



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE AGRONOMIA**

ELIETE OLIVEIRA REIS

**TESTES PARA DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DO CACAUEIRO VISANDO
ESTABELECIMENTO *IN VITRO***

FORTALEZA

2018

ELIETE OLIVEIRA REIS

TESTES PARA DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DO CACAUEIRO VISANDO
ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Monografia apresentada ao curso de Agronomia
do Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.
Área de concentração: Fitotecnia

Orientador: Prof. D.Sc Júlio César do Vale Silva

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R299t Reis, Eliete Oliveira.
Testes para desinfestação de explantes do cacaueteiro visando estabelecimento in vitro / Eliete Oliveira
Reis. – 2018.
36 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Júlio César do Vale Silva.

1. Theobroma cacao L.. 2. Micropropagação. 3. Agentes desinfestantes. I. Título.

CDD 630

ELIETE OLIVEIRA REIS

TESTES PARA DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DO CACAUEIRO VISANDO
ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Monografia apresentada ao curso de Agronomia
do Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.
Área de concentração: Fitotecnia

Aprovada em: 20 / 06 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. D.Sc. Júlio César do Vale Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

D.Sc. Elaine Facco Celin
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.Sc. Priscila Bezerra dos Santos Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me abençoar dando força e saúde para atingir meus objetivos e superar os momentos difíceis.

À minha família por todo carinho. Em especial aos meus pais e irmão, que não mediram esforços para me proporcionar educação de qualidade e sem os quais teria sido impossível chegar à reta final deste curso de graduação. Por estarem comigo durante todas as batalhas vencidas nesse período, e mais ainda, pelos cuidados desde a infância, ensinamentos e exemplos.

Ao meu namorado, Éder Raulino, por todo amor, compreensão e incentivo.

Aos amigos que a Agronomia me proporcionou, sem os quais as rotinas teriam sido bem mais difíceis, em especial à Neurilan, Vanessa Priscila, Gabriel, Ricardo, Leandro, Tamara, Clíce, Jean, Michelle, Albertina, Celly, Lucas, Paloma e Manoela.

Ao grupo AgroLol, que me carregou nas ranqueadas, proporcionando momentos ímpares de lazer e trabalho em equipe.

Ao primeiro orientador que tive na UFC e grande amigo, João Batista Santiago Freitas, que além dos ensinamentos em agricultura e astronomia agrícola, me proporcionou uma visão diferente do mundo com seus “assuntos aleatórios e letras apagadas”.

Aos professores Cândida e Júlio César pelas orientações e oportunidade de crescimento pessoal quando à época de bolsista em iniciação à docência. Em especial ao professor Júlio, agora como orientador de estágio e TCC, por toda compreensão, disposição e ensinamentos acadêmicos. Meu muito obrigada também à banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões de melhorias do trabalho.

À Agronômica – Consultoria e Projetos Agropecuários, local em que passei por experiências únicas, e ao lado dos colegas adquirir aprendizados para a vida toda. Meu muito obrigada a todos que fizeram ou fazem a história da nossa Empresa Júnior, pelo tempo dedicado nesse trabalho voluntário, especialmente aos integrantes das Gestões 2014, 2015 e 2016.

À Bioclone Produção de Mudas LTDA, pela oportunidade de aprendizado no estágio obrigatório, do qual derivou este TCC. Roberto Caracas, Ary Lacerda, Cléa Cruz, Elinete Sousa, registro aqui meu muito obrigada pelas experiências proporcionadas e paciência no ensino. Agradeço também à melhor equipe de trabalho do Brasil (Cecílio, Alliny, Anderson, Leonardo, Fernando, Eder) pelo convívio e cooperação diária.

Gratidão a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

“A necessidade de mudar abriu um caminho no centro da minha mente”. (Maya Angelou)

RESUMO

Com a demanda crescente de chocolate e de seus derivados, cresce também a necessidade de mudas de cacaueteiro sadias e de alto potencial genético, muitas vezes não contempladas na multiplicação assexual convencional ou por sementes. Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho testar diferentes produtos para desinfestação de explantes do cacaueteiro para seu estabelecimento *in vitro*. Realizaram-se dois ensaios na empresa Bioclone Produção de Mudanças LTDA. No primeiro, os explantes utilizados foram segmentos nodais oriundos de plantas em campo dos genótipos PS 1319 e CCN 51. Testaram-se hipoclorito de sódio 1,5% ou dióxido de cloro 0,025% na desinfestação, e meio de cultura com ou sem dióxido de cloro. No segundo, os explantes foram gemas apicais de plantas jovens do genótipo PS 1319 cultivadas em ambiente protegido. Testaram-se desinfestação com hipoclorito de sódio (3% ou 6%) ou com dióxido de cloro (3% ou 5%). Dada a contaminação de 100% dos segmentos nodais do primeiro ensaio, verificou-se que as concentrações usadas dos produtos não foram suficientes para desinfestá-los e que dióxido de cloro no meio de cultura não provocou esterilização química. Para assepsia de gemas apicais de cacaueteiros mantidos em cultivo protegido, o uso do hipoclorito de sódio a 6% impossibilitou o desenvolvimento de contaminações *in vitro*. Para redução de perdas por oxidação, a transferência dos explantes para outro meio deve ocorrer antes dos 21 dias. O ajuste nas concentrações dos produtos utilizados e o uso de agentes antioxidantes podem auxiliar na obtenção de um protocolo eficaz para desinfestação de explantes de cacaueteiro.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L. Micropropagação. Agentes desinfestantes.

ABSTRACT

With the increasing demand for chocolate and its derivatives, there is also a growing need for healthy cocoa seedlings with high genetic potential, often not contemplated in conventional asexual multiplication or by seeds. In this sense, the objective of this work was to test different products for disinfestation of cacao explants for their establishment in vitro. Two tests were performed at Bioclone Produção de Mudas LTDA. In the first, the explants used were nodal segments from field plants of genotypes PS 1319 and CCN 51. Sodium hypochlorite 1.5% or chlorine dioxide 0.025% was tested in disinfestation, and growth media with or without chlorine dioxide. In the second, the explants were apical buds of young plants of the genotype PS 1319 cultivated in greenhouse. Disinfestation was tested with sodium hypochlorite (3% or 6%) or with chlorine dioxide (3% or 5%). Faced with the contamination of 100% of the nodal segments of the first test, it was found that the concentrations of the products used were not sufficient to disinfect them and that chlorine dioxide in the growth media does not cause chemical sterilization. For asepsis of apical buds of cacao trees kept in greenhouse, the use of sodium hypochlorite at 6% did it impossible to develop in vitro contaminations. To reduce oxidation losses, the transfer of the explants to another growth media must occur before 21 days. The adjustment in the concentrations of the products used and the use of antioxidant agents may help to obtain an effective protocol for disinfestation of cocoa explants.

Keywords: *Theobroma cacao* L. Micropropagation. Disinfestation agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Material do ensaio realizado no laboratório da Bioclone, Eusébio-CE, com contaminação	24
Figura 2 – Índices de explantes contaminados ao longo dos dias	25
Figura 3 – Índices de explantes oxidados, mas não contaminados ao longo dos dias	26
Figura 4 – Índices de explantes viáveis ao longo dos dias	27
Figura 5 – Amostras indicando: A- viabilidade; B- contaminação; C- oxidação	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos e número de explantes utilizados - Desinfestação em segmentos nodais de genótipos de cacauero	22
Tabela 2 – Tratamentos e número de explantes utilizados – Desinfestação de gemas apicais de cacauero genótipo PS1319	22

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	O cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	14
2.2.	Importância Econômica	15
2.3.	Propagação do cacauzeiro	17
2.3.1.	<i>Mudas seminais</i>	17
2.3.2.	<i>Mudas clonais</i>	18
2.4.	Micropropagação de plantas	18
2.4.1.	<i>Desinfestação de explantes</i>	19
3.	METODOLOGIA	21
3.1.	Ensaio I - Desinfestação de segmentos nodais	21
3.2.	Ensaio II - Desinfestação de gemas apicais	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1.	Ensaio I - Desinfestação de segmentos nodais	24
4.2.	Ensaio II - Desinfestação de gemas apicais.....	25
5.	CONCLUSÕES	29
5.1.	Ensaio I - Desinfestação de segmentos nodais	29
5.2.	Ensaio II - Desinfestação de gemas apicais	29
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), pertence à família botânica Malvaceae; é oriundo de regiões de florestas pluviais da América Tropical, desde o Peru até o México, onde até hoje é encontrado em estado silvestre (CEPLAC, 2018a). Em condições naturais sem ação de poda, pode chegar a 20 metros de altura, mas em condições de cultivo normalmente apresenta altura entre 3 e 5 metros. O fruto, cacau, é a principal matéria-prima para a fabricação do chocolate, que ocorre com a torrefação e moagem das amêndoas.

O cacauieiro é cultivado em seis estados brasileiros em cerca de 66 mil propriedades rurais, sendo que metade delas são do Sul da Bahia, maior estado produtor, seguido do Pará. A elevada rentabilidade obtida com o cultivo, em meados do século passado, e as condições de solo e clima favoráveis impulsionaram a rápida expansão da cacauicultura e a consolidação da agroindústria do cacau no Brasil. Entretanto, no final da década de 80, a atividade foi afetada por uma grave crise estrutural e conjuntural com o surgimento e dispersão da doença vassoura-de-bruxa (ESALQ/USP, 2018). Esse cenário estimulou a reestruturação da cadeia para que assim a produção pudesse voltar a crescer, com pesquisa e adoção de novas tecnologias de produção, como podas de saneamento, uso de genótipos resistentes e controle químico (SOUZA et al., 2009).

O sucesso na produção ocorre por várias razões, sendo a formação ou aquisição de mudas livres de pragas e doenças, uma das principais (DINIZ; HAMANN, 2015). No cacauieiro, pode-se propagar mudas sexuadamente (de origem seminal) ou assexuadamente (convencionalmente oriundas de propagação vegetativa de ramos). Nesta, existe ainda a micropropagação, uma opção biotecnológica utilizada em diversas culturas e altamente desejável para a conservação do potencial genético de determinado indivíduo vegetal, assim como para a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária (RIBEIRO et al. 2013).

As vantagens contempladas pela micropropagação são muito importantes para a cultura cacauieira, principalmente em se tratando de genótipos resistentes a vassoura-de-bruxa, vistos como uma alternativa para a problemática referente à baixa produção (ALEXANDRE et al, 2015). Estes geralmente são propagados clonalmente a fim de manter a fidelidade genotípica à planta matriz. No entanto, muitas vezes a propagação assexuada convencional é um processo lento e apresenta sérios riscos de disseminação de doenças e pragas. Contudo, a micropropagação permite produzir milhares de plantas, livres de doenças em curto espaço de tempo (ULISSES et al., 2010). Assim, acredita-se que nos próximos anos haja um aumento na demanda de mudas micropropagadas.

Para esta técnica, seguem-se em geral, as seguintes etapas: cuidados com a planta doadora de explantes; seleção, desinfestação e inoculação dos explantes em condições assépticas; multiplicação dos propágulos *in vitro*; enraizamento das plântulas obtidas e aclimatização (BORSOI, 2009). O sucesso de cada etapa é dependente da anterior, de modo que só haverá êxito na obtenção de mudas para aclimatização e, posterior disponibilização ao mercado, se a seleção da planta mãe e desinfestação dos explantes forem eficientes.

Para a desinfestação, normalmente utiliza-se etanol a 70% por alguns segundos (± 10) e compostos à base de cloro (BORSOI, 2009), em geral na forma de hipoclorito de sódio, facilmente encontrado em formulações comerciais de água sanitária (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O dióxido de cloro (ClO_2) também pode ser usado como agente desinfestante dos explantes, agindo na maioria das vezes como agente oxidante dos componentes intracelulares de microorganismos gram-negativos e gram-positivos (SREBERNICH, 2007).

Na técnica de micropropagação do cacaueteiro ainda não foi desenvolvido um protocolo comercial adequado. Esse deve conter a etapa desinfestação, apresentando combinação ideal da concentração do agente desinfestante e do tempo de exposição para o binômio tecido-genótipo vegetal, já que não há um produto ou concentração ideal que possa ser usado de forma generalizada e com eficiência para todos os tecidos e espécies.

Diante do exposto, objetivou-se com esse trabalho testar diferentes produtos para desinfestação de explantes do cacaueteiro para seu estabelecimento *in vitro* na empresa Bioclone Produção de Mudanças LTDA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cacau (*Theobroma cacao* L.)

No início do século XVII, o cacau foi citado pela primeira vez na literatura botânica, por Charles de L'Écluse que o descreveu com o nome de *Cacao fructus*. Porém, em 1737 foi classificado por Linneu como *Theobroma fructus*. Já em 1753, foi modificado para *Theobroma cacao*, como permanece atualmente (SILVA NETO, 2001). Faz parte do gênero *Theobroma*, que possui 22 espécies (Sánchez, 2011), das quais destacam-se além do *T. cacao* o *T. grandiflorum* (DUCKE, 1953).

Pertencente à família Malvaceae (ALVES, 2002), a espécie se espalhou em duas principais direções, resultando nos dois principais grupos: Criollo e Forasteiro. O grupo Criollo é cultivado na Venezuela, Colômbia, Equador, América Central e México, e o Forasteiro, no Norte do Brasil, Guianas e Venezuela (DIAS, 2001; SOUNIGO et al., 2003), sendo ambos classificados de acordo com características morfológicas, genéticas e origem geográfica. Um terceiro grupo denominado Trinitário é considerado por alguns autores, como originário de cruzamentos naturais entre os grupos Forasteiro e Criollo (DIAS, 2001; ALMEIDA; VALLE, 2007).

O cacauzeiro é uma espécie umbrófila perene de porte arbóreo, pertencente a regiões com clima tipicamente tropical, tanto de terras baixas, dentro de bosques escuros e úmidos sob a proteção de grandes árvores, como em florestas menos exuberantes e relativamente menos úmidas. A ocorrência é comum em altitudes variáveis chegando a atingir 20 metros de altura em condições silvestres, mas em condições de cultivo normalmente alcançam cerca de 5 metros (BARTLEY, 2005; ALMEIDA; VALLE, 2007). As raízes dessa espécie são pivotantes e atingem profundidade variável de acordo com as características do solo, podendo chegar a 2 metros de profundidade. O caule é ereto, liso e esverdeado durante os dois primeiros anos, tornando-se cinza-escuro e de superfície irregular na planta adulta, em decorrência do desenvolvimento das almofadas florais. Os ramos apresentam dimorfismo, podendo ser ortotrópicos (tronco e ramos “chupões”), que apresentam crescimento vertical, e plagiotrópicos (ramos laterais), de crescimento oblíquo. As folhas são pecioladas com dois intumescimentos, sendo que as novas são tenras com coloração variando do verde-esbranquiçado ao vermelho e podendo ter tonalidade de roxo. Na planta adulta possuem bordas lisas, são acuminadas, peninérveas e apresentam coloração verde-escuro. O tamanho e espessura delas variam de acordo com a intensidade luminosa (TOXOPEUS, 1985; AGUILAR et al., 2016).

As plantas do cacauero são caulifloras, ou seja, as flores surgem em almofadas florais no tronco ou nos ramos lenhosos, em uma gema desenvolvida no lugar da axila de uma antiga folha. As flores são hermafroditas e possuem a seguinte constituição: cinco sépalas, cinco pétalas, cinco estaminóides, cinco estames e um pistilo cujo ovário possui cinco lojas (SILVA NETO, 2001). Uma planta de cacauero adulta pode produzir mais de 50 mil flores por ano, das quais menos de 5% são polinizadas e somente 0,5% a 2% resultam na produção de frutos. O estame e o pistilo encontram-se isolados na flor por uma coroa de estaminóides e pelas pétalas que envolvem as anteras (SOUZA; DIAS, 2001). Os frutos são indeiscentes, do tipo bacóide e pentalocular, com tamanho variando de 10 a 32 cm de comprimento. Apresentam grande diferença em forma, espessura da casca, coloração e rugosidade, peso de 100 a 2000 g dependendo do grupo e do cultivar a que pertence. Conforme os frutos se desenvolvem a cor varia de verde a vermelho quando imaturos, e amarelo a alaranjado quando maduros (AGUILAR et al., 2016).

A parte de maior interesse econômico, as sementes, possui peso seco unitário entre 0,5 e 5 g, com concentração de antocianina que seguem padrões de coloração do branco ao roxo intenso (BARTLEY, 2005; MONTEIRO; AHNERT, 2007). Após o beneficiamento, as sementes são utilizadas na fabricação de chocolate. Dessas também se extrai manteiga, muito utilizada na indústria farmacêutica. A polpa que envolve as sementes é utilizada na fabricação de diversos produtos como geleia, vinho, líquido, vinagre e suco (SOUZA; DIAS, 2001; ALMEIDA; VALLE, 2007).

A propagação do cacauero pode ser realizada via semente (sexuada) ou por propagação vegetativa (assexuada). A mais comum, com o uso de sementes, foi intensivamente usada na implantação e recuperação de lavouras na região cacauera do estado da Bahia, entre 1970 e 1980 (SODRÉ, 2009). Porém, resulta em segregação e no desenvolvimento de plantas desuniformes quanto ao crescimento, floração e frutificação, dificultando o manejo (LIRA JUNIOR et al., 2007). Já na propagação vegetativa, utiliza partes da planta para produzir novos indivíduos, constituindo-se uma boa opção de multiplicação de variedades clonais de cacauero. O clone é uma planta geneticamente igual à planta que lhe deu origem, o que faz da variedade clonal um material mais homogêneo (SODRÉ, 2009).

2.2. Importância Econômica

O cacauero é explorado para produção de sementes, que após beneficiamento e agregação nutricional irá compor o produto que é consumido sob as mais variadas formas em

todo o mundo, o chocolate. O consumo do chocolate e seus derivados é maior em países de clima frio, no entanto, em países tropicais o consumo é intensificado em datas comemorativas, como páscoa, dia das mães, namorados, natal, dentre outras (SODRÉ, 2007a).

A indústria do chocolate movimenta cerca de 83 bilhões de dólares por ano, tornando-se um elemento de importância econômica na África Ocidental, Sudeste Asiático, América do Sul e Central (FLOREZ et al., 2015). Além do consumo de chocolate e confeitos sob as mais variadas formas também tem sua manteiga utilizada nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Possui também polpa muito apreciada, que vem conquistando mercados, inclusive internacionais (MENEZES; CARMO-NETO, 1993).

A cadeia produtiva do cacau ascendeu ao longo dos séculos XVIII a XX no Brasil, motivada principalmente pelo crescimento de sua produção primária no período, catalisada pela boa adaptação da cultura em regiões do Nordeste brasileiro (LEITER; HARDING, 2004). A produção nas lavouras cacauíferas brasileiras atingiu seu ápice na década de 1980, quando o país se tornou um dos maiores produtores mundiais do fruto, com destaque para a produção no estado da Bahia, onde a atividade exerceu influência significativa no desenvolvimento socioeconômico do estado, com efeitos, inclusive, na estrutura social local (ESTIVAL et al., 2014). Após essa fase inicial de expansão, que prosseguiu até o começo da década de 1990, iniciou um processo de declínio produtivo agrícola.

Atualmente, os principais produtores mundiais de cacau são Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria, Brasil, Equador e Camarões (ZUGAIB; BARRETO, 2014). Vizinho ao Brasil, o Equador se destaca na produção de cacau, representando 0,4% do PIB total do país e 6,7% do PIB agrícola, possuindo papel fundamental na geração de empregos. O Equador é um dos principais exportadores de cacau fino (FAO-IICA, 2007), mercado que está em expansão, cujo valor adicional de preço atinge três vezes mais que o cacau básico e representa uma oportunidade para os produtores brasileiros de cacau (SANTOS; SANTOS; SANTOS, 2010).

Além de ser a fonte de produção do chocolate e um dos principais componentes econômicos nas regiões onde é cultivado, o cacauífero exerce também um papel importante na preservação ambiental. Seu cultivo associado a árvores nativas tem auxiliado na preservação de biomas ameaçados. Os sistemas agroflorestais com o cacauífero são considerados como uma alternativa sustentável (DIAS, 2001).

A cadeia produtiva envolve produtores e compradores de amêndoas, indústrias e moageiras, empresas de importação e exportação, indústria chocolateira e de cosméticos, além de várias empresas fabricantes e distribuidoras de insumos e equipamentos envolvidos em toda a cadeia de produção (ICCO, 2011). A expectativa a nível mundial é de boa safra em 2017/18

no continente africano e será fator de pressão para redução nos preços. Todavia existe a expectativa de crescimento na demanda segundo dados da European Cocoa Association (ECA) e da Cocoa Association of Asia que preveem aumento de 4% em ambos os mercados (europeu e asiático); se confirmando, será fator de pressão de alta dos preços (SOUZA; JESUS, 2018).

A indústria cacaueteira está prevendo uma escassez de cacau (sementes de cacau fermentadas e secas) futuramente devido ao aumento da demanda de chocolate e à disseminação recente de patógenos devastadores de cacau (FLOREZ et al., 2015). Considerando somente a cadeia cacaueteira baiana, tem-se uma demanda de 15 milhões mudas apenas por parte da agricultura familiar, de acordo com o levantamento do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), apesar de ter ocorrido um avanço na produção em 2012. No entanto, a previsão de produção anual é de apenas um 1,1 milhão de mudas (UNIVERSO AGRO, 2013).

2.3. Propagação do cacaueteiro

O cacaueteiro pode ser propagado tanto sexuado como assexuadamente. Na América Central, a propagação assexuada é utilizada desde a década de 50 em genótipos resistentes à vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer), nos plantios comerciais de cacau. No Brasil, pela facilidade de produção de sementes, estabeleceram-se grandes lavouras de plantas híbridas, que apresentavam boas respostas em campo e reduzidas taxas de segregação na geração F₁. Assim, o plantio clonal era amplamente superado pelo seminal (DIAS, 1993) já que a doença vassoura-de-bruxa ainda não tinha impacto econômico na produção brasileira.

Com a mudança desse cenário, ocorreu aumento na demanda por variedades clonais resistentes, havendo necessidade de se recorrer às técnicas de enraizamento, principalmente porque a resistência genética é a mais importante ferramenta usada para controle da doença. Nesse contexto, a produção de mudas de cacaueteiros por estaquia tem crescido diretamente em relação ao surgimento dos novos clones resistentes (SODRÉ, 2007b), e as mudas de origem seminal sendo muitas vezes utilizadas como porta-enxertos (SODRÉ, 2017).

2.3.1. Mudas seminais

A propagação sexuado do cacaueteiro é realizada via sementes, que no fruto, encontram-se envoltas por uma polpa. Para a limpeza dessas sementes, os frutos devem ser quebrados e em seguida, as sementes esfregadas contra algum elemento que cause leve atrito como, por

exemplo, o pó de serra seco, para só em seguida realizar-se a semeadura (ADAFAX, 2013). As plantas de origem seminal apresentam sistema radicular amplo: além de raiz pivotante, possuem também raízes secundárias, em maior número e com diâmetro de duas a três vezes superiores às plantas oriundas de estaquia (SODRÉ; MARROCOS; SARMENTO, 2017).

2.3.2. Mudas clonais

Os métodos de propagação assexuada ou vegetativa usam partes da planta mãe para produzir novos indivíduos, constituindo uma boa opção de multiplicação de variedades clonais de cacauero (SODRÉ; MARROCOS, 2009). A clonagem do cacau em escala comercial pode ser realizada com as técnicas de estaquia e de enxertia. Outras técnicas de propagação vegetativa como mergulhia e encostia não são recomendadas por serem muito onerosas e não permitirem o seu uso para obtenção de grandes quantidades de plantas (CEPLAC, 2018c). Espera-se que, num futuro próximo, o protocolo para multiplicação assexuada, utilizando-se a cultura de tecidos, esteja disponível para sua aplicação comercial.

2.4. Micropropagação de plantas

Cultura de tecidos vegetal é uma técnica que estuda e possibilita o crescimento de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob meio artificial (GEORGE, 1993). É uma ferramenta que permite a clonagem de plantas em escala comercial e, de modo geral, tem como base a teoria da totipotência, em que uma única célula é capaz de se regenerar até tornar-se um organismo inteiro, idêntico à matriz doadora (ALVES et al., 2008).

A micropropagação ou propagação *in vitro* é uma das aplicações da cultura de tecidos com maior destaque na perpetuação das espécies. Assim chamada por conta do tamanho dos explantes utilizados, essa técnica visa à obtenção de plantas idênticas à matriz em curto período de tempo, num espaço reduzido e livre de contaminantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ao realizar-se propagação *in vitro*, a escolha da planta matriz, da qual se retiram os explantes, é uma etapa de fundamental importância, uma vez que as plantas obtidas *in vitro* serão idênticas a planta mãe (JUNGHANS; SOUZA, 2009).

Qualquer técnica de cultivo *in vitro* tem como finalidade dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em um meio de cultivo. Esse controle é exercido, basicamente, pela adição de substâncias de diversas naturezas ao meio de cultivo. Dentre essas substâncias encontram-se os reguladores de crescimento e alguns nutrientes (CARVALHO;

VIDAL, 2003).

Cultivos *in vitro* são baseados em dois procedimentos: a) organogênese, que é processo de diferenciação no qual se formam órgãos vegetais novos a partir de estruturas preexistentes; ou b) embriogênese, processo de iniciação e desenvolvimento de embrião que pode ser sexual (embrião zigótico) ou assexual (embrião somático) (CARVALHO; VIDAL, 2003). Contudo, em geral, seguem um esquema padrão: estágio I - seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo, sob condições assépticas; estágio II - multiplicação dos propágulos por meio de sucessivas subculturas, em meio próprio para multiplicação; estágio III - transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e, subsequente, transplântio das plantas, obtidas para substrato do solo (MURASHIGE, 1974).

2.4.1. Desinfestação de explantes

A primeira etapa da micropropagação é o estabelecimento *in vitro* do material a ser multiplicado e, para tanto, deve-se determinar a melhor metodologia para desinfestação dos explantes a serem inoculados. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a maior dificuldade para o estabelecimento *in vitro* está em se obter material descontaminado sem danificar os tecidos vegetais. Como os explantes geralmente são extraídos de plantas mantidas em casa de vegetação, para o sucesso deste tipo de propagação é essencial que se encontre um método eficiente de desinfestação tanto da planta matriz quanto do explante (GEORGE, 1993).

A assepsia é comumente realizada com compostos clorados, que possuem amplo espectro de atividade biocida. Entre os mais utilizados está hipoclorito de sódio (GRIFFINTGS; RAY, 1979), que pode controlar contaminações sem causar toxicidade ao material vegetal (PEREIRA; CORREA; BOLIANI, 2001). Nascimento et al. (2007) constataram que sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam) quando desinfestadas com 2,5 e 5,0% durante 30 e 15 minutos, respectivamente, apresentaram maior porcentagem de germinação, além de fornecerem as menores porcentagens de contaminação fúngica e/ou bacteriana. Além deste, há também o dióxido de cloro, um potente desinfetante, cujas vantagens são a ausência de reatividade com amônia, o que evita a formação de cloraminas, além da estabilidade em soluções na faixa de pH entre 3 e 9, tendo maior efetividade em pH próximo à neutralidade (JUNLI et al., 1997). É considerado um potente desinfetante por conter cloro na molécula, sendo um ótimo bactericida e fungicida (AQUASTEL, 2009). Martins et al. (2017) observaram aumento da germinação de explantes de amora preta quando as concentrações de ClO₂ foram crescentes, testando-o a 0, 1, 2 e 4% por quinze minutos. Além disso, este produto também vem

sendo estudado para esterilização química do meio de cultura, podendo ser empregado com eficiência semelhante à da autoclavagem, sem problemas de fitotoxicidade (CARDOSO, 2009).

Dessa forma, o tipo de substância utilizada na desinfestação bem como a concentração e o tempo de exposição ao agente desinfestante devem ser previamente testados, de modo a melhor adequá-los à espécie em estudo e à sensibilidade do tecido a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3. METODOLOGIA

Os ensaios foram conduzidos no laboratório da empresa Bioclone Produção de Mudanças Ltda no município de Eusébio-CE, utilizando material vegetal de cacauzeiros cultivados na Fazenda FrutaCor, situada na região do Tabuleiro de Russas-CE. Foram realizados ensaios anteriores, não publicados, com o uso de explantes florais e foliares, de modo que os ensaios aqui descritos utilizam segmentos nodais e gemas apicais.

3.1. Ensaio I - Desinfestação de segmentos nodais

Ramos jovens, com textura herbácea, de clones referentes aos genótipos PS1319 e CCN51 de cacauzeiro, ambos resistentes à vassoura-de-bruxa (CEPLAC, 2018b) foram coletados no dia 22 de fevereiro de 2018 e armazenados em geladeira na sede da BioClone. A desinfestação e posterior isolamento foram realizados no dia 01 de março no material do genótipo PS1319 e em 02 de março no genótipo CCN51.

Nos dias de realização dos isolamentos, com o uso de bisturi, foram retirados segmentos nodais dos ramos jovens. Utilizou-se água corrente para limpeza inicial dos materiais, sendo seguida pelas atividades realizadas em capela de fluxo laminar. Os segmentos nodais foram imersos com agitação durante dois minutos em 100 ml de álcool 70% e, posteriormente, em hipoclorito de sódio a 1,5% ou dióxido de cloro a 0,025% com duração de 15 min, sob agitação, seguindo-se tríplice lavagem com água destilada estéril, por 2 min cada uma. Os tratamentos consistiram de todas as combinações envolvendo os genótipos, agentes desinfestantes (hipoclorito de sódio ou dióxido de cloro) e meio com ou sem dióxido de cloro (Tabela 1).

Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou MS com dióxido de cloro (ClO₂) a 0,01%, ambos com aferição e correção de pH para 5,8. Utilizou-se no total 40 explantes, sendo 20 de cada genótipo. Desses 20, metade foi inoculada em meio MS e a outra metade em MS com ClO₂, resultando em 5 explantes por tratamento. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média em torno de 21 °C e fotoperíodo de cerca de 12 horas. Realizou-se apenas uma leitura, aos sete dias após inoculação dos segmentos nodais.

Tabela 1 – Tratamentos e número de explantes utilizados - Desinfestação em segmentos nodais de genótipos de cacauero.

Genótipo	Meio	Desinfestação	Repetições
PS 1319	Com Dióxido de Cloro	Com Dióxido de Cloro	5
		Com Hipoclorito de Sódio	5
	Sem Dióxido de Cloro	Com Dióxido de Cloro	5
		Com Hipoclorito de Sódio	5
CCN 51	Com Dióxido de Cloro	Com Dióxido de Cloro	5
		Com Hipoclorito de Sódio	5
	Sem Dióxido de Cloro	Com Dióxido de Cloro	5
		Com Hipoclorito de Sódio	5

Fonte: Autora (2018).

3.2. Ensaio II - Desinfestação de gemas apicais

Aos 120 dias após a semeadura, em 12 de abril de 2018, foram retiradas gemas apicais de plantas jovens mantidas em casa de vegetação, oriundas de frutos de cacauero, genótipo PS1319, cultivado na Fazenda FrutaCor. As plantas jovens foram decapitadas e esse material vegetal contendo a gemas apicais foi levado ao laboratório e lavado em água corrente.

Em capela de fluxo laminar e com o uso de bisturi esterilizado, retiraram-se as gemas apicais (explantes). Após submersas em solução de álcool 70% sob agitação por dois minutos, as gemas foram submetidas ao processo de desinfestação com hipoclorito de sódio ou dióxido de cloro em concentrações de 3 ou 6% (Tabela 2), em imersão na solução sob agitação por 15 minutos. Posteriormente, todos os explantes passaram pelo processo de tríplex lavagem com água destilada e autoclavada, sob agitação por dois minutos cada.

Tabela 2 – Tratamentos e número de explantes utilizados - Desinfestação de gemas apicais de cacauero genótipo PS1319

Tratamento	Agente desinfestante	Concentração	Repetições
T1	Hipoclorito de sódio (NaClO)	3%	4
T2		6%	4
T3	Dióxido de cloro (ClO ₂)	3%	4
T4		5%	4

Fonte: Autora (2018).

Após o processo de desinfestação, ainda em condições assépticas, os explantes foram inoculados em tubo de ensaio contendo cada um 10 ml de meio de cultura MS + benzilaminopurina (BAP) 0,45 mg/l + ácido naftalenoacético (ANA) 0,1 mg/l + 30 mg/l de sulfato de adenina, já autoclavados por 15 minutos sob pressão de 1 kgf/cm² e temperatura 121

°C, tendo seu pH previamente aferido e ajustado para 5,8.

Os tubos foram posteriormente acondicionados em sala de crescimento com temperatura média em torno de 21 °C e fotoperíodo de cerca de 12 horas, envoltos em sacos plásticos pretos para que permanecessem em condições escuras nos primeiros sete dias, a fim de reduzir as possíveis taxas de oxidação dos explantes. Realizaram-se avaliações semanais, em total de quatro, observando as variáveis oxidação e contaminação dos explantes. Os dados foram analisados de forma descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio I - Desinfestação de segmentos nodais

Observaram-se contaminações em todas as repetições dos tratamentos apresentados no Ensaio I. Essa contaminação ficou evidente aos sete dias após a inoculação (Figura 1), não sendo possível observar diferenças entre os genótipos.

Figura 1 – Material do ensaio realizado no laboratório da Bioclone, Eusébio-CE, com contaminação



Fonte: Elaborada pela autora.

Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo (MEDEIROS, 2008), como as utilizadas nesse ensaio. Essas contaminações geralmente são causadas por fungos e bactérias presentes na superfície dos tecidos vegetais (CASSELS, 1991) ou originárias de microrganismos endógenos. Esses contaminantes, impõem consideráveis limitações ao desenvolvimento vegetal na fase de introdução *in vitro* (MARTINS, 2017), podendo impossibilitá-lo, como ocorreu em todos os explantes inoculados nesse trabalho. Para minimizar essas contaminações e perdas, é recomendável cultivar a planta, da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas, como telados com cobertura plástica ou casa de vegetação (TEIXEIRA, 2001).

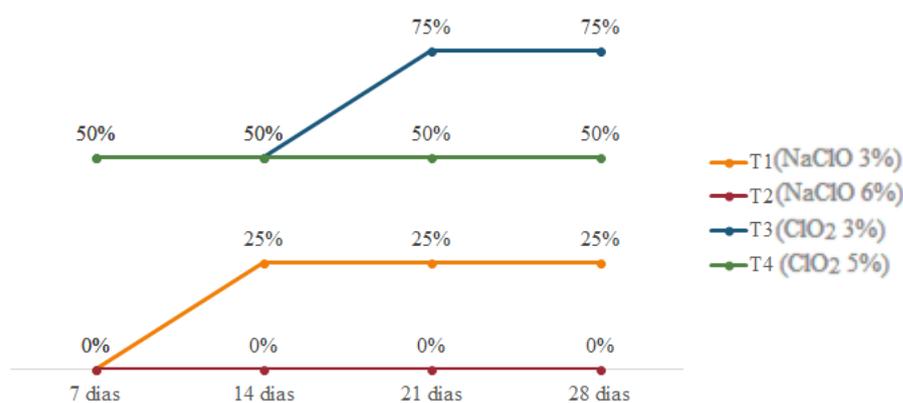
A alta taxa de contaminação pode estar também relacionada ao método utilizado para descontaminação, concentrações de hipoclorito e dióxido de cloro, ou até mesmo ao tempo de

exposição dos segmentos a esses produtos. Dentre os agentes sanitizantes utilizados, apenas o hipoclorito de sódio já é usualmente empregado na biofábrica onde o ensaio foi realizado, cuja principal cultura da qual são produzidas mudas, é a banana (*Musa spp.*), utilizando-se concentrações que podem variar de 1,5 a 3%, dependendo da aparente condição de sujidades que o rizoma possa apresentar ao chegar do campo. Já para o agente dióxido de cloro foi utilizada a concentração de 250 ppm na solução de imersão dos explantes, a fim de observar sua eficiência em desinfestá-los e servir como um guia de aumento ou redução da concentração a ser utilizada deste produto em próximos ensaios. Dados os resultados obtidos, acredita-se que seja necessário utilizar maiores concentrações dos agentes desinfestantes visando reduzir as contaminações, porém atentando-se à possibilidade de arriscar a integridade dos explantes.

4.2. Ensaio II - Desinfestação de gemas apicais

Com relação às contaminações, observaram-se respostas diferentes entre os tratamentos aos 21 dias, de modo que T2 apresentou os melhores índices, com 0% (Figura 2). T3 e T4 apresentaram similaridade nos índices de contaminação durante os 14 primeiros dias. Depois disso, T3 teve taxas mais elevadas de contaminação dentre todos os tratamentos, 75%.

Figura 2 – Índices de explantes contaminados ao longo dos dias.



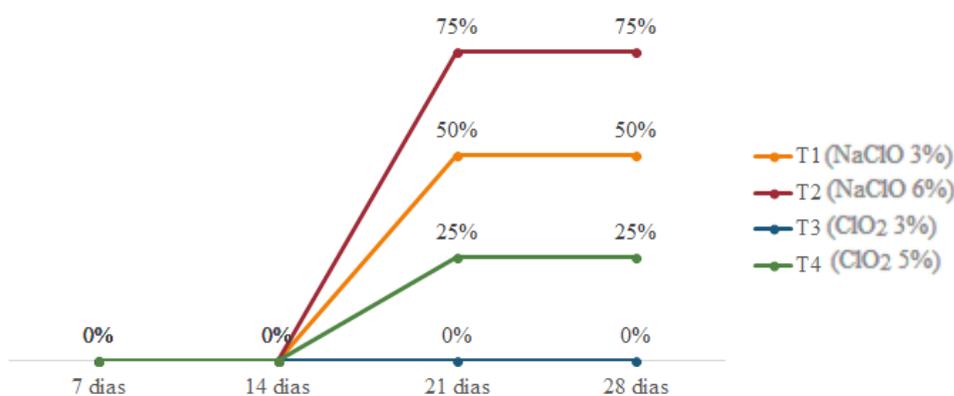
Fonte: Elaborada pela autora.

Nos tratamentos T1 e T3 os agentes desinfestantes foram utilizados em mesma concentração, 3%. O T1 não apresentou contaminação nos primeiros sete dias, atingiu 25% aos 14 dias e permaneceu nesse percentual até a última avaliação. Já T3, logo na primeira avaliação já apresentava metade dos explantes contaminados. As maiores concentrações dos agentes

desinfestantes foram aplicadas em T2 e T4 que apresentaram índices de contaminação constantes durante todo o período do ensaio, em 0 e 50% respectivamente (Figura 2).

A proporção de oxidação dos explantes permaneceu em 0% para todos os tratamentos durante os primeiros 14 dias (Figura 3). Nos sete primeiros dias a condição foi de escuro, visando justamente retardar ou reduzir as taxas de oxidação, pois a luz aumenta a atividade das enzimas relacionadas a biossíntese e oxidação de fenóis (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998).

Figura 3 – Índices de explantes oxidados, mas não contaminados ao longo dos dias.

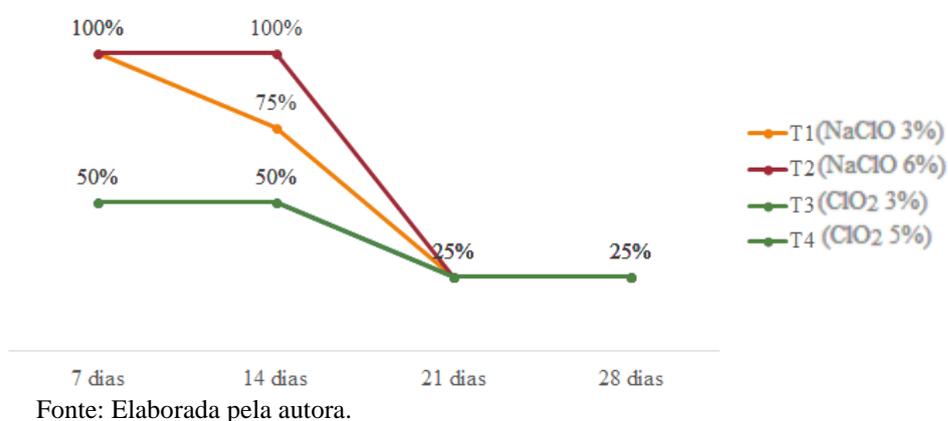


Fonte: Elaborada pela autora.

Após os 14 dias iniciais apenas T3 manteve taxa constante de 0% quanto aos explantes oxidados. Os demais tratamentos apresentaram taxas superiores, com destaque para T2 e T1, com 75 e 50%, respectivamente (Figura 3). Vale ressaltar que as taxas de oxidação aqui dimensionadas contemplam os explantes nos quais foi possível realizar a constatação visual durante as avaliações, ou seja, os que não apresentaram contaminação. Portanto, pode ser que os índices de explantes oxidados sejam superiores aos apresentados.

Os tratamentos T3 e T4 apresentaram as mesmas proporções de explantes viáveis ao longo de todas as avaliações (Figura 4). Aos 7 dias, após a retirada da condição de escuro, T1 e T2 não apresentaram contaminação ou oxidação. O T2 permaneceu assim até o 14^o dia, quando T1 apresentou viabilidade de 3 em cada 4 explantes. Apesar das taxas de contaminação ou oxidação terem variado entre os tratamentos, compensaram-se ao ponto de resultar na viabilidade de 1 a cada 4 explantes, aos 21 dias, em todos os tratamentos.

Figura 4 – Índices de explantes viáveis ao longo dos dias.



Dobrando-se a concentração de NaClO na desinfestação a fim de verificar um limite superior de tolerância dos explantes que remediasses possíveis contaminações, em T2 foi usado NaClO a 6%. Como resultado disso, apresentou todos os explantes viáveis até a chegada do 14º dia, a partir do qual demonstrou aumento abrupto das taxas de oxidação, passando de 100% de viabilidade aos 14 dias, para 25% aos 21 dias, podendo indicar o período mais adequado à transferência dos explantes para outro meio de cultura (Figura 4). A alta concentração do agente desinfestante possivelmente foi um fator considerável para os índices de oxidação apresentados em T2. Palú et al (2011) em estudo com figueira (*Ficus carica* L.), planta também arbustiva lenhosa como o cacauzeiro cultivado, observaram 90% de sobrevivência dos explantes ao utilizar NaClO a apenas 2,5%, mostrando que não há um procedimento (produto-concentração) generalizado para desinfestação de materiais vegetais para cultivo *in vitro*.

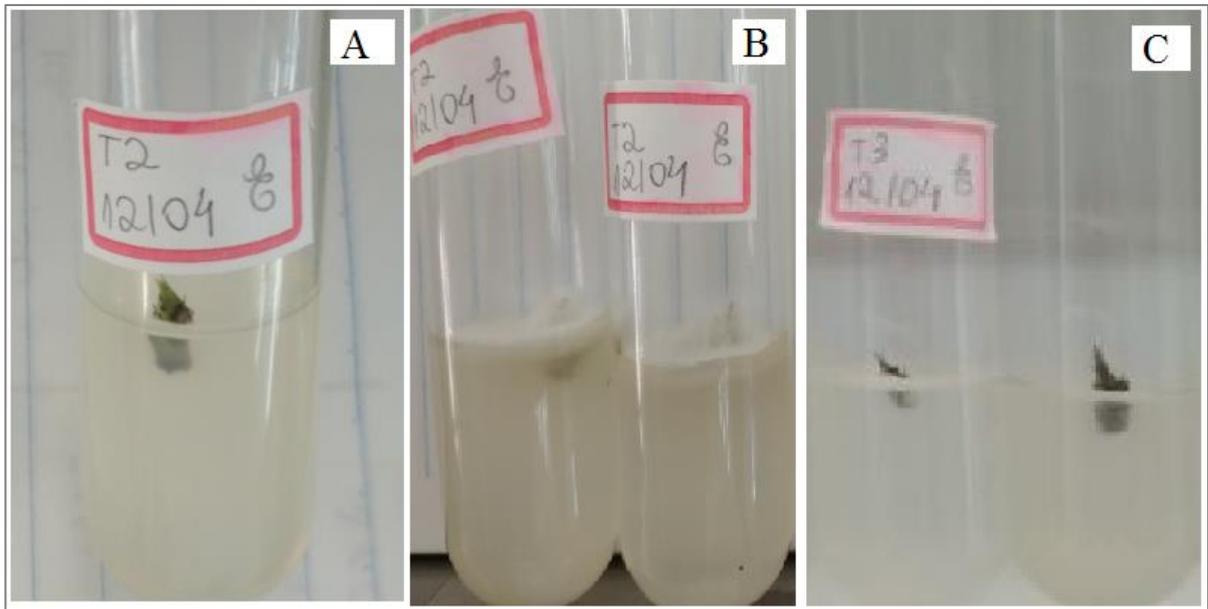
Já nos tratamentos T3 e T4 a ideia inicial era a de repetir as concentrações usadas com o NaClO, mas como o produto comercial aplicado tem o ClO₂ estabilizado a 5% em meio líquido, utilizou-se esta concentração em T4. Ambos os tratamentos, apesar da diferença de concentração, apresentaram mesmos índices de viabilidade dos explantes. Porém, é oportuno salientar que ambos apresentaram contaminação, mas T4 além disso, apresentou oxidação. Fica nítido que o aumento da concentração do princípio ativo ClO₂ não trouxe ganhos em viabilidade, pois apesar da redução da contaminação (T3 com 75% e T4 com 50%) pode ter provocado aumento da oxidação em proporção similar.

Em geral, a partir dos 21 dias, todos os tratamentos, independente do agente desinfestante ou concentração dele, tenderam a uma mesma proporção de viabilidade (25%), o que aponta para perdas em torno de 75% apenas na etapa inicial do estabelecimento *in vitro* (Figura 4). Ainda que utilizando os mesmos produtos (NaClO e ClO₂) pode ser que haja uma

concentração intermediária entre as utilizadas, ou tempo de exposição menor, que reduzindo a contaminação não cause tanta oxidação. Com relação a essas perdas por oxidação fenólica, Monaco et al. (1977) constaram que elas podem ser minimizadas pela redução de danos mecânicos e químicos nos explantes, pela modificação do ambiente, ou pelo uso de antioxidantes. Elas podem ainda estar relacionadas ao tempo considerado na avaliação, indicando necessidade de transferência antes dos 21 dias para outro meio de cultura visando morfogênese.

Camolesi et al (2007) observaram efeito antioxidante em ápices caulinares de bananeira maçã com pré-tratamento em solução de ácido cítrico e de citrato de potássio. Como os sete dias de escuro não foram suficientes para reduzir a níveis aceitáveis os valores de oxidação dos materiais (Figura 5) quando expostos ao NaClO e ao ClO₂ nas concentrações utilizadas, a redução dos danos químicos por meio de soluções desinfestantes um pouco mais diluídas que as máximas utilizadas neste ensaio ou a adição de antioxidantes ao processo podem ajudar na melhora das taxas de explantes viáveis.

Figura 5 – Amostras indicando: A- viabilidade; B- contaminação; C- oxidação.



Fonte: Elaborada pela autora.

5. CONCLUSÕES

5.1. Ensaio I - Desinfestação de segmentos nodais

Para os genótipos de cacaueteiro PS1319 e CCN 51, as concentrações usadas de hipoclorito de sódio (1,5%) e dióxido de cloro (0,025%) não são suficientes para limitar contaminações na introdução dos explantes ao cultivo *in vitro*.

O uso de dióxido de cloro no meio de cultura (0,01%) não provoca esterilização química.

5.2. Ensaio II - Desinfestação de gemas apicais

O uso do hipoclorito de sódio a 6% para desinfestação de explantes de cacaueteiro impossibilita o desenvolvimento de contaminações *in vitro*.

Para redução de perdas por oxidação, a transferência dos explantes para outro meio deve ocorrer antes dos 21 dias.

O ajuste nas concentrações dos produtos utilizados e o uso de agentes antioxidantes podem auxiliar na obtenção de um protocolo eficaz para desinfestação de explantes de cacaueteiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAFAX (ASSOCIAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA AGRICULTURA FAMILIAR DO ALTO XINGU). **Cultivo e manejo de cacauzeiros**. 2013. Disponível em: <<http://repositorio.faema.edu.br:8000/jspui/handle/123456789/1843>>. Acesso em: 25 de mai. 2018.

AGUILAR, M. A. G.; SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S.; MARINATO, C. S. Botânica e Morfologia. In: SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S.; AGUILAR, M. A. G.; BORÉM, A. (Eds.) **Cacau: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2016. p.111-122.

ALEXANDRE, R. S.; CHAGAS, K.; MARQUES, H. I. P.; COSTA, P. R.; FILHO, J. C. Caracterização de frutos de clones de cacauzeiros na região litorânea de São Mateus, ES. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.8, p.785–790, 2015.

ALMEIDA, A. A. F.; VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 425-448, 2007.

ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. DE O.; PAULA, J. C. R. DE.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A. DE.; MENDONÇA, M. R.:. **A Cultura de Tecidos na Agricultura**. I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí, 2008.

ALVES, S.A.M. **Epidemiologia da vassoura de bruxa (Crinipellis perniciososa (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba**. 2002. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP, 2002.

AQUASTEL. **Propriedades dos desinfetantes da água**. Disponível em: <<http://www.aquastel.com.br/index1.htm>>. Acesso em: 11 mai. 2018.

BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. CABI Publishing. Wallingford, UK, p. 341, 2005.

BORSOI, N. L. **Desinfecção de explantes e cultivo *in vitro* de Piretro da Dalmácia**

(*Chrysanthemum cinerariaefolium* cv. **Vacaria**). - Piracicaba, 2009. 65 p.

CAMOLESI, M. R. et al. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, jul./ago., 2007.

CARDOSO, J.C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.7, p.785-788, jul. 2009.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Documentos, 116. Embrapa Algodão. Campina Grande, PB. 39p. 2003.

CASSELS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 31-44, 1991.

CEPLAC. **CACAU HISTÓRIA E EVOLUÇÃO**. Bahia: CEPLAC. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 30 abr. 2018a.

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Lista de clones. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/ListaClones.asp>>. Acesso em: 10 jun 2018b.

CEPLAC. Radar – **Clonagem**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/clones.htm>. Acesso em: 10 jun. 2018c.

DIAS, L. A. S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS, L. A. S. (Orgs). **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, 2001, p.81-127.

DIAS, L.A.S. Propagação vegetativa vs reprodução seminal em cacau. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA**, 45. 1993. Recife. Anais... Recife: SBPC, 1993. v.1.

DINIZ, F.; HAMANN, J. J. **Viveiros e propagação de mudas**. UFSM, Colégio Politécnico : Rede e-Tec Brasil, Santa Maria-RS, 2015.

DUCKE, A. **As espécies brasileiras do gênero Theobroma L.** Belém: Instituto Agrônômico do Norte, 1953. 89p. (Boletim Técnico, 28).

ESALQ/ USP. **Novo cenário da produção de cacau.** São Paulo. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/cprural/noticias/mostra/3342/novo-cenario-da-producao-de-cacau-no-brasil.html>>. Acesso em: 04 mai. 2018.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture.** Part 1 - The Technology, 2 ed. Wilts, England, p. 574, 1993.

ESTIVAL, K. G. S.; TEIXEIRA, L. R.; TEOTONIO, A. N. A.; CORREA, S. R. S. Da Política dos Coronéis do Cacau aos Espaços de Participação Política: Estudo de Caso da Câmara Setorial do Cacau no Brasil. **Revista de Ciências Gerenciais**, v.18, n. 27, p. 43-52, 2-14, 2014.

FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)/ IICA (Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura). Estudo de caso: **Denominación de origen “cacao arriba”**. Quito, Ecuador. 70 p. 2007.

FLOREZ, S. L.; ERWIN, R. L.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M. J.; CURTIS, W. L. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 121, 2015.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília, DF: Embrapa- SPI; Embrapa-CNPQ, v. 1, p.183-260, 1998.

GRIFFINGS, L.R.; RAY, P.M. Dependence of cell wall secretion on calcium. **Plant Physiology**, v.63, n.5, 1979, 51 p.

ICCO - International Cocoa Organization. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Cocoa year 2010/11.** London: ICCO, v.37, n.2, 2011.

JUNGHANS, T. G; SOUZA, A. S. (Orgs.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385 p.

JUNLI, H.; LI, W.; NANQUI, R.; FANG, M. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. **Water Research**, v.31, p.607-613, 1997.

LIRA JUNIOR, J. S.; BESERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. Pitangueira. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, 2007. 87p.

LEITER, J.; HARDING, S. *Trinidad, Brazil, and Ghana: three melting moments in the history of cocoa*. **Journal of Rural Studies**, v. 20, n. 1, p. 113–130, 2004.

MARTINS, R. C. et al. Agentes desinfestantes no processo de micropropagação da amora preta (*Rubus ssp*). **Revista Mirante**, Anápolis (GO), v. 10, n. 2, jul. 2017 (edição extra).

MEDEIROS, C.P.C. Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.). In: ALMEIDA, J. R. de A., MARTINS, C. R., DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. Revista da FZVA. Uruguaiana, v.15, n.1, p. 54-60. 2008.

MENEZES, J. A. de S.; CARMO-NETO, D. **A modernização do agronegócio cacau**. São Paulo, Fundação Cargill, 1993. 223p.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. et al. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Melhoramento genético do cacaueiro. In: Valle, R. R. (Ed). **Ciência tecnologia e manejo do cacaueiro**. Itabuna: Editora Vital, 2007. p.1-16.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, P. K. V. do; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). NOTA CIENTÍFICA - **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007

PALÚ, E. G. et al. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p.587-592, 2011.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L de S.; BOLIANI, A. C.; Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande Naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 222-226, Outubro 2011.

RIBEIRO, J. M.; PINTO, M.; TEIXEIRA, S. L. S. T. **Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudanças *In Vitro***. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2013 (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 256).

SÁNCHEZ, S.E.M. **Cacau e graviola: descrição e danos das principais pragas-de insetos**. EDITUS: Ilhéus, 147p., 2011.

SANTOS, G. B. M. dos; SANTOS, P. B. M. dos; SANTOS, A. M. dos. POTENCIALIDADES DE MERCADO PARA O CACAU FINO. 2010. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/paginas/publicacoes/paginas/artigos_tecnicos/artigos_tecnicos.asp>. Acesso em: 02 de jun. 2018.

SILVA NETO, P. J. **Sistema de Produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém, PA. CEPLAC. 125p, 2001.

SODRÉ, G. A. A espécie *Theobroma cacao*: novas perspectivas para a multiplicação de cacauzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 0-0, 2007a.

SODRÉ, G. A. **Cultivo do cacauzeiro no estado da Bahia**. MAPA/Ceplac/Cepec. Ilhéus, BA,. 126p. 2017

SODRÉ, G. A. **Substratos e estaquia na produção de mudas de cacauzeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 84p. 2007b.

SODRÉ, G. A.; MARROCOS, P. C. L.; SARMENTO, D. A. **Cultivo do cacau no estado do Ceará**. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 209. 2017. 34p.

SODRÉ, G. A.; MARROCOS, P. C. L. **Manual da produção vegetativa de mudas de cacau**. Ilhéus : Editus, 2009

SOUNIGO, O.; LACHENAUD, P.; BASTIDE, P.; CILAS, C.; N'GORAN, J.; LANAUD, C. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of Applied Genetics**, v. 44, p. 339-353, 2003.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S.; AGUILAR, M. A. G.; SONEGHETI, S.; OLIVEIRA, J.; COSTA, J. L. A. Cacao yield in different planting densities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.1313-1320, 2009.

SOUZA, C.A.S.; DIAS, L.A.S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacau**. Viçosa, MG: FUNAPE/UFG, 2001. p.1-48.

SOUZA, E. C. M.; JESUS, L. S. de. **Análise mensal: Cacau (Amêndoa)**. Brasília: CONAB, 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-cacau/item/download/15300_4d47d125de6ac70fc4e9cc00cfb6fded> Acesso em: 02 mai. 2018.

SREBERNICH, S.M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.787-792, 2007.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

TOXOPEUS, H. **Botany, types and populations. Cocoa**. 4 ed. Essex, England:Longman, 1985.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R. CLONAGEM VEGETAL. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p.86-91, 2010.

UNIVERSO AGRO. **Demanda por mudas de cacau para agricultura familiar é de 15 mi.**

Disponível em: <<http://www.uagro.com.br/editorias/agricultura/2013/01/14/demanda-por-mudas-de-cacau-para-agricultura-familiar-e-de-15-mi.html>>. Acesso em: 04 de jun. 2018.

ZUGAIB, A. C. C.; BARRETO, R. C. S. Mercado internacional de cacau: previsão da demanda, oferta e preços - International cocoa market: forecast of demand, supply and prices. Revista Bahia Agrícola. 3.8. 2014.