

## VARIABILIDADE GENÉTICA DO CACAUEIRO COM BASE NO POLIMORFISMO DE HOMÓLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA

*Brena Farias Santos<sup>1</sup>, Francisca Feitosa Jucá Santos<sup>1\*</sup>, Hellen Lazaro Melo<sup>1</sup>, Uilson Vanderlei Lopes<sup>2</sup>, Karina Peres Gramacho<sup>2</sup>, José Luís Pires<sup>2</sup> e Dário Ahnert<sup>3</sup>*

<sup>1,3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz/Programa de Pós graduação em Genética e Biologia Molecular, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus/Itabuna, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil, [chicafeitosa@yahoo.com.br](mailto:chicafeitosa@yahoo.com.br). <sup>2</sup>Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/Centro de Pesquisas do Cacau/Seção de Melhoramento Genético do Cacau, Rodovia Ilhéus/Itabuna, km 22, 45.600-970, Ilhéus, Bahia, Brasil

\*Autor para correspondência: [chicafeitosa@yahoo.com.br](mailto:chicafeitosa@yahoo.com.br)

O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de um conjunto de 57 clones de cacau, representativos do material genético utilizado para cultivo na Bahia. Foram utilizados 12 primers de homólogos de genes de resistência (RGHs) para amplificar fragmentos de DNA, os quais foram separados em gel de acrilamida não desnaturante a 6%. Os dados de bandas coletados no gel foram analisados usando os Softwares GENES e SAS. Dos 12 primers, dez amplificaram e sete demonstraram polimorfismo. Um total de 79 marcas distintas de ssDNA foram geradas, com média de 7,9 marcas/primer. As estimativas de distâncias genéticas variaram de 0,0253 a 0,3797, com média de 0,2036. O nível de heterozigose variou de 20 a 90%. Observou-se dispersão relativamente elevada, em escalas multidimensionais (MDS), mas não foi observado nenhum agrupamento com base nos grupos genéticos existentes ou com base na resistência e suscetibilidade dos clones. Os dados mostraram a presença de seis marcas únicas RGHs-SSCP em clones suscetíveis e dez em clones resistentes. Estes resultados podem auxiliar em futuros cruzamentos e seleções entre clones no programa de melhoramento do cacau.

**Palavras-chave:** SSCP, *Theobroma cacao* L., vassoura-de-bruxa.

**Genetic diversity of cacao based on polymorphism of homologues of resistance genes.** The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of a set of 57 cocoa clones, representative of the genetic material used for cultivation in Bahia. Twelve resistance genes homologues (RGHs) primers were used to amplify DNA fragments, which were separated on 6% non-denaturing acrylamide gel. The data collected on the gel were analyzed using the GENES and SAS Software. Of the 12 primers, 10 amplified and 7 demonstrated polymorphism. A total of 79 distinct ssDNA bands on the gel were generated, with a mean of 7.9 bands / primer. Estimates of genetic distances ranged from 0.0253 to 0.3797, with an average of 0.2036. The level of heterozygosity ranged from 20 to 90%. Relatively high dispersion of genotypes was observed at multidimensional scales (MDS), but no clustering was observed based on the existing genetic groups or based on the resistance and susceptibility of the clones. The data showed the presence of six unique RGHs-SSCP bands in susceptible clones and 10 in resistant clones. These results may aid in future crosses and selections between clones in the cacao breeding program.

**Key words:** SSCP, *Theobroma cacao* L., witches' broom.

## Introdução

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é cultivado em cerca de 119 países tropicais (FAO, 2015), sendo uma espécie de grande importância econômica e social utilizada para produção de amêndoas, que constituem a matéria prima do chocolate. Seu cultivo ocorre entre as latitudes 20°N e 20°S (Bartley, 2005), em regiões com temperaturas médias mensais na faixa de 18 a 32°C e precipitações pluviométricas variando de 1.150 a 2.500 mm anuais. O cacau pertence à família Malvaceae e a ordem Malvales (Alverson et al., 1999), sendo uma planta perene, arbórea, alógama e dicotiledônea, nativa das florestas tropicais úmidas das Américas Central e norte da América do Sul, com seu centro de origem mais provável na região das nascentes dos rios Amazonas e Orinoco (Bartley, 2005). Inicialmente a espécie foi dividida em três grandes grupos genéticos: Crioulo, Trinitário e Forasteiro Amazônico (Cheesman, 1944). Recentemente, o número de grupos de cacau foi ampliado para 10 (Motamayor et al., 2008), mas a classificação dos germoplasmas nos três grupos originais ainda é a mais usada.

Uma descrição detalhada e bastante completa das várias populações de cacau das Américas, dos seus híbridos e da amplitude da diversidade genética encontrada na espécie, com base em características botânico-morfológicas e agrônômicas, foi realizada por Bartley (2005). Também, foram realizados vários estudos com base em marcadores moleculares genômicos RAPD, AFLP, SSR, SNP (Faleiro et al., 2001, Yamada et al. 2003, Efombagn et al., 2008; Motamayor, et al., 2008; Ji et al., 2013), o que contribuiu para melhorar o entendimento da diversidade genética existente na espécie e também para dirigir cruzamentos e seleção de cultivares.

Marcadores moleculares derivados de regiões conservadas de homólogos de genes de resistência (RGH), tais como o sítio de ligação de nucleotídeo (NBS), a repetição rica em leucina (LRR) e quinases constituem-se numa forma direta de abordagem de genes de resistência em plantas (Kuhn et al., 2003). Estes autores isolaram 74 marcadores moleculares RGHs em cacau que foram classificados em 11 categorias. A partir de *primers* específicos para cada categoria, usando a técnica de Polimorfismo

Conformacional de Fita Simples (SSCP) (Spinard et al., 1991), RGHs foram mapeados em uma população F<sub>2</sub> segregando para resistência à vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*). Um destes RGHs foi mapeado no mesmo grupo de ligação em que foi encontrado um QTL para resistência à vassoura-de-bruxa (RGH2) (Faleiro et al., 2006) e três foram localizados em grupo de ligação em que foi mapeado um QTL para resistência à podridão-parda (*Phytophthora palmivora*) (RGH1, RGH4 e RGH5) (Lanaud et al., 2004).

Neste trabalho foram utilizados marcadores RGHs objetivando i) avaliar o nível de diversidade genética entre clones de cacau resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa; ii) identificar marcas (alelos) RGH-SSCP exclusivas de clones resistentes e suscetíveis; e iii) avaliar o nível de heterozigose dos locos RGHs de clones de cacau.

## Material e Métodos

### Obtenção do material genético

Foram analisados 57 clones de cacau, implantados em experimentos de competição de clones pela CEPLAC, CEPEC, Ilhéus-BA (Tabela 1); dentre eles, controles resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa, incluindo 21 clones representativos da diversidade que existe na espécie, denominados clones âncoras (Pires, 2003; Yamada et al., 2003) e 36 clones selecionados por produtores como resistentes à vassoura-de-bruxa.

### Extração de DNA genômico, amplificação dos marcadores RGHs e eletroforese em gel de acrilamida SSCP a 6%.

O DNA de cada clone de cacau foi extraído a partir de folhas jovens utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1990) com algumas modificações (Faleiro et al., 2002). A integridade do DNA foi analisada em eletroforese em gel de agarose e a concentração foi verificada com Espectrofotômetro 260 nm Cary Winv 50 (software RNA e DNA) e diluídas para 10ng/mL. Doze *primers* RGHs foram utilizados para genotipagem dos clones, desenvolvidos para cada categoria de RGHs identificados em cacau, desenhados por Kuhn et al. (2003) a partir de regiões conservadas de genes.

Tabela 1. Lista de clones selecionados por produtores e considerados âncoras para estudo de diversidade em genes candidatos à resistência a doenças no cacauero e respectivos grupos genéticos

Tipo	Clones	Grupo Genético
Seleção de Produtores	AM 01; AM 02; BB 1.33; BB 6018; BB 6020; CSF 22; FADA 100; FL 16; FL 60; FLN 30; FSU 1; FSU 151; FSU 77; GM 33; M 05; NV 22; PAT 118; PAT 84; PB 617; PH 16; RT 06; RT 09; RT 106; RVID 08; RVID 12; SJ 02; SM 06; T 11; TR 15; TR 35; VB 515; VB 547; VB 679; VB 892; VB 900; VB 902	Híbrido
Âncoras	EET 392; EET 399 C.SUL 3; MO 20; RB 36 ICS 1; ICS 32 CCN 10 OC 67 IMC 67; POUND 4B; POUND 7; Sca 6; MOQ 216; NA 33 MA 16; SIAL 169; SIC 23 TSH 1188; TSH 516; TSH 565	Nacional Equador Amazônicos Trinitário Híbrido Crioulo Alto Amazônico Baixo Amazônico Híbridos Sca

Os padrões eletroforéticos entre acessos suscetíveis e resistentes foram comparados para os 12 *primers* RGHs, verificando-se a presença de marcas únicas (exclusivas) para cada *primer* em um grupo de indivíduos que apresentam algum nível de resistência (C.SUL 3, VB 679, TSH 565, EET 392, RB 36, FLN 30 e OC 67) e suscetibilidade (SIC 23, SIAL 169 e ICS 1) à vassoura-de-bruxa do cacauero. O polimorfismo dos 12 marcadores RGHs foi caracterizado a partir do número de fragmentos de ssDNA gerados.

#### **Análise de diversidade genética e índice de heterozigose**

A diversidade genética entre os clones foi realizada por meio de estimativas de dissimilaridades genéticas obtidas de análises multivariadas utilizando-se o índice de similaridade de Jaccard, disponível no Programa GENES (Cruz, 1997). Definida a matriz de distâncias genéticas (matriz de dissimilaridade), o espaço multidimensional foi reduzido a tridimensional pelo método Multidimensional Scaling-MDS usando o programa SAS, e este apresentado em representação gráfica, obtida por SAS G3D (SAS Institute 2000). O nível de heterozigose de cada acesso foi calculado baseado na relação entre o número de locos em heterozigose e o número total de locos analisados.

#### **Resultado e Discussão**

Dos 12 *primers* flangeadores de regiões conservadas de genes RGHs, dez amplificaram e, destes, sete tiveram todas as marcas polimórficas nos 57 clones estudados (Tabela 2). Obtiveram-se 79 marcas distintas de ssDNA, com média de 7,9 marcas por *primer*, e variação de 4 a 16 marcas para o RGH10 e o RGH3BC, respectivamente. O número elevado de alelos por *primer* para as regiões testadas confirma, em cacau, o que já havia sido encontrado em espécies de tabaco para os genes RGHs (Leng et al., 2010). O polimorfismo encontrado pelo uso da técnica SSCP, neste conjunto de clones de cacau, foi superior ao encontrado por vários autores que utilizaram marcadores genômicos (Faleiro et al. 2004, Santos et al. 2005).

Seis dos dez marcadores RGHs amplificados geraram marcas ssDNA específicas, encontradas somente em plantas resistentes ou somente em plantas suscetíveis (Tabela 3). O grupo de genótipos resistentes, com marcas únicas, poderia ser cruzado objetivando uma possível piramidação de genes de resistência. Considerando-se que todas as seis marcas representam alelos diferentes e que os RGHs encontram-se em tandem, isso facilitaria a piramidação de genes. No grupo de genótipos suscetíveis, as marcas exclusivas poderão estar relacionadas com alelos que respondem a raças específicas do patógeno, algo que precisaria ser testado.

Tabela 2. Polimorfismos encontrados nos 10 primers RGHs, a partir do número de marcas (ssDNA) geradas, número de marcas polimórficas e monomórficas, percentual de polimorfismo e média de marcas por *primer*

<i>Primer</i>	Nº marcas geradas	Nº marcas polimórficas	Nº marcas monomórficas	% Polimorfismo
RGH1	6	6	0	100
RGH2	7	7	0	100
RGH3A	6	6	0	100
RGH3BC	16	16	0	100
RGH4	6	6	0	100
RGH5	8	6	2	75
RGH6	7	7	0	100
RGH7	8	6	2	75
RGH8	11	11	0	100
RGH10	4	2	2	50
Média	7,9	7,3	0,6	90

Tabela 3. Representação esquemática de marcas ssDNA amplificadas por primers RGHs que caracterizaram grupos de clones de cacau suscetíveis e resistentes a doenças. Os RGHs listados foram aqueles que amplificaram apenas marcas (M) características para clones de grupos distintos de resistência, e a numeração das marcas M representam a posição da mobilidade eletroforética de cada uma por *primer*

<i>Primers</i>	Clones Suscetíveis			Clones Resistentes						
	SIC 23	SIAL 169	ICS 1	C.SUL 3	VB 679	TSH 565	EET 392	RB 36	FLN 30	OC 67
RGH1					RGH1_M1		RGH1_M5			
RGH2	RGH2_M7	RGH2_M6 RGH2_M7	RGH2_M6							
RGH3BC	RGH3BC_M4 RGH3BC_M9	RGH3BC_M4 RGH3BC_M9	RGH3BC_M4 RGH3BC_M10	RGH3BC_M14 RGH3BC_M16	RGH3BC_M1		RGH3BC_M2			
RGH4										RGH4_M6
RGH5									RGH5_M5	RGH5_M2 RGH5_M1 RGH5_M2
RGH7	RGH7_M8	RGH7_M8								

As estimativas de dissimilaridade genética baseadas em marcadores RGH-SSCP, geradas a partir de 1596 pares de combinações dos 57 acessos estudados, variaram de 0,0253 a 0,3797, com média de 0,2036. Grande parte dos pares de genótipos variou de 0,15 a 0,25 de dissimilaridade, apresentando uma tendência de distribuição normal (Figura 1). Em estudo de diversidade genética com 270 acessos de cacau de diferentes origens, baseado em RAPD (15 acessos idênticos ao deste trabalho), observou-se uma variação

da distância genética de 0,000 a 0,5691, com média de 0,310 (Marita et al., 2001). Faleiro et al. (2004) analisando 30 acessos de cacau, baseado em SSR (16 clones idênticos ao deste trabalho) encontraram distâncias genéticas de 0,13 a 0,71. Tanto com o marcador RAPD quanto com o SSR as análises indicaram alta variabilidade entre os clones com elevadas amplitudes de distâncias genéticas, o que não foi observado neste estudo com marcador RGH-SSCP.

Na análise dos 21 clones considerados âncoras verificou-se existir alta similaridade genética entre os

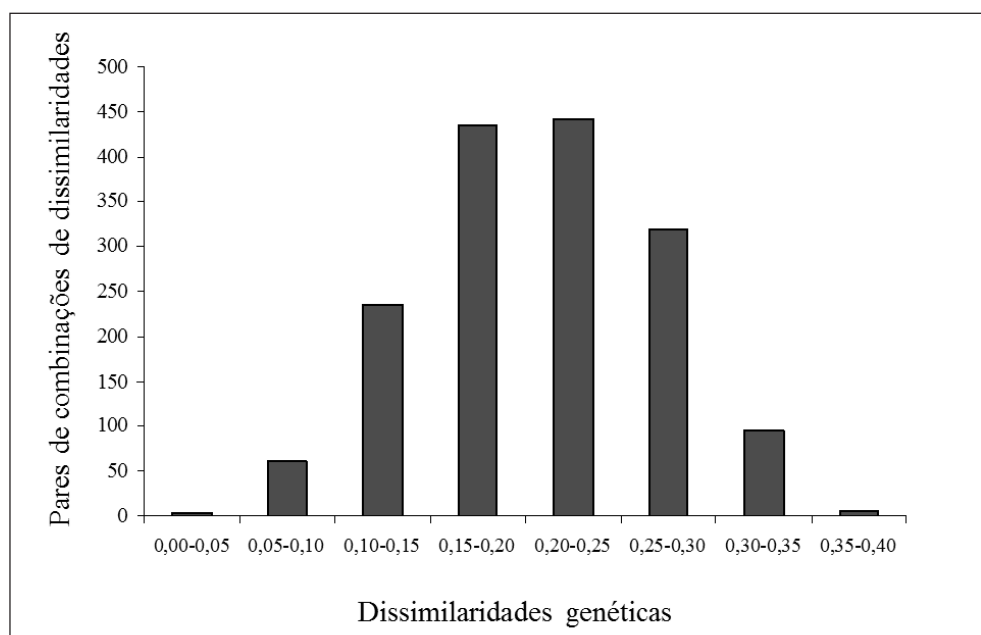


Figura 1. Histograma da distribuição de frequências das dissimilaridades genéticas dos pares de genótipos.

mesmos 81% (0,1909), apesar de serem de diferentes origens geográficas (Tabela 4). Este índice de similaridade é superior a valores encontrados com marcadores genômicos (Marita et al., 2001; Yamada et al., 2003; Faleiro et al., 2004). Elevado índice de similaridade genética 79% (0,2112) foi encontrado também para os 36 clones selecionados por produtores, contudo menor do que os clones âncoras, possivelmente devido terem genitores em comum (Yamada et al., 2003). Como a amplificação destes fragmentos RGHs é feita em regiões conservadas, esperava-se existir realmente maior similaridade genética. Por outro lado, as diferenças existentes entre os mesmos poderão ser importantes para seleções de níveis diferenciados de resistência entre clones de cacauzeiros.

Tabela 4. Dissimilaridades médias dos grupos de clones estudados (Conjunto, seleções por produtores e âncoras) e destes grupos em relação ao Sca 6

Grupos	Dissimilaridade Médias
Conjunto	0,2036
Seleções	0,2112
Âncoras	0,1909
Conjunto X Sca 6	0,1668
Seleções X Sca 6	0,1733
Âncoras X Sca 6	0,1633

O clone Sca 6 é um dos principais genitores das plantas resistentes à vassoura-de-bruxa selecionadas em fazendas na região Sulbaiana (Yamada, et al., 2003; Faleiro et al., 2004) e possui um gene de efeito maior que controla a resistência (Faleiro et al., 2006). Analisando o gráfico de dispersão dos clones, percebe-se que o Sca 6, os clones Alto Amazônicos, os Baixo Amazônicos, os Trinitários e aqueles selecionados por produtores estão dispersos por todo o plano multidimensional, sem agrupamentos característicos (Figura 2A e 2B). Possivelmente estes resultados são devidos ao tipo de marcador, que não se baseia no genoma como um todo e sim em regiões conservadas e específicas não sendo adequado para diferenciar grupos. Contudo, a identificação de pequenas diferenças nucleotídicas nos fragmentos RGHs possibilita a formação de conformações de DNA diferenciadas detectadas nos géis entre os clones e, estas conformações podem mostrar-se representativas de possíveis alelos alternativos para características de interesse ao melhoramento genético do cacauzeiro (Lanaud et al., 2004), como a resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda.

O índice de heterozigose nos clones estudados variou de 20 a 90%, correspondendo aos clones VB 892 e FSU 77, respectivamente (Tabela 5). Dos clones

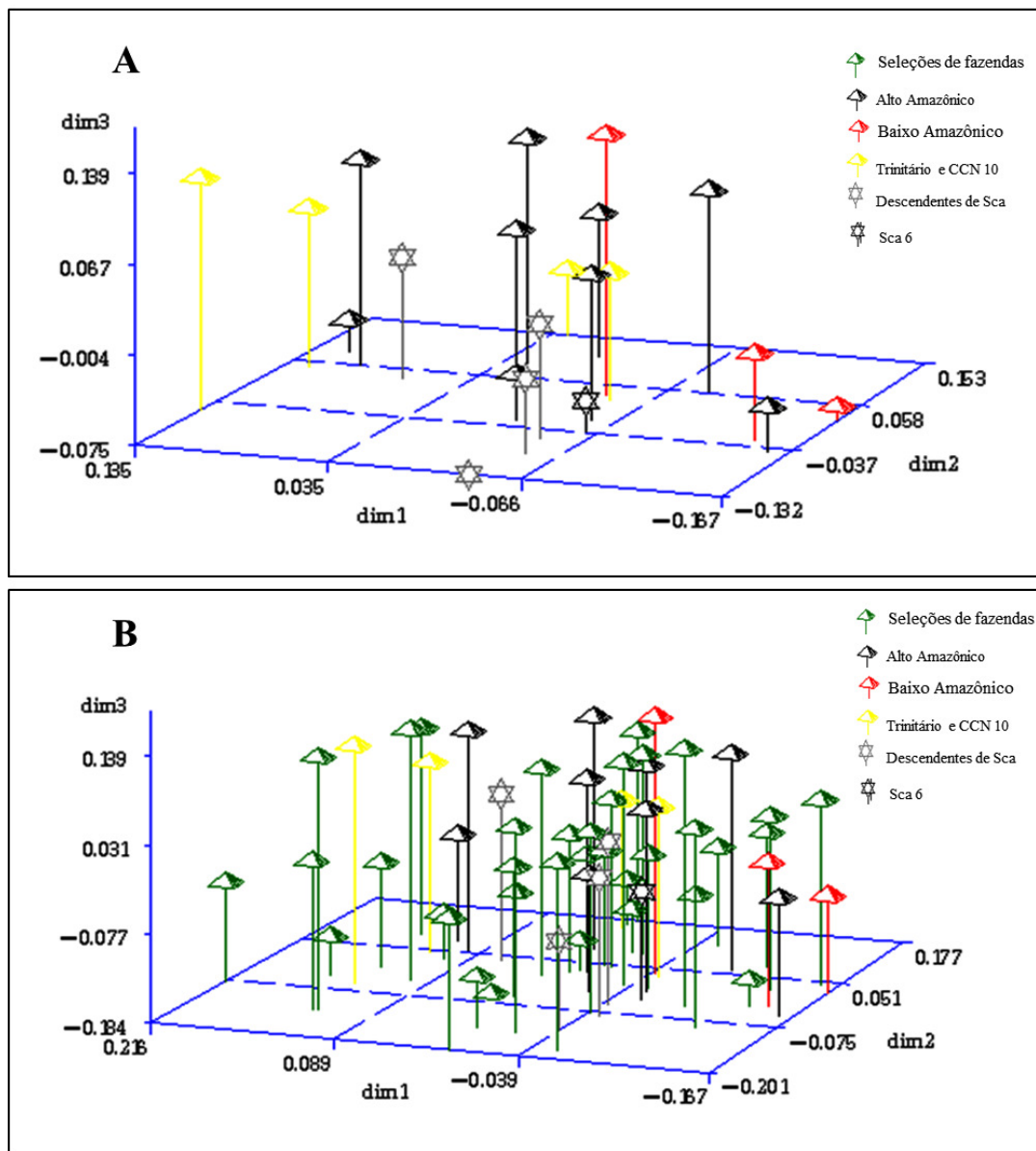


Figura 2. **A** - Dispersão dos grupos raciais de clones de cacauero considerados representantes da diversidade da espécie (Alto e Baixo Amazônicos, Trinitário e CCN 10, Sca 6 e seus descendentes), baseada na análise de escalas multidimensionais (MDS) das distâncias genéticas. **B** - Dispersão dos clones de cacauero incluindo-se os clones selecionados em fazendas, baseada na análise de escalas multidimensionais (MDS) das distâncias genéticas.

analisados, 35 (61%) apresentaram um índice de heterozigose acima de 50% para os 10 locos RGHs. Dezesesseis clones apresentaram índice de heterozigose abaixo de 50% para os 10 RGHs e seis clones tiveram índice de heterozigose de 50% para os locos estudados. Estes resultados mostram um elevado índice de heterozigose, possivelmente devido ao cacauero ser uma planta alógama. Também, ao analisar a disposição física e estrutural das regiões dos genes de resistência,

verifica-se que após as regiões conservadas seguem-se regiões muito variáveis responsáveis pelas diversas funções dos mecanismos de defesa da planta (Vidhyasekaran, 2008). Além disso, como os homólogos de genes de resistência estão em cluster no genoma, é possível que alguns genes sejam funcionais e outros sejam reservatórios de mutação dando elevado índice de heterozigose para os locos RGHs nos clones estudados.

Tabela 5. Nível de Heterozigose de cada clone em relação aos 10 locos RGHs. Determinando a quantidade de locos heterozigotos, homozigotos e perdidos, além do nível de heterozigose dos clones

	Quantidade de Locos			
	Heterozigotos	Homozigotos	Perdidos	% Heterozigose
AM 01	5	4	1	55,56
AM 02	4	6	0	40
BB 1.33	7	3	0	70
BB 6018	7	3	0	70
BB 6020	7	3	0	70
CCN 10	7	3	0	70
CSF 22	5	5	0	50
OC 67	4	4	2	50
EET 392	3	4	3	42,86
FADA 100	7	3	0	70
RB 36	5	4	1	55,56
FL16	6	3	1	66,67
FL 60	7	2	1	77,78
FLN 30	7	3	0	70
MO 20	6	3	1	66,67
FSU 13	6	4	0	60
FSU 151	8	2	0	80
FSU 77	9	1	0	90
GM 33	5	4	1	55,56
ICS 1	2	6	2	25
IMC 67	3	7	0	30
M 05	4	5	1	44,44
NV 22	4	6	0	40
NA 33	5	5	0	50
MA 16	4	5	1	44,44
PAT 118	6	3	1	66,67
PAT 84	3	4	3	42,86
PB 617	5	3	2	62,5
PH 16	4	5	1	44,44
POUND 4B	4	6	0	40
POUND 7	4	6	0	40
EET 399	6	2	2	75
ICS 32	5	2	3	71,43
RT 06	5	5	0	50
RT 09	6	4	0	60
RT 106	5	4	1	55,56
RVID 08	7	3	0	70
RVID 12	6	2	2	75
Sca6	6	2	2	75
C.SUL 3	6	4	0	60
SIAL 169	8	2	0	80
SIC 23	8	1	1	88,89
SJ 02	4	5	1	44,44
MOQ 216	4	4	2	50
SM 06	5	4	1	55,56
T 11	7	2	1	77,78
TR 15	3	6	1	33,33
TR 35	6	4	0	60
TSH 1188	4	4	2	50
TSH 516	6	3	1	66,67
TSH 565	6	2	2	75
VB 515	7	1	2	87,5
VB 547	7	3	0	70
VB 679	7	3	0	70
VB 892	2	8	0	20
VB 900	4	5	1	44,44
VB 902	2	6	2	25

## Conclusões

As análises de diversidade genética baseadas em marcadores gênicos (RGHs) mostraram que os clones considerados âncoras são menos divergentes geneticamente quando foram comparados com análises por marcadores genômicas como RAPD, AFLP e SSR. Os clones selecionados por produtores foram também muito similares entre si e ao Sca 6. Esta alta similaridade entre os clones possivelmente é devida à amplificação de regiões conservadas em genes de resistência a doenças de plantas.

Foram identificadas marcas RGH-SSP exclusivas de clones suscetíveis, o que requer novos estudos com outras populações de cacauzeiros para testar a hipótese de ligação gênica

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento de bolsa de estudo. Agradecemos também a CEPLAC por disponibilizar o material genético utilizado no estudo.

## Literatura Citada

- ALVERSON, W. S. et al. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. *American Journal of Botany* 86:1474-1486.
- BARTLEY, B. G. D. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford, CABI Publishing. 341p.
- CHEESMAN, E. E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cocoa population. *Tropical Agriculture* 218:144-159.
- CRUZ, C. D. 1997. Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 442p
- DOYLE, J. C.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- EFOMBAGN, M. I. B. et al. 2008. Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Genetic Genome* 4:821-831.
- FALEIRO, F. G. et al. 2001. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e Microsatélites. *Agrotrópica (Brasil)* 13:79-86.
- FALEIRO, F. G. et al. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores moleculares RAPD. *Agrotrópica (Brasil)* 14:31-34.
- FALEIRO, A. S. G. et al. 2004. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches' broom based on microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:290-297.
- FALEIRO, F. G. et al. 2006. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* 149:227-235.
- JI, Q. et al. 2013. Molecular mechanism of quinone signaling mediated through S-quinonization of a YodB family repressor QsrR. *PNAS* 26:5010-5015.
- KUHN, D. N. et al. 2003. Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. *Theoretical Applied Genetics* 107:191-202.
- LANAUD, C. et al. 2004. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Molecular Breeding* 13: 211-227.
- LENG, X. et al. 2010. Identification of NBS-Type resistance gene homologs in tobacco genome. *Plant Molecular Biology Reporter* 28:152-161.
- MARITA, J. M. et al. 2001. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* L. with emphasis on witches' broom disease resistance. *Crop Science* 41:1305-1316.
- MOTAMAYOR, J. C. et al. 2008. Geographic and generic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao*, L.). *Plos One* 3(10):1-8.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO. 2015. FAOSTAT Agriculture Data. Disponível em <http://faostat.fao.org>. (Acesso em 17 de setembro de 2015).
- PIRES, J. L. 2003. Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacauzeiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. Tese Doutorado. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa. 328p.
- SANTOS, R. C. et al. 2005. Assessment of genetic diversity on a sample of cocoa accessions resistant to witches' broom disease based on RAPD and pedigree data. *Bragantia (Brasil)* 64 (3):361-368.
- SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). 2000. SAS/STAT user's guide. Cary, CD-ROM.
- SPINARDI, L.; MAZARS, R.; THEILLET, C. 1991. Protocols for an improved detection of mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research* v.19. 14p.
- YAMADA, M. M. et al. 2003. Genetic variability and heterozygosity of cocoa accessions of Parinari (Pa) population, based on microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 3:289-296.
- VIDHYASEKARAN, P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops molecular biology and host defense mechanisms. 2. ed. Boca Raton, CRC Press. 509p. ●