



## Diversidade genética de duas espécies de *Theobroma L.* em um fragmento florestal no Portal da Amazônia, MT, Brasil

Ana Aparecida Bandini ROSSI<sup>1</sup>\*, Marcia de Souza Almeida da SILVA<sup>1</sup>, Maicon Douglas ARENAS DE SOUZA<sup>2</sup>, Kelli Evelin Müller ZORTEÁ<sup>1</sup>, Luana Della GIUSTINA<sup>3</sup>, Vinícius Delgado da ROCHA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil.

<sup>2</sup>Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade – Rede Pró-Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

\*E-mail: [anabanrossi@unemat.br](mailto:anabanrossi@unemat.br)

Recebido em março/2017; Aceito em agosto/2017.

**RESUMO:** O estudo objetivou analisar a diversidade genética de *Theobroma speciosum* e *Theobroma subincanum* em um fragmento florestal no município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. Foram amostrados aleatoriamente 21 indivíduos *T. speciosum* e 20 de *T. subincanum*. Sete primers ISSR foram utilizados e produziram 35 fragmentos dos quais 42,8% apresentaram polimorfismo para *T. speciosum* e 57,1% para *T. subincanum*. A diversidade genética de Nei e o Índice de Shannon foram de 0,133 e 0,201 para *T. speciosum* e 0,244 e 0,351 para *T. subincanum* respectivamente. O dendrograma UPGMA apresentou quatro grupos para *T. speciosum* e três grupos para *T. subincanum*. Os marcadores ISSR foram capazes de acessar a diversidade das duas espécies em estudo gerando informações para programas de conservação e melhoramento genético e demonstraram que a fragmentação vegetal ocasionou um efeito maior sobre a diversidade genética da espécie *T. speciosum* nas populações estudadas. Os níveis de diversidade encontrados no estudo indicam existência de variabilidade genética e alertam para a importância da conservação *in situ* destas populações como fonte de genes para o melhoramento genético do gênero *Theobroma*.

**Palavras-chave:** Cacaúí, Cupuí, fragmentação florestal, ISSR.

### Genetic diversity of two species of *Theobroma L.* in a forest fragment in Amazon Portal, MT, Brazil

**ABSTRACT:** This study aimed to analyze the genetic diversity of *Theobroma speciosum* and *Theobroma subincanum* in forest fragment in the municipality of Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil. We randomly sampled twenty-one *T. speciosum* individuals and twenty *T. subincanum* individuals. The seven ISSR primers used produced 35 fragments, from which 42,8% were polymorphic for *T. speciosum* and 57,1% were polymorphic for *T. subincanum*. The Nei's genetic diversity and Shannon index respectively were 0,133 and 0,201 for *T. speciosum* and 0,244 and 0,351 for *T. subincanum*. The UPGMA dendrogram showed four clusters for *T. speciosum* and three clusters for *T. subincanum*. The ISSR markers were able to access the genetic diversity of the two species studied, thus they provided information for conservation and breeding programs, also demonstrated that forest fragmentation caused a greater effect on genetic diversity of the *T. speciosum* species in the populations studied. The levels of diversity found in the study indicate that there is genetic variability and alert to the importance of *in situ* conservation of these populations as a source of genes for the genetic improvement of the genus *Theobroma*.

**Keywords:** Cacaúí, Cupuí, Forest fragmentation, ISSR

#### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Theobroma L.*, pertencente à família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999), tem apresentado grande importância devido à relevância econômica do cacauieiro (*Theobroma cacao L.*) e do cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. (ALVES et al., 2013). Estas são as únicas espécies do gênero cultivadas comercialmente (SILVA et al., 2011). Espécies silvestres deste gênero como o cacaúí (*Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng.) e o cupuí (*Theobroma subincanum* Mart.) são importantes por representarem um banco de genes a serem utilizados no melhoramento genético das espécies cultivadas comercialmente (SOUZA; VENTURIERI, 2010).

O cacaúí é nativo da região Amazônica e ocorre preferencialmente em floresta ombrófila e floresta de várzea

(FLORA DO BRASIL, 2017). Seus frutos são comestíveis e com as sementes (amêndoas) pode-se preparar chocolate. Possui inflorescências caulinares, em fascículos densos, com flores vermelhas e forte odor de limão, apresenta características ornamentais podendo ser usada com sucesso no paisagismo em geral (LORENZI, 2009). Entre as espécies do gênero é a que possui o teor de gordura mais parecido com o cacau, podendo ser considerado um potencial substituto (SILVA et al., 2004).

O cupuí é uma frutífera nativa da Amazônia e ocorre principalmente em matas de terra firme e nas margens dos igarapés não inundáveis onde é grande a umidade do terreno (LORENZI, 2009). Seus frutos possuem alto potencial alimentício sendo apreciados pela população local, consumidos tanto como fruta fresca, como na forma de

refresco e suas sementes geralmente são utilizadas na preparação de chocolate caseiro (SOUZA et al., 1996; CAVALCANTE, 2010). O fruto também é considerado básico na alimentação da fauna local.

Espécies como as do gênero *Theobroma* tem enfrentado pressão crescente por parte da fragmentação e exploração florestal (DARDENGO et al., 2016). De acordo com França; Marini (2009) a fragmentação de florestas constitui uma das maiores ameaças a perda da biodiversidade, pois interfere nos processos ecológicos e causa fortes efeitos sobre as populações (FAHRIG, 2003). A redução dos habitats disponíveis, exposição a condições adversas diferentes das que existiam anteriormente (NASCIMENTO; LAURENCE, 2006), diminuição do número de indivíduos, bem como o isolamento espacial das populações causam alterações em processos evolucionários básicos, como deriva genética, seleção, migração e reprodução, os quais resultam em mudanças na diversidade e estrutura genética (SILVA et al., 2014).

A informação sobre a estrutura genética de populações e das variações genéticas dentro e entre populações, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de domesticação e incorporação dessas espécies em sistemas produtivos, e para criação de planos de conservação dos recursos genéticos (COSTA et al., 2011).

Os marcadores moleculares são considerados uma das principais ferramentas utilizadas para obter informações acerca da diversidade genética de populações (SOARES et al., 2016). O marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é amplamente utilizado para avaliar a diversidade genética em plantas, baseia-se na amplificação de DNA via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e consiste em um único *primer* com sequência de microssatélite (SOARES et al., 2016; LIU et al., 2011), amplifica a região entre os dois sítios de ligação – *Indels*, perda ou ganho de sítios de ligação dentro da região amplificada são detectados como bandas polimórficas (YANG et al., 1996). É uma técnica simples, rápida, que não necessita de informação prévia da sequência de DNA, apresenta polimorfismo abundante, alta repetibilidade, elevada taxa de transferência para qualquer espécie de planta e custo reduzido (BHATIA et al., 2011; BRANDÃO et al., 2011; SOUZA et al., 2005).

Diante do exposto este trabalho objetivou analisar a diversidade genética de *Theobroma speciosum* e *Theobroma subincanum* em um fragmento florestal no município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil. As informações geradas proporcionam conhecimentos para serem aplicados em estratégias de conservação e melhoramento genético das espécies do gênero.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

A área de estudo foi selecionada com base na ocorrência natural das espécies em um fragmento florestal no município de Alta Floresta no estado de Mato Grosso (Figura 01). Foram amostrados aleatoriamente 21 indivíduos de cacauí (*Theobroma speciosum*) e 20 indivíduos de cupuí (*Theobroma subincanum*).

### 2.2. Figuras e gráficos

O material vegetal consistiu em folhas em estágio intermediário de maturação coletadas em todos os indivíduos

selecionados. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel ainda em campo e posteriormente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  no laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso, campus de Alta Floresta.

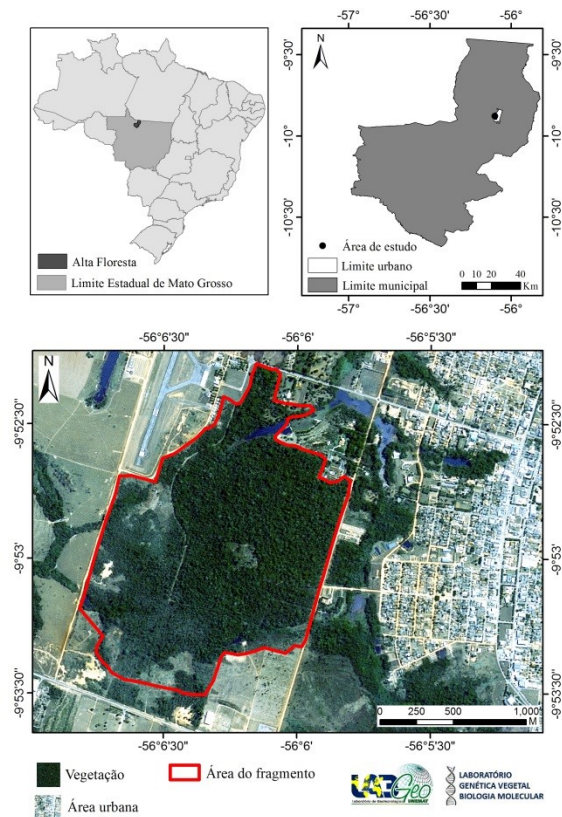


Figura 1. Localização da área de estudo. Fragmento florestal no município de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil, onde foram coletadas as amostras.

Figure 1. Location of the study area. Forest fragment in the municipality of Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil, where the samples were collected.

### 2.3. Extração do DNA total

A extração foi realizada a partir do método descrito por Faleiro et al. (2002) com alterações: CTAB 5% (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M cloreto de sódio; 20 mM EDTA); 2% polivinilpirrolidona (PVP), 2%  $\beta$ -mercaptoetanol e 3,5  $\mu\text{l}$  de Proteinase K (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A quantificação do DNA extraído foi realizada por comparação com marcador DNA  $\lambda$  de massa molecular conhecida em eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/V), corado com brometo de etídio. Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras de DNA genômico foram diluídas e padronizadas a uma concentração de 10 ng/ $\mu\text{l}$ .

### 2.4. Reações de amplificação via PCR dos ISSRs

As reações de amplificação via PCR foram realizadas com sete iniciadores ISSRs (Tabela 1). As reações continham um volume total de 20  $\mu\text{L}$ . O programa de amplificação foi estabelecido de acordo com o descrito por Charters & Wilkinson (2000): 1 ciclo inicial de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto,  $47^{\circ}\text{C}$  a  $53^{\circ}\text{C}$  (dependendo do *primer* utilizado) por 2 minutos e  $72^{\circ}\text{C}$

°C por 30 segundo, finalizando com 1 ciclo de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/V) em tampão de corrida TBE 1X em voltagem constante de 85 V por cerca de quatro horas. A coloração do gel foi feita com brometo de etídeo (0,6 ngmL<sup>-1</sup>). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados, por comparação, com o marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™). Em seguida, o gel foi analisado em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

#### 2.5. Reações de amplificação via PCR dos ISSRs

Os produtos de amplificação foram analisados e codificados como caracteres binários: presença (1) ou ausência (0) de bandas, para a construção de uma matriz. A matriz binária de presença/ausência foi enviada ao programa

POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999) para estimar os parâmetros de diversidade. Os dendrogramas foram construídos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizado o programa GENES (CRUZ, 2013).

### 3. RESULTADOS

Os sete *primers* utilizados amplificaram um total de 35 bandas para cada uma das espécies, com uma média de 5 bandas por *primer*. Estes fragmentos revelaram 42,8% de polimorfismo para *T. speciosum* e 57,1% para *T. subincanum* (Tabela 01).

A espécie *T. subincanum* apresentou maior reserva de variabilidade genética, indicada pelos valores do Índice de Shannon (I) e de Diversidade de Nei (H) descritos na Tabela 2.

Tabela 1. *Primers* ISSR utilizados para a amplificação do DNA de 21 indivíduos de *T. speciosum* e 20 indivíduos de *T. subincanum*. TB: total de bandas amplificadas; BP: bandas polimórficas; %P: porcentagem de polimorfismo.

Table 1. ISSR primers used for DNA amplification of 21 *T. speciosum* individuals and 20 *T. subincanum* individuals. TB: total amplified bands; BP: polymorphic bands; % P: percentage polymorphism.

Primer	Sequência 5' - 3'	Ta (°C)	<i>T. speciosum</i>			<i>T. subincanum</i>		
			TB	BP	%P	TB	BP	%P
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	47	6	3	50,0	4	3	75,0
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48.8	5	0	0,0	6	1	16,7
826	ACACACACACACACACC	53	6	4	66,7	5	3	60,0
827	ACACACACACACACACG	53	4	2	50,0	6	5	83,3
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	50.2	6	1	16,7	6	2	33,3
844	CTCTCTCTCTCTCTRC	48.6	5	4	80,0	5	4	80,0
889	*DBDACACACACACACAC	51.4	3	1	33,3	3	2	66,7
Média			5	2,14	42,4	5	2,86	59,3
Total			35	15	42,9	35	20	57,1

Tabela 2. Diversidade genética de Nei (H); Índice de Shannon (I) e porcentagem de polimorfismo (% P) de *Theobroma subincanum* e *Theobroma speciosum*.

Table 2. Nei's genetic diversity (H); Shannon index (I) and percentage polymorphism (% P) of *Theobroma subincanum* and *Theobroma speciosum*.

Espécie	H	I	%P
<i>T. subincanum</i>	0,244	0,351	57,1
<i>T. speciosum</i>	0,133	0,201	42,9

No dendrograma gerado com os indivíduos de *T. speciosum*, foi possível notar a formação de quatro grupos principais, tomando-se como ponto de corte a distância média de 60% (Figura 3). O grupo I foi o que concentrou o maior número de indivíduos (18) além de ter apresentado indivíduos geneticamente idênticos para os locos estudados (10 e 16; 5, 7 e 8; e 13 e 15). Os grupos II, III e IV foram formados por apenas um indivíduo cada.

O dendrograma dos indivíduos de *T. subincanum*, apresentou três grupos. O grupo I agregou maior número de indivíduos, 16 no total. O grupo II foi composto pelos indivíduos 9, 10 e 1. O indivíduo 11 demonstrou ser o mais distante geneticamente dos demais uma vez que ficou isolado o grupo III.

### 4. DISCUSSÃO

Os *primers* ISSR revelaram porcentagem de polimorfismo similar a outros estudos realizados com as

espécies, porém com valores inferiores. Rivas et al. (2013) estudando três populações de *T. subincanum* na Amazônia brasileira, encontraram 4,69 bandas por *primer* e 67,2% de polimorfismo utilizando 13 *primers* ISSR. Giustina et al. (2014) estudando quatro populações de *T. Speciosum* na Amazônia brasileira, verificou que o polimorfismo gerado para a espécie com 15 iniciadores ISSR foi de 54,46%. O polimorfismo superior encontrado nestes estudos pode estar relacionado ao número de indivíduos amostrados, bem como o fato de serem provenientes de mais de uma população.

A espécie *T. subincanum* revelou maior porcentagem de polimorfismo e maior diversidade genética quando comparada a espécie *T. Speciosum*, indicada pelos maiores valores do Índice de Shannon (I) e de Diversidade de Nei (H), bem como pelo método de agrupamento UPGMA. Em estudos semelhantes sobre as espécies, Giustina et al. (2014) encontraram valores próximos aos relatados neste estudo para *T. speciosum* (H = 0,1672 e I = 0,2549) e Rivas et al. (2013) encontraram H = 0,2612 e I = 0,3889 em populações naturais de *T. subincanum*. Silva et al. (2016), em um estudo com populações cultivadas de *Theobroma grandiflorum* encontrou valores próximos de H e I (0,15 e 0,24 respectivamente). Considerando que estes índices variam de 0 a 1, onde 0 é considerado diversidade gênica nula e 1 diversidade gênica máxima (SILVA et al., 2016), esses dados sugerem que a diversidade genética varia de moderada a baixa dentro da população de cada espécie estudada.

O dendrograma da população de *T. speciosum* evidenciou a formação de poucos grupos e alta proximidade entre os indivíduos estudados. De acordo com Varella et al. (2016), com base em observações de campo, a dispersão das sementes *T. speciosum* é realizada principalmente por macacos, que ao se alimentarem dos frutos deixam cair as sementes próximas da árvore mãe. Esse padrão de dispersão,

aliado ao sistema reprodutivo da espécie que é auto-incompatível (SOUZA & VENTURIERI, 2010), gera um agrupamento maior de indivíduos aparentados e aumenta a possibilidade de cruzamentos entre indivíduos da mesma família. Esses fatores explicam a proximidade genética encontrada entre os indivíduos da população estudada.

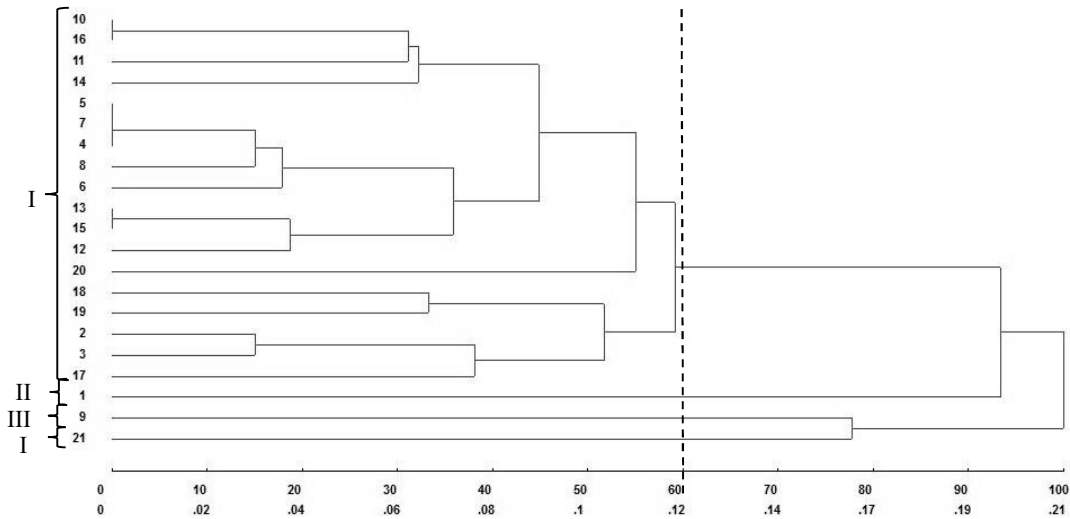


Figura 3. Dendrograma representativo do agrupamento de indivíduos da população de *Theobroma speciosum* de Alta Floresta - MT, pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei.

Figure 3. Dendrogram representative of the clusters *Theobroma speciosum* individuals of Alta Floresta – MT, by UPGMA method based on the Nei's genetic distance.

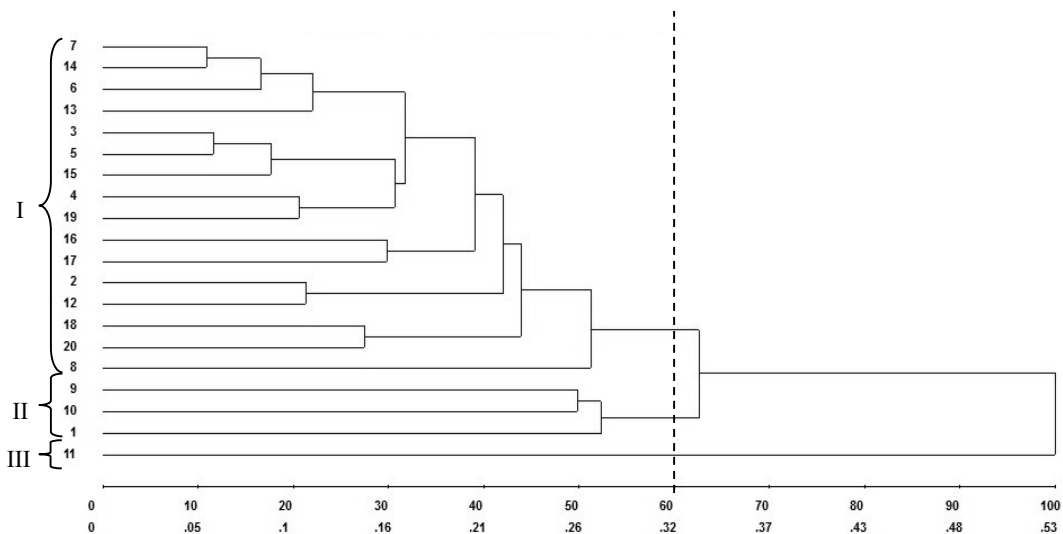


Figura 4. Dendrograma representativo do agrupamento de indivíduos da população de *Theobroma subincanum* de Alta Floresta - MT, pelo método UPGMA com base na distância genética de Nei.

Figure 4. Dendrogram representative of the clusters *Theobroma subincanum* individuals of Alta Floresta – MT, by UPGMA method based on the Nei's genetic distance.

A formação de poucos grupos demonstra alta similaridade genética entre os indivíduos analisados para as duas espécies. Além do sistema reprodutivo e do método de dispersão de sementes, limitações físicas também podem dificultar o cruzamento de indivíduos mais distantes, e contribuem para cruzamentos com indivíduos mais próximos aumentando a similaridade entre eles. Entre as causas dessas limitações, a mais provável deve ser a fragmentação do habitat. De acordo com Arenas de Souza et al. (2015) a

configuração espacial da vegetação do município de Alta Floresta mostra fragmentos distribuídos de forma heterogênea e não conectados por corredores verdes. A ausência de conexão entre os fragmentos, aliada a pressão antrópica exercida sobre as áreas vegetadas, têm influenciado desfavoravelmente a conservação e levado a redução da biodiversidade (ARENAS DE SOUZA et al., 2015).

A variabilidade genética encontrada nessas duas populações naturais é importante para a manutenção destas

espécies, servindo como uma fonte de variação para adaptação a mudanças em fatores bióticos como pragas e doenças, bem como para uso em programas de melhoramento do gênero *Theobroma*.

## 5. CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR foram capazes de acessar diversidade genética das populações de *T. speciosum* e *T. subincanum*, sendo a maior diversidade genética detectada na população de *T. subincanum*.

Os níveis de diversidade encontrados no estudo, mesmo sendo moderados a baixos, indicam existência de variabilidade genética e alertam para a importância da conservação *in situ* destas populações. A fragmentação vegetal ocasionou um efeito maior sobre a diversidade genética da espécie *T. speciosum* nas populações estudadas.

## 6. AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo financiamento do Projeto: Diversidade, Conservação e Uso de Recursos Genéticos de Quatro Espécies Amazônicas de *Theobroma* L. com Potencial Econômico para a Região.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFLER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 10, p. 1474–1486, 1999. Disponível em <<http://www.amjbot.org/content/86/10/1474.full.pdf+html>>
- ALVES, R. M.; SILVA, C. R. S.; SILVA, M. S. C.; SILVA, D. C. S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 818-828, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000300019>
- ARENAS DE SOUZA, M. D.; NEVES, S. M. A. S.; ROSSI, A. A. B.; COCHEV, J. S.; SILVA, I. V. Cobertura vegetal de Alta Floresta, Amazônia Meridional Matogrossense. **Espacios**, v. 36, n. 20, p. 15-26, 2015. Disponível em <<http://www.revistaespacios.com/a15v36n20/15362015.html>>
- BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 957-964, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000600001>
- BHATIA, R.; SINGH, K. P.; SHARMA, T. R.; JHANG, T. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 1, p. 131-135, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9806-5>
- CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterisation of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 1, p. 160-166, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00002903>

- CAVALCANTE, P. **Frutas comestíveis na Amazônia**. 7 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2010. 282p.
- COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LEDÓ, A. S.; SANTOS, A. R. F.; SILVA JÚNIOR, J. F. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000500007>
- CRUZ, C. D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>.
- DARDENGO, J. F. E.; ROSSI, A. A. B.; SILVA, B. M.; SILVA, I. V.; SILVA, C. J.; SEBBENN, A. M. Diversity and spatial genetic structure of a natural population of *Theobroma speciosum* (Malvaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biologia Tropical**, v. 64, n. 3, p. 1091-1099, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v64i3.21461>
- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 34, p. 487-515, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>
- FALEIRO, F. G.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. F.; YAMADA, M. M.; ANHERT, D. Otimização de extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. **Agrotropica**, v. 14, p. 31-34, 2002.
- FRANÇA, L. C.; MARINI, M. A. Teste do efeito de borda na predação de ninhos naturais e artificiais no Cerrado. **Revista Zoologia**, v. 26, n. 2, p. 241-250, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702009000200006>
- FLORA DO BRASIL. 2017. **Malvaceae**. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23622>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2017.
- GIUSTINA, L. D.; LUZ, L. N.; VIEIRA, F. S.; ROSSI, F. S.; SOARES-LOPES, C. R. A.; PEREIRA, T. N. S.; ROSSI, A. A. B. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3510-3519, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2014.February.14.5>
- LIU, D.; HE, X.; LIU, G.; HUANG, B. Genetic diversity and phylogenetic relationship of *Tadehagi* in southwest China evaluated by inter-simple sequence repeat (ISSR). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 5, p. 679-688, 2011. <http://dx.doi.org/DOI 10.1007/s10722-010-9611-3>
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1.ed., v.3. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. 373 p.
- NASCIMENTO, H. E. M.; LAURENCE, W. F. Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 36, p. 183-192, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672006000200008>.

- RIVAS, L. H.; GIUSTINA, L. D.; LUZ, L. N.; KARSBURG, I. V.; PEREIRA, T. N. S.; ROSSI, A. A. B. Genetic diversity in natural populations of *Theobroma subincanum* Mart. in the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 4998-5006, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.October.24.12>
- SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ARAÚJO, V. A. M. A.; ROSSI, F. S.; OLIVEIRA, L. O.; CLARINDO, W. R. Diversidade genética estimada com marcadores moleculares entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141634>.
- SILVA, C. R.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian *Theobroma L.* collections, species identification and characterization of interspecific hybrids. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, p. 333-341, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000200012>.
- SILVA, C. R. S.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ERVEDOSA, F. R.; MOTA, J. W. S.; FIGUEIRA, A.; SEBBENN, A. M. Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. **Heredity**, v. 106, n. 4, p. 973-985, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2010.145>
- SILVA, S. M. M.; MARTINS, K.; MESQUITA, A. G. G.; WADT, L. H. O. Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril L.* na Amazônia sul-ocidental. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 87-95, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509813326>
- SOARES, A. N. R.; VITÓRIA, M. F.; NASCIMENTO, A. L. S.; LEDO, A. S.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brasil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038624>
- SOUZA, A. G. C.; SILVA, S. E. L.; TAVARES, A. M.; RODRIGUES, M. R. L. **A Cultura do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum.** Manaus: Embrapa, 1996.
- SOUZA, M. S.; VENTURIERI, G. A. Floral biology of cacaueiro (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 53, n. 4, p. 861-872, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000400016>.
- SOUZA, V. Q.; PEREIRA, A. S.; MARINIKOPP, M.; COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; LUZ, V. K.; OLIVEIRA, A. C. Dissimilaridade genética em mutantes da aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 569-575, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052005000400006>
- VARELLA, T. L.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; SILVEIRA, G. F.; SOUZA, M. D. A.; CARVALHO, M. L. S. Effect of fragmentation on the natural genetic diversity of *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. Populations. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-10, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr15048630>
- YANG, S. L.; MEEROW, A. W. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex structure and gene flow. **International Journal of Plant Sciences**, v. 157, n. 4, p. 468-483, 1996.
- YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. P. **Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31.** Edmonton: University of Alberta, 1999.