



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A
AMAZÔNIA – CITA



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Manihot esculenta*
Crantz DO ACRE USANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Nathalia Almeida Costa

RIO BRANCO, AC
Maio / 2019

Nathalia Almeida Costa

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Manihot esculenta*
Crantz DO ACRE USANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Inovação Tecnológica**.

Orientadora: Dra. Tatiana de Campos

RIO BRANCO, AC
Maio / 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

- C837c Costa, Nathalia Almeida, 1994 -
Caracterização molecular de *Manihot esculenta Crantz* do Acre usando marcadores microssatélites / Nathalia Almeida Costa; orientadora: Dr^a. Tatiana de Campos. – 2019.
54 f.: il. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia, Rio Branco, 2019.
Inclui referências bibliográficas.
1. Mandioca – Diversidade genética. 2. Mandioca – Marcadores microssatélites. 3. Mandioca – Embrapa -AC. I. Campos, Tatiana de. II. Título.

CDD: 509

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

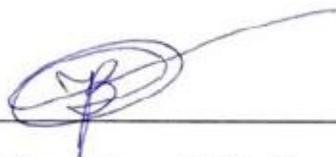
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Manihot esculenta* Crantz
DO ACRE USANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

NATHALIA ALMEIDA COSTA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 03/05/2019



Dra. Tatiana de Campos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Prof. Dr. Josimar Batista Ferreira
Universidade Federal do Acre



Dr. Amauri Siviero
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

AGRADECIMENTOS

A Deus, que fez com que todas as coisas cooperassem para a realização desse sonho.

À minha orientadora, Dra. Tatiana de Campos, pela orientação, sabedoria de seus ensinamentos, paciência e incentivo que foram essenciais para a concretização deste trabalho.

À Universidade Federal do Acre, em especial, o Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA), por ter me proporcionado a oportunidade de dar continuidade à minha qualificação acadêmica.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio financeiro, por proporcionar condições técnicas, como a disponibilização do laboratório de Biologia Molecular (LabMol), e logística para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família pelo amor, estrutura, incentivo e confiança no meu potencial, em especial minha mãe, por todo cuidado e zelo para que eu pudesse me dedicar totalmente a este sonho.

Ao meu amado e querido namorado, Jair Marim, por ser meu porto seguro, parceiro e maior motivador.

À Hellen Azêvedo pela paciência, contribuições e auxílio na condução das análises estatísticas, além das palavras amigas de motivação nos momentos de incerteza.

Aos colegas Clemeson Souza, Sabrina Oliveira, Jônatas Oliveira e o analista Luciélcio Manoel pela disposição e paciência em me ensinar as técnicas e rotinas do laboratório.

Aos amigos do LabMol: Lídia Cavalcante, André Lucas Domingos e Suzana Melo pelo apoio, convivência e momentos de descontração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, pelas contribuições e disciplinas ministradas.

Aos amigos do CITA por compartilharem as dificuldades e experiências deste mestrado, além dos momentos de confraternização.

E a todos os amigos que colaboraram direta ou indiretamente para esta conquista.

MUITO OBRIGADA!

*Aos meus pais, Maria Alice e Evandro, pelo apoio
e força em todos os momentos.*

DEDICO

RESUMO

A mandioca é uma das mais importantes culturas de subsistência em países tropicais e apresenta grande potencial industrial. É preciso conservar e conhecer a diversidade genética existente para o uso adequado deste recurso genético. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética dos acessos de mandioca da coleção presente na Embrapa Acre. Foram analisados 106 acessos por meio de dez marcadores microssatélites. A genotipagem dos produtos amplificados foi realizada em sequenciador automático. Os parâmetros de diversidade genética estimados foram: heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Agrupamentos foram realizados pelo método UPGMA e *Neighbor-Joining*. Utilizou-se também análises bayesianas, dispersão por coordenadas principais e a identificação de uma coleção nuclear. Os dez locos amplificaram 8,40 alelos em média. A média das estimativas de diversidade foram altas: $H_E = 0,71$, $H_O = 0,58$ e $PIC = 0,72$. As distâncias genéticas variaram de 0,9083 a 0,1581. Foram identificadas redundâncias equivalentes a 9,43% do total da coleção. Os agrupamentos e análises de dispersão não evidenciaram distinção entre variedades bravas e mansas e não foi identificada estrutura genética correspondente a origem dos acessos. A coleção nuclear foi formada por 22 indivíduos, que representaram 94% da diversidade alélica total e 20,75% da coleção base. Os resultados indicam que as distâncias genéticas evidenciaram alta dissimilaridade entre os acessos e permitiram a detecção de genótipos redundantes, mostrando o uso de marcadores genéticos como ferramentas informativas para o manejo de coleções.

Palavras-chave: Mandioca. Marcadores microssatélites. Recursos genéticos. Variabilidade. Coleção nuclear.

ABSTRACT

Cassava is one of the most important subsistence crops in tropical regions and has great industrial potential. It is necessary to preserve and know the genetic diversity that exists for the adequate use of this genetic resource. The objective of this study was to characterize the genetic diversity of cassava accessions from the Embrapa Acre collection. A total of 106 accessions were analyzed using ten microsatellite markers. The genotyping of the amplified products was performed in an automated DNA sequencer. The estimated genetic diversity parameters were: expected heterozygosity (H_E), observed heterozygosity (H_O) and polymorphic information content (PIC). Clustering were performed using the UPGMA and *Neighbor-Joining* method. Bayesian analysis, analysis of principal coordinates and identification of a core collection were also used. The ten loci amplified on average 8.40 alleles. The average diversity estimates were: $H_E = 0.71$, $H_O = 0.58$ e $PIC = 0.72$. Genetic distances ranged from 0.9083 to 0.1581. Redundancies equivalent to 9.43% of the total collection were identified. Clustering and dispersion analysis did not show a distinction between bitter and sweet cassava and no genetic structure corresponding to the origin of the accessions was identified. The core collection consisted of 22 individuals represented 94% of total allelic diversity and 20.75% of the base collection. The results indicate that the genetic distances showed high dissimilarity between the accessions and allowed the detection of redundant genotypes, showing the use of genetic markers as informative tools for the management of collections.

Keywords: Cassava. Microsatellites markers. Genetic Resources. Variability. Core collection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Parte aérea da espécie *Manihot esculenta* Crantz (A) e suas raízes tuberosas (B)..... 17
- Figura 2** – Dendrograma com os 106 acessos de *Manihot esculenta* obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância de Rogers modificada (WRIGHT, 1978) com dez locos microssatélites. Os círculos coloridos em verde e vermelho são referentes aos agrupamentos obtidos pelo programa STRUCTURE para K = 2. Os terminais destacados são referentes aos genótipos redundantes 33
- Figura 3** – Gráfico de delta (K) com K=2, obtido a partir da análise bayesiana no programa STRUCTURE com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005) em 106 acessos de *Manihot esculenta* da coleção da Embrapa Acre..... 35
- Figura 4** – Representação dos 106 acessos de *Manihot esculenta* de acordo com a análise bayesiana do programa STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma coluna, ordenados de acordo com o valor de probabilidade Q. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos (K=2): grupo I representado pela cor vermelha; grupo II representado pela cor verde..... 36
- Figura 5** – Representação gráfica dos 106 acessos de *Manihot esculenta* com base na análise de coordenadas principais. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2..... 39
- Figura 6** – Árvore *Neighbor-Joining* representando a relação genética entre 106 acessos de *M. esculenta*. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2..... 40
- Figura 7** – Número total de acessos e percentagem de alelos incluídos na coleção nuclear de mandioca..... 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertencentes a coleção da Embrapa Acre.....26
- Tabela 2** – Sequência dos dez iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) utilizados com suas respectivas temperaturas de anelamento (T_a °C) e amplitudes alélicas em pares de base (pb).....28
- Tabela 3** – Caracterização dos dez locos utilizados em número de alelos por loco (N); Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_O) e conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 106 acessos de *Manihot esculenta* Crantz.....31
- Tabela 4** – Identificação dos 22 acessos de *Manihot esculenta* para formação da coleção nuclear da coleção de mandioca da Embrapa Acre.....41

LISTA DE ABREVIATURAS

HCN: Ácido Cianídrico

BAG: Banco Ativo de Germoplasma

CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ADPIC: Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio

OMC: Organização Mundial do Comércio

IG: Indicação Geográfica

IBPGR: *International Board For Plant Genetic Resources*

SSR: *Simple Sequence Repeats*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

Taq: *Thermus aquaticus*

FAM: *6-carboxy-fluoresceine*

Pb: Pares de base

H_O: Heterozigosidade observada

H_E: Heterozigosidade esperada

PIC: Conteúdo de informação polimórfica

GDA: *Genetic Data Analysis*

TFPGA: *Tools for Population Genetic Analyses*

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with an Arithmetic Mean*

MCMC: *Markov Chain Monte Carlo*

PCoA: Análise de Coordenadas Principais

NJ: *Neighbor-Joining*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Cultura da Mandioca	13
2.1.1 Contexto socioeconômico da cultura da mandioca no Acre	13
2.1.2 Origem e domesticação da mandioca	15
2.1.3 Aspectos gerais e variabilidade genética da mandioca.....	17
2.2 Marcadores Moleculares.....	19
2.2.1 Marcadores Microsatélites	20
2.3 Estudos moleculares com <i>Manihot esculenta</i> Crantz	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Material Vegetal	25
4.2 Extração de DNA	27
4.3 Locos microsatélites	27
4.4 Análise estatística.....	28
4.4.1 Análise da diversidade genética	28
4.4.2 Análise de agrupamento	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Análise dos Microsatélites	31
5.2 Agrupamentos e diversidade genética dos acessos de <i>Manihot esculenta</i> Crantz	32
5.3 Análise bayesiana e métodos de ordenação aplicados aos acessos de <i>Manihot esculenta</i> Crantz	35
5.4 Coleção nuclear de <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	41
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais fontes alimentares para cerca de 800 milhões de pessoas no mundo devido ao grande conteúdo de carboidratos nas raízes, principalmente nos continentes Americano, Africano e Asiático (ALBUQUERQUE, 2017). A espécie é associada a alta adaptação a ambientes desfavoráveis, como solos de baixa fertilidade e tolerância à seca (ORTIZ et al., 2016), a mandioca tornou-se atualmente a quinta cultura mais importante do mundo, sendo consumida majoritariamente em regiões tropicais (SOUSA et al., 2017). O Brasil é o quarto maior produtor de mandioca do mundo (FAO, 2017). A região Norte é responsável pela maior parte dessa produção (IBGE, 2018). A presença dessa cultura na dieta alimentar dos nortistas é constante. O Estado do Acre apresentou a terceira maior produtividade de mandioca da região Norte com 641.967 t/ha em 2018.

A espécie cultivada *Manihot esculenta* Crantz também é conhecida por sua ampla diversidade de variedades, estimada em aproximadamente 7000 variedades espalhadas pelo mundo (HERSHEY, 1994). No sistema de agricultura tradicional, as variedades de mandioca são classificadas em duas categorias de uso baseadas nos níveis de ácido cianídrico (HCN) das raízes: amarga ou brava (a partir de 100 mg HCN.kg⁻¹) e doce ou mansa (< 100 mg HCN.kg⁻¹), conhecida em certas regiões como macaxeira ou aipim (DUFOUR, 1988). A mandioca brava é considerada tóxica se consumida sem o tratamento de pré-cozimento apropriado para remoção dos glicosídeos cianogênicos (BRADBURY et al., 2013).

A maior parte da produção de mandioca no Brasil é conduzida por agricultores familiares tradicionais que utilizam o sistema de derrubada e queimada e, por meio da propagação vegetativa, fixam os genótipos de interesse em conjunto com a geração de novas variedades por hibridação entre diferentes clones e possivelmente hibridação interespecífica (SAMBATTI et al., 2001; FREGENE et al., 2003). Este tipo de cultivo tem demonstrado grande papel na preservação da diversidade genética da cultura devido a seleção consciente ou acidental de plantas, incorporação e intercâmbio de variedades entre os produtores (ELIAS et al., 2001; EMPERAIRE; PERONI, 2007; COSTA et al., 2013; MOURA; FARIAS NETO, 2017; SOUSA et al., 2017).

Com essa ampla variabilidade da cultura é indispensável a conservação deste recurso biológico para impedir uma erosão genética, que teria como consequência a perda

de genes ou de combinações gênicas favoráveis (VIEIRA et al., 2010). A conservação do germoplasma de mandioca tem efeito direto na manutenção da agricultura moderna, que visa elevados níveis de produção por meio da busca por melhores variedades que tenham características de interesse como resistência às principais pragas e doenças, qualidade de raízes e maior teor de amido (GOMES et al., 2007).

Uma parte dessa diversidade genética de mandioca é conservada em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG), mantida pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colômbia) com mais de 6.500 acessos. No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) mantém mais de 4.000 acessos em condições de campo (*ex situ*) e em laboratório (*in vitro*) (ALBUQUERQUE, 2017). Considerando que o centro de origem e diversidade da mandioca seja no Brasil (OLSEN, 2004) há evidências que apontam o Sudoeste da Bacia Amazônica como possível local de domesticação da *Manihot esculenta* (ALLEM, 1994; OLSEN; SCHAAL, 2001). A Embrapa Acre tem procurado manter uma coleção de recursos genéticos da espécie, em condições de campo, para uso imediato e futuro.

Para auxiliar a utilização dessa diversidade em programas de melhoramento é imprescindível a caracterização e avaliação dos materiais introduzidos na coleção, para diferenciar seus acessos, identificar possíveis redundâncias e localizar genótipos com caracteres de interesse (CUEVAS et al., 2017). Uma análise prévia de parte da coleção de mandioca da Embrapa Acre, por meio de descritores morfológicos e agronômicos, foi capaz de detectar ampla variabilidade genética entre a maioria dos cultivares com indicativos de alguns acessos duplicados (SIVIERO; SCHOTT, 2011). A identificação de redundâncias nas coleções contribui para a melhor conservação e manejo do germoplasma, diminuindo os dispêndios de manutenção e garantindo uma diversidade mais representativa (MOURA et al., 2013).

Com o intuito de avaliar e otimizar a variabilidade dentro do germoplasma, os marcadores microssatélites têm sido empregados como ferramenta (COSTA et al., 2013; MOURA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2017; SOUSA et al., 2017), por serem altamente informativos, codominantes, capazes de detectar níveis de polimorfismo diretamente no genótipo, independentes dos efeitos ambientais e estágio de desenvolvimento da planta (VIEIRA et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi identificar a divergência genética de acessos de *Manihot esculenta* da coleção presente na Embrapa Acre, para analisar a estrutura genética dos acessos por meio de marcadores moleculares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cultura da Mandioca

2.1.1 Contexto socioeconômico da cultura da mandioca no Acre

A mandioca, *Manihot esculenta* subsp. *esculenta*, é largamente difundida nas áreas tropicais do planeta, apresentando valores na produção mundial acima de 277 milhões de toneladas em 2018. O continente Africano foi responsável por 58% da produção mundial, seguido pela Ásia e América Latina com 31% e 11%, respectivamente. O Brasil é o maior produtor da América Latina e o quarto maior do mundo (FAO, 2018).

A mandioca é utilizada de diversas maneiras e a alimentação humana constitui seu principal fim. No entanto, o emprego da cultura na alimentação animal e no setor industrial e de energia têm sido proeminentes (PARMAR et al., 2017). Países da África Subsaariana, a maior região produtora de mandioca do mundo, estabeleceram a cultura como parte da agenda de programas de segurança alimentar e de combate à fome estimulando a produção doméstica e comercialização de mandioca. Já no continente Asiático, a principal demanda industrial da mandioca está nos setores de etanol, amido e alimentação animal (FAO, 2017).

No Brasil, a mandioca é cultivada praticamente em todos os estados da união ocupando mais de 2 milhões de hectares de área plantada em 2017, com produção de 20,6 milhões de toneladas e consumo médio anual de 36,3 kg per capita (IBGE, 2018). O Brasil é tradicionalmente o pioneiro no aproveitamento industrial da mandioca, especialmente na alimentação, como fonte de amido e seus derivados (SILVA et al., 2018).

A fécula, o polvilho e a farinha de mesa se destacam pela sua utilização em nível nacional. Na indústria têxtil, o amido é usado para reduzir ruptura e desfibramento nos teares, para espessar corantes e agir como suporte das cores. Na indústria de papel essa matéria-prima é base para dar corpo, aumentando a firmeza e o peso de papel, papelão e tecidos, conferindo resistência das dobras e melhoria na aparência dos produtos finais (CAMARGO, 1985; SILVA et al., 2001a).

A região Norte é a maior produtora de mandioca do Brasil, em termos quantitativos (produção em toneladas), superando a produção da região Nordeste, que desde 1990 era a maior produtora tanto em área plantada quanto em quantidade produzida

(FILGUEIRAS; HOMMA, 2016). A presença dessa cultura na dieta alimentar dos nortistas é de grande importância, principalmente relativa a produtos como farinha de tapioca, goma, farinha de mesa, tucupi e fécula (polvilho). Suas folhas também são usadas na culinária, além de servir para ração animal e ser insumo de indústria (FILGUEIRAS; HOMMA, 2016).

O Estado do Acre é autossuficiente na produção da farinha de mandioca e exporta o excedente para outros estados da região Norte. Sua produção foi a 2ª maior na safra de 2017 com 1,1 milhão de toneladas de mandioca (IBGE, 2018).

Em estudo comparativo entre as duas grandes regiões do Acre, Sá et al. (1997) identificaram duas práticas diferentes na cadeia produtiva entre o Baixo Acre e o Vale do Juruá. Na primeira, os agricultores cultivam a mandioca associada com outras espécies agrícolas no sistema de derrubada e queima da floresta, com o objetivo final de formação de pastagens. Na segunda região, que abrange Cruzeiro do Sul, os agricultores têm a mandioca como principal fonte de renda. Porém, em ambos os casos, apresentaram pouco uso de insumos e tecnologia na produção, problemas na comercialização devido a subordinação e dependência de atravessadores, o que leva ao comprometimento da capitalização do produtor.

A produção da farinha de mandioca na Regional do Vale do Juruá é uma atividade tipicamente da agricultora familiar, onde o proprietário é responsável por todas as etapas do processo, desde o campo até o beneficiamento da mandioca na casa de farinha. Portanto o planejamento do processo de fabricação de farinha leva em consideração a disponibilidade de mão de obra familiar (SILVA et al., 2017).

Devido à falta de informação técnica por parte dos técnicos e agricultores, são negligenciados fatores como uso adequado dos recursos naturais, técnicas de produção de mudas, adubação, manejo conservacionista dos solos, colheita, pós-colheita e processamento. Além disso, a produção de mandioca está dispersa geograficamente em áreas ribeirinhas, reservas extrativistas, terras indígenas e em projetos de assentamento (SILVA et al., 2017).

Em 2017, foi concedido pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial o Selo de Indicação Geográfica da Farinha de Mandioca de Cruzeiro do Sul, que constitui um direito de propriedade intelectual autônomo, a exemplo de uma patente ou de uma marca, o qual é reconhecido nacional e internacionalmente. No Brasil é amparado pela Lei de Propriedade Industrial (Lei nº 9.279/1996) e internacionalmente pelo Acordo sobre

Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (ADPIC), da Organização Mundial do Comércio (OMC) (SEBRAE, 2017).

Indicações Geográficas (IG) qualificam produtos e serviços por apresentarem características genuínas que os vinculam à região onde são produzidos, seja por qualidades atribuídas ao meio ambiente (solo, clima, geografia), seja pelo saber fazer tradicional transmitido de uma geração para outra ao longo de anos (SOUZA et al., 2015). Além de agregar valor ao produto, a IG proporciona o desenvolvimento socioeconômico da região, a organização dos produtores e da produção, a valorização do patrimônio cultural e o incremento do turismo (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2017). Há de se considerar, portanto, uma série de ajustes tecnológicos, estruturais, gerenciais e sistemáticos para que o produto satisfaça as expectativas do mercado e dos consumidores de outras regiões do Brasil.

2.1.2 Origem e domesticação da mandioca

Por muito tempo a origem da Mandioca (*Manihot esculenta* subsp. *esculenta*) tem sido discutida, com a intenção de responder importantes questões sobre a origem botânica, geográfica e agrícola. Estudos sobre a taxonomia do gênero *Manihot* no Brasil levaram a avanços inesperados sobre a sua origem e filogenia (ALLEM, 2002).

O primeiro estudo monográfico do gênero *Manihot*, realizado por Pohl (1827) apresentou a cultivar *M. esculenta* dividida em duas espécies separadas, *M. utilissima* e *M. aipi*. As espécies divergem sobre o conteúdo de ácido cianídrico (HCN), em alta concentração em *M. utilissima* e baixa em *M. aipi*.

Os esforços para se identificar o centro de origem da mandioca começaram com as publicações de Rogers (1963; 1965; ROGERS; FLEMING, 1973), que indicavam que a cultura não tinha um antepassado rastreável e foi, na verdade, o subproduto da introgressão indiscriminada envolvendo um número de parentes silvestres. Rogers e Appan (1973) consideraram uma espécie nativa do México e Mesoamérica como a mais próxima morfologicamente da mandioca, a *M. aesculifolia* (H.B.K.) Pohl. Bertram e Schaal (1993) encontraram resultados semelhantes e ainda indicaram a espécie *M. carthaginensis* como parente próxima da mandioca.

Allem (1987) estabeleceu ligação entre uma população selvagem e a origem botânica da espécie cultivada. Em uma viagem de campo aos Estados do Mato Grosso,

Goiás e Rondônia, o autor encontrou algumas populações da espécie selvagem *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* (Pohl) Ciferri que eram indistinguíveis morfológicamente da cultivar domesticada, e chegou à conclusão de que a mandioca cresce em estado selvagem. A convicção era de que as populações selvagens de *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* provavelmente levaram à gênese de cultivares comerciais modernos e variedades locais de mandioca (ALLEM, 1994). Populações naturais de *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* foram encontradas nos Estados de Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre, e esses locais foram apontados como possíveis regiões brasileiras de domesticação da mandioca (ALLEM, 1997; OLSEN; SCHAAL, 1999).

Outros estudos moleculares foram realizados para testar a ascendência da mandioca e sua possível relação com *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* e grande parte deles apresentaram resultados que corroboram esta ligação (BRONDANI, 1996; BONIERBALE et al., 1997; OLSEN; SCHAAL, 1999; CABRAL et al., 2000; SCHAAL; OLSEN, 2000; ROA et al., 2000; COLOMBO et al., 2000a; OLSEN; SCHAAL, 2001; OLSEN, 2004).

Allem et al. (2001) revisou espécies possivelmente envolvidas com a linhagem da mandioca, e apontou a *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* e *M. esculenta* subsp. *peruviana* como parte do *pool* gênico primário da cultura.

Por se tratar de uma cultura antiga na América neotropical, Lathrap (1970) estima que a domesticação tenha começado há 10.000 anos baseado nos achados arqueológicos na Amazônia (GIBBONS, 1990). Supõe-se que a mandioca tenha sido domesticada diretamente na natureza e, porque a cultura é propagada vegetativamente, espera-se que as formas cultivadas tenham morfologias botânicas muito semelhantes às do ancestral vivo (ALLEM, 2002).

Uma das teorias sobre o possível local da domesticação inicial é apresentada por Allem (1997), onde o autor expõe seus argumentos a favor dos Estados brasileiros de Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre como possíveis berços de domesticação da mandioca, baseado no fato de que populações de ambas espécies (*M. esculenta* subsp. *flabellifolia* e *M. esculenta* subsp. *peruviana*) são muito densas nessas áreas. Outros dois estudos trouxeram o Sul da Bacia Amazônica como local onde se iniciou a domesticação da cultura, baseado na forte congruência do genoma documentada entre as populações selvagens de *M. flabellifolia* e *M. esculenta* (OLSEN; SCHAAL, 1999; 2001).

Entretanto para uma conclusão mais detalhada são necessários estudos sobre os padrões de migração dos indígenas na América do Sul no período pré-colombiano, pois

essa informação pode ser a chave para a determinação do berço da domesticação da mandioca (ALLEM, 1997).

2.1.3 Aspectos gerais e variabilidade genética da mandioca

Segundo a sistemática botânica de classificação hierárquica, a mandioca pertence à classe das Dicotyledonae, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, tribo Manihoteae e gênero *Manihot* (FUKUDA, 1999). O gênero *Manihot* têm cerca de 98 espécies documentadas, entre essas a única cultivada comercialmente é *Manihot esculenta* subsp. *esculenta* (ALVES, 2002) (Figura 1A e 1B).



Fotos: Amauri Siviero

Figura 1 – Aspecto da parte aérea da espécie *Manihot esculenta* Crantz (A) e das raízes tuberosas (B).

A mandioca é uma espécie alógama, altamente heterozigótica, monóica, protogínica e diploide ($2n = 36$) (FUKUDA, 1999). Ao longo do tempo, a mandioca tem sido cultivada, principalmente, por meio de propagação vegetativa. Entretanto a reprodução sexual se mantém ativa, promovendo o aumento da variabilidade genética (SILVA et al., 2001b). A variabilidade genética presente na cultura da mandioca é o resultado da seleção natural, do processo de domesticação da espécie cultivada, da predisposição para polinização cruzada, dos altos níveis de heterozigosidade e da deiscência dos frutos que conseguem ser preservados em bancos de sementes e são

capazes de germinar após o processo de derrubada e queimada para a instalação da nova lavoura (FUKUDA; SILVA, 2002).

O caule maduro da mandioca é lenhoso, cilíndrico e formado por nós alternados (ALVES, 2002). O sistema foliar da mandioca é composto pela lâmina foliar palmeada e profundamente lobulada, variando de três a nove lóbulos e o pecíolo pode medir entre 9 e 20 cm, apresentando variação tanto na coloração das folhas quanto dos pecíolos entre as cultivares. As flores não apresentam cálice ou corola, possuindo uma estrutura indefinida chamada perianto, composta por cinco tépalos, onde nas flores femininas se encontram totalmente separadas. O fruto é uma cápsula deiscente e trilobular de forma ovoide a globular, com seis bordas longitudinais proeminentes (CEBALLOS; CRUZ, 2002).

Anatomicamente, as raízes podem apresentar várias formas e tamanhos (cilíndricas, cônicas e até mesmo globosas) e são constituídas de três tecidos distintos: a casca, o córtex e o parênquima. Este último pode ser encontrado em diferentes tonalidades como amarelo, creme, rosado e branco, dependendo da variedade de mandioca (CEBALLOS; CRUZ, 2002).

A mandioca é um arbusto perene cultivado, principalmente, por suas raízes amiláceas. Sua altura pode variar de um a cinco metros, porém normalmente não ultrapassa os três metros de altura. Estimativas afirmam a existência de aproximadamente 7.000 variedades de mandioca no mundo inteiro (HERSHEY, 1994).

No entanto, a taxonomia popular classifica as variedades de mandioca em dois grupos, de acordo com o critério de toxicidade das raízes: mansas ou doces e bravas ou amargas. O sabor amargo, ou sua ausência (mandioca doce), está associado ao potencial cianogênico, isto é, à capacidade de liberação de ácido cianídrico (HCN), amplamente conhecida entre os agricultores como uma substância altamente tóxica (VALLE et al., 2004), o qual é perceptível a partir de 100 mg HCN.kg⁻¹ de polpa das raízes (DUFOUR, 1988).

Essa diferenciação é importante no direcionamento da produção, pois as mandiocas bravas necessitam de um processamento desintoxicante antes do consumo, sendo utilizadas para extração do amido e a produção de farinha. As mandiocas mansas podem ser utilizadas tanto na forma processada como sem processamento, sendo consumidas cozidas, fritas ou assadas (VALLE et al., 2004).

A cultura encontra-se distribuída ao longo de uma ampla gama de condições edafoclimáticas, crescendo em regiões desde o nível do mar até 2.300 metros de altitude,

em solos de baixa fertilidade com precipitação anual de < 600 mm no trópico semiárido até > 1500 mm nos trópicos úmido e subúmido e tolerando temperaturas entre 16 e 38 °C, porém o melhor desenvolvimento ocorre entre 25 e 29 °C (COCK, 1984; CEBALLOS; CRUZ, 2002).

A época ideal de plantio é no início do período chuvoso para assegurar alta produtividade, e as manivas (pequenos segmentos cortados do caule) podem ser plantadas em três modalidades: em covas, camalhões e sulcos (SIQUEIRA, 2008). As plantações de mandioca estão associadas aos sistemas de cultivo consorciados, encontrados em áreas de agricultores familiares em todo Brasil. Entre os consórcios mais comuns estão o milho, amendoim, algodão e arroz (CRAVO; SOUZA, 2016), rentabilizando sua produção sem causar prejuízo ao cultivo da mandioca.

Os genótipos da mandioca podem ser diferenciados a partir de 54 descritores morfológicos e 21 agronômicos, elaborados pelo *International Board For Plant Genetic Resources* (IBPGR) em 1983. Foram revisados e atualizados pelo Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical da Embrapa, em 1995, com apoio do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Dentre esses descritores os principais para identificação de uma cultivar são: cor da folha apical, pubescência do broto apical, forma do lóbulo central, cor do pecíolo, cor do córtex do caule, cor externa do caule, comprimento da filotaxia, presença de pedúnculo nas raízes, cor externa da raiz, cor do córtex da raiz, cor da polpa da raiz, textura da epiderme da raiz e floração (FUKUDA; GUEVARA, 1998).

Porém o efeito da interação entre variedade e ambiente é bastante notável na mandioca, o que significa que a arquitetura típica de uma certa variedade pode sofrer alterações caso a mesma seja plantada em condições ambientais diferentes de sua origem (CEBALLOS; CRUZ, 2002). Assim, dado o grande número de genótipos de mandioca, diferenciá-los somente com o auxílio dos descritores morfológicos torna-se uma tarefa difícil. Portanto, é necessário fazer a associação dos descritores morfológicos com a caracterização baseada em marcadores moleculares, os quais permitem a caracterização do genótipo sem interferência com o ambiente.

2.2 Marcadores Moleculares

A capacidade de distinguir diferentes genótipos que são relevantes para uma característica de interesse é um dos objetivos principais da genética e, frequentemente,

essa distinção é baseada em sistemas de marcadores informativos (SCHLÖTTERER, 2004).

Marcadores moleculares são sequências de nucleotídeos correspondentes a uma região em particular dentro do genoma e essas sequências precisam ser polimórficas para que seja possível identificar os padrões herdáveis (SCHULMAN, 2007). Polimorfismo refere-se à variação genética, quando existem diferentes alelos em um loco particular. Essas diferenças entre os indivíduos de uma dada população são causadas por variações nas sequências de bases do DNA (CAIXETA et al., 2009).

As possíveis aplicações de marcadores moleculares são bastante amplas, onde destacam-se: identificação de origem parental, teste de paternidade, identificação e discriminação de genótipos, caracterização da diversidade genética, certificação de pureza genética de linhagens e híbridos, identificação e proteção de variedades e/ou clones patenteados, construção de mapas genéticos de ligação predição por seleção genômica ampla (JIANG, 2017).

2.2.1 Marcadores Microsatélites

Organismos eucariotos apresentam genoma densamente povoado por sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats* (TAUTZ; RENZ, 1984)), mais tarde denominadas também “Microsatélites”, que consistem em sequências de um a dez nucleotídeos repetidos em *tandem*, distribuídas ao acaso em locos polimórficos e podem ser analisados por ampliações com PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VIEIRA et al., 2016).

Existem diferentes repetições de microsatélites e são classificadas em: (1) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; (2) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; (3) repetições simples, quando o microsatélite é formado por apenas um motivo repetitivo; (4) repetições compostas, quando dois ou mais motivos repetitivos de microsatélite estão dispostos adjacentes. As repetições simples e compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (OLIVEIRA et al., 2006).

As sequências que flanqueiam as regiões microsatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, portanto permite a seleção e desenho de iniciadores específicos que podem ser utilizados para amplificar, via PCR, os

fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos de uma espécie (CAIXETA et al., 2009).

Cada microssatélite amplificado individualmente com o auxílio dos iniciadores flanqueadores, quase que invariavelmente apresenta alto grau de polimorfismo para tamanho de bandas (TAUTZ; RENZ, 1984). Esse polimorfismo é consequência da natureza altamente mutável dos SSR, por adição ou deleção de nucleotídeos nos motivos repetitivos devido a erros da enzima DNA polimerase ou erros de recombinação. Portanto as variações entre diferentes indivíduos são detectadas pela ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro do microssatélite (VIEIRA et al., 2016).

Os microssatélites constituem locos genéticos altamente variáveis, multialélicos, e de grande conteúdo informativo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). São marcadores codominantes, facilmente reproduzíveis, transferíveis entre espécies relacionadas, com simplicidade técnica, exigindo pequenas quantidades de DNA, com alto poder de resolução e grande heterozigosidade. A natureza informativa desses marcadores faz deles ferramentas eficientes para mapeamento genômico, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (CAIXETA et al., 2009).

Os microssatélites são marcadores baseados em sequências genômicas, assim, é necessária a construção de uma biblioteca de fragmentos genômicos do organismo de interesse para identificar a presença de microssatélites (JIANG, 2017). Além disso, são selecionados e desenhados iniciadores específicos que flanqueiam os marcadores. Este é um processo laborioso e de alto custo, mas compensado pela facilidade e eficiência do uso desses marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.3 Estudos moleculares com *Manihot esculenta* Crantz

Estudos com o objetivo de avaliar a diversidade genética de variedades de mandioca já foram realizados utilizando isoenzimas (CABRAL et al., 2002; RESENDE et al., 2000), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BEECHING et al., 1993), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (COLOMBO et al., 2000b; COSTA et al., 2003; VIEIRA et al., 2010; 2011; 2013), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (WONG et al., 1999; ELIAS et al., 2000;) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (KAWUKI et al., 2009; FERGUSON et al., 2012a; OLIVEIRA et al., 2014; RABBI et al., 2015).

Cerca de milhares de marcadores microssatélites já foram desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa, a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1998; MBA et al., 2001; TANGPHATSORNRUANG et al., 2008; RAJI et al., 2009; SRAPHET et al., 2011). Para identificar possíveis iniciadores duplicados, Ferguson et al. (2012b) analisaram as informações de SSR da *M. esculenta* utilizando o genoma de mandioca como referência, e chegaram ao total de 1.675 marcadores microssatélites válidos, sendo que destes, 312 pares de iniciadores são duplicados.

Por meio dos marcadores moleculares microssatélites, estudos envolvendo a espécie *M. esculenta* foram desenvolvidos para entender sobre sua origem e domesticação (ALLEM, 1994; OLSEN; SCHAAL, 2001; 2004), grau de parentesco com espécies selvagens do gênero *Manihot* (ROGERS; APPAN, 1973; ALLEM et al., 2001), identificação de duplicatas em coleções (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al., 1999; MOURA et al., 2013; MOURA et al., 2016), caracterização de clones (OLIVEIRA et al., 2012a), diversidade genética (PERONI et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011; BEOVIDES et al., 2015; CARRASCO et al., 2016; TOVAR et al., 2016), seleção genômica ampla (OLIVEIRA et al., 2012b) e construção de mapas genéticos (MBA et al., 2001; OKOGBENIN et al., 2006; SRAPHET et al., 2011; WHANKAEW et al., 2011; RABBI et al., 2012).

Fregene et al. (2003) avaliaram acessos de mandioca da América Neotropical (centro primário de origem da espécie) e África para avaliar a diversidade genética e diferenciação derivada dos dados de microssatélites e entender as forças moduladoras das frequências alélicas em uma cultura alógama propagada vegetativamente. Foi observado alto nível de heterozigosidade entre todos os locais, porém a maior diversidade de mandioca foi encontrada no Brasil e na Colômbia, os prováveis locais de origem da mandioca. Com base nesses resultados concluíram que recombinação espontânea e seleção por agricultores para adaptação desempenham papel importante nas diferenças das frequências alélicas da espécie.

Com o objetivo de identificar duplicatas, Moura et al. (2013) analisaram 36 acessos da região Norte do Brasil com marcadores microssatélites e puderam constatar três situações diferentes: (1) materiais com o mesmo nome que compartilhavam o mesmo genótipo; (2) acessos com nomes iguais, porém geneticamente diferentes; (3) e genótipos idênticos com diferentes nomes coletados em locais distintos. Isso demonstra a alta capacidade de diferenciação dos marcadores microssatélites, a grande dispersão de alguns

genótipos de mandioca e a importância da agricultura local na manutenção da variabilidade genética da espécie.

A diferenciação genética entre variedades bravas e mansas também foi comprovada pelo uso de microssatélites (ELIAS et al., 2004). Esses estudos destacam a elevada diversidade genética das etnovarietades de mandioca, mantidas principalmente pelos agricultores tradicionais, e a complexidade da variação genética envolvida nesta espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar acessos de *Manihot esculenta* Crantz da coleção de mandioca da Embrapa Acre usando marcadores microsatélites.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a divergência da coleção de mandioca da Embrapa Acre;
- b) Analisar a estrutura genética de acessos da coleção de mandioca da Embrapa Acre;
- c) Detectar genótipos redundantes;
- d) Construir coleção nuclear da coleção base da Embrapa Acre

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O estudo foi realizado com os 106 acessos da Coleção de Mandioca presente na Embrapa Acre, Rio Branco, composta por variedades provenientes dos Estados do Acre (74), Amazonas (24), Roraima (1), São Paulo (3) e acessos de origem desconhecida (4). Os nomes locais foram mantidos para cada variedade tradicional e os materiais foram classificados em dois tipos de mandioca, brava e mansa (Tabela 1).

Tabela 1 – Acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertencentes a coleção da Embrapa Acre.

Nº	Variedade	*Origem	**Uso	Nº	Variedade	Origem	Uso	Nº	Variedade	Ori	Uso	Nº	Variedade	Origem	Uso
1	Muxuanga	AM	B	28	João Grande	AM	B	55	Goela de Jacu	AC	M	82	Branquinha 1* ¹	AM	B
2	Gavião	AM	B	29	IM194	AM	B	56	Primavera	AC	M	83	Branquinha 2* ¹	AC	B
3	06 Meses	AM	B	30	IM196	AM	B	57	Fécula Branca	SP	M	84	Paxiúba 1* ²	AC	B
4	João Gonçalo	AM	B	31	IM198	AM	B	58	Corcunda	SP	B	85	Paxiúba 2* ²	AC	M
5	Bonitinha	AM	B	32	IM319	AM	B	59	IAC Caipora	SP	M	86	Milagrosa 1* ³	AC	B
6	Acari	AC	B	33	IM322	AM	B	60	Capora	AC	M	87	Milagrosa 2* ³	AC	B
7	IM201	AM	B	34	IM486	AM	B	61	N2 Cascuda	AC	B	88	Chico Anjo 1* ⁴	AC	B
8	IM204	AM	M	35	Peruana	AM	B	62	FB2	AC	M	89	Chico Anjo 2* ⁴	AC	B
9	IM205	AM	B	36	Noé	AC	B	63	BRS Kiriris	DS	B	90	Caboquinha 1* ⁵	AC	M
10	IM214	AM	B	37	Curumim Doida	AC	B	64	BRS Rosada	DS	M	91	Caboquinha 2* ⁵	AC	B
11	IM215	AM	B	38	Fortaleza	AC	M	65	BRS Gema de Ovo	DS	M	92	Pirarucu 1* ⁶	AC	B
12	IM220	AM	B	39	Curumim Mansa	AC	M	66	BRS Jari	DS	M	93	Pirarucu 2* ⁶	AC	B
13	IM221	AM	B	40	Amarelinha	AC	B	67	Roxinha	AC	B	94	Varejão 1* ⁷	AC	B
14	Verdinha	AC	B	41	Baianinha	AC	B	68	Curumiem Doida	AC	B	95	Varejão 2* ⁷	AC	B
15	Cariri	AC	B	42	Rosada	AC	B	69	Curumiem Branca	AC	B	96	Amarela 1* ⁸	AC	M
16	Chica de Coca	AC	B	43	Emílio Borges	AC	M	70	Pinhão Manso	AC	B	97	Amarela 2* ⁸	AC	M
17	Cabocla	AC	B	44	Paranacre	AC	M	71	Juriti	AC	B	98	Cumarú 1* ⁹	AC	M
18	Ferreirão	AC	B	45	Manteguinha	AC	M	72	Boa Fé	AC	B	99	Cumarú 2* ⁹	AC	B
19	Baiana Roxa	AC	M	46	Caipora	AC	M	73	Curumiem Roxa	AC	B	100	Rasgadinha 1* ¹⁰	AC	B
20	Pão	AC	B	47	MX-26	RR	M	74	Mulatinha	AC	B	101	Rasgadinha 2* ¹⁰	AC	M
21	Aruari	AC	M	48	MX_2	AM	M	75	Santa Maria	AC	B	102	Metro 1* ¹¹	AC	M
22	Camparia	AC	M	49	MD_35	AM	B	76	Curumiem Torcida	AC	B	103	Metro 2* ¹¹	AC	M
23	Baixinha	AC	B	50	Cruzeiro do Sul	AC	M	77	Mansa Brava	AC	B	104	Agromazon 1* ¹²	AC	M
24	Xerém	AC	M	51	Hélia	AC	M	78	Mansi Brava	AC	B	105	Agromazon 2* ¹²	AC	M
25	Casquinha	AC	M	52	Novo Ideal	AC	M	79	Paxiubão	AC	B	106	Agromazon 3* ¹²	AC	M
26	Pretinha	AC	M	53	Sutinga	AC	M	80	BRS Ribeirinha	AC	B				
27	Grilo Roxo	AM	M	54	Pãozinho	AC	M	81	BRS Tapioqueira	AC	B				

* AC = Estado do Acre; AM = Estado do Amazonas; RR = Estado de Roraima; SP = Estado de São Paulo; DS = Desconhecida.

** M = Mandioca mansa; B = Mandioca brava.

*ⁿ = Genótipos com a mesma nomenclatura coletados em pontos diferentes.

4.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, foram coletadas 3 folhas jovens recém expandidas em uma única planta de cada acesso da coleção, as quais foram liofilizadas e depois trituradas em moinho no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LabMol) da Embrapa Acre. O material vegetal resultante da trituração foi armazenado em microtubos de 3 mL de capacidade e acondicionados em freezer a -20 °C.

O DNA genômico total foi extraído usando o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994) modificado. O DNA foi quantificado em gel de agarose (1%) usando o DNA fago lambda em diferentes quantidades (50, 100 e 200 ng) como marcador padrão. O DNA genômico foi diluído para 5 ng. μL^{-1} .

4.3 Locos microssatélites

Dez marcadores microssatélites descritos por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e Mba et al. (2001) foram sintetizados (Tabela 2).

A etapa de amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. As reações de amplificação foram feitas contendo 5 ng de DNA genômico, 0,25 mM de cada dNTP; 0,2 μM de cada iniciador, 2 mM de MgCl_2 , 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase e 1X de tampão, em um volume final de 15 μL . As amplificações foram conduzidas usando o termociclador (Analytikjena®) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de cada iniciador por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 minutos para uma extensão final. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose (3%), comparados a um marcador de peso molecular padrão 1 kb plus (Invitrogen®). Para fins de genotipagem no Laboratório de Análise Genética e Molecular da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, cada iniciador *forward* foi marcado com fluorescência 6-carboxy-fluoresceine (FAM) para a análise por meio de eletroforese capilar em sequenciador automático AB 3500xL (Applied Biosystems Hitachi®), usando o padrão GeneScan 600 LIZ como marcador interno para inferir o tamanho dos alelos. Esta genotipagem foi realizada no. A leitura dos dados foi realizada por meio do software GeneMarker v 2.7.4.

Tabela 2 – Sequência dos dez iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) utilizados com suas respectivas temperaturas de anelamento (Ta °C) e amplitudes alélicas em pares de base (pb).

Loco microsatélite	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Ta (°C)	Amplitude alélica (pb)
GA12*	F: GATTCCTCTAGCAGTTAAGC R: CGATGATGCTCTTCGGAGGG	55	131 – 157
GA126*	F: AGTGGAATAAGCCATGTGATG R: CCCATAATTGATGCCAGGTT	55	178 – 214
GA131*	F: TTCCAGAAAGACTTCCGTTCA R: CTCAACTACTGCACTGCACTC	55	75 – 119
GA134*	F: ACAATGTCCCAATTGGAGGA R: ACCATGGATAGAGCTCACCG	55	309 – 337
GA136*	F: CGTTGATAAAGTGGAAGAGCA R: ACTCCACTCCCGATGCTCGC	55	145 – 161
GA140*	F: TTCAAGGAAGCCTTCAGCTC R: GAGCCACATCTACTCGACACC	55	154 – 164
GAGG5*	F: TAATGTCATCGTCGGCTTCG R: GCTGATAGCACAGAACACAG	55	109 – 127
SSRY13**	F: GCAAGAATTCCACCAGGAAG R: CAATGATGGTAAGATGGTGCAG	55	193 – 245
SSRY89**	F: AGTTGAGAAAACCTTGCATGAG R: GGCTGTTCGTGATCCTTATTAAC	55	102 – 117
SSRY164**	F: TCAAACAAGAATTAGCAGAACTGG R: TGAGATTTCGTAATATTCATTTCACTT	45	134 – 182

*CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al. (1998); **MBA et al. (2001).

4.4 Análise estatística

4.4.1 Análise da diversidade genética

Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade genética: Número de alelos (N) por loco, Heterozigosidade observada (H_O), Heterozigosidade esperada (H_E) pelo programa *Genetic Data Analysis* – GDA versão 1.1 (LEWIS; ZAYKIN, 2001). O número médio de alelos por loco foi obtido pela divisão do número total de alelos pelo número total de locos.

O programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para calcular o conteúdo de informação polimórfica (PIC) o qual estima a informatividade do loco a partir da equação de Botstein et al. (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2f_i^2 f_j^2$$

Onde, f_i é a frequência do i -ésimo alelo, f_j é a frequência do j -ésimo alelo e a soma se estende ao longo de n alelos.

4.4.2 Análise de agrupamento

As distâncias genéticas foram calculadas utilizando-se a matriz de distância genética de Rogers modificada (WRIGHT, 1978), obtida pelo programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997), utilizando o critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with an Arithmetic Mean*) e usada na construção de dendrograma no programa MEGA X: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms* (KUMAR et al., 2018).

Por meio do método bayesiano do programa STRUCTURE versão 2.3 (PRITCHARD et al., 2000) foi verificado o número de *pools* gênicos (K) diferentes, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados. Desde modo, os grupos de indivíduos que partilham o mesmo *pool* gênico são agrupados, sem necessidade de informação prévia sobre sua origem.

O programa foi executado com número total dos acessos estabelecidos, com K variando de 1 a 10. Foram realizadas 20 simulações independentes para cada K, usando o modelo *admixture* de frequências alélicas independentes, que pressupõe a existência de fluxo gênico entre as amostras, 100.000 burn-in e 1000 simulações de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). A determinação do número K mais provável foi realizada utilizando valores de ΔK segundo Evanno et al. (2005), pelo aplicativo *Structure Harvester* versão 0.6.9 (EARL; VON HOLDT, 2012).

A mesma matriz de distância genética de Rogers modificada (WRIGHT, 1978), obtida pelo programa TFPGA, foi utilizada para verificar a relação entre os acessos por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) calculada no *software* Darwin versão 6.0.15 (PERRIER; JACQUEMOUND-COLLET, 2006). Também neste programa foi realizada a análise de *cluster* usando o método de *Neighbor-Joining* (NJ).

Para determinar a coleção nuclear foi utilizado o *software* CoreFinder versão 1.1 (POLICRITI; SGARRO, 2018), com base na estratégia M, mantendo 100% dos alelos. Essa estratégia utiliza simulações de Monte Carlo para selecionar um grupo de genótipos com maior riqueza alélica (GOUESNARD et al., 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos Microssatélites

Todos os locos foram polimórficos. Os dez locos microssatélites amplificaram 84 alelos com uma média de 8,4 alelos por loco. O loco GA12 apresentou o menor número de alelos, identificando somente quatro e o loco com a maior quantidade de alelos foi o SSRY13 com 15 alelos (Tabela 3).

Valores próximos foram encontrados por Sousa et al. (2017) ao analisar 470 acessos do BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Ocidental, detectaram 113 alelos, com média de 11,3 alelos por loco e por Mühlen et al. (2013), no qual amplificaram uma média de 9,9 alelos por loco em 494 acessos pertencentes a coleções das Regiões Amazônica, Centro-Oeste e Sudeste. Mesmo com o grande tamanho amostral destes estudos, a média de alelos por loco esteve próxima ao encontrado neste trabalho, demonstrando que os acessos aqui avaliados representam de forma consistente a diversidade da espécie.

Tabela 3 - Caracterização dos dez locos em número de alelos por loco (N); Heterozigosidade esperada (H_E); Heterozigosidade observada (H_o) e conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 106 acessos de *Manihot esculenta* Crantz.

Loco	N	H_E	H_o	PIC
GA12	4	0,54	0,54	0,54
GA126	10	0,83	0,80	0,84
GA131	10	0,80	0,70	0,82
GA134	5	0,49	0,44	0,51
GA136	11	0,81	0,65	0,81
GA140	7	0,72	0,62	0,73
GAGG5	5	0,58	0,51	0,64
SSRY13	15	0,89	0,74	0,89
SSRY89	6	0,64	0,24	0,65
SSRY164	11	0,75	0,56	0,75
Total	84			
Média	8,4	0,71	0,58	0,72

Plantas com reprodução alógama associada à propagação vegetativa, como a mandioca, comumente apresentam altos valores de heterozigosidade (ORTIZ et al.,

2016). A heterozigosidade esperada (H_E) média entre os locos foi 0,71, variando de 0,49 (GA134) a 0,89 (SSRY13). A média de heterozigosidade observada (H_O) foi 0,58 e variou de 0,24 (SSRY89) a 0,80 (GA126) (Tabela 3).

Os altos níveis de heterozigosidade podem indicar que o fluxo gênico e a recombinação têm papel significativo na manutenção da diversidade genética da *M. esculenta* (MEZETTE et al., 2013). No entanto, nota-se que os valores de H_O foram menores quando comparados aos de H_E na maioria dos locos, indicando um leve déficit de heterozigotos. Outros estudos realizados com amostras de mandioca da Amazônia Brasileira também detectaram déficit na heterozigosidade observada, sendo uma provável consequência da propagação assexuada e fixação imediata dos genótipos (ALVES-PEREIRA et al., 2011; MÜHLEN et al., 2013).

Esses valores de heterozigosidade foram similares aos encontrados em estudos com acessos de mandioca de bancos de germoplasma coletados no Pará e Amapá (MOURA et al., 2013), Amazonas (MOURA-CUNHA et al., 2016), região do Tapajós, Pará (SILVA et al., 2016) e entre cinco bacias hidrográficas da região Amazônica (SOUSA et al., 2017), porém, os níveis de heterozigosidade do presente estudo são maiores do que os encontrados em trabalhos realizados com bancos de germoplasma da região Sudeste e Sul do Brasil (SIQUEIRA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010; ORTIZ et al., 2016). Esses resultados apontam a ampla diversidade genética na região Amazônica, o que corrobora com os estudos que apontam esta região como o centro de origem e berço da domesticação da mandioca (MARTINS, 2005).

Houve variação no conteúdo de polimorfismo entre os locos. A média observada entre os dez locos microssatélites foi 0,72, tendo o loco SSRY13 o maior valor (0,89) e GA134 com menor conteúdo de polimorfismo (0,51) (Tabela 3). Todos os locos apresentaram valores de PIC superiores a 0,50. De acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), locos com valores de PIC acima de 0,50 são altamente informativos.

5.2 Agrupamentos e diversidade genética dos acessos de *Manihot esculenta* Crantz

Com base na distância genética de Rogers modificada (WRIGHT, 1978) os acessos foram agrupados pelo método UPGMA (Figura 2). A maior distância (0,9083) foi observada entre o grupo redundante “Caboquinha2”, “Paxiubão”, “BRS Ribeirinha” e “Pirarucu2” e o acesso “IM194”. Acessos com grande divergência podem ser empregados em programas de melhoramento como progenitores, para produzir híbridos altamente heteróticos (GONÇALVES et al., 2017).

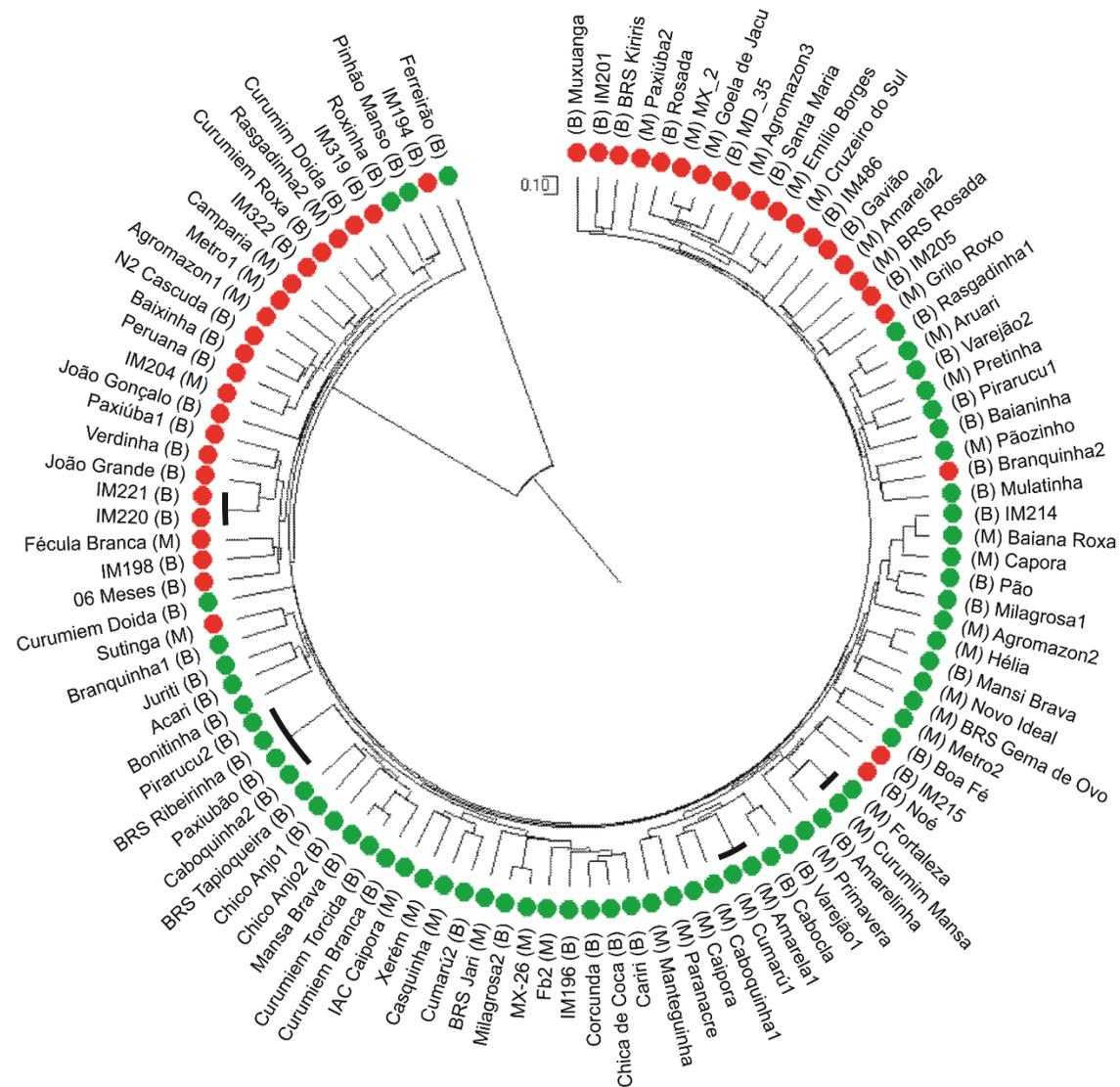


Figura 2 – Dendrograma com 106 acessos de *Manihot esculenta* obtido pelo método UPGMA, utilizando-se a distância de Rogers modificada (Wright, 1978) com dez locos microssatélites. Os círculos em verde e vermelho são referentes aos agrupamentos obtidos pelo programa STRUCTURE para K = 2. Os terminais destacados são referentes aos genótipos redundantes.

O acesso “Ferreirão” se destacou em um grupo externo no dendrograma. Siviero et al. (2009) avaliou as características agrônômicas das cultivares da coleção de trabalho de mandioca da Embrapa Acre e atestou que o acesso “Ferreirão” se destaca dos demais por apresentar alto teor de amido, matéria seca, boa produtividade por t/ha e resistência a podridão de raízes. Dessa forma, é um genótipo bastante divergente e as distâncias genéticas obtidas por dados moleculares corroboram com os resultados morfológicos.

Por meio do dendrograma foi possível observar a redundância em agrupamentos de genótipos com nomes diferentes. Dez acessos (9,43%) apresentaram perfis genéticos idênticos, em quatro grupos distintos. Três grupos apresentaram genótipos em duplicidade: acessos “IM220” e “IM221”; “Curumim Mansa” e “Fortaleza”, e “Amarela1” e “Cumarú1” (Figura 2). Os materiais “Caboquinha2”, “Paxiubão”, “BRS Ribeirinha” e “Pirarucu2” apresentaram o mesmo perfil genético em todos os locos. Bergo et al. (2015) identificaram as mesmas médias de produtividade entre estes acessos, corroborando com os dados moleculares.

Moura et al. (2013) ao analisar os acessos da coleção de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental, por meio de marcadores microsatélites, identificaram que aproximadamente metade da coleção era composta por acessos duplicados.

A identificação de redundâncias em coleções de espécies propagadas vegetativamente é comum (IRISH et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011; GROSS et al., 2012), provavelmente devido às trocas de materiais entre agricultores (MOURA et al., 2016), onde no novo local o genótipo pode receber outro nome. A presença de acessos duplicados representa grande dispêndio na preservação do germoplasma de mandioca em condições de campo. Por esse motivo, é fundamental a utilização de ferramentas para identificar redundâncias no momento da incorporação de novos acessos a uma coleção.

Todos os indivíduos com o mesmo nome, destacados na tabela 1, apresentaram distâncias superiores a 0,55 entre si (Figura 2). Provavelmente, a denominação das variedades é realizada de maneira independente pelos agricultores de diferentes locais e é baseada em poucos caracteres podendo considerar genótipos distintos como pertencentes à mesma variedade (MOURA; FARIAS NETO, 2017). Sambatti et al. (2001) ao analisarem as nomenclaturas populares de variedades de *M. esculenta* perceberam a tendência da utilização de caracteres visuais para designá-las, como a cor do pecíolo, cor do broto apical, cor da polpa da raiz; e características de cozimento e palatabilidade.

Ainda deve ser levada em consideração, a possível introdução de variedades originadas de cruzamentos intervarietais, que escapam o controle humano e são inconscientemente propagadas e designadas a uma variedade reconhecida baseada na similaridade morfológica (ELIAS et al., 2001).

Essa baixa acurácia dos agricultores na diferenciação das variedades pode levar a designação incorreta, entretanto, o descarte de acessos com base na nomenclatura deve ser evitado (MOURA; FARIAS NETO, 2017), sendo necessária a caracterização prévia dos materiais por meio de marcadores morfológicos, agronômicos e moleculares.

5.3 Análise bayesiana e métodos de ordenação aplicados aos acessos de *Manihot esculenta* Crantz

Através da análise bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE e a estatística de Evanno et al. (2005), observou-se o maior valor de delta K para K=2 (Figura 3), destacando a diferenciação genética dos 106 acessos de *M. esculenta* em dois diferentes grupos (Figura 4).

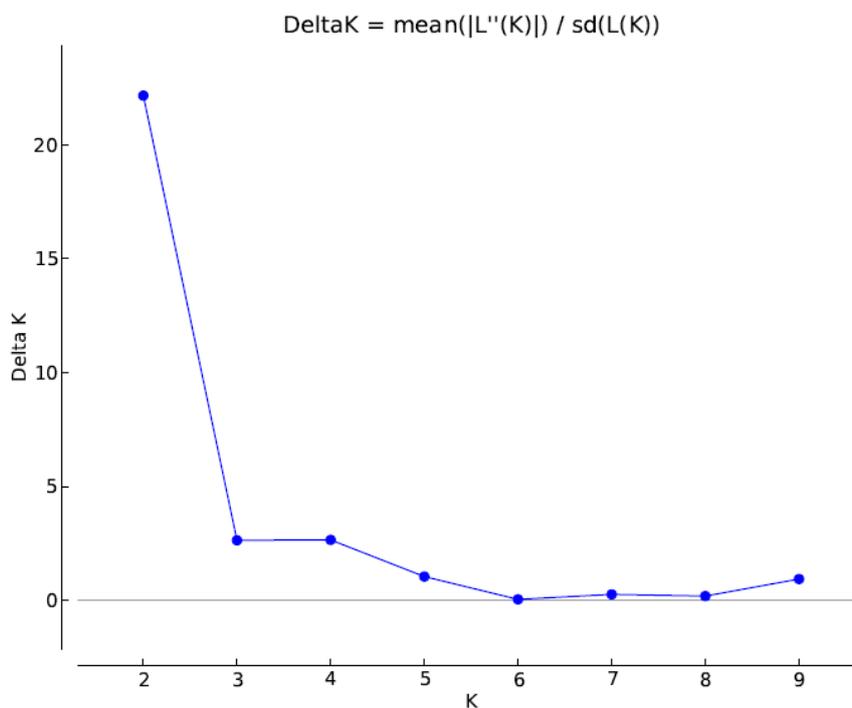


Figura 3 – Gráfico de delta (K) com K=2, obtido a partir da análise bayesiana no programa STRUCTURE com aplicação do modelo de Evanno et al. (2005) em 106 acessos de *Manihot esculenta* da coleção da Embrapa Acre.

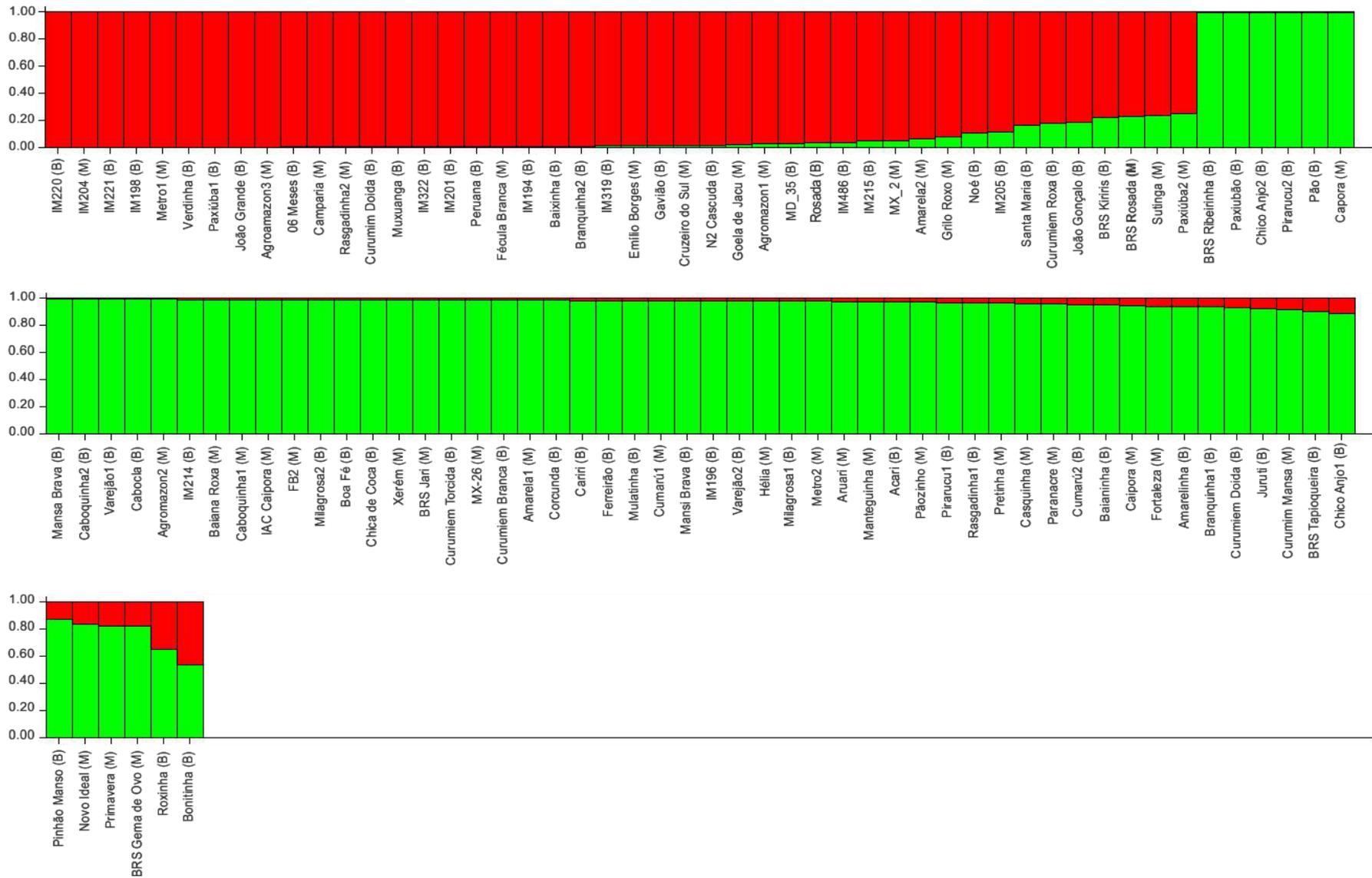


Figura 4 – Representação dos 106 acessos de *Manihot esculenta* de acordo com a análise bayesiana do programa STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma coluna, ordenados de acordo com o valor de probabilidade Q. Os acessos avaliados foram divididos em 2 grupos (K=2): grupo I representado pela cor vermelha; grupo II representado pela cor verde.

O *pool* gênico I representado pela cor vermelha (Figura 4) agrupou 44 acessos (41,5%) de *M. esculenta*, sendo 28 acessos de mandioca brava e 16 mansa. O *pool* gênico apresentado em cor verde agrupou 62 acessos (58,5%), onde 38 são de mandioca brava e 24 de mandioca mansa. Os dois *pools* gênicos apresentaram fraca estruturação genética correspondente a informação sobre o conteúdo de HCN, pois houve praticamente a mesma proporção de variedades bravas e mansas nos dois grupos.

A distinção entre mandioca brava e mansa foi detectada em alguns trabalhos em diferentes regiões do Brasil (PERONI et al., 2007; MÜHLEN et al., 2013). Sousa et al. (2017) que também não encontraram relação do conteúdo de glicosídeos cianogênicos com a estrutura genética, atribuída pelo $K=2$, entre os acessos do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental. Bradbury et al. (2013) analisaram acessos de mandioca coletados na África Central e não conseguiram detectar grande diferenciação entre variedades bravas e mansas, devido às oportunidades para hibridação entre mandioca mansa e brava nos sistemas de cultivo, associado a incorporação, troca e difusão de mudas híbridas entre agricultores, tendo assim como consequência, a baixa distinção genética entre as variedades doces e amargas.

Além disso, a diferenciação entre mandioca mansa e brava pelos agricultores pode variar a nível de região e até mesmo entre comunidades (MOURA; FARIAS NETO, 2017). Portanto misturas devido a hibridação intraespecífica entre variedades bravas e mansas nos locais de produção; erros na diferenciação das variedades por parte dos agricultores, que se baseiam na palatabilidade das raízes (BRADBURY et al., 2013), permitindo assim, demasiada subjetividade na classificação dos cultivares; e por consequência disso, dados de identificação incorretos no momento da introdução dos acessos na coleção, podem ter contribuído para a baixa consistência da estrutura genética observada no presente estudo.

As duas subpopulações advindas da análise bayesiana ($K=2$) não apresentaram correlação em relação a origem dos acessos. O *pool* gênico I agrupou a maioria dos acessos do Amazonas, enquanto o *pool* gênico II reuniu a maior parte das variedades advindas do Acre, o que era esperado já que estes acessos foram coletados na mesma região (MÜHLEN et al., 2013; MOURA et al., 2016; RABBI et al., 2015). Contudo, alguns acessos foram dispersos de maneira não correspondente aos locais de coleta. Esta fraca correlação se deve, possivelmente, à falta de barreiras geográficas promovida pelo intenso intercâmbio de genótipos entre os produtores da região Amazônica (MEZETTE et al., 2013; SOUSA et al., 2017), de tal maneira que o local de coleta não mais reflete

a origem do genótipo. Além disso, a arquitetura da inflorescência e mecanismo de dispersão de sementes da *M. esculenta* oportuniza o cruzamento entre plantas vizinhas (KAWUKI et al., 2013) favorecendo a troca de alelos, que associada a propagação vegetativa e a permuta de manivas entre produtores, facilita a disseminação dos genótipos (MEZETTE et al., 2013).

A associação entre os acessos foi apresentada de forma multidimensional por meio da PCoA (Figura 5). As duas primeiras coordenadas principais representaram 20,54% da variação total. Isto significa que em duas dimensões pôde se observar a maior parte da variação encontrada.

A variação acumulada nas duas primeiras coordenadas principais foi baixa, como no estudo de Sousa et al. (2017), ao analisarem variedades de mandioca bravas e mansas, identificaram apenas 17,84% da variação nas duas coordenadas e que, assim como no presente estudo, não foram capazes de detectar estrutura genética correspondente às variedades bravas e mansas, atribuindo isto a falhas na identificação das variedades acerca do conteúdo cianogênico das raízes e possível mistura de acessos durante a multiplicação clonal pelos produtores locais e *ex situ*. No entanto Costa et al. (2013) e Gonçalves et al. (2017) ao avaliarem somente variedades mansas conseguiram explicar grande parte da variação nas duas coordenadas principais (53,25% e 48,21%, respectivamente).

Dos acessos que compõem o grupo I da árvore de NJ, 68,85% pertencem ao *pool* gênico de cor vermelha e 31,15% ao *pool* gênico representado pela cor verde. No que se refere ao grupo II da árvore de NJ, 95,55% dos acessos foram alocados no *pool* gênico verde e somente 2 acessos pertencem ao *pool* gênico vermelho (Figura 6).

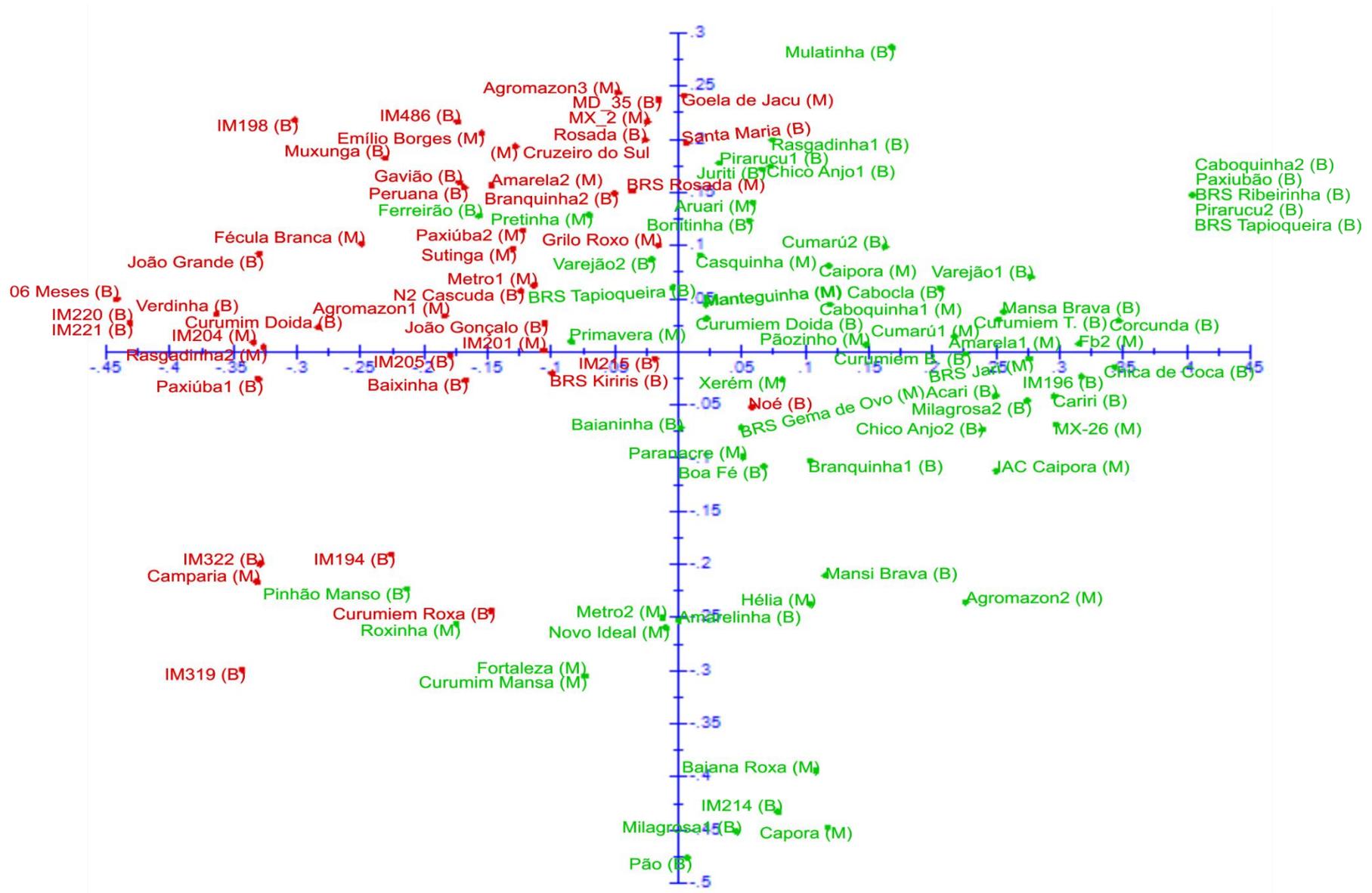


Figura 5 – Representação gráfica dos 106 acessos de *M. esculenta* com base na análise de coordenadas principais. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2.

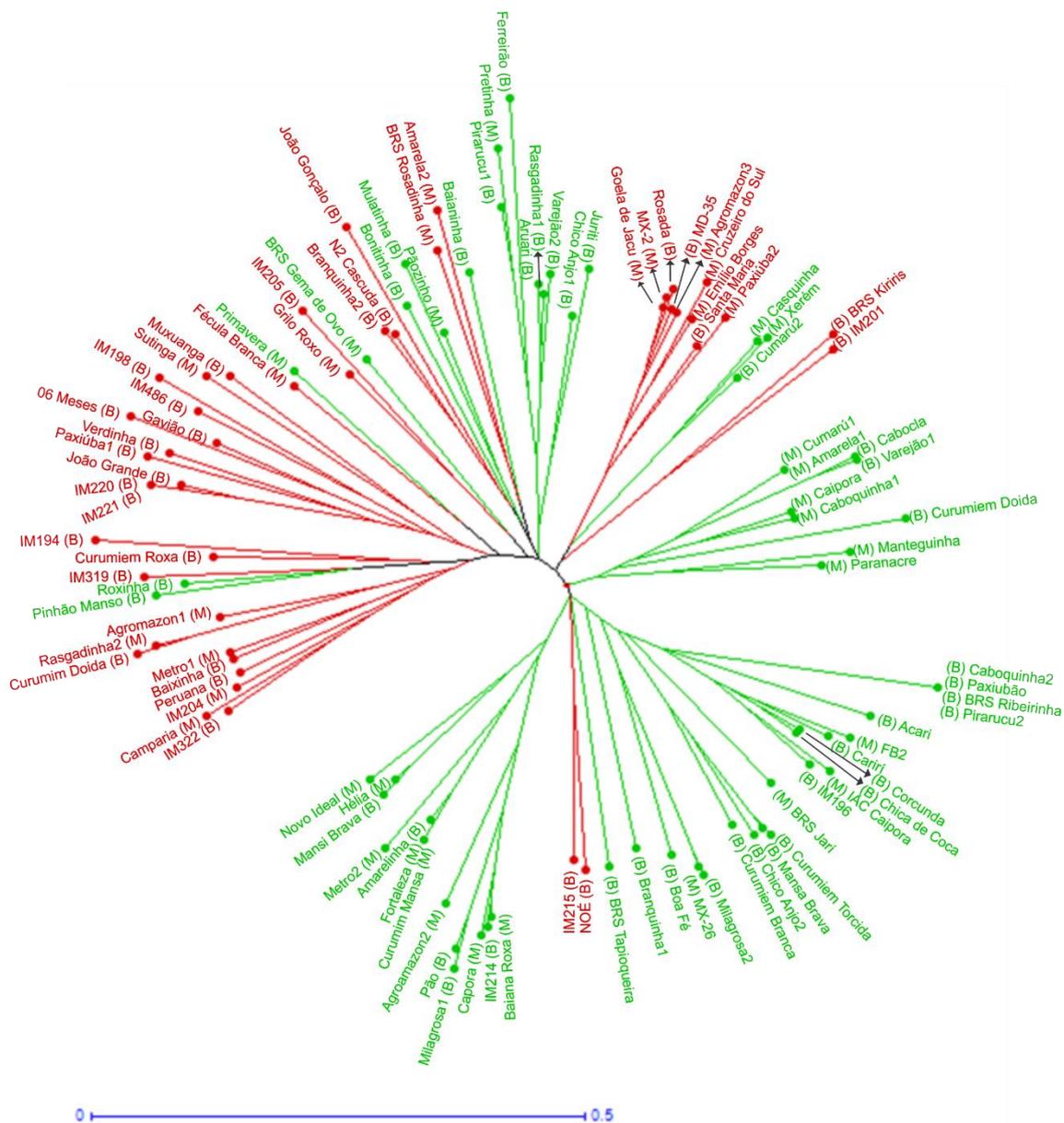


Figura 6 – Árvore *Neighbor-Joining* representando a relação genética entre 106 acessos de *M. esculenta*. As cores estão de acordo com a formação dos grupos gerados pelo programa STRUCTURE, considerando o K=2.

Comparando os dados da análise bayesiana apurada pelo programa STRUCTURE com a PCoA e a árvore de NJ, nota-se que a dispersão observada corroborou com a formação dos dois grupos identificados pela análise Bayesiana, enfatizando o agrupamento dos acessos redundantes e também não mostrando correspondência tanto com o conteúdo cianogênico dos acessos quanto com o local de coleta dos genótipos.

5.4 Coleção nuclear de *Manihot esculenta* Crantz

Os 84 alelos identificados podem ser encontrados em 30 indivíduos que representam a diversidade alélica total, sendo 28,30% dos acessos que constituem a coleção. Contudo, para o estabelecimento de uma coleção nuclear, esse percentual é considerado alto. Este subconjunto deve representar entre 70 a 80% da diversidade da coleção base com apenas 5 a 20% dos indivíduos (BROWN; SPILLANE, 1999). Logo, para identificar a coleção nuclear contendo 20,75% dos acessos da coleção base foram necessários 22 indivíduos representando 94% da diversidade alélica (Tabela 4). Destes, dez acessos foram agrupados no pool gênico (I), e 12 acessos foram alocados no pool gênico (II). Quanto ao conteúdo cianogênico dos indivíduos da coleção nuclear, 16 são de mandioca brava e 6 de mandioca mansa. A Figura 7 demonstra o número de acessos da coleção nuclear e a diversidade alélica representada neste subconjunto.

Tabela 4 – Identificação dos 22 acessos de *Manihot esculenta* para formação da coleção nuclear da coleção de mandioca da Embrapa Acre.

Nº	Variedade	Uso	Nº	Variedade	Uso
1	Bonitinha	B	12	Pão	B
2	Curumim Doida	B	13	BRS Jari	M
3	Chico Anjo2	B	14	Metro 2	M
4	Curumiem Doida	B	15	BRS Rosada	M
5	IM201	B	16	IM198	B
6	FB2	M	17	Ferreirão	B
7	Amarela2	M	18	Baixinha	B
8	IM205	B	19	Pinhão Manso	B
9	Caboquinha2	B	20	IM319	B
10	Paxiúba2	M	21	MX-26	M
11	IM215	B	22	Curumiem Torcida	B

* B = mandioca brava; M = mandioca mansa.

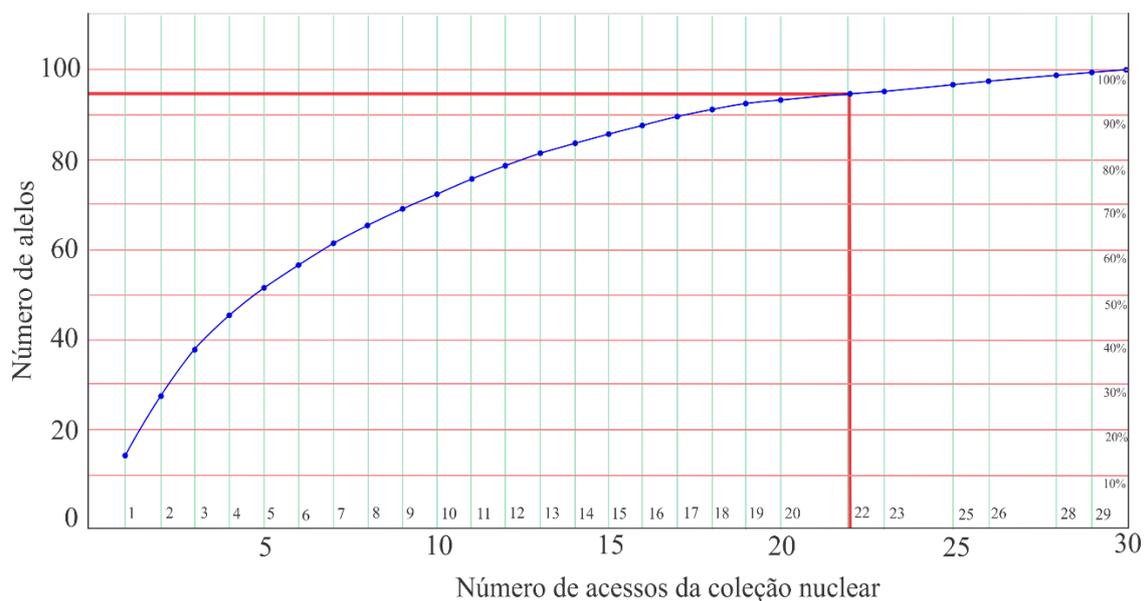


Figura 7 – Número total de acessos e porcentagem de alelos incluídos na coleção nuclear de mandioca.

A coleção nuclear sugerida neste estudo poderá auxiliar na garantia de preservação da variabilidade genética observada na coleção, assim como facilitar o acesso a informação genética contida nestes genótipos por parte de programas de melhoramento da mandioca.

Visto que a mandioca é uma cultura propagada vegetativamente e sua conservação na coleção situada na Embrapa Acre é mantida em condições de campo, a identificação das redundâncias poderão impactar nos custos para manutenção do germoplasma e na utilização destes acessos em programas de melhoramento, evitando os cruzamentos entre as duplicatas.

6. CONCLUSÃO

Os marcadores microssatélites utilizados nesta pesquisa foram eficientes para a caracterização da coleção de mandioca da Embrapa Acre. Conseguiram estimar a variabilidade genética entre 106 acessos, separar e agrupar variedades e propor uma coleção nuclear composta por 22 acessos de *M. esculenta*, caracterizando molecularmente todos os acessos de mandioca da coleção.

7. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, H. Y. G. **Diversidade genética e identificação de duplicatas de *Manihot esculenta* Crantz com base em marcadores *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP)**. 2017. 113 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2017.
- ALLEM, A. C. *Manihot esculenta* as a native of the neotropics. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 71, n. 1, p. 22-24, 1987.
- ALLEM, A. C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 41, n. 3, p. 133-150, 1994.
- ALLEM, A. C. A reappraisal on the geographical origin of cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1, 1997. Campinas, **Anais...** Campinas: IAC/Embrapa-CENARGEN, 1997. p. 86-87.
- ALLEM, A. C. et al. The primary gene pool of cassava (*Manihot esculenta* Crantz subspecies *esculenta*, Euphorbiaceae). **Euphytica**, v. 120, n. 1, p. 127–132, 2001.
- ALLEM, A. C. The origins and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R. J. et al. (Ed.). **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CAB International, 2002a. 352 p.
- ALVES, A. A. C. Cassava botany and physiology. In: HILLOCKS, R. J. et al. (Ed.). **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. 352 p.
- ALVES-PEREIRA, A. et al. Genetic structure of traditional varieties of bitter manioc in three soils in Central Amazonia. **Genetica**, v. 139, n. 10, p. 1259-1271, 2011.
- BEECHING, J. R. et al. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. **Annals of Botany**, v. 72, n. 6, p. 515-520, 1993.
- BEOVIDES, Y. et al. Molecular diversity of Cuban cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars assessed by simple sequences repeats (SSR). **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 19, n. 4, p. 364-377, 2015.
- BERGO, C. L. et al. Produtividade e teor de amido de sete genótipos de mandioca em diferentes épocas em Rio Branco, Acre. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA E CONGRESSO LATINO-AMERICANO E CARIBENHO DE MANDIOCA, 16, 2015, Foz do Iguaçu, **Anais...** PR: SBM, 2015.
- BERTRAM, R. B.; SCHAAL, B. A. Phylogeny of *Manihot* and evolution of cassava. **Cassava Biotechnology Network Newsletter**, v. 1, n. 1, p. 4-6, 1993.
- BONIERBALE, M. et al. Assessment of genetic diversity in *Manihot* species with AFLPs. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 2, n. 2, p. 139, 1997.

- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.
- BRADBURY, E. J. et al. Geographic differences in patterns of genetic differentiation among bitter and sweet manioc (*Manihot esculenta* subsp. *esculenta*; Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 5, p. 857-866, 2013.
- BRONDANI, C. Variação isoenzimática de três espécies do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae) relacionadas morfológicamente à mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 287–289, 1996.
- BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C. Implementing core collections principles procedures, progress, problems and promise. In: JOHNSON, R. C.; HODGKIN, T. (Ed.) **Core collections for today and tomorrow**. Roma: IPGRI, 1999. p. 1-9.
- CABRAL, B. L. R. et al. Isoenzymatic variability of cassava accessions from different regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 521-527, 2002.
- CABRAL, G. B. et al. Relationship analysis of closely related species to cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on microsatellite-primed PCR. In: CARVALHO, L. J. C. B. et al. (Ed.). **Proceedings of the Fourth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network**. Brasília: CBN, 2000. p. 36–50.
- CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2009. 532 p.
- CAMARGO, C. E. D. **Mandioca – “o pão caboclo”:** de alimento a combustível. São Paulo: Editora Ícone, 1985. 64 p.
- CARRASCO, N. F. et al. Growing cassava (*Manihot esculenta*) in Mato Grosso, Brazil: Genetic diversity conservation in small-scale agriculture. **Economic Botany**, v. 70, n. 1, p. 15-28, 2016.
- CEBALLOS, H.; CRUZ G. A. Taxonomía y morfología de la yuca. In: OSPINA, B.; CEBALLOS, H. (Ed.). **La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2002. 587 p.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. et al. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 3, p. 493-501, 1998.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. et al. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 3, p. 263-273, 1999.
- COCK J. H. Cassava. In: GOLDSWORTHY, P. R.; FISHER, N. M. (Ed.). **The Physiology of Tropical Field Crops**. Chichester: Jhon Wiley & Sons, 1984. 682 p.

- COLOMBO, C. et al. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 417–423, 2000a.
- COLOMBO, C. et al. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000b.
- COSTA, M. R. et al. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 158-164, 2003.
- COSTA, T. R. et al. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 1040-1048, 2013.
- CRAVO, M. S.; SOUZA, B. D. L. Produção mecanizada de mandioca e alternativas de consórcios. In: MODESTO JÚNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. (Ed.). **Cultura da mandioca**. Brasília: Embrapa, 2016. 260 p.
- CUEVAS, H. E. et al. Genomic characterization of a core set of the USDA-NPGS Ethiopian sorghum germplasm collection: implications for germplasm conservation, evaluation, and utilization in crop improvement. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2017.
- DUFOUR, D. L. Cyanide content of cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) cultivars used by Tukanoan indians in Northwest Amazonia. **Economic Botany**, v. 42, n. 2, p. 255-266, 1988.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361. 2012.
- ELIAS, M. et al. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, v. 85, n. 3, p. 219-230, 2000.
- ELIAS, M. et al. Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 8, p. 1895-1907, 2001.
- ELIAS, M. et al. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, v. 58, n. 2, p. 242-256, 2004.
- EMPERAIRE, L.; PERONI, N. Traditional management of agrobiodiversity in Brazil: a case study of manioc. **Human Ecology**, v. 35, n. 6, p. 761-768, 2007.
- EVANNO, G. et al. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611- 2620, 2005.

FAO, 2017. **Food Outlook: Biannual report on global food markets – November 2017**. Disponível em: < <http://www.fao.org> >. Acesso em: 3. jun. 2018.

FAO, 2018. **Food Outlook: Biannual report on global food markets – November 2018**. Disponível em: < <http://www.fao.org> >. Acesso em: 10. dez. 2018.

FERGUSON, M. E. et al. Identification, validation and high-throughput genotyping of transcribed gene SNPs in cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 4, p. 685-695, 2012a.

FERGUSON, M. et al. Molecular markers and their application to cassava breeding: Past, present and future. **Tropical Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. 95-109, 2012b.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa – Cenargen, 1998, 220 p.

FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos socioeconômicos da cultura da mandioca na região Norte. In: MODESTO JÚNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. (Ed.). **Cultura da mandioca**. Brasília: Embrapa, 2016. 260 p.

FREGENE, M. A. et al. Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 6, p. 1083-1093, 2003.

FUKUDA, W. M. G.; GUEVARA, C. L. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Ba, 1998, 67p. (Documentos, 78).

FUKUDA, W. M. G. Melhoramento de mandioca. In: BÓREM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 969 p.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. Melhoramento de mandioca no Brasil. In: CEREDA, M. P. (Ed.) **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 540 p.

GIBBONS, A. New view of early Amazonia. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1488–1490, 1990.

GOMES, C. N. et al. Divergência genética entre clones de mandioca estimada por meio de caracteres agronômicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 12, 2007. Paravaí, **Anais...** Paravaí: Revista Raízes e Amidos Tropicais (CERAT - UNESP), 2007.

GONÇALVES, T. M. et al. Genetic diversity and population structure of traditional sweet cassava accessions from Southern of Minas Gerais State, Brazil, using microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 346-358, 2017.

GOUESNARD, B. et al. MSTRAT: an algorithm for building germplasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. **Journal of Heredity**, v. 92, n. 1, p. 93–94. 2001.

- GROSS, B. L. et al. Identification of “duplicate” accessions within the USDA-ARS National plant germplasm system *Malus* collection. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 137, n. 5, p. 333–342, 2012.
- HERSHEY, C. H. Manihot genetic diversity. In: MEETING OF THE INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1, 1994. Cali, **Anais...** Cali: CIAT, 1994.
- HOISINGTON, D. et al. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. 2 ed. México: CIMMYT, 1994. 102 p.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2018. Disponível em: <<http://ibge.com.br>>. Acesso em: 7. jun. 2018.
- IRISH, B. M. et al. Microsatellite fingerprinting of the USDA-ARS tropical agriculture research station cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm collection. **Crop Science**, v. 50, n. 2, p. 656–667, 2010.
- JIANG, G. Molecular Markers. In: THOMAS, B.; MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (Ed.). **Encyclopedia of applied plant sciences**. 2 ed. Waltham: Academic Press, 2017. 1706 p.
- KAWUKI, R. S. et al. Identification, characterization and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding**, v. 23, p. 669-684, 2009.
- KAWUKI, R. S. et al. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces and cultivars from southern, eastern and central Africa. **Plant Genetic Resources**, v. 11, n. 2, p. 170-181, 2013.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LATHRAP, D.W. **The Upper Amazon**. London: Thames and Hudson, 1970. 256 p.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. 2001. GDA (Genetic Data Analysis): **Computer Program for the Analysis of Allelic Data**. Version 1.1, University of Connecticut, Storrs. Disponível em: <<http://phylogeny.uconn.edu/software/>> Acesso em: 27. Mai. 2018.
- MARTINS, P. S. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 53, p. 209-220, 2005.
- MBA, R. E. C. et al. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 1, p. 21-31, 2001.
- MEZETTE, T. F. et al. Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 510-518, 2013.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA): **A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3.** Northern Arizona University, Arizona, 1997.

MOURA, E. F. et al. Identification of duplicates of cassava accessions sampled on the North Region of Brazil using microsatellite markers. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 4, p. 461-468, 2013.

MOURA, E. F. et al. Molecular characterization of accessions of a rare genetic resource: sugary cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Brazilian Amazon. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, n. 4, p. 583-593, 2016.

MOURA, E. F.; FARIAS NETO, J. T. **Diferenciação genética entre variedades de mandioca com a mesma nomenclatura coletadas na Amazônia Brasileira.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 20 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 113).

MOURA-CUNHA, E. F. et al. Molecular characterization of “sweet” cassavas (*Manihot esculenta*) from a germplasm bank in Brazilian Eastern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 28-34, 2016.

MÜHLEN, G. S. et al. Genetic diversity and differentiation of Brazilian bitter and sweet manioc varieties (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) based on SSR molecular markers. **Tipiti: Journal of the Society for the Anthropology of Lowland South America**, v. 11, n. 2, p. 66-73, 2013.

OKOGBENIN, E. et al. An SSR-based molecular genetic map of cassava. **Euphytica**, v. 147, n. 3, p. 433-440, 2006.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, E. J. et al. Development of a cassava core collection based on single nucleotide polymorphism markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 6472-6485, 2014.

OLIVEIRA, M. V. C. et al. Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 170-176, 2012a.

OLIVEIRA, E. J. et al. Genome-wide selection in cassava. **Euphytica**, v. 187, n. 2, p. 263-276, 2012b.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, n. 10, p. 5586-5591, 1999.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 131-142, 2001.

- OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 517-526, 2004.
- ORTIZ, A. H. T. et al. Population structure and genetic diversity in sweet cassava cultivars from Paraná, Brazil. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, n. 6, p. 1153-1166, 2016.
- PARMAR, A. et al. Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. **Food Security**, v. 9, n. 5, p. 907-927, 2017.
- PERONI, N. et al. Molecular differentiation, diversity, and folk classification of “sweet” and “bitter” cassava (*Manihot esculenta*) in Caiçara and Caboclo management systems (Brazil). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 6, p. 1333-1349, 2007.
- PERRIER, X.; JACQUEMOUND-COLLET, J. P. 2006. **DARwin software**. Disponível em: <<http://www.darwin.cirad.fr/darwin>>. Acesso em: 02. Jun. 2018.
- POHL, J. E. *Plantarum Brasiliae icones et descriptiones*. Vindobonae: Antonii Strauss, 1827. 136 p.
- POLICRITI, A.; SGARRO, A. **CoreFinder v.1.1**. 2018. Disponível em: <<http://services.appliedgenomics.org/software/corecollections/>>. Acesso em: 05. Abr. 2019.
- PRITCHARD, J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959. 2000.
- RABBI, I. Y. et al. An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 2, p. 329-342, 2012.
- RABBI, I. Y. et al. Tracking crop varieties using genotyping-by-sequencing markers: a case study using cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **BioMed Central Genetics**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2015.
- RAJI, A. A. J. et al. Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 118-129, 2009.
- RESENDE, A. G. et al. Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). **Biochemical Genetics**, v. 38, n. 7, p. 203-216, 2000.
- RIBEIRO, M. N. O. et al. Genetic variability among cassava accessions based on SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 263-269, 2011.
- ROA, A. C. et al. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.
- ROGERS, D. J. Studies of *Manihot esculenta* Crantz and related species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 90, n. 1, p. 43-54, 1963.

ROGERS, D. J. Some botanical and ethnological considerations of *Manihot esculenta*. **Economic Botany**, v. 19, n. 4, p. 369-377, 1965.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. *Manihot Manihotoides (Euphorbiaceae)*. New York: Hafner, 1973. 272 p.

ROGERS, D. J.; FLEMING, H. S. A monograph of *Manihot esculenta* with an explanation of the taximetrics methods used. **Economic Botany**, v. 27, n. 1, p. 1-113, 1973.

SÁ, C. P.; ANDRADE, F. G.; ALMEIDA, N. F. **Fatores críticos que afetam a eficiência da cadeia produtiva da mandioca, nos municípios de Rio Branco e Cruzeiro do Sul**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 1997. 4 p. (Embrapa Acre. Comunicado técnico, 82).

SAMBATTI, J. B. M. et al. Folk taxonomy and evolutionary dynamics of cassava: a case study in Ubatuba, Brazil. **Economic Botany**, v. 55, n. 1, p. 93-105, 2001.

SCHAAL, B. A.; OLSEN, K. M. Gene genealogies and population variation in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 13, p. 7024–7029, 2000.

SCHLÖTTERER, C. The Evolution of molecular markers – just a matter of fashion?. **Nature Reviews**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SCHULMAN, A. H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, v. 158, n. 3, p. 313-321, 2007.

SEBRAE. **Selo de indicação geográfica da farinha de mandioca de Cruzeiro do Sul será entregue.** Disponível em: <<http://www.ac.agenciasebrae.com.br/sites/asn/uf/AC/selo-de-indicacao-geografica-da-farinha-de-mandioca-de-cruzeiro-do-sul-sera-entregue,51fc3a3a400210aRCRD>> Acesso em: 20. dez. 2017.

SILVA, F. A. C. et al. Contexto econômico e social da produção de farinha de mandioca na regional do Juruá, Acre. In: SOUZA, J. M. L. S. et al. (Ed.). **Indicação geográfica da farinha de mandioca de Cruzeiro do Sul, Acre**. Brasília: Embrapa, 2017. 160 p.

SILVA, L. E. B. et al. Aspectos gerais e peculiaridades sobre mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Diversitas**, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2018.

SILVA, M. J. et al. **Apontamento dos cursos: cultivo da mandioca e derivados**. Campo Grande: Gráfica GrafNews. 2001a. 100 p.

SILVA, R. M. et al. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 101-107, 2001b.

SILVA, R. S. et al. Genetic divergence among accessions of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) sampled in the Tapajós region, State of Pará, using agronomic characters and microsatellite markers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2989-3004, 2016.

SIQUEIRA, Marcos Vinícius Bohrer Monteiro. **Diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em áreas de Cerrado no Estado do Mato Grosso do Sul e de variedades comerciais por meio de marcadores microssatélites**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SIQUEIRA, M. V. B. M. et al. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 101-110, 2009.

SIQUEIRA, M. V. B. M. Microsatellite polymorphisms in cassava landraces from the Cerrado Biome, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 9-10, p. 879-895, 2010.

SIVIERO, A et al. Produtividade, teor de amido, matéria seca e resistência a podridão radicular de cultivares de mandioca do Acre. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13, 2009. Botucatu, **Anais...** Botucatu: UNESP, 2009.

SIVIERO, A.; SCHOTT, B. Caracterização botânica e agrônômica da coleção de mandioca da Embrapa Acre. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 7, n. 1, p. 31-41, 2011.

SOUSA, S. B. et al. Farmer variety exchange along Amazonian rivers influences the genetic structure of manioc maintained in a regional Brazilian GeneBank. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1 - 11, 2017.

SOUZA, J. M. L. et al. Potencial da IG da farinha de mandioca de Cruzeiro do Sul. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 1, p. 182-191, 2015.

SRAPHET, S. et al. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical Applied Genetics**, v. 122, n. 1, p. 1161-1170, 2011.

TANGPHATSORNRUANG, S. et al. Development of polymorphic markers from expressed sequence tags of *Manihot esculenta* Crantz. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 3, p. 682-685, 2008.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

TOVAR, E. et al. Diversity and genetic structure of cassava landraces and their wild relatives (*Manihot* spp.) in Colombia revealed by simple sequence repeats. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 14, n. 3, p. 200-210, 2016.

VALLE, T. L. et al. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 221-226, 2004.

VIEIRA, E. A. et al. Caracterização molecular e variabilidade genética de acessos elite de mandioca para fins industriais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2467-2471, 2010.

VIEIRA, E. A. et al. Characterization of sweet cassava accessions based on molecular, quantitative and qualitative data. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 232-240, 2011.

VIEIRA, E. A. et al. Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 567-582, 2013.

VIEIRA, M. L. C. et al. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

WHANKAEW, S. et al. A genome scan for quantitative trait loci affecting cyanogenic potential of cassava root in an outbred population. **BMC Genomics**, v. 12, p. 266-278, 2011.

WONG, H. L. et al. Customization of AFLP analysis for cassava varietal identification. **Phytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 919-924, 1999.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations, vol 4: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590 p.