

Utilização de marcadores microsatélites para avaliação da diversidade genética de variedades locais de mandioca

Use of microsatellite markers to evaluate the genetic diversity of local cassava landraces

Eliane Cristina Moreno de Pedri¹, Giovana Cuchi^{2*}, Auana Vicente Tiago³,
 Ana Aparecida Bandini Rossi⁴

¹Bióloga, Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede Bionorte, Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Alta Floresta, Mato Grosso; e-mail: elicmbio@gmail.com; ²Bióloga pela Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Alta Floresta, Mato Grosso; e-mail: giovana.cuchi@unemat.br; ³Bióloga, Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede Bionorte, Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Alta Floresta, Mato Grosso; e-mail: auanavt@gmail.com; ⁴Bióloga pela Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado, Alta Floresta, Mato Grosso; Doutora em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa; Professora Sênior da Universidade do Estado de Mato Grosso; e-mail: anabanrossi@unemat.br. *Autora correspondente

ARTIGO

Recebido: 27-03-2023
 Aprovado: 14-10-2023

Palavras-chave:

Manihot esculenta
 Simple Sequence Repeats
 Variabilidade genética

RESUMO

A mandioca é cultivada pelos agricultores familiares que conservam em suas propriedades variedades locais, atuando como mantenedores desse importante recurso genético. A diversidade genética existente para a espécie pode ser estimada por meio de marcadores moleculares microsatélites. Assim, objetivou-se realizar a caracterização molecular de quatro variedades locais de mandioca (Cacau Branca, Cacau Roxa, Cacau Amarela e Mandioca Pão) cultivadas por agricultores familiares no município de Apiacás-MT, utilizando marcadores microsatélites. Foram amostradas quatro variedades locais de mandioca, totalizando 40 indivíduos. O material foliar foi utilizado para a extração do DNA total e para as amplificações via PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Foram amplificados 67 alelos, sendo que os *loci* que amplificaram o maior e o menor número de alelos, foram SSR126 e SSR21, respectivamente. Dentre os alelos amplificados foram identificados 33 alelos raros (49%). Os valores médios de heterozigosidade observada (0,840) foram superiores aos valores de heterozigosidade esperada (0,643), refletindo em índices de fixação negativos. Dentre os *loci* testados, os que apresentaram valores de PIC acima de 0,5 foram: GA12; GA131; GA140; SSR127; SSR128; SSR126. O dendrograma formado pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA gerou cinco grupos genéticos que estão em concordância com a análise bayesiana. Sendo assim, foi observado que há diversidade genética entre as variedades locais cultivadas por agricultores familiares do município de Apiacás. Os indivíduos AP5 (Cacau Branca) e AP20 (Cacau Roxa) são os mais divergentes geneticamente entre o conjunto analisado e a variedade Mandioca pão está mais distante geneticamente das outras três variedades (Cacau Branca, Cacau Roxa, Cacau Amarela).

ABSTRACT

Key words:

Manihot esculenta
 Simple Sequence Repeats
 Genetic variability.

Cassava is cultivated by family farmers who preserve local landraces in their properties, acting as guardians of this genetic resource. The existing genetic diversity for the species can be estimated using microsatellite molecular markers. Thus, the objective was then to carry out the molecular characterization of four local varieties of cassava (Cacau Branca, Cacau Roxa, Cacau Amarela and Mandioca Pão) cultivated by family farmers in the municipality of Apiacás, Mato Grosso state, Brazil using microsatellite markers. Four local landraces of cassava were sampled, totaling 40 individuals. Leaf material was used for DNA extraction and PCR amplification. A total of 67 alleles were amplified, with SSR126 and SSR21 amplifying the highest and lowest number of alleles, respectively. Among the amplified alleles, 33 rare alleles (49%) were identified. The observed heterozygosity (0.840) was higher than the expected heterozygosity (0.643), reflecting negative fixation indices. *Loci* with PIC values above 0.5 were GA12, GA131, GA140, SSR127, SSR128, and SSR126. The dendrogram formed by the UPGMA hierarchical clustering generated five genetic clusters, which were in agreement with the Bayesian analysis. Thus, genetic diversity was observed among the local landraces cultivated in the family farmers' fields in the municipality of Apiacás. The AP5 and AP20 individuals are the most genetically divergent among the analyzed group, and the Mandioca pão landrace is the most genetically distant from the other three landraces.

INTRODUÇÃO

A espécie *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) popularmente conhecida como mandioca, macaxeira ou aipim é muito apreciada e utilizada tanto na alimentação humana quanto animal (DUARTE et al., 2016). O Brasil é considerado o principal centro de origem da mandioca e desde a sua colonização é o produto mais popular da alimentação brasileira (APOLINÁRIO, 2019). Segundo Rodrigues e Aguiar (2019) a domesticação da espécie foi realizada pelos povos originários amazônicos que, durante a colonização chegou a ser chamada de “pão dos trópicos”, sendo a farinha, seu principal produto, consumida por toda a população.

A espécie apresenta alguns nutrientes que são acumulados na raiz da planta, dentre eles os carboidratos e outros são acumulados nas folhas da planta, como as proteínas e vitaminas (BAYATA, 2019). Pelo fácil cultivo, adaptação edafoclimáticas e produtividade de raízes, a planta é cultivada mundialmente (TUMUHIMBISE et al., 2014).

No estado de Mato Grosso, os agricultores familiares cultivam e conservam variedades locais de mandioca atuando como mantenedores desse importante recurso genético pois, além de cultivar e conservar realizam a troca de manivas entre si, ampliando a variabilidade dos acervos (FIGUEREDO et al., 2019). A existência de variabilidade genética na espécie é essencial para a conservação, e monitorá-la é essencial nos estudos de diversidade. E essa diversidade genética da mandioca pode ser estimada por meio do emprego de marcadores moleculares.

Dentre as técnicas moleculares utilizadas para estimar a variabilidade genética entre e dentro de populações, estão os marcadores moleculares microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR). Esse tipo de marcador é abundante na maioria dos genomas, é codominante e multialélico, ou seja, altamente informativo (TURCHETTO, 2017; GRIFFITHS, 2022). Além disso, há estudos que comprovam sua eficiência na análise de amostras de mandioca utilizando tais marcadores (MOURA et al. 2016; OLIVEIRA et al., 2018; ASHA et al. 2019; TIAGO et al., 2020; MIRANDA et al., 2020; RONDON et al., 2023).

Diante disso, objetivou-se neste estudo realizar a caracterização molecular de variedades locais de mandioca, cultivadas por agricultores familiares no município de Apiacás-MT, utilizando marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Área de estudo

Para o estudo foram amostradas quatro variedades locais de mandioca (AP1-AP10: Cacau Branca, AP11 a AP20: Cacau Roxa; AP21 a AP30: Cacau Amarela; AP31 a AP40: Mandioca pão) cultivadas por agricultores familiares no município de Apiacás – MT, sendo coletadas folhas jovens de dez indivíduos de cada variedade no primeiro semestre do ano de 2016, totalizando 40 indivíduos. A pesquisa foi cadastrada na plataforma SisGen com o número AB35BA4.

Nas coletas, o material foliar foi inserido em microtubos de polipropileno (2 mL) contendo 1 mL de solução saturada NaCl-CTAB (tampão de carregamento = 70 g de NaCl, 3 g de CTAB, dissolvidos em 200 mL de água destilada e autoclavada) e, posteriormente, armazenados em geladeira (4 °C) no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) do Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional (CEPTAM), Universidade do Estado de

Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), campus de Alta Floresta, Mato Grosso.

Extração de DNA

Para a extração do DNA total seguiu-se o método CTAB (Brometo de Metil Trimetil Amônio), protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com as seguintes modificações: acréscimo de polivinilpirrolidona (PVP) na concentração de 1% e aumento nas concentrações de CTAB de 2 para 3% e de β -mercaptoetanol de 0,2% para 2% no tampão de extração.

Após a obtenção do DNA genômico, o mesmo foi quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop-2000 (Thermo Scientific) com o intuito de avaliar a quantidade e a pureza do material obtido. As amostras foram coradas com GelRed e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% a fim de analisar a qualidade visual do material extraído. O gel foi então fotografado e o material genético padronizado a aproximadamente 100 ng μL^{-1} e armazenado a -20 °C até posteriores análises.

Amplificação de DNA via PCR-SSR

Para a realização das amplificações via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram utilizados dez *loci* desenvolvidos por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e Mba et al. (2001). Foi adicionada a reação a cauda M13 de acordo com a metodologia de Schuelke (2000). As reações foram padronizadas em um volume final de 10 μL contendo: 2 μL de DNA; 0,2 μL de TAQ-Polimerase; 1 μL de Buffer (0,05% bromphenol blue, 40% sucrose, 0,1 M EDTA, pH 0,8 e 0,5% sodium laury sulfate); 0,8 μL de dNTP; 0,13 μL do iniciador F; 0,25 μL do R; 0,25 μL de calda M13 (HEX, 6-FAM) e 5,37 μL de H₂O Milli-Q.

As amplificações foram conduzidas em termociclador T100 “Thermal Cycler” BIO-RAD com o seguinte programa de amplificação: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 45 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, 8 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

A eficiência do processo de amplificação foi verificada antes da genotipagem através da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão de corrida TAE 5X, em voltagem de 100 v. O gel foi corado com GelRed, visualizado e fotografado em transiluminador L-PIX Image (Loccus Biotecnologia).

Genotipagem das amostras

As amostras foram enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo, São Paulo (USP) e genotipadas em sequenciador automático modelo ABI 3730 (Applied Biosystems). Foram utilizados dois diferentes tipos de fluorocromos [6-FAM (emite fluorescência azul) e HEX (verde)] combinados em sistema duplex.

A leitura no sequenciador automático gerou arquivos contendo os picos de eletroferogramas, que foram visualizados e analisados com auxílio do programa computacional GeneMarker v.2.6.3 (Demo).

Análise estatística

A diversidade genética entre as variedades locais foi estimada por meio do número de alelos (N_a) e a Heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os níveis de endogamia dentro das amostras foram quantificados pelo índice de fixação (f) de

acordo com o método de Weir e Cockerham (1984) e para verificar a eficiência dos *loci* utilizados foi calculado o valor do conteúdo de informação polimórfica (PIC) classificando-os entre altamente informativos (PIC > 0,5), razoavelmente informativos (0,25 < PIC < 0,5) e pouco informativos (PIC < 0,25), segundo Botstein (1980).

Para análises descritivas foi utilizado o programa Power Marker v.3.25 (LIU; MUSE, 2005), a matriz de distância genética de Nei (1983) e a frequência alélica, além da identificação de alelos raros. A matriz foi importada para o programa Genes (CRUZ, 2013) para a construção de um dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) e também para obter o CCC (Coeficiente de Correlação Cofenético).

O número de grupos genéticos (K) foi indicado por análise bayesiana, por meio do programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000). Para cada valor de K (K=4) foram realizadas 20 interações, com 200.000 “burnins” e 500.000 simulações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável, em relação aos propostos, foram utilizados os critérios de Pritchard e Wen (2004) e Evano et al. (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dez *loci* microssatélites utilizados amplificaram um total de 67 alelos, sendo que os *loci* que amplificaram o maior (12) e o menor (3) número de alelos, respectivamente, foram SSRY126 e SSRY21 (Tabela 1). Dentre os alelos amplificados foram identificados 33 alelos raros (49%), com uma variação de frequência entre 0,0125 a 0,0441. A identificação de alelos raros reforça a importância de aumentar a proteção da diversidade genética de uma espécie (MONTAGNA et al., 2012). Deste modo, destaca-se a necessidade de conservação das variedades estudadas, uma vez que os alelos raros podem

estar relacionados ao desenvolvimento de adaptações das variedades de mandioca a novos ambientes ou a resistência a doenças.

Os valores médios de heterozigosidade observada (0,840) foram superiores aos valores de heterozigosidade esperada (0,643), refletindo em índices de fixação negativos, confirmando a alta taxa de heterozigose e, conseqüentemente, baixo índice de endogamia (CRUZ et al., 2011). Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa, revelam a existência de diversidade genética entre e dentro das variedades estudadas, sendo informações relevantes para pesquisas futuras que visam o melhoramento genético e programas de conservação da espécie.

Dentre os *loci* testados os que apresentaram valores de PIC acima de 0,5 foram: GA12; GA131; GA140; SSRY27; SSRY28; SSRY126, sendo classificados como altamente informativos. Os demais *loci* (4) apresentaram-se como mediamente informativos. Ortiz et al. (2019) e Costa et al. (2013) em seus estudos com a espécie também encontraram valores de PIC acima de 0,5 para os *loci* GA12, GA140, GA131, SSRY27, SSRY28 e SSRY126, confirmando a eficiência dos *loci* testados na detecção do polimorfismo existente dentro da espécie.

Quanto a frequência de alelos observados, houve uma variação de 0,0125 (GA131) a 0,6923 (GA21) (Figura 1). O *locus* SSRY126, que amplificou o maior número de alelos, teve as frequências distribuídas entre 0,0147 e 0,3235, também foi o *locus* com o maior número de alelos raros (8) identificados. O *locus* com menor número de alelos observado (SSRY21) apresentou uma frequência alélica entre 0,0128 e 0,6923, sendo que dois alelos raros foram identificados por esse *locus*.

O dendrograma formado pelo método de agrupamento hierárquico inferiu na formação de cinco agrupamentos genéticos que foram denominados I, II, III, IV e V (Figura 2).

Tabela 1. Estatística descritiva por *loci* microssatélite (Número de alelos (Na); Heterozigosidade esperada (He); Heterozigosidade observada (Ho); Índice de fixação (f) e Conteúdo de informação polimórfica (PIC)).

<i>Locus</i>	Sequência (5' - 3')	Na	He	Ho	f	PIC
GA12	F: GATTCCTCTAGCAGTTAAGC R: CGATGATGCTCTTCGGAGGG	6	0,590	0,842	-0,415	0,509
GA21	F: GGCTTCATCATGGAAAACC R: CAATGCTTTACGGAAGAGCC	4	0,441	0,615	-0,385	0,364
GA131	F: TTCCAGAAAGACTTCCGTCCA R: CTCAACTACTGCACTGCACTC	11	0,812	0,850	-0,034	0,790
GA140	F: TTCAAGGAAGCCTTCAGCTC R: GAGCCACATCTACTCGACACC	7	0,775	0,485	0,387	0,744
SSRY8	F: AGTGGTTTGAGAAGACTGGTGA R: TTTCCAAAATGGAACCTCAAA	4	0,541	0,971	-0,791	0,435
SSRY21	F: CCTGCCACAATATTGAAATGG R: CAACAATTGGACTAAGCAGCA	3	0,524	1,000	-0,907	0,410
SSRY27	F: CCATGATTGTTAAGTGGCG R: CCATTGGAGAACTTGGCAAC	8	0,696	0,784	-0,113	0,656
SSRY28	F: TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG R: GCTGCGTGCAAAACTAAAAT	6	0,680	0,975	-0,423	0,620
SSRY35	F: GCAGTAAAACCATTCCTCCAA R: CTGATCAGCAGGATGCATGT	6	0,581	1,000	-0,714	0,493
SSRY126	F: AATGGATCATGTTCAATGTCTTC R: TTGAAATACGGCTCAAGCTC	12	0,792	0,882	-0,100	0,765
Média		6,7	0,643	0,840	-0,295	0,579

F= forward loco; R= reverse loco; pb = Pares de base.

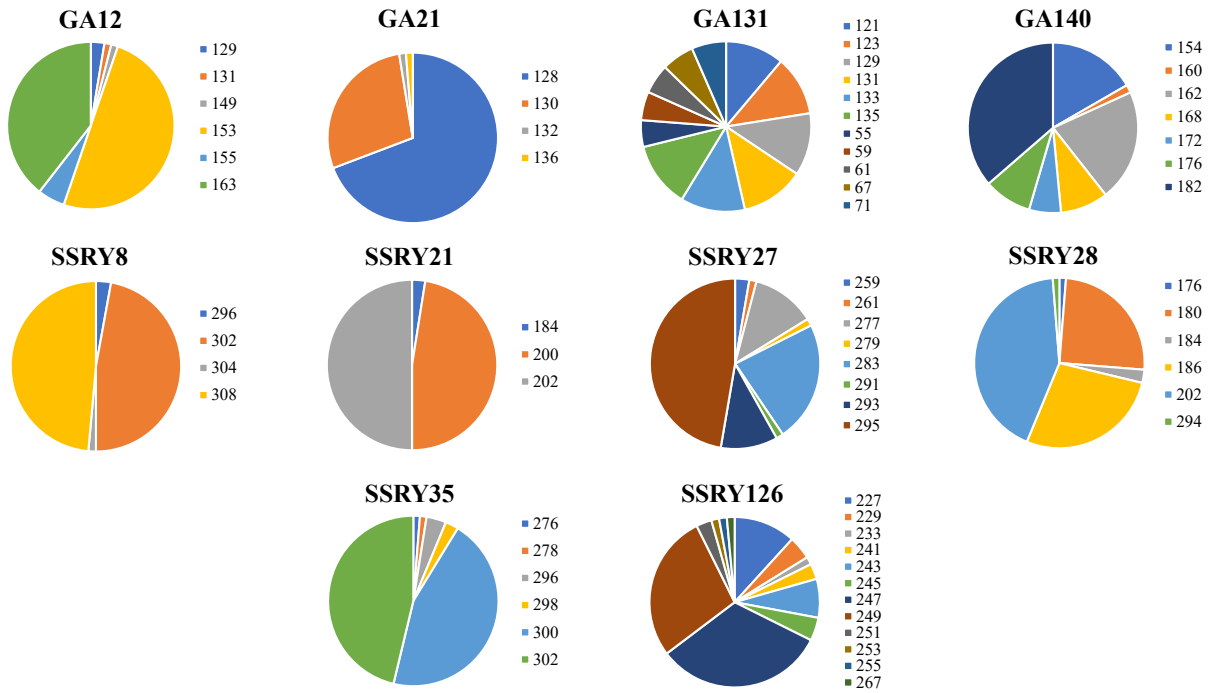


Figura 1. Representação das frequências alélicas dos dez *loci* microsatélites utilizados na análise de quatro variedades locais de mandioca cultivadas por agricultores familiares no município de Apicás – MT.

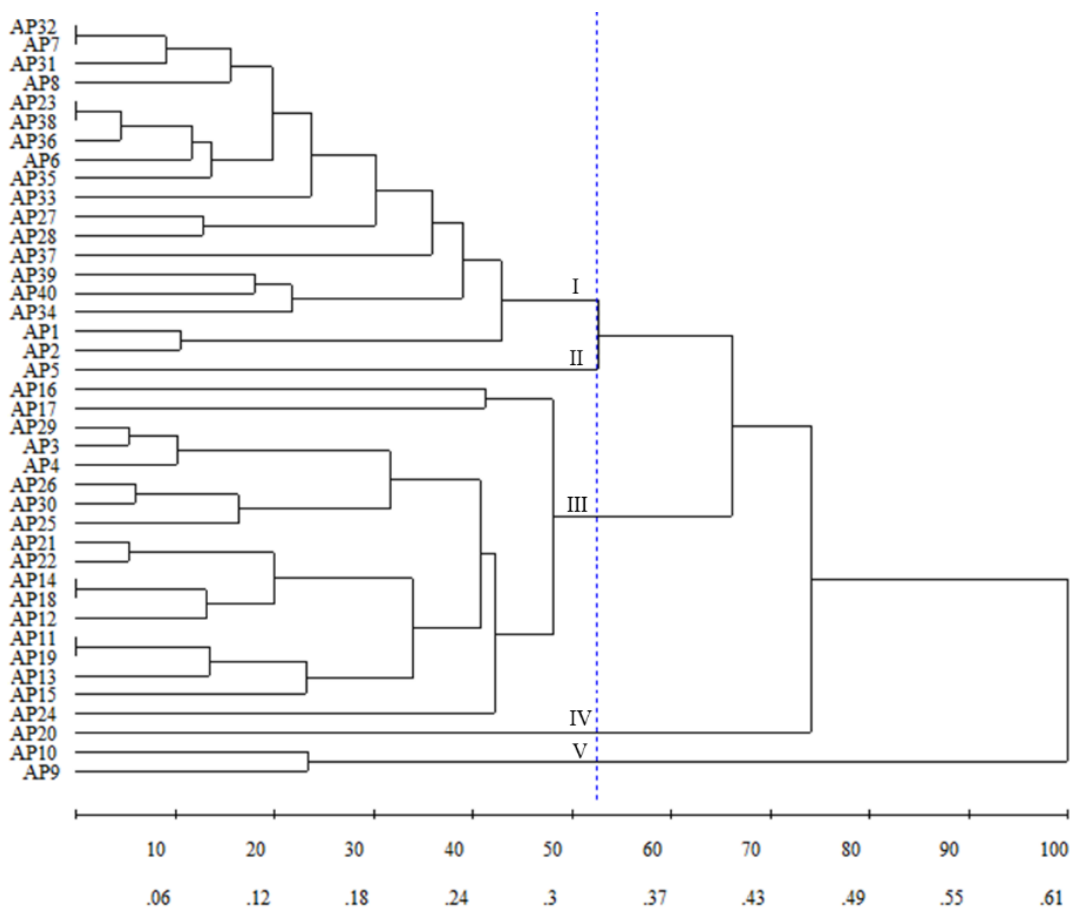


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA e complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade entre 40 indivíduos de *M. esculenta* com base em 10 *loci* microsatélite de variedades locais cultivadas por agricultores familiares no município de Apicás – MT. Ponto de corte = 52,40%. CCC = 0,866. Distorção (%) = 4,20. Estresse (%) = 20,48.

Os grupos I e III concentram a maior parte das variedades locais, sendo que o grupo I alocou indivíduos das quatro variedades amostradas. No grupo III estão as representantes das três variedades de Cacau (Cacau branca, Cacau roxa e Cacau amarela). O grupo V abriga indivíduos de uma variedade apenas, a Cacau branca (AP9 e AP10). E os grupos II e IV são formados por apenas uma variedade cada, sendo elas Cacau branca (AP5) e Cacau roxa (AP20), respectivamente.

No dendrograma há existência de duplicatas, sendo que duas dessas duplicações (AP14-AP18; AP11-AP19) foram de indivíduos da variedade Cacau. Nesse caso, a similaridade apresentada no dendrograma pode indicar que se tratam de indivíduos repetidos na amostra ou indivíduos aparentados, ou mesmo advindas do mesmo detentor e distribuída entre os agricultores da comunidade. Mediante este fato, ressaltamos a importância da disseminação das variedades entre os agricultores, fortalecendo a rede de circulação do material propagativo da mandioca, seja na mesma comunidade, região ou estado.

A análise bayesiana, dividiu os 40 indivíduos de mandioca em dois grupos genéticos ($K=2$) (Figura 3), vermelho e verde, sendo que o verde mantém a maioria dos indivíduos amostrados (55%) e esses correspondem a todas as quatro variedades locais. Observa-se que os indivíduos da variedade Mandioca não se reuniram apenas no grupo verde, mostrando, portanto, uma distância genética maior em relação as outras três variedades. Isso sugere que a variedade Mandioca não possui características genéticas distintas das outras três variedades, que estão mais intimamente relacionadas entre si, fazendo com que no agrupamento formado pela análise bayesiana quanto pelo método de agrupamento UPGMA, todos os indivíduos da variedade fiquem organizados em apenas um grupo. Porém, apesar desse isolamento nota-se a ocorrência de poucos ou alguns alelos compartilhados entre as variedades Cacau e Mandioca não pela permanência da cor vermelha entre o grupo verde e vice-versa.

A análise bayesiana e o dendrograma estão em concordância, visto que o agrupamento III é composto unicamente por indivíduos do grupo vermelho da análise bayesiana, e os demais indivíduos distribuídos entre os grupos I, II, IV e V são os mesmos encontrados no agrupamento verde.

Dentre os indivíduos observados, podemos destacar AP5 Cacau branca e AP20 Cacau roxa que, além de formarem agrupamentos individuais no método UPGMA, também estavam agrupadas no grupo verde da análise bayesiana. Mas, diferente da maioria, mostraram compartilhar informações de ambos os

agrupamentos, o que pode demonstrar serem uma combinação de ambos os grupos (vermelho e verde), diferenciando-as das demais.

Levando em consideração a organização dos grupos em relação as variedades locais, a Mandioca não se destaca por não ter indivíduos distribuídos em nenhum outro grupo além do grupo I (UPGMA) e verde (bayesiana). Isso indica a distância genética entre as variedades locais do agrupamento III (Cacau branca, Cacau roxa e Cacau amarela), que são todas exclusivas do grupo vermelho. Isso pode ser explicado devido a variedade em questão ser fenotipicamente diferente das demais.

Na etnobotânica, a nomenclatura das variedades pelos agricultores pode se basear segundo Tamaia (2021), na coloração do caule, a forma das folhas, o porte da planta e o padrão das ramificações, além de estarem associadas também às características culinárias e semelhanças com outras espécies, como é o caso das variedades do presente estudo. A escolha dos nomes das variedades locais é muito importante para que o produtor possa diferenciar e ter controle dos recursos genéticos que mantém em seus cultivos. Segundo Marchetti (2012) o conhecimento complexo sobre as variedades locais quando mantido pelos produtores rurais, permite evitar perdas desses recursos. Dentre os indivíduos analisados, os que se mostraram mais divergentes dentre os demais por estarem em agrupamentos individuais foram: AP9, AP10, AP5 e AP20, todos esses são variações da variedade Cacau. Essa variedade e suas variações (Cacau roxa, Cacau branca, Cacau amarela) são muito frequentes em estudos de diversidade (MARCHETTI, 2012; MARCHETTI et al., 2013; OLER; AMOROZO, 2017) e costumam se destacar dentre as demais como dominantes (SILVA et al., 2022) e mais dissimilares (WOLF et al., 2022).

Sendo assim, os dados mostram que há diversidade genética dentro de cada variedade, decorrente do processo

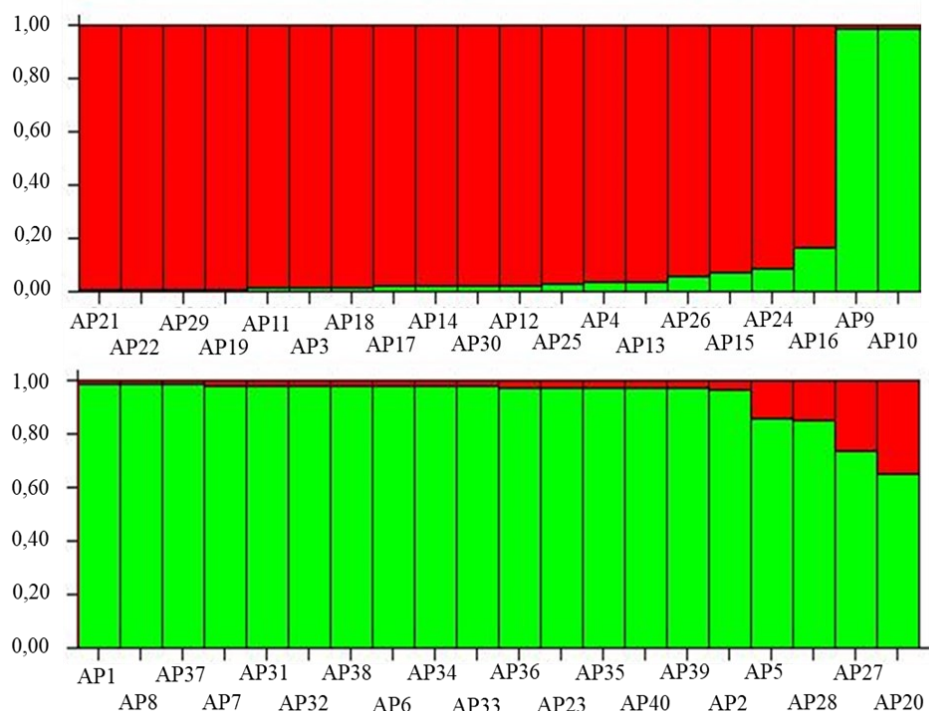


Figura 3. Agrupamento formado por 40 indivíduos de *M. esculenta* de variedades locais cultivadas por agricultores familiares no município de Apicás – MT segundo bases moleculares com dez *loci* microsatélites utilizando a análise bayesiana. $K=2$.

natural da mutação ou até mesmo resultado da seleção do agricultor a partir do cruzamento entre as variedades. Isso demonstra como os agricultores familiares têm participação essencial da preservação da diversidade e dos recursos genéticos que mantêm em seus cultivos, dentre eles, a mandioca, que é importante para sua subsistência.

CONCLUSÕES

Há diversidade genética entre e dentro dos indivíduos da mesma variedade, sendo a Mandioca Pão a mais distante geneticamente das outras três variedades (Cacau Branca, Cacau Roxa, Cacau Amarela).

Os marcadores microsatélites foram eficientes em detectar a diversidade genética existente entre os indivíduos de mandioca, sendo o *locus* SSRY126 o que apresentou mais informação polimórfica.

REFERÊNCIAS

- APOLINÁRIO, J. R. Sabores, saberes e o “pão dos trópicos”: contatos interétnicos entre indígenas e colonizadores a partir da circulação e uso da mandioca. *Patrimônio e Memória*, 15(1): 28-46, 2019.
- ASHA, K. I.; MARIA, V. A.; KOUNDINYA, A. V. V.; KRISHNAN, P. Molecular Profiling of Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Germplasm Using ISSR and SSR Markers. *Journal of Root Crops*, 45 (2): 24-32. 2019.
- BAYATA, A. Review on nutritional value of cassava for use as a Staple Food. *Science Journal of Analytical Chemistry*, 7(4): 83-91, 2019. [10.11648/j.sjac.20190704.12](https://doi.org/10.11648/j.sjac.20190704.12)
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314-331, 1980.
- BROWN, A. H. D.; WEIR, B. S. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.73-86, 1983.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 493-501, 1998. [10.1007/s001220050922](https://doi.org/10.1007/s001220050922)
- COSTA, T. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; GALVÁN, M. Z.; LACANALLO, G. F.; SILVA, L. I.; KVITSCHAL, M. V. Genetic diversity and population structure of sweet cassava using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, 12(10): 1040-1048, 2013. [10.5897/AJB12.2727](https://doi.org/10.5897/AJB12.2727)
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35(3): 271-276, 2013. [10.4025/actasciagron.v35i3.21251](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251)
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. 1ed. *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11-15, 1987.
- DUARTE, F. F.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; MALAQUIAS, J. V. Produtividade e valor nutricional da parte aérea e de raízes tuberosas de oito genótipos de mandioca de indústria. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 17(4): 1-12, 2016. [10.1590/S1519-9940201600010000](https://doi.org/10.1590/S1519-9940201600010000)
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611-2620, 2005. [10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x)
- FIGUEREDO, P. E.; TIAGO, A. V.; ZANETTI, G. T.; PINTO, J. M. A.; ROSSI, A. A. B.; HOOGERHEIDE, E. S. S. Diversidade genética de mandiocas na região periurbana de Sinop, Mato Grosso, Brasil. *Magistra*, 30: 143-153, 2019.
- GRIFFITHS, A. J. F.; DOEBLEY, J.; PEICHEL, C. 12ed. *Introdução à Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022, 768 p.
- LIU, K.; MUSE, S. V. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21: 21-29, 2005.
- MARCHETTI, F. F. Agricultura tradicional e a manutenção da agrobiodiversidade em comunidades rurais do município de Santo Antonio do Leverger - MT. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012, 99p.
- MARCHETTI, F. F.; MASSARO, L. R.; AMOROZO, M. C. D. M.; BUTTURI-GOMES, D. Maintenance of manioc diversity by traditional farmers in the state of Mato Grosso, Brazil: a 20-year comparison. *Economic botany*, 67(4): 313-323, 2013.
- MBA, R. E. C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; APEL, K.; GALE, M.; TOHME, J.; FREGENE, M. 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*, 102: 21-31, 2001. [10.1007/s001220051614](https://doi.org/10.1007/s001220051614)
- MIRANDA, K. M. C.; GUIMARÃES, R. A.; SILVA, M. J.; OLIVEIRA, P. R. O.; RIBEIRO, T. G.; MENDES, T. P.; TELLES, M. P. C.; SOARES, T. N. Cross-amplification and characterization of microsatellite markers in species of *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) endemic to the Brazilian Cerrado. *Acta Botanica Brasílica*, 34(4): 772-777, 2020. [10.1590/0102-33062019abb0374](https://doi.org/10.1590/0102-33062019abb0374)
- MONTAGNA, T.; FERREIRA, D.K.; STEINER, F.; FERNANDES, C. D.; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z.; MONTOVANI, A.; REIS, M. S. A Importância das Unidades de Conservação na Manutenção da Diversidade Genética de

- Xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado de Santa Catarina. Biodiversidade Brasileira, 2(2): 26-32, 2012.
- MOURA, E. F.; SOUSA, N. R.; MOURA, M. F.; DIAS, M. C.; SOUZA, E. D.; FARIAS NETO, J. T.; SAMPAIO, J. E. Molecular characterization of accessions of a rare genetic resource: sugary cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Brazilian Amazon. Genetic Resources and Crop Evolution, 63: 583-593, 2016. [10.1007/s10722-016-0378-z](https://doi.org/10.1007/s10722-016-0378-z)
- NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. Journal of Molecular Evolution, 19: 153-170, 1983.
- OLER, J. R. L.; AMOROZO, M. C. D. M. Etnobotânica e conservação *on farm* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na agricultura de pequena escala no Estado de Mato Grosso, Brasil. Interações, 18(4): 137-153, 2017. [10.20435/inter.v18i4.1600](https://doi.org/10.20435/inter.v18i4.1600)
- OLIVEIRA, P. H. G. A.; BARBOSA, A. C. O.; DINIZ, R. P.; OLIVEIRA, E. J.; FERREIRA, C. F. Molecular marker assisted selection for increasing inbreeding in S1 populations of cassava. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 90(4): 3853-3869, 2018. [10.1590/0001-3765201820180278](https://doi.org/10.1590/0001-3765201820180278)
- ORTIZ, A. H. T.; VIDIGAL FILHO, P. S.; ROCHA, V. P. C.; FERREIRA, R. C. U.; GONÇALVES, T. M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. Population structure and genetic diversity of sweet cassava accessions from the midwestern, southeastern and southern regions of Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, 62: (e19180556), 2019. [10.1590/1678-4324-2019180556](https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180556)
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959, 2000.
- PRITCHARD, J. K.; WEN, W. Documentation for structure software: Version 2. University of Chicago. 2004.
- RODRIGUES, A. F.; AGUIAR, J. O. Práticas agrícolas nas propriedades dos participantes da Inconfidência Mineira (Minas Gerais, comarca do Rio das Mortes, segunda metade do século XVIII). Patrimônio e Memória, 15(1): 114-133, 2019.
- RONDON, M. J.; TIAGO, A. V.; HOOGERHEIDE, E. S. S. On-farm conservation of cassava in Cuiabá, Mato Grosso state, Brazil: ethnobotanical aspects and genetic diversity. Pesquisa Agropecuária Tropical, 53: (e73659), 2023. [10.1590/1983-40632023v5373659](https://doi.org/10.1590/1983-40632023v5373659)
- SCHUELKE, M. Na economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18: 233-234, 2000.
- SILVA, M. C. M. DA; CORDEIRO, A. G. M.; TIAGO, A. V.; PEDRI, E. C. M.; ROSSI, A. A. B. Levantamento e caracterização fenotípica de etnovariedades de mandioca cultivadas em assentamentos rurais no estado de Mato Grosso, Brasil. Research, Society and Development, 11(7): e10211729731-e10211729731, 2022. [10.33448/rsd-v11i7.29731](https://doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29731)
- TAMAIA, C. C. Etnobotânica de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no bairro São Sebastião, em São Paulo de Olivença, Amazonas. Monografia, Universidade Federal do Amazonas, São Paulo de Olivença, 2021, 73p.
- TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B.; PEDRI, E. C. M.; ROSSI, F. S.; ROCHA, V. D.; LIMA, J. A.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; SANTOS, L. L.; CARDOSO, E. S.; SOUZA, S. A. M. Estrutura genética de mandiocas cultivadas na Amazônia norte-mato-grossense. In: OLIVEIRA JUNIOR, J. M. B.; CALVÃO, L. B. (Org.). Ciências biológicas: campo promissor em pesquisa 3. Ponta Grosso: Atena, 2020. 3(14): 169-179. [10.22533/at.ed.25720160114](https://doi.org/10.22533/at.ed.25720160114)
- TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. (2009). Caracterização molecular de raças e seu uso em conservação. Livestock Science, 120(3), p.174–195.
- TUMUHIMBISE, R.; MELIS, R.; SHANAHAN, P.; KAWUKI, R. Genotype x environment interaction effects on early fresh storage root yield and related traits in cassava. The Crop Journal, 2: 329-337, 2014. [10.1016/j.cj.2014.04.008](https://doi.org/10.1016/j.cj.2014.04.008)
- TURCHETTO, C.; ZOLET, A. C. T.; PASSAIA, G.; ZANELLA, C. M. Marcadores genéticos baseados em DNA. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. led. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017, p. 12-20.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the analysis of population Structure. Evolution, 38(6): 1358-1370, 1984.
- WOLF, M. S.; CUCHI, G.; PEDRI, E. C. M.; TIAGO, A. V.; SILVA, M. C. M.; ROSSI, A. A. B. Diversidade genética entre etnovariedades de mandioca por meio de marcadores ISSR. Conjecturas, 22(16): 532-546, 2022.