada. Em seguida, as sementes foram inoculadas em caixas tipo Gerbox[®] transparentes contendo 30 mL de meio MS (Murashig & Skoog, 1962) com metade da concentração dos sais. O meio foi suplementado com phytigel (3.0 g L⁻¹) e diferentes concentrações de sacarose: 0 (controle), 10, 20 e 30 g L⁻¹. Adicionalmente, sementes sem tratamento asséptico prévio foram dispostas em placas transparentes contendo areia de quartzo

estéril. O ensaio (*in vitro* e em areia) foi conduzido em câmara de cultivo do tipo Fitotron® (SGC 120, Weiss Technik, UK) com temperatura constante de 25 °C, umidade relativa do ar em 60% e fotoperíodo de 12:12h para dia: noite e densidade de fluxo de fótons de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As sementes foram distribuídas em 6 placas por tratamento, sendo 50 por placa. O número de sementes germinadas (emissão de radícula) foi contabilizado diariamente até completar o período de 45 dias. Após os 45 dias foram calculados a taxa de germinação (%), o tempo médio de germinação (TMG) (LABOURIAU, 1983) e o percentual de sementes germinadas que desenvolveram parte aérea. As plântulas de sementes germinadas em areia foram transferidas para bandejas com células cônicas preenchidas com substrato comercial (Carolina soil) e mantidas em câmara de cultivo do tipo Fitotron® (SGC 120, Weiss Technik, UK) com as mesmas condições ambientais descritas para o período de germinação. As plantas cultivadas *in vitro* foram transferidas para o mesmo substrato ao término dos 45 dias, porém a umidade relativa do ar foi ajustada para 80%. A reposição de água ao substrato foi realizada conforme necessidade em intervalos regulares de 2 dias. Após 30 dias da retirada do cultivo *in vitro* e transferência para aclimação em substrato comercial foi avaliada a sobrevivência das plantas. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.2. Otimização e escalonamento da produção de mudas

As etapas para o estabelecimento do protocolo para escalonamento da micropropagação da *S. rupicola* foram desenvolvidas na Biofábrica do Centro de Tecnologia de Ferrosos (CTF) localizada na cidade de Nova Lima/MG.

Espécimes de *S. rupicola* foram coletadas em áreas de atendimento aos Processos de Ampliação da Mina Horizontes e cultivadas em casa de vegetação no Centro de Biodiversidade da Vale em Nova Lima. Estas plantas são mantidas como matrizes, sendo cultivadas para obtenção de sementes e produção de mudas (Fig. 1A). Frutos maduros (frutos com nervuras escurecidas) foram coletados e transferidos para laboratório. Em condições controladas, as capsulas foram abertas sobre papel toalha para a retirada de sementes (Fig. 1B) e, posteriormente, 0.21g de sementes foram transferidas para seringas de 10 mL. Para o processo de desinfestação das

sementes foi utilizado o álcool etílico 70% e a solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0.3%. Inicialmente, as sementes foram colocadas em um béquer graduado contendo a solução de álcool 70% por 1 min e posteriormente a desinfestação realizada com hipoclorito de sódio por 12 minutos. Durante este período as pontas das seringas foram mantidas imersas na solução objetivando evitar contaminações cruzadas. Em seguida, de outro béquer foi succionado 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 1. Planta adulta de *Sinningia rupicola* florida durante período de cultivo em casa de vegetação (A) e sementes obtidas após processamento dos frutos (B).

Após o processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 1 mL da solução contendo as sementes de *S. rupicola* foi adicionada em potes contendo 22 mL do meio de cultivo composto por sacarose (15 g L^{-1}) e fertilizante B&G® (3 mL L^{-1}). O meio de cultura utilizado foi suplementado com carvão ativado (1.5 g L^{-1}) e ágar nutriente (5 g L^{-1}), 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 .

O período de germinação e crescimento *in vitro* no meio de cultura teve duração de 22 meses. Durante esse período foram realizados dois processos de repicagem (mudança dos explantes do meio de cultivo), aos 330 e 570 dias. Na 1ª repicagem foram transferidos 10 indivíduos para cada pote contendo o meio de cultura, enquanto na 2ª repicagem as mudas foram transferidas para uma mistura de musgo chileno e isopor, onde as plantas permaneceram em potes individuais (uma planta por pote) em laboratório para desenvolvimento e aclimatação. Para esta etapa, as plantas foram fixadas sobre a mistura de musgo chileno e isopor e os potes fechados com tampas plásticas perfuradas permitindo trocas gasosas com o ambiente. As plantas foram separadas 5 lotes com 15 plantas cada e mantidas em prateleiras de cultivo com as mesmas condições ambientais do período de germinação de crescimento *in vitro*. A sobrevivência e o crescimento das plantas foi avaliado aos 30, 60 e 120 dias após transferência para aclimatação, sendo contabilizado as plantas vivas e o número de folhas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes de germinação, crescimento inicial e aclimatação em condições controladas

A germinação *S. rupicola* ocorreu em todos os tratamentos testados e iniciou entre o 8º e 10º dia de semeadura. As maiores taxas de germinação alcançaram cerca de 30% e foram observadas em sementes mantidas tanto em areia quanto no cultivo *in vitro* em meio de cultura sem a adição de sacarose. Esses resultados diferem de observações anteriores, onde RANIERI et al. (2007) relataram que a espécie *S. rupicola* apresentou uma taxa de germinação de 12% e que a emergência das plântulas se iniciou após 5 meses do plantio das sementes. Além disso, os resultados obtidos por estes autores sugerem possíveis mecanismos de dormência em sementes de *S. rupicola*, o que não foi observado em nosso estudo. Estas diferenças podem estar associadas ao fato de Ranieri et al. (2007) terem usado sementes recém colhidas, enquanto as sementes usadas no estudo atual foram armazenadas por cerca de 12 meses. Neste caso, o período de armazenamento das sementes pode ter sido suficiente para quebra de dormência, explicando tanto o menor tempo de germinação quanto a maior taxa de germinação.

No cultivo *in vitro*, a germinação de *S. rupicola* foi maior no tratamento com ausência de sacarose (Fig. 2A e 3A) e o aumento na concentração desta fonte de

carbono levou a redução progressiva da taxa de germinação. Por outro lado, sementes cultivadas em meio nutritivo sem adição de sacarose apresentaram uma maior amplitude temporal para o processo de germinação (Fig. 3B). Esses resultados sugerem que a ausência de uma fonte de carbono no meio pode ter retardado o processo de germinação da espécie (uma vez que aumentou o tempo médio de germinação – TMG), porém não afetou negativamente a taxa de germinação, a qual se manteve com médias similares a de sementes mantidas em areia. O aumento na concentração de sacarose no meio pode reduzir o potencial hídrico, limitando a disponibilidade hídrica para a semente, afetando assim sua germinação (JOHNSON et al., 2011). O efeito osmótico pode justificar o menor percentual sementes germinadas observado no meio contendo a maior concentração de sacarose (30 g L^{-1}) e o maior em areia, visto que nesse último o potencial osmótico é praticamente nulo. No entanto, a presença de sacarose no meio, mesmo que em baixas concentrações, aumentou significativamente a emissão de folhas (Fig. 3C) nesta fase inicial de cultivo.

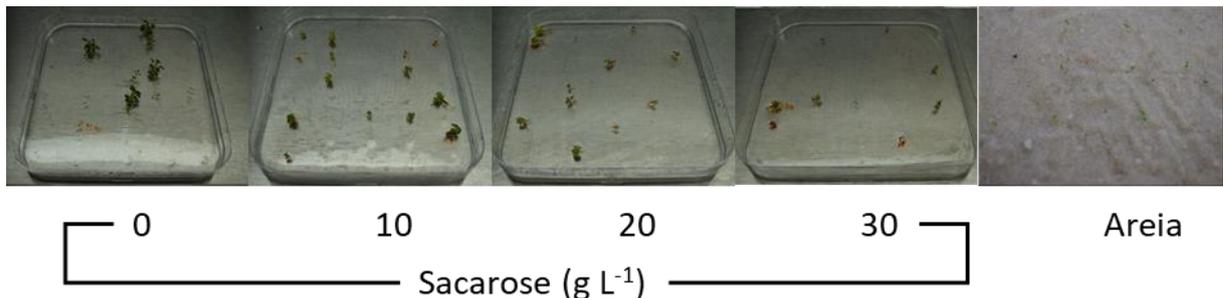


Figura 2. Sementes de *Sinningia rupicola* durante período de germinação em areia e meio nutritivo tipo MS com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30g).

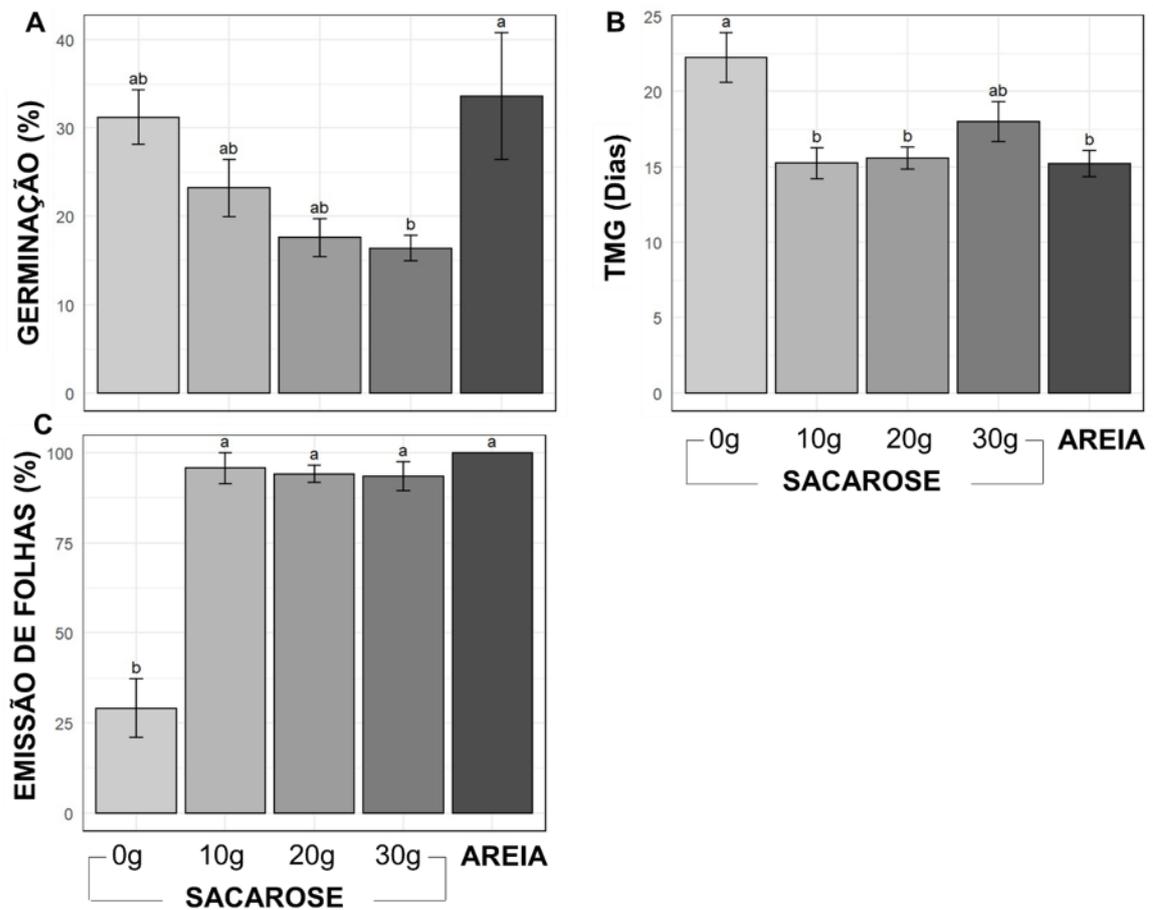


Figura 3. Germinação (A), tempo médio de germinação (TMG) (B) e emissão de folhas (C) em sementes de *Sinningia rupicola* cultivadas em meio nutritivo contendo diferentes concentrações de sacarose e em areia. Valores representam a média de 6 repetições contendo 50 sementes cada. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p < 0.05$). Barra representa erro padrão da média.

Após os 45 dias de germinação, as plantas cultivadas no meio sem sacarose apresentaram um desenvolvimento superior, com maior crescimento em altura, número de folhas e desenvolvimento das raízes (Fig. 4A). A presença da sacarose no meio aumentou as brotações, porém influenciou negativamente no crescimento das plantas (Figs. 4B, C e D). As plantas cultivadas nesses tratamentos apresentaram menor desenvolvimento radicular, foliar e possível redução na produção de pigmentos fotossintéticos, levando em consideração a coloração das folhas. Essas características podem acarretar no aumento das taxas de mortalidade durante a etapa

de aclimatização, visto que as plantas podem não apresentar maturidade morfofisiológica para as condições *ex vitro*.

As limitações impostas pelo ambiente *in vitro*, como a redução das trocas gasosas, promovem restrições no processo fotossintético (HASSANKHAH et al., 2014). Sendo assim, a sacarose é comumente utilizada no cultivo *in vitro* de plantas, proporcionando condições favoráveis para o crescimento das mudas (MORFOT et al., 2015; SOUZA et al., 2020). Por outro lado, a adição de sacarose no meio pode contribuir para a redução da capacidade fotossintética das plantas, uma vez que esse carboidrato é a fonte primária de carbono para as mudas. Portanto, a redução nas doses de sacarose e/ou alterações nas condições do ambiente *in vitro* podem estimular o aumento da autotrofia em algumas espécies durante a micropropagação (LUCCHESINI et al., 2019; SCHMILDT et al., 2015).

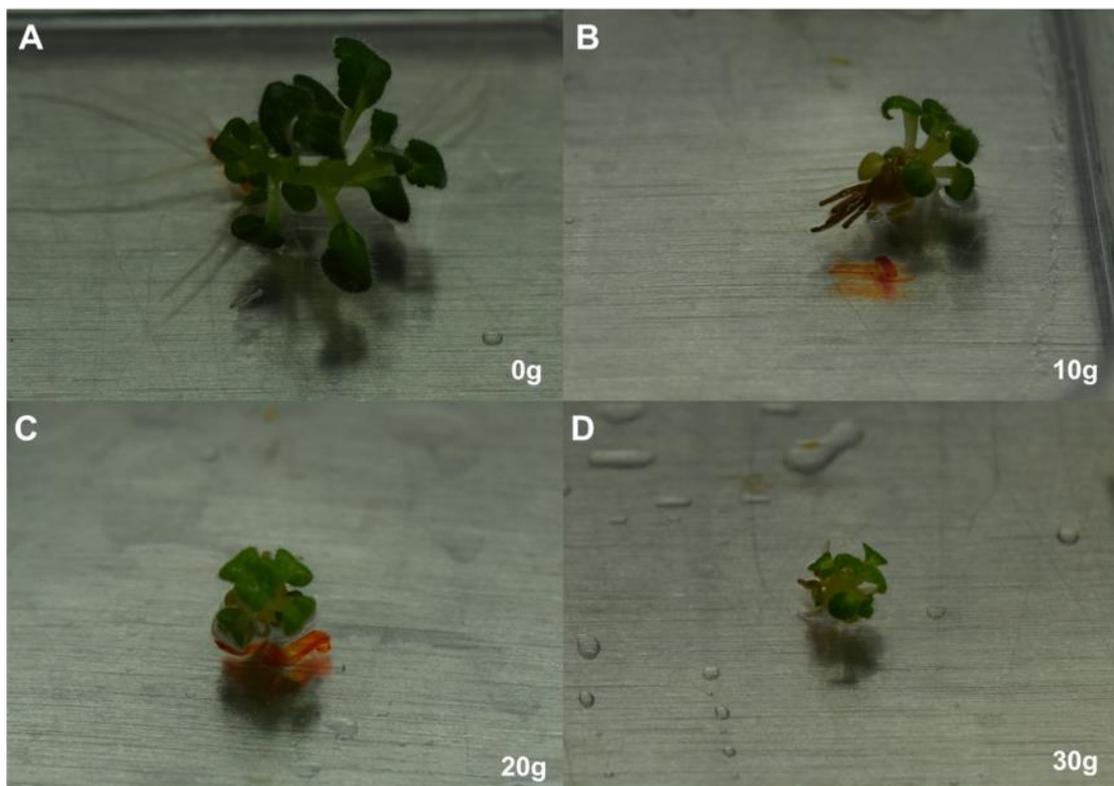


Figura 4. Plantas de *Sinningia rupicola* provenientes da germinação de sementes cultivadas em meio nutritivo com diferentes concentrações de sacarose: 0g (A), 10g (B), 20g (C) e 30g (D) após 45 dias de germinação.

Na etapa de aclimatização, observou-se que para as mudas de *S. rupicola* nas concentrações de 20 e 30g de sacarose influenciaram negativamente na taxa de

sobrevivência das plantas aos 45 dias de transplante, levando a redução significativa (Fig. 5A). Esse resultado reforça que a adição de elevadas concentrações de sacarose no meio promove alterações morfofisiológicas nas plantas que impactam diretamente no sucesso da aclimatização.

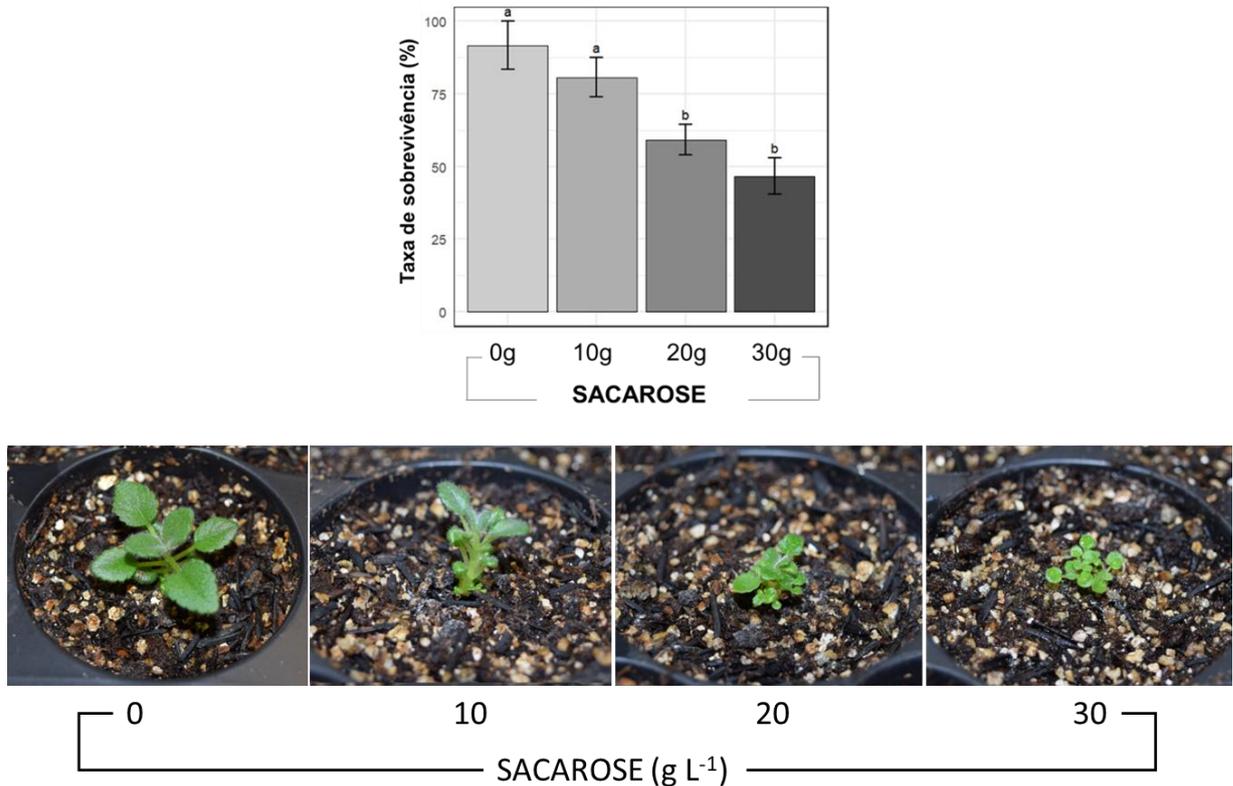


Figura 5. Percentual de sobrevivência de mudas aclimatadas e imagens das plântulas de *Sinningia rupicola* durante período de cultivo *ex vitro* em substrato comercial Carolina Soil. As plântulas correspondem aos meios onde foram cultivadas em diferentes concentrações de sacarose. Valores representam a média de 6 repetições com plantas advindas das 50 sementes inicialmente usadas para germinação. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p < 0.05$). Barra representa erro padrão da média.

3.2. Otimização e escalonamento da produção de mudas

Para o sucesso propagativo de plantas *in vitro* em larga escala se faz necessário que o processo de assepsia seja realizado rigorosamente, porém sem promover danos no material vegetal a ser inoculado. Cuidados extras devem ser tomados devido ao grande número de materiais de propagação que são manipulados ao mesmo tempo. Neste estudo, onde foram usadas sementes de *S. rupicola*, o hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 0,3% e o álcool etílico 70% mostraram-se eficientes para a assepsia das sementes, pois observou-se uma baixa taxa de contaminação (aproximadamente 2%) e uma elevada germinação, conforme mostrado na Figura 6. Valores assim baixos de contaminação permitem que o protocolo de propagação seja usado para obtenção de mudas em larga escala.

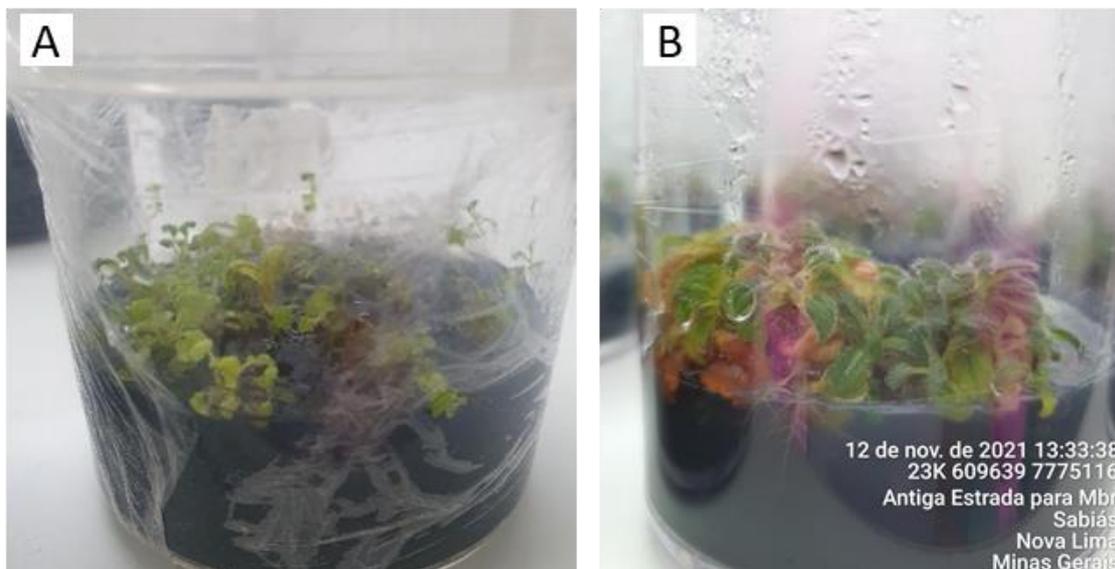


Figura 6. Germinação de crescimento *in vitro* de *Sinningia rupicola*. Plântulas de *S. rupicola* após (A) 120 dias de inoculação das sementes em meio de cultura e (B) após repique com 150 dias. Detalhe para a presença de sistema radicular nas plantas após o repique.

Diferente do observado na 1ª etapa do estudo, onde foram usadas sementes armazenadas por um longo período, nesta etapa onde as sementes estavam recém colhidas, a germinação iniciou cerca de 60 dias após inoculação. Tal redução do período para iniciar a germinação quando comparado ao observado por Ranieri et al. (2007) pode estar associado as condições favoráveis do meio de cultura, temperatura e umidade empregadas nas condições controladas; enquanto no estudo de Ranieri et

al. (2007) o uso do substrato natural e as condições climáticas flutuantes do ambiente de ocorrência da espécie podem ter influenciado diretamente nos resultados.

Os resultados anteriores permitiram adequar o meio de cultura para condições que permitem tanto uma boa germinação e também asseguram o crescimento inicial vigoroso das plantas. Para tanto, foi decidido usar concentração baixa de sacarose no meio de cultura e suplementar com fertilizantes, os quais deverão suprir as plantas com nutrientes que permitem seu bom desenvolvimento. Desta forma, conforme se observa na Figura 6B, as condições nutricionais *in vitro* proporcionaram o crescimento satisfatório das plantas, com o desenvolvimento de raízes nas mudas que puderam ser facilmente serem repicadas para a mistura de musgo chileno e isopor (Figura 7). Nestas condições, as plantas apresentaram sobrevivência de 100% e crescimento vigoroso (Fig. 7). Em geral, o crescimento das mudas foi mais elevado nos primeiros 45 dias e se tornou praticamente estável após este período (Fig. 8A). Aos 105 dias de aclimação, a grande maioria das plantas apresentou até 12 folhas, havendo um número com mais de 20 folhas (Fig. 8B). Determinadas plantas alcançaram até 36 folhas durante este período, perfazendo uma média geral de 11 folhas.

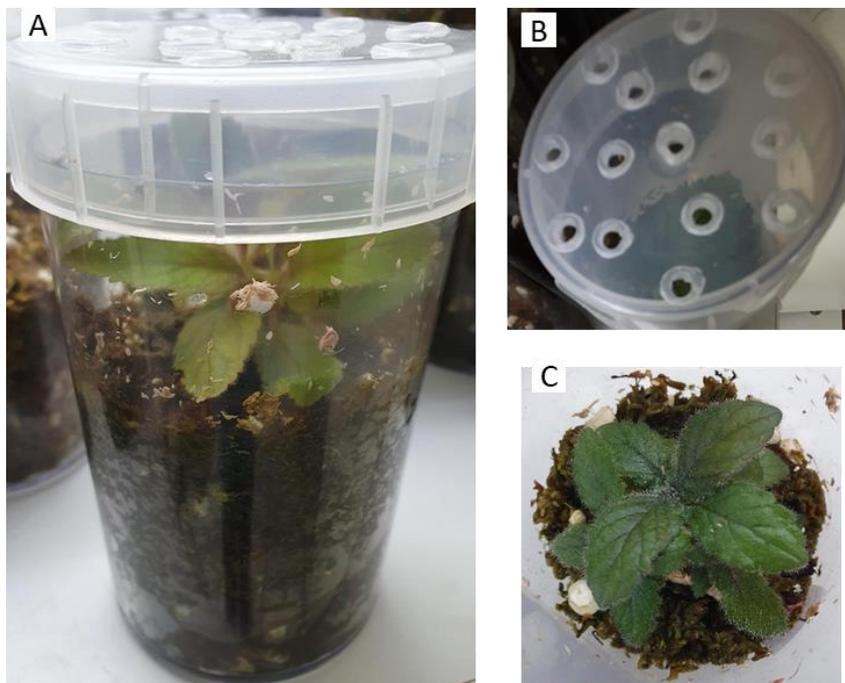


Figura 7. Mudas de *Sinningia rupicola* durante aclimação em mistura de musgo chileno e isopor. (A) Muda contida em frasco plástico usado para o cultivo *in vitro*, (B) fechado com tampa perfuradas para trocas gasosas com o ambiente natural e (C) detalhe de uma planta de *S. rupicola* com desenvolvimento vigoroso.

Foi observado um desenvolvimento mais acentuado para as plantas do lote 2. As plantas de lote, mesmo apresentando um número de folhas iniciais similar ao dos demais lotes, tiveram um acréscimo de folhas muito elevado nos primeiros 45 dias, alcançando uma média de cerca de 20 folhas, praticamente o dobro dos demais (Fig. 8B). Todavia, nos 60 dias seguintes, tais plantas tiveram o número de folhas reduzido possivelmente associado a perda das folhas mais velhas. *Sinningia rupicola* é uma planta perene, tem sua sobrevivência associada a formação de um tubérculo que emite anualmente parte aérea (Ranieri et al. 2012). Perdas de folhas são geralmente observadas para esta espécie e, em plantas cultivadas, esta perda de folhas mais velhas tem sido comumente observada mesmo ao longo do período vegetativo.

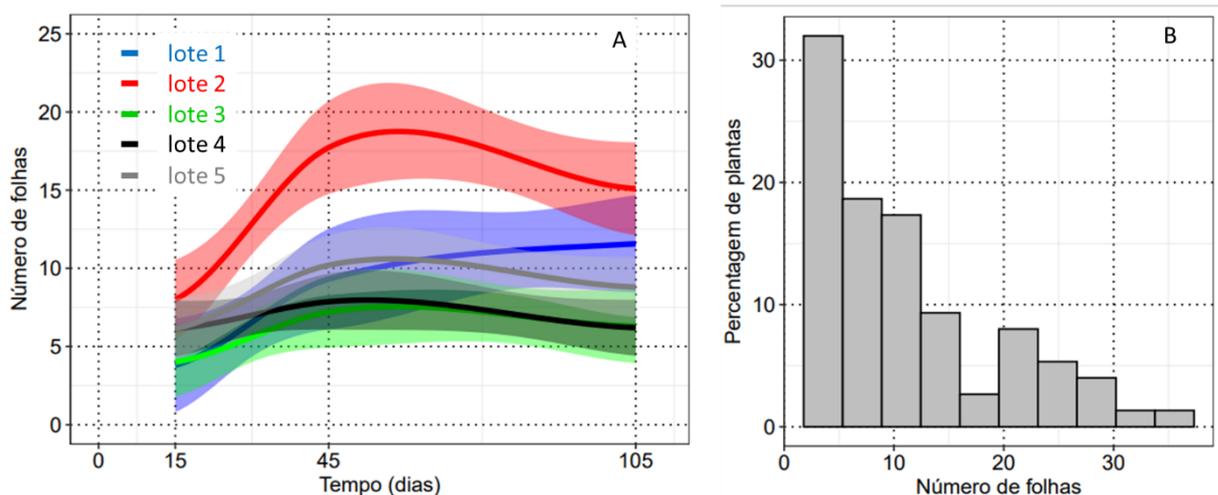


Figura 8. Crescimento de plantas de *Sinningia rupicola* durante aclimação em musgo chileno e isopor. (A) Evolução do número de folhas ao longo 105 dias após transferência e (B) porcentagem de plantas em cada classe conforme número de folhas após 105 dias de aclimação.

4. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

O protocolo de propagação e aclimação de *S. rupicola* foi desenvolvido e permite a geração de elevado número de plantas com elevada qualidade fisiológica. As sementes de *S. rupicola* possivelmente apresentam algum grau de dormência fisiológica e que pode ser superada com o armazenamento, uma vez que sementes mantidas por cerca de 12 meses a temperaturas baixas apresentaram maior taxa de germinação e em poucos dias. A primeira etapa do estudo mostrou que o uso de

concentrações reduzidas de sacarose no meio é benéfico para o crescimento inicial e aclimação das plantas e serviu para definir a melhor estratégia para escalonar a propagação visando a obtenção de grande número de mudas. Com a segunda etapa, foi evidenciada que o acréscimo de um passo durante o processo de aclimação (cultivo em musgo chileno e isopor) tem favorecido a obtenção de mudas de qualidade. A próxima etapa consiste na transferência destas plantas para o ambiente externo, seja casa de vegetação ou viveiro, onde deverão efetuar o desenvolvimento e adaptação final antes de serem transferidas definitivamente para o ambiente natural. Por outro lado, uma vez que germinação em areia e crescimento inicial das plantas de *S. rupicola* em substrato orgânico comercial foi favorável, novos ensaios seriam interessantes para verificar a viabilidade de produção de mudas por este método, atentando sobretudo para o crescimento e formação da estrutura de reserva (tubérculo).

5. REFERÊNCIAS

Araújo, A.O., Souza, V.C., & Chautems, A. 2005. Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 28: 109-135

CARMO, F.F.; CAMPOS, I.C. & JACOBI, C.M. Cangas: ilhas de ferro estratégicas para a conservação. **Ciência Hoje** 295: 48-53. 2012.

CARMO, F.F.; JACOBI, C.M.. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia**, v. 64, p. 527-541, 2013.

CNCFlora. *Stephanopodium engleri* 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/Stephanopodium engleri](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Stephanopodium_engleri)>. Acesso em 08 setembro 2023.

Drummond, G.M., Martins, C.M., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A. & Antonini, Y. 2005. Biodiversidade em Minas Gerais: Um Atlas para sua Conservação. 2 ed. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas

FORZZA, R.C.; et al. **Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 23 ago. 2023

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.

HASSANKHAH, A.; VAHDATI, K.; LOTFI, M.; MIRMASOUMI, M.; PREECE, J.; ASSAREH, M. Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated Persian Walnut plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v.1, p. 111-120, 2014.

JOHNSON T.R., KANE M.E., PEREZ H.E. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). **Plant Growth Regul.** V.63, p.89–99. 2011.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**, p. 139-174, 1983.

LUCCHESINI, M. et al. A novel microfloating culture system for the *in vitro* rooting of *Echinacea angustifolia* DC: photosynthetic performance and production of caffeic acid derivatives. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, n. 1, p. 123-132, 2019.

MONFORT, L. E. F., PINTO, J. E. B. P., BERTOLUCCI, S. K. V., ROSSI, Z. T. T., LIMA, A. F., SILVA, S. T., & SILVA, G. M. D. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atoveran. **Revista Ceres**, V. 62, p. 215-223. 2015.

MARINHO, M.J.M.; ALBUQUERQUE, C.C.; MORAIS, M.B.; SOUZA, M.C.G.; SILVA, K.M.B. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V. 13, n.2, p.246-252. 2011.

MELO, B. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento de plântulas na cultura *in vitro* de embriões da *guarirobeira* *Syagrus oleracea* (MART.) BECC. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301–1306, 2001.

MREMA, E.M. Post-2020 global biodiversity framework emphasises ‘all-hands-on-deck’ approach. **IUCN 2020**. <https://www.iucn.org/crossroads-blog/202109/post-2020-global-biodiversity-framework-emphasises-all-hands-deck-approach>. Acesso em 29 de novembro de 2021.

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Planta**. V. 15(3), p.473–497.1962.

OLIVEIRA, NILMA PORTELA; RIBEIRO, SANTUZA APARECIDA FURTADO; DE SOUZA, MARÍLIA MAIA. Controle de contaminação e oxidação no cultivo *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. “Koroneiki”. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. 1-10. 2021.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Indicadores Brasileiros para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. <https://odsbrasil.gov.br/> Acesso em: 29 nov. 2021

PEREIRA, Wellington José et al. Estabelecimento *in vitro* de bananeiras em diferentes meios de cultura submetidas a agentes antioxidantes. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 4973-4984, 2020.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. D. How and why to measure the germination process? **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

RANIERI, B. D.; FRANÇA, M. G. C.; PEZZINI, F. F. Umidade do Solo e sua Influência no Estabelecimento de duas Espécies Rupestres (Gesneriaceae) Endêmicas de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 3-5. 2007.

RANIERI, B. D.; PEZZINI, F. F.; GARCIA, Q. S.; CHAUTEMS, A.; FRANÇA, M. G. C. Testing The Regeneration Niche Hypothesis With Gesneriaceae (Tribe Sinningiae) In Brazil: Implications For The Conservation Of Rare Species. **Austral Ecology**, v. 37, n. 1, p. 125-133, 2011.

RONI, M. Z. K., ISLAM, M. S., & SHIMASAKI, K. *In vitro* seed germination and tracking the seedling growth of eustoma. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, V.46, p.224-242. 2017.

SAMPER, C. To save our planet, let's embrace nature-positive solutions. **IUCN 2021**. <https://www.iucn.org/crossroads-blog/202109/save-our-planet-lets-embrace-nature-positive-solutions>. Acesso em 29 de novembro de 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.

SCHMILDT, O. et al. Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden'papaya cultivated in vitro with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 1, p. 7-18, 2015.

SILVA, W. A. Gradiente vegetacional e pedológico em complexo rupestre de quartzito no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. 2013.

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

UDOMDEE, W., WEN, P.J., LEE, CY. ET AL. Effect of sucrose concentration and seed maturity on in vitro germination of *Dendrobium nobile* hybrids. **Plant Growth Regul** V.72, p.249-255. 2014.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 86-91, 2010

VINCENT, R. C.; MEGURO, M. Plant soil relationships in ferruginous rocky soil vegetation. **Revista Brazil. Bot**, v. 31, p. 377-388, 2008.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.149-158. 2011.