

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**ALEX HENRIQUE TIENE ORTIZ**

**Estrutura populacional e diversidade genética em cultivares tradicionais  
de mandioca-de-mesa do Paraná**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO - 2013**

**ALEX HENRIQUE TIENE ORTIZ**

**Estrutura populacional e diversidade genética em cultivares tradicionais  
de mandioca-de-mesa do Paraná**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Soares Vidigal Filho.

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
DEZEMBRO - 2013

Aos meus pais, Humberto Ortega Ortiz e Ana Maria Tiene Ortiz.  
À minha noiva, Mariana Aparecida Lopes.  
Aos meus familiares.  
Aos meus amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela perseverança, saúde e capacidade concedida para realização deste trabalho. Também por colocar sempre em meu caminho pessoas boas, competentes e solícitas para me ajudar.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM,) por fornecer estrutura e oportunidades únicas para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão Bolsa de Estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros fundamentais para o cumprimento de todas as tarefas referentes a este curso.

Ao professor doutor Pedro Soares Vidigal Filho, pelo apoio constante, firme orientação e aconselhamentos.

Às Coorientadoras, professora doutora Maria Celeste Gonçalves Vidigal e doutora Gisely Figueiredo Lacanallo, por todo o suporte para a conclusão deste trabalho.

À professora doutora Marta Zulema Galván, pela brilhante participação, a qual foi fundamental à realização deste trabalho.

A todos os professores envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento por fornecerem o conhecimento necessário aos trabalhos realizados.

Aos amigos Alberto Yuji Numoto, Antônio Augusto Nogueira Franco, Giseli Valentini, Gleberson Guillen Piccinin, Leandro Paiola Albrecht, Leonel Domingos Moiana, Lilian Gomes de Moraes Dan, Rafael Felipin Azevedo, Rebecca Caroline Ulbricht Ferreira, Ricardo Shigueru Okumura, Tiago Maretti Gonçalves, Vanesca Priscila Camargo Rocha, Vinicius Bovo Cortinove, entre tantos outros que tiveram participação direta em minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Ao professor doutor Odair José Marques, pelos aconselhamentos profissionais e pela grande amizade.

A todos os colaboradores da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), assim como do Núcleo de Pesquisa Aplicada a Agricultura (Nupagri), pela ajuda prestada.

## **BIOGRAFIA**

ALEX HENRIQUE TIENE ORTIZ, filho de Humberto Ortega Ortiz e de Ana Maria Tiene Ortiz, nasceu em 8 de dezembro de 1988, na cidade de Apucarana, estado do Paraná.

Sua vida escolar iniciou na mesma cidade, onde, de fevereiro de 1994 a dezembro de 1998, na Escola Municipal João Antônio Braga Cortes, cursou da pré-escola até a quarta série do Ensino Fundamental. Em 1999, ingressou no Colégio Estadual Nilo Cairo onde, em 2002, concluiu o Ensino Fundamental.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 2005, no Colégio Platão, na cidade de Apucarana, estado do Paraná.

Em 2006, ingressou no Curso de Agronomia, na Universidade Estadual de Maringá, Paraná, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em dezembro de 2010.

Em março de 2011, ingressou no curso de Mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Origem, evolução e domesticação da mandioca.....	4
2.2. Importância da cultura.....	6
2.3. Variabilidade genética.....	9
2.4. Melhoramento genético da mandioca.....	11
2.5. Marcadores moleculares.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. Coleta e plantio das cultivares tradicionais.....	19
3.2. Extração e quantificação de DNA.....	22
3.2.1. Extração do DNA.....	22
3.2.2. Quantificação, amplificação do DNA e eletroforese.....	22
3.3. Análises estatísticas.....	25
<b>4. A RESULTADOS E DICUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
4.1. Diversidade genética.....	27
4.2. Estrutura da população.....	38
4.3. Considerações finais.....	51
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>

## RESUMO

ORTIZ, Alex Henrique Tiene, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2013. **Estrutura populacional e diversidade genética em cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa do Estado do Paraná.** Professor orientador: Pedro Soares Vidigal Filho. Professores Conselheiros: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal e Gisely Figueiredo Lacanallo.

A mandioca-de-mesa é encontrada principalmente em pequenas áreas cultivadas pelos agricultores, denominadas cultivos de “fundo de quintal”. Em geral, é nesse sistema de cultivo que se encontra grande parte do germoplasma disponível da espécie, cujo potencial genético ainda foi pouco estudado. A avaliação da variabilidade presente em cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa pode ser realizada utilizando tanto marcadores morfoagronômicos quanto marcadores moleculares. O presente estudo teve por objetivos avaliar a estrutura populacional e a diversidade genética de cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa coletadas em lavouras de “fundo de quintal” nos municípios de Maringá, Cianorte e Toledo, no Estado do Paraná por meio de marcadores moleculares SSR. Na análise de diversidade genética realizada, todos os *loci* SSR analisados foram considerados polimórficos com uma média de 3,15 alelos por *locus*. O valor médio de PIC de 0,4598 indica que os *primers* foram em sua maioria medianamente informativos, sendo que os *loci* GA 126, GA 140, SSRY 13, SSRY 21, SSRY 45 e SSRY 101 foram considerados altamente informativos. Os valores de PIC variaram entre 0,5824 para GA 140 até 0,2646 para GA 21. Os *loci* SSR foram altamente heteróticos, propiciando a detecção de elevados índices de diversidade genética entre as cultivares. Os valores de heterozigosidade observada variaram entre 0,0270 (GA 134) e 0,8718 (SSRY 45), com uma média de 0,4762. Com relação à diversidade genética, a média obtida foi de 0,5407, variando de 0,3138 (GA 21) a 0,6502 (GA 140). As combinações mais divergentes foram: BGM 434T x BGM 20M, BGM 35C x BGM 20M, BGM 430T x BGM 232M, BGM 430T x BGM 164M, BGM 430T x BGM 322M e BGM 35C x BGM 164M. Entre essas são mais indicadas as combinações que utilizam a cultivar tradicional BGM 20M, por suas características agrônômicas de resistência à bacteriose e ao superalongamento, somadas à presença de floração nas condições de Maringá. A análise de estrutura populacional

revelou a ocorrência de 4 grupos entre as cultivares tradicionais dos três locais de coleta, observáveis pelo método probabilístico, pela Árvore do Vizinho mais Próximo e pela análise de PCoA. Pela dispersão dos pontos representativos de cada cultivar tradicional na análise de PCoA, foi possível observar a ampla diversidade genética entre as cultivares de mandioca-de-mesa. Na análise molecular de variância, foram determinados os parâmetros da estatística F de Wright. Observou-se uma variância estimada de 11% entre grupos, 15% entre indivíduos dentro de grupos e 74% entre indivíduos dentro da população como um todo. Os valores de  $F_{is}$  e  $F_{it}$  de 0,170 e 0,259 indicam um número de heterozigotos na população menor que o necessário para alcançar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto dentro de grupos como considerando todos os indivíduos. O valor de  $F_{st}$  de 0,107 indica uma diferenciação moderada entre os quatro grupos. A variabilidade genética encontrada entre as cultivares tradicionais de mandioca foi considerada ampla e os grupos que mais se distanciaram apresentaram em sua maioria cultivares de Toledo e de Maringá.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta*, diversidade genética, marcadores moleculares SSR.

## ABSTRACT

ORTIZ, Alex Henrique Tiene, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, february, 2013. **Populational structure and genetic diversity of sweet cassava accessions from Paraná.** Adviser: Pedro Soares Vidigal Filho. Committee Members: Maria Celeste Gonçalves-Vidigal and Gisely Figueiredo Lacanallo.

Sweet cassava can be found mainly in small farms named “backyard cultivations”. In general, these cultivation systems maintain most of the available germplasm of the species, which genetic potential has not been enough studied. The evaluation of genetic variability in sweet cassava landraces can be done using both morpho-agronomic markers based in phenotype and molecular markers based on DNA (genotype). The objectives of this study were to evaluate the populational structure and the genetic diversity of sweet cassava landraces collected in “backyard cultivations” in the cities of Maringá, Cianorte and Toledo, in Parana State by using SSR molecular markers. All the analyzed *loci* were considered polymorphic and the average of alleles per *locus* was 3.15. The mean value of PIC of 0.4598 indicates that the primers were mostly considered moderately informative although the *loci* GA 126, GA 140, SSRY 13, SSRY 21, SSRY 45 and SSRY 101 were considered highly informative. The PIC values ranged from 0.5824 for GA 140 to 0.2646 for GA 21. In general the SSR *loci* were highly heterotic and presented high indexes of genetic diversity. The values of observed heterozygosity ranged from 0.0270 for GA 127 to 0.8718 for SSRY 45 with an average of 0.4762. The mean value of genetic diversity was 0.5407 ranging from 0.3138 for GA 21 to 0.6502 to GA 140. The most divergent combinations were: BGM 434T x BGM 20M, BGM 35C x BGM 20M, BGM 430T x BGM 232M, BGM 430T x BGM 164M, BGM 430T x BGM 322M and BGM 35C x BGM 164M. From these combinations the most recommended ones are those involving the accession BGM 20M which presented positive agronomic traits as resistance to bacterial blight and superelongation combined with flowering under the weather conditions of Maringá. The analysis of population structure revealed the occurrence of 4 groups among the sweet cassava landraces of the three localities. These results could be observed in all the methods used, as in the probabilistic method, as in the PCoA and the Neighbor-joining tree. The graphic dispersion of the points representing each of the landraces in PCoA allowed to observe the broad

genetic diversity among the sweet cassava landraces. The parameters of Wright's F statistics were determined using the analysis of molecular variance. A variance of 11% among groups, 15% among individuals inside the groups and 74% among individuals in the whole population was observed. The  $F_{is}$  and  $F_{it}$  values, of 0.170 and 0.259 respectively, indicate a lack of heterozygotes in the population to reach the Hardy-Weinberg equilibrium, as inside groups as inside the whole population. The  $F_{st}$  value indicates a moderate differentiation among the groups. The genetic diversity among sweet cassava landraces was considered high, and the groups that diverged the most were consisted mainly of individuals from Toledo and Maringá.

**Keywords:** *Manihot esculenta*, genetic diversity, SSR markers.

## 1. INTRODUÇÃO

A mandioca pertence à família *Euphorbiaceae* e a espécie mais cultivada é *Manihot esculenta* Crantz, conhecida popularmente no Brasil como mandioca, macaxeira ou aipim (Nassar et al., 1986; Mühlen et al., 2000; Siqueira et al., 2009).

Cultivada no mundo nas latitudes de 30°N a 30°S, em locais com temperatura média superior a 18°C (Nassar e Ortiz, 2007), a mandioca é considerada a principal fonte de carboidratos para aproximadamente 1 bilhão de pessoas em 105 países e representa em torno de um terço das calorias diárias consumidas pelas populações nessas regiões (FAO, 2008).

Em relação à origem e à domesticação de *M. esculenta*, segundo Allem (1997), os estados de Goiás, Mato Grosso e Rondônia são os possíveis locais de domesticação da mandioca e Goiás é o principal centro de diversidade de espécies do gênero *Manihot* (Allem, 2002).

Há relatos da existência de uma grande diversidade genética de mandioca no Brasil, cultivada por pequenos agricultores, para o próprio consumo, tipo de cultivo chamado de “fundo de quintal” (Zuin et al., 2009). Esse tipo de cultivo “fundo de quintal” vem se extinguindo devido à migração do homem que habitava na zona rural para as cidades com a conseqüente diminuição da população rural de 54,9%, em 1960, para 15,6%, em 2010 (IBGE, 2010), e também com a expansão das grandes culturas, fazendo com que os grandes proprietários dominem as áreas antes ocupadas pela agricultura familiar (Serra, 2003).

As cultivares tradicionais de mandioca encontradas em cultivos de “fundo de quintal” até o momento foram pouco estudadas morfológicamente, assim como geneticamente (Zuin et al., 2009). Por meio de novos trabalhos sobre diversidade genética buscando cultivares tradicionais de mandioca em lavouras de pequenos agricultores (Zuin et al., 2009; Costa et al., 2013), as boas características agrônômicas, como boa produtividade, alto conteúdo de massa seca, arquitetura de planta adequada e com baixa incidência de bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*) e de superalongamento (*Sphaceloma manihoticola*), poderão ser utilizadas futuramente em programas de melhoramento (Rimoldi et al., 2010).

A etapa inicial de qualquer programa de melhoramento genético vegetal constitui-se da fase de coleta e caracterização do germoplasma disponível, caso o

melhorista ainda não disponha de recurso genético com ampla variabilidade (Farias et al., 1997). Tal fato é especialmente importante para a cultura da mandioca, em função da sua elevada diversidade genotípica natural existente (Elias et al., 2000a; Faraldo et al., 2000; Ribeiro et al., 2011).

Diante disso, a caracterização do germoplasma disponível, o conhecimento da estrutura populacional, bem como da divergência genética entre as cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa torna-se fundamental (Kawuki et al., 2009; Siqueira et al., 2009). Neste contexto, a biologia molecular tem fornecido ferramentas indispensáveis à caracterização de germoplasmas (Agarwal et al., 2008; Raji et al., 2009a).

No processo de caracterização de germoplasma podem ser utilizados marcadores morfoagronômicos (Raghu et al., 2007; Zuin et al., 2009; Rimoldi et al., 2010; Asare et al., 2011; Castro et al., 2012). Os marcadores morfológicos são oligo ou monogênicos, de alta herdabilidade e usualmente de fácil identificação, enquanto os descritores agronômicos são usualmente poligênicos (herança quantitativa) e de herdabilidade relativamente baixa (Bered et al., 1997; Kvitschal, 2008; Pereira et al., 2008).

A influência do meio ambiente sobre os marcadores morfoagronômicos e a necessidade de um avaliador treinado e de um estágio específico de desenvolvimento da planta dificultam e reduzem a eficiência de sua utilização (Chakravarthi e Naravaneni, 2006). Estes problemas podem ser contornados pela utilização de marcadores baseados em DNA que, além de permitirem a caracterização do germoplasma em estágios iniciais de desenvolvimento, são usualmente neutros e, assim, a seleção de plantas baseada em divergência por este tipo de marcadores não acarreta necessariamente a seleção de características indesejáveis, como ocorre com marcadores morfoagronômicos (Castro et al., 2012; Asare et al., 2011).

Entre os marcadores de DNA, destacam-se os microssatélites (SSR), que possuem um alto conteúdo informativo, permitindo a diferenciação entre homo e heterozigotos e estão abundantemente presentes no genoma da mandioca (Chavarriga-Aguirre et al., 1998; Raji et al., 2009a; Kalia et al., 2011).

O presente estudo teve por objetivos avaliar a estrutura populacional e a divergência genética de 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa coletadas

em áreas periurbanas dos municípios de Maringá, Cianorte e Toledo, estado do Paraná, mediante o emprego de marcadores moleculares microssatélites (SSR).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Origem, evolução e domesticação da mandioca

A mandioca é uma planta pertencente ao filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, à ordem *Malpighiales*, família *Euphorbiaceae*, gênero *Manihot* (Tantiado, 2012). A espécie mais cultivada no Brasil é *Manihot esculenta* Crantz, que no território brasileiro é conhecida popularmente como mandioca, macaxeira ou aipim (Nassar et al., 1986; Mühlen et al., 2000; Siqueira et al., 2009).

A família *Euphorbiaceae* é composta por aproximadamente 7.300 espécies (Thakur e Patil, 2012) e, no gênero *Manihot*, estão classificadas em torno de 98 delas (Rogers e Appan, 1973). A espécie *M. esculenta* é a que apresenta maior importância econômica dentro deste gênero, uma vez que ela é utilizada tanto para o consumo *in natura* na alimentação humana e animal quanto na indústria, na produção de farinha e fécula. Os produtos do processamento industrial da mandioca podem ser utilizados na produção de amido para consumo humano ou para indústria têxtil, química e farmacêutica (Leonel et al., 2002).

Uma análise citogenética realizada por Carvalho e Guerra (2002) com 39 cultivares de mandioca e oito parentais silvestres, revelou a presença de  $n=18$  ou  $2n=36$  cromossomos, constando uma forte similaridade cariotípica entre as espécies, o que pode justificar um elevado pareamento meiótico e a viabilidade do pólen em híbridos interespecíficos. A mandioca é uma planta diplóide, embora alguns autores a considerem como um alotetraplóide (Nassar, 2004).

Segundo Allem (2002), quanto à origem de uma cultura, temos que considerar o local (origem geográfica), a espécie ancestral (origem botânica) e onde ela foi primeiramente cultivada (origem agrícola).

A mandioca é considerada uma planta nativa do Brasil e a espécie *Manihot esculenta* Crantz foi situada por Vavilov (1951) no centro de origem Brasil-Paraguaio. Por sua vez, Nassar (1978) estudou a diversidade da mandioca e concluiu que a distribuição da espécie está localizada em quatro centros de diversidade, ou seja, o Sudoeste do México, o Nordeste, o Centro (Sul de Goiás e Oeste de Minas Gerais) e o Oeste do Brasil (Sul do Mato Grosso e Parte da Bolívia).

O Estado de Goiás é o centro primário de diversidade de espécies do gênero *Manihot* no Brasil (Nassar, 1978). Uma única espécie pertencente ao gênero *Manihotoides* com características primitivas mais próximas do gênero *Manihot*, *Manihotoides pauciflora*, é considerada a provável genitora das espécies silvestres de mandioca (Nassar et al., 2008).

De acordo com Allem (1999), o mais provável ancestral silvestre de *M. esculenta* Crantz é *M. esculenta* ssp. *flabelifolia*, que tem como espécie mais aparentada *Manihot pruinosa*, a qual ocorre exclusivamente em Goiás e no Mato Grosso (Allem, 2002). Para Nassar et al. (2008) a mandioca cultivada foi domesticada a partir de um híbrido entre duas espécies de mandiocas silvestres, sendo provavelmente *M. pilosa* uma delas, e o desenvolvimento de raízes maiores se deu a partir dessa hibridação interespecífica.

Estudos por meio de marcadores SSR, realizados por Olsen e Schaal (2001) efetuados com cultivares de mandioca cultivada e silvestre, demonstraram que a variabilidade genética presente entre elas é moderadamente elevada e *M. pruinosa* não foi considerada um parental da mandioca cultivada. O trabalho realizado por Olsen (2004), utilizando marcadores SSR e SNP (*Single nucleotide polymorphisms*), *Manihot esculenta* ssp. *Flabellifolia*, demonstrou ser o parental silvestre da mandioca cultivada, uma vez que compartilha quase toda a variabilidade genética encontrada em *M. esculenta* Crantz.

Segundo Meyer et al. (2012), a domesticação é o processo contínuo de transformação das características genéticas da planta em benefício do homem, podendo tornar a planta inapta à sobrevivência no meio ambiente. Deste modo, em uma abordagem sobre o centro de origem agrícola da cultura da mandioca, estima-se que sua domesticação tenha tido início entre 5.000 e 7.000 a.C. (Allem, 2002). Diversos trabalhos baseados em levantamentos e coletas de acessos silvestres de mandioca, assim como em registros arqueológicos, indicam possíveis locais de ocorrência dessa domesticação (Schmidt, 1951; Nassar, 1978; Allem, 1994, 1997; Olsen e Schaal, 1999; Allem, 2002).

Segundo Allem (1997), o sítio de domesticação da cultura da mandioca se deu nos estados de Goiás, Mato Grosso e Rondônia, ideia compartilhada parcialmente por Olsen e Schaal (1999), que citavam apenas Mato Grosso e Rondônia como sendo os possíveis locais. Entretanto, há estudos de Schmidt

(1951) que citam a região norte da Amazônia, entre os estados do Amapá e do Pará, como possível local de domesticação, em decorrência da ação das tribos indígenas Arawak.

A ação dos indígenas Arawak também é citada por Nassar (1978), reforçando os resultados de Schmidt (1951) e afirmando a importância das migrações desta tribo para a América Central, cruzando o Caribe, onde possíveis hibridações entre as cultivares tradicionais levadas pelos nativos, juntamente com espécies locais silvestres, possam ter originado o centro de diversidade do México.

Deste modo, conforme Nassar (2002), a domesticação da cultura da mandioca pode estar ligada à formação de híbridos interespecíficos mantidos pelas populações indígenas por propagação vegetativa. Este fato pode ser comprovado pela existência de diversos trabalhos, reportando a formação de híbridos entre *M. esculenta* e espécies locais, que sugerem barreiras fracas à fecundação entre espécies do gênero (Nassar, 1980, 1986, 1992).

## **2.2. Importância da cultura**

A mandioca tem sido uma importante fonte nutricional presente nos países em desenvolvimento, localizados principalmente na África Subsaariana, Ásia e algumas regiões da América Latina (El-Sharkawy, 2004; Nassar, 2004; Siritunga e Sayre, 2004; Nassar e Hashimoto, 2006). O cultivo desta espécie está conectado diretamente à sua elevada tolerância à seca, à sensibilidade dos estômatos das plantas e às variações no potencial hídrico do ar e do solo (El-Sharkawy, 2004). Esta tolerância ao déficit hídrico pode ser comparada à de gramíneas C4, como o sorgo, porém a mandioca apresenta maior eficiência, uma vez que seu índice de colheita e unidades de massa seca, produzidas por unidade de água transpirada, muitas vezes, excedem esta poácea (El-Sharkawy, 2004). Além disso, a mandioca é adaptada a condições de solos ácidos, com baixa aplicação de insumos, nas quais a maioria das espécies de importância não prosperaria. Este contexto torna a cultura importante para a segurança alimentar para as populações de países em desenvolvimento em regiões tropicais (El-Sharkawy, 2004; Chávez et al., 2005; Sherif e Nassar, 2010).

Somando-se à sua adaptação as condições de déficit hídrico, a mandioca é cultivada em função de sua elevada eficiência em acúmulo de carboidratos em suas

raízes tuberosas, excedida apenas pela da cana-de-açúcar, e gira em torno de 250 kcal ha<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (Balagopalan et al., 1988).

Além da exploração das raízes tuberosas em função do amido acumulado, a parte aérea da planta de mandioca apresenta um elevado potencial em termos de sua composição proteica, sais minerais e vitaminas (Modesti et al., 2007). Em avaliações do teor de proteína bruta de folhas de mandioca, Sagrilo et al. (2003) observaram variações entre 24 e 36%; Modesto et al. (2004) encontraram valores entre 20,7 e 38,4%; Nassar e Marques (2006) encontraram valores entre 22,73 e 32,58%.

Apesar dos níveis relativamente elevados de proteínas nas folhas, as mesmas são pouco aproveitadas na alimentação humana devido à baixa digestibilidade decorrente do alto teor de compostos fenólicos (Modesti et al., 2007) e principalmente à presença de glicosídeos cianogênicos, que podem estar em concentrações até seis vezes mais elevadas nas folhas em relação às raízes (Yeoh e Chaw, 1976; Nassar e Marques, 2006). Deste modo, a parte aérea da planta de mandioca tem importância principalmente como forrageira (Balagopalan, 2002), desde que corretamente administrada.

Assim, de acordo com os teores de glicosídeos cianogênicos presentes em suas raízes tuberosas, as cultivares de *M. esculenta* podem ser classificadas em mandioca mansa (mandioca-de-mesa) e brava. A mandioca mansa apresenta, em sua maioria, concentrações aceitáveis (abaixo de 100 mg kg<sup>-1</sup> de polpa crua) de glicosídeos cianogênicos (Siritunga e Sayre, 2004; Valle et al., 2004; Kizito et al., 2007). Por outro lado, a mandioca brava apresenta concentração de glicosídeos cianogênicos acima de 100 mg kg<sup>-1</sup> de polpa crua, o que a torna inadequada para o consumo *in natura* humano (Lorenzi e Dias, 1993; Zuin et al, 2009).

As mandiocas-de-mesa são usualmente mais precoces, levando entre 6 e 9 meses para que suas raízes tuberosas estejam em ponto de colheita e são utilizadas principalmente no consumo *in natura* (Nassar e Ortiz, 2007). As cultivares bravas, usualmente, levam entre 12 e 18 meses, mas, apesar disso, apresentam maior tolerância a longos períodos no solo se não colhidas, possibilitando maior período para acúmulo de massa seca (Nassar e Ortiz, 2007). Deste modo, as cultivares de mandioca utilizadas para fins industriais devem preferencialmente ser classificadas como mandiocas bravas, pois os glicosídeos cianogênicos aumentam a resistência das plantas a adversidades, tais como a herbivoria (Siritunga e Sayre,

2004), e podem ser facilmente eliminados por processos tradicionais (lavagem, moagem, secagem, cozimento, etc.) ou industriais (El-Sharkawy, 2004; Siritunga e Sayre, 2004; Chávez et al., 2005) .

O consumo *per capita* de raízes tuberosas de mandioca *in natura* por todo o Brasil é em média de 6,1 g dia<sup>-1</sup>. No Centro-Oeste do país é onde se consome mais mandioca *in natura*, cerca de 11,5 g dia<sup>-1</sup>; no Sul 7,9 g dia<sup>-1</sup>; no Norte 7,7 g dia<sup>-1</sup>; no Nordeste 7,0 g dia<sup>-1</sup>; no Sudeste 3,8 g dia<sup>-1</sup>. Por sua vez, o consumo da farinha de mandioca no Brasil é em média de 7,1 g dia<sup>-1</sup>, no Norte 46,2 g dia<sup>-1</sup>, no Nordeste 11,5 g dia<sup>-1</sup>, no Sudeste 0,8 g dia<sup>-1</sup>, no Sul 0,2 g dia<sup>-1</sup>; e no Centro-Oeste 0,5 g dia<sup>-1</sup> (IBGE, 2011).

No mundo, cerca de 80 países cultivam mandioca, sendo que o Brasil participa com mais de 15% da produção mundial. A produção mundial de raízes tuberosas de mandioca é de aproximadamente 233,8 milhões de toneladas, com produtividade média de 12,36 t ha<sup>-1</sup> (FAO, 2011). O maior produtor mundial é a Nigéria, com produção de 36,8 milhões de toneladas e produtividade de 11,77 t ha<sup>-1</sup>. Já o Brasil, terceiro maior produtor mundial, com uma produção de 24,4 milhões de toneladas, apresenta produtividade média de 13,86 t ha<sup>-1</sup> (FAO, 2011).

No ano agrícola de 2011/2012, as regiões brasileiras que mais produziram mandioca foram Norte e Nordeste. A produção do Nordeste brasileiro foi de 8,5 milhões de toneladas, com produtividade de 11.017 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto, no Norte, a produção foi de 7,6 milhões de toneladas, com produtividade média de 15.317 kg ha<sup>-1</sup>. A região Sul, por sua vez, obteve produção de 5,9 milhões de toneladas, com produtividade de 20.034 kg ha<sup>-1</sup> (Groxko, 2012).

Conforme Groxko (2012), os principais estados brasileiros produtores de mandioca são o Pará (17,7%), o Paraná (15,8%) e a Bahia (12,9%). No Estado do Paraná, na safra 2011/2012, foram cultivados 186 mil ha de mandioca, com uma produção de 4,1 milhões de toneladas de raízes tuberosas e uma produtividade média de 22.113 kg ha<sup>-1</sup> (Groxko, 2012).

Cabe ressaltar que os dados estatísticos de produção e produtividade de raízes tuberosas de mandioca, principalmente no Brasil, referem-se ao uso industrial para farinha e amido. Não existem disponíveis dados estatísticos confiáveis de produção e produtividade de mandioca-de-mesa. Entretanto, sabe-se que o consumo tem sido crescente (Vieira et al., 2009).

### 2.3. Variabilidade genética

Estudos de Faraldo et al. (2000) sobre avaliação da diversidade genética de cultivares coletadas no litoral de São Paulo e na região Amazônica, por meio de marcadores isoenzimáticos, verificaram ampla variabilidade entre os acessos de ambas as regiões. Ampla variabilidade também foi encontrada por Resende et al. (2000), Kvitschal (2008), Zuin et al. (2009) e Costa et al. (2013) em trabalhos realizados com cultivares tradicionais do Estado do Paraná, concordando com Nassar (1978) que citava a ampla variabilidade genética encontrada na cultura da mandioca.

Grande parte da diversidade genética presente na cultura da mandioca-de-mesa encontra-se em cultivos familiares tradicionais denominados áreas de “fundo de quintal”. O crescente processo de urbanização que vem ocorrendo em muitos municípios tradicionalmente agrícolas ocasiona a eliminação de muitas dessas áreas. Tal fato tem ocorrido no Estado do Paraná, resultando em erosão genética no germoplasma tradicional de mandioca-de-mesa (Kvitschal, 2008; Zuin et al., 2009). A diminuição das lavouras de “fundo de quintal” pode ocasionar a perda de polimorfismo pela eliminação de alelos, principalmente de baixa frequência na população, mesmo sendo vantajosos, ocasionando perda de capacidade de adaptação (Treuren et al., 1991). Este germoplasma, de potencial genético ainda pouco estudado, precisa ser coletado, armazenado e avaliado no que tange ao potencial produtivo e às suas qualidades organolépticas, de forma que o mesmo possa vir a ser utilizado pelos agricultores e, principalmente, por programas de melhoramento (Zuin et al., 2009).

As variações genotípicas são todas aquelas que envolvem o genoma do indivíduo, podendo ser herdadas por seus descendentes, alterando ou não seu fenótipo (Carvalho et al., 2011). Eventos naturais, como mutações, recombinações e alterações cromossômicas; e artificiais, como tecnologia de DNA recombinante e mutações somaclonais em culturas de células ou embriões, podem ocasionar o surgimento de novos alelos em um indivíduo (Paterniani, 2002; Carvalho et al., 2011).

Todos estes processos geradores de variabilidade genética são fundamentais para a persistência das espécies na natureza, pois ampliam suas bases genéticas, tornando-as mais adaptáveis a diferentes condições (Reed e

Frankham, 2003). Desse modo, é fundamental que se conheça o quanto de variabilidade existe dentro do genoma de uma espécie, para que se conheçam quais medidas necessárias de conservação de seu germoplasma (Petit et al., 1998; Reed e Frankham, 2003), assim como qual o potencial de uso de sua base genética no melhoramento.

A quantificação da diversidade genética em um grupo de indivíduos pode ser realizada de duas formas (Cruz e Regazzi, 2001). A primeira, denominada Análise de Divergência por Modelos Biométricos, realiza-se analisando características específicas dos genitores por meio do híbrido obtido entre eles. A segunda forma utilizada no presente estudo é denominada Métodos Preditivos (Cruz e Regazzi, 2001). Estes métodos consideram apenas as variações morfológicas, fisiológicas e moleculares que ocorrem nos próprios indivíduos de interesse, dispensando a realização de qualquer cruzamento *a priori* (Cruz e Regazzi, 2001; Carvalho et al., 2003). Justamente por dispensarem a realização desses cruzamentos, eles se tornam muito interessantes na avaliação de distância genética entre indivíduos de uma mesma espécie, principalmente quando se tem uma grande população (Carvalho et al., 2003).

Várias são as metodologias utilizadas para a determinação da distância genética entre indivíduos. Existe por exemplo a metodologia denominada distância generalizada de Mahalanobis (1936), utilizada em diversos estudos baseados em marcadores morfoagronômicos (Sarawat et al., 1994; Chen e Nelson, 2004; Elias et al., 2007; Rimoldi et al., 2010). Existe também a distância Euclidiana, de maior aplicabilidade em estudos tanto com marcadores morfoagronômicos como moleculares (Genet et al., 2005; Nagella et al., 2008; Zuin et al., 2009; Asare et al., 2011).

Neste trabalho foi utilizada a distância de C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967), dada pela equação:

$$D_{ch} = \frac{2}{\pi} \sqrt{2 \left( 1 - \sum_u \sqrt{X_u \cdot Y_u} \right)}$$

Onde:

$D_{ch}$ = Distância C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1976)

$X_u$ = Frequência do u-ésimo alelo da população 1

$Y_u$ = Frequência do u-ésimo alelo na população 2

Conceitualmente, nesta metodologia, as diferentes populações são dadas por pontos distribuídos por um espaço euclidiano com  $m$  dimensões, sendo  $m$  o total de alelos em todas as populações. As distâncias são dadas pelos ângulos entre os pontos considerados (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967). Em se tomando uma única população, a distância é dada entre grupos dentro da mesma.

No estudo da estrutura populacional, podem ser utilizados modelos probabilísticos que visam a agrupar os indivíduos em um número  $K$  de grupos, usualmente com alta precisão (Pritchard et al., 2000). Tem sido utilizados métodos principalmente baseados na Máxima Verossimilhança (Evanno et al., 2005; Ronfort et al., 2006; Efombagn et al., 2009; Kwak e Gepts, 2009).

A coleta e a caracterização morfoagronômica e molecular de cultivares de mandioca-de-mesa das regiões urbanas de Maringá, Cianorte e Toledo foram efetuadas por Kvitschal et al. (2008); Zuin et al. (2009); Costa et al. (2013) e Silva (2010). Estes autores observaram que alguns destas cultivares tradicionais apresentam potencial produtivo e conseqüentemente merecem ser melhor avaliadas para o uso em programas de melhoramento ou para futura redistribuição para agricultores.

Os resultados obtidos por Kvitschal (2008) indicaram que a amostragem da variabilidade genética de mandioca-de-mesa foi suficientemente representativa da variabilidade existente no germoplasma do município de Maringá, visto ter sido observada elevada magnitude nos valores de dissimilaridade para as características estudadas.

#### **2.4. Melhoramento genético da mandioca**

Os métodos de melhoramento genético mais utilizado na cultura da mandioca são: introdução e seleção de variedades, hibridação intraespecífica e interespecífica (Nassar *et al.*, 1986; Kawano, 2003; Fukuda e Iglesias, 2006). Em mandioca, alguns fatores influenciam a escolha dos métodos de melhoramento, tais como a heterozigosidade, o nível de endogamia, o hábito de florescimento e de

polinização das plantas, a baixa taxa de produção de sementes por polinização, e o seu modo de propagação vegetativa (Li et al., 1996; Prochnik et al., 2012).

Um programa de melhoramento da mandioca inicia-se com a introdução de acessos como um método de melhoramento (Nassar, 2004). A introdução, seguida de avaliações criteriosas, além de constituir o método mais simples e menos oneroso utilizado em mandioca, apresenta uma grande chance de êxito (Kawano, 2003), em função da ampla diversidade genética disponível ainda pouco explorada (Nassar, 1978; Faraldo et al., 2000; Kawano, 2003; Zuin et al., 2009).

As chances de êxito dos programas de melhoramento de mandioca podem ser grandemente aumentadas por meio da realização de hibridações entre indivíduos divergentes (Faraldo et al., 2000), uma vez que estas hibridações propiciam a ampliação da base genética das populações e, assim, aumentam as chances de seleção de acessos superiores (Cruz e Regazzi, 2001). Conforme Nassar (2002), algumas espécies do gênero *Manihot* podem ser cruzadas entre si e originar pólenes razoavelmente viáveis. O fluxo gênico da mandioca para espécies relacionadas do gênero *Manihot* pode ter um importante papel na evolução destas espécies silvestres (Rogers e Appan, 1973; Nassar, 2002).

O melhoramento da cultura da mandioca tem por objetivos obter cultivares com alta adaptabilidade e estabilidade produtiva, resistência a pragas e a doenças, resistência à deterioração pós-colheita, baixo índice de glicosídeos cianogênicos, facilidade de descascamento das raízes tuberosas, além de tamanho e formato adequados das mesmas (Chávez et al., 2005; Peroni et al., 2007).

Valle et al. (2004) avaliaram a possibilidade de se utilizarem mandiocas bravas no melhoramento de mandioca-de-mesa. Para tanto, avaliaram a geração segregante proveniente do cruzamento entre variedades bravas e mansas e concluíram que o teor de glicosídeos cianogênicos não é empecilho para a utilização de mandioca brava no melhoramento de mandioca-de-mesa.

Em um programa de melhoramento, quando se deseja realizar hibridações com o intuito de aumentar a base genética da geração  $F_1$ , para que sejam selecionados híbridos de interesse, é fundamental que sejam escolhidos parentais promissores e divergentes (Bressegello et al., 1999; Fontes et al., 2002; Costa et al., 2003). Essa escolha pode ser realizada por mecanismos que determinem a diversidade genética entre os acessos de mandioca estudados e os separem por metodologias de agrupamento (Cruz e Regazzi, 2001). Dessa forma, os marcadores

moleculares tornam-se nessa etapa ferramentas de extrema importância, pois permitem a diferenciação de acessos ainda em sua fase juvenil, baseando-se em seu DNA, reduzindo significativamente o tempo de espera para a avaliação de características fenotípicas das plantas (Collard et al., 2005).

## 2.5. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são trechos de DNA em heterozigose que não necessariamente expressam uma variação fenotípica e são utilizados como marcação para um determinado *locus* cromossômico (Griffiths et al., 2009). Eles são ferramentas úteis em programas de melhoramento para a identificação da origem parental, identificação e proteção de variedades, certificação de pureza genética, estudo de populações (variabilidade genética, diversidade, distância genética e filogenia), construção de mapas genéticos, entre outras aplicações (Montaldo e Meza-Herrera, 1998; Zhang et al., 2007; Inghelandt et al., 2010; Kalia et al., 2011).

Os marcadores de DNA apresentam várias vantagens sobre os outros tipos de marcadores, tais como o número elevado de marcadores obtidos, o alto grau de polimorfismo, a não influência ambiental e a não apresentação de efeito pleiotrópico (Collard et al., 2005; Agarwal et al., 2008).

Dessa forma, diversas metodologias baseadas em marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para análise genética, sejam eles dominantes, tais como os marcadores RAPD e AFLP (Elias et al., 2000b; Costa et al., 2003; Kalia et al., 2011) ou codominantes, tais como os marcadores RFLP e SSR (Fregene et al., 1997; Kawuki et al., 2009; Sree Lehka et al., 2010; Kalia et al., 2011; Turyagyenda et al., 2012; Costa et al., 2013).

Os microssatélites são regiões contendo sequências simples repetidas (SSR) em tandem, que são amplificadas, por meio da PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos complementares às sequências únicas que flanqueiam a região do microssatélite (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989; Collard et al., 2005; Kalia et al., 2011). Esta técnica revela o polimorfismo devido à diferença no tamanho das sequências repetitivas do alelo encontradas nos *loci* (Kalia et al., 2011) e mais de um *locus* pode ser analisado simultaneamente quando os alelos contêm tamanhos diferentes e migram para zonas separadas no gel (Mitchell et al., 1997; Vaughan e Russel, 2004; Collard et al., 2005). Os marcadores SSR apresentam elevado

conteúdo informativo por possuir natureza multialélica, herança codominante e ampla distribuição no genoma, sendo transferíveis de genoma para genoma dentro de uma mesma espécie e entre espécies geneticamente relacionadas (Collard et al., 2005; Raghu et al., 2007; Raji et al., 2009a; Sree Lekha et al., 2010; Kalia et al., 2011; Turyagyenda et al., 2012).

Um dos principais usos de marcadores de DNA nas espécies de interesse agrícola tem sido na construção de mapas genéticos para diversas espécies cultivadas (Khattak et al., 2007; Luro et al., 2008; Shoemaker et al., 2008, Sraphet et al., 2011). Os mapas de ligação têm sido utilizados para a identificação de regiões cromossômicas que contêm genes que controlam uma única característica simples ou características quantitativas (Mohan et al., 1997; Collard et al., 2005; Kalia et al., 2011).

Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de construir mapas genéticos e analisar grupos de ligação em *Manihot esculenta* Crantz (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998; Mba et al., 2001; Okogbenin et al., 2006). Recentemente, Sraphet et al. (2011) elaboraram um mapa genético de ligação para a cultura da mandioca utilizando a variedade Huay Bong 60 que incluiu 510 marcadores, compreendendo 1.420,3 cM, com os marcadores espaçados em média por 4,54 cM.

Os estudos de Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e Mba et al. (2001) ajudaram no desenvolvimento de uma biblioteca de *primers* SSR para *Manihot esculenta*, utilizados na grande maioria dos estudos envolvendo marcadores microsatélites na cultura da mandioca. Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) registraram um total de 14 pares de *primers* denominados “GA” devido à alta taxa de repetição desse dinucleotídeo em suas sequências, enquanto Mba et al. (2001), utilizando a cultivar TMS 30572 desenvolvida pelo IITA-Nigéria e um acesso da coleção base do CIAT, denominada CMC 40, desenvolveram 172 novos marcadores codominantes para o genoma de mandioca, que foram denominados “SSRY”, como forma de diferenciá-los dos demais *primers* criados para a cultura.

Em plantas de mandioca, a técnica de SSR tem sido aplicada em vários estudos (Mühlen et al., 2000; Fregene et al., 2003; Mkumbira et al., 2003; Elias et al., 2004; Lokko et al., 2006; Kizito et al., 2007; Moyib et al., 2007; Peroni et al., 2007; Raghu et al., 2007; Rocha et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Sree Lekha et al., 2010; Sree Lekha et al., 2011; Asare et al., 2011; Turyagyenda et al., 2012; Costa et al., 2013). Entre os exemplos está o marcador microsatélite SSRY 28 ligado à

resistência à doença do mosaico (CMD), identificado com o auxílio de uma análise de 6 cópias de cada um dos 158 indivíduos segregantes provenientes do cruzamento entre uma *landrace* Nigeriana (TME 3) e uma linhagem fonte de resistência (TMS 30555) (Akano et al., 2002).

Na caracterização da diversidade genética e estrutura populacional de 54 etnovarietades de mandioca pertencentes à Amazônia e ao Litoral Sul do Estado de São Paulo, além de uma cultivar comercial (Mantiqueira), Mühlen et al. (2000) analisaram 11 *loci* microssatélites. Eles encontraram um total de 49 bandas, das quais foi obtida uma heterozigosidade média de 0,56. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) realizada possibilitou o agrupamento da população entre cultivares mansas e bravas. Resultados obtidos por Elias et al. (2004), no estudo da estrutura populacional de mandioca-de-mesa e mandioca brava de cinco localidades da América do Sul, por meio dos marcadores microssatélites, confirmaram os resultados de Mühlen et al. (2000), uma vez que foi evidenciada uma diferenciação genética entre variedades bravas e mansas, sugerindo que cada forma tenha evoluído separadamente após a domesticação.

Resultados similares foram alcançados por Mkumbira et al. (2003) estudando a estrutura populacional e a diversidade genética de 10 cultivares tradicionais de produtoras locais do Malawi, utilizando 8 marcadores microssatélites. Observaram 21 bandas e possibilitaram a distinção das cultivares entre mandioca-de-mesa e brava pela análise de PCoA.

Em estudos desenvolvidos por Fregene et al. (2003), avaliou-se a diversidade de 283 cultivares *landraces* de mandioca de países da África (Tanzânia e Nigéria) e de países do Neotrópico (Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Guatemala, México e Argentina) pelo uso de marcadores SSR. Os marcadores revelaram alto grau de polimorfismo, em média  $94 \pm 1,06\%$ , sendo que as cultivares oriundas do Brasil e da Colômbia propiciaram o polimorfismo mais elevado: 100% e 98,5%, respectivamente.

Lokko et al. (2006), utilizando 18 *primers* SSR na caracterização de cultivares tradicionais e comerciais resistentes e suscetíveis a CMD (*Cassava mosaic disease*), realizaram o agrupamento das mesmas pelo método UPGMA (média aritmética não ponderada). Foram obtidos cinco grupos dos quais três apresentaram predomínio de cultivares melhoradas (resistentes ao Vírus do Mosaico da Mandioca – CMD). Os outros dois grupos formados apresentaram um

maior número de cultivares tradicionais suscetíveis, sendo que estas apresentaram maior variabilidade entre si quando comparadas às cultivares comerciais. Os resultados de Lokko et al. (2006) permitiram a obtenção das combinações mais divergentes entre acessos pertencentes a grupos distintos com pelo menos um deles apresentando resistência ao CMD, de forma a diversificar a resistência à doença nas populações melhoradas de mandioca de programas africanos.

Moyib et al. (2007) estudaram a divergência genética entre 36 acessos de mandioca cultivados na Nigéria, sendo seis etnovariedades (cultivares tradicionais) e 31 cultivares melhoradas. Com os resultados das análises do coeficiente de similaridade de Jaccard e da Análise de Coordenadas Principais, os autores concluíram que a divergência genética dentro do grupo das cultivares melhoradas foi maior que a registrada para o grupo das etnovariedades, devido ao fato de que, para a composição destas cultivares melhoradas, utilizaram-se acessos de outras regiões do continente e de outras regiões do mundo. Conforme os autores, a reduzida divergência entre as cultivares tradicionais era esperada devido ao intercâmbio de propágulos entre os produtores, além do fluxo gênico entre as cultivares trocadas.

Em trabalho realizado por Kizito et al. (2007), foi constatado, em 11 comunidades de Uganda, por meio do uso de marcadores SSR que diversos acessos com características distintas são cultivados sob a mesma denominação. Neste trabalho, foi realizado um *approach* multidisciplinar envolvendo entrevistas com produtores, observação de caracteres morfológicos e utilização de 11 marcadores microssatélites, objetivando relacionar a diferenciação de nomenclatura utilizada pelos agricultores e a diferenciação genética entre as cultivares. Peroni et al. (2007) também identificaram entre 169 cultivares tradicionais de regiões de Mata Atlântica e Floresta Amazônica várias delas sendo cultivadas sob a mesma denominação, já que encontraram apenas 115 denominações distintas. Neste estudo foram analisados 9 *loci* SSR e foi constatada elevada diversidade para cultivares de mandioca-de-mesa (0,654) e mandiocas bravas (0,582). Em outro estudo, Raghu et al. (2007) utilizaram 15 *primers* SSR para acessar a diversidade genética de cultivares de mandioca da região Sul da Índia, encontrando um total de 71 alelos com 86,56% de polimorfismo. Neste estudo, foi possível determinar a maior eficiência da utilização de marcadores SSR na diferenciação entre acessos de mandioca, uma vez que foi observada a divisão da população em 9 grupos, em

detrimento dos marcadores morfológicos que permitiram a identificação de apenas 6 grupos distintos.

Rocha et al. (2008) realizaram a comparação da diversidade genética encontrada em 109 cultivares tradicionais de mandioca das reservas indígenas de Coto Brus e Talamanca, na Costa Rica, com duas cultivares comerciais de mandioca típicas deste país. Foram utilizados 13 marcadores microssatélites, dos quais 12 foram considerados polimórficos para cultivares tradicionais e nove para cultivares comerciais. A variação genética encontrada foi maior dentro dos grupos do que entre os grupos e ampla diversidade genética foi encontrada entre cultivares tradicionais, demonstrada pelo excesso de heterozigotos apontado pelos parâmetros  $F_{is}$  e  $F_{it}$  encontrados de -0,3660 e -0,3223; respectivamente. Os elevados níveis de heterozigosidade observada, que foram de 42% e 45% para Coto Brus e Talamanca, respectivamente, foram superados, como esperado, pelas cultivares comerciais, as quais apresentaram 47% de heterozigosidade.

Siqueira et al. (2009) analisaram 42 *landraces* de mandioca provenientes das regiões de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Amazonas e Mato Grosso, utilizando nove *loci* SSR. Os autores constataram elevada diversidade, principalmente dentro das regiões com média de 3,3 alelos por *locus* e valores entre 88 e 100% de polimorfismo entre as regiões. As regiões que apresentaram as cultivares que mais se relacionaram geneticamente entre si foram São Paulo, Mato Grosso do Sul e Amazonas, enquanto as de Minas Gerais formaram um subgrupo dentro do grupo dessas regiões. Cultivares coletadas no Estado do Mato Grosso foram aquelas que mais se diferenciaram das demais. Estes resultados demonstram a grande importância do fluxo migratório humano nas relações filogenéticas entre acessos de mandioca, transportando propágulos de uma região para outra e promovendo a troca de alelos com cultivares locais. O intercâmbio e o transporte de cultivares entre regiões explica o fato de locais mais próximos geograficamente, tais como Minas Gerais e São Paulo, terem se diferenciado mais geneticamente do que locais mais distantes geograficamente Amazonas.

Em trabalho realizado por Sree Lekha et al. (2010), foram analisadas 45 cultivares tradicionais de mandioca cultivadas na região norte de Kerala, Índia, utilizando-se 36 pares de *primers* microssatélites. Os resultados demonstraram o máximo de duas bandas por *primer*, número esse inferior à maioria dos estudos encontrados na literatura (Mühlen et al., 2000; Siqueira et al., 2009; Turyagyenda et

al., 2012; Costa et al., 2013). Isso faz com que os índices de diversidade encontrados nas cultivares sejam reduzidos, assim como a informatividade dos *primers* utilizados. Resultados similares foram encontrados por novos estudos realizados nos mesmos moldes por Sree Lekha et al. (2011), realizando uma análise comparativa entre cultivares da região central de Kerala e 24 cultivares comerciais recém lançadas. Os 36 *loci* microssatélites analisados foram eficientes no agrupamento da população em dois grupos, separando cultivares comerciais das coletadas na região central de Kerala.

Comparados aos estudos de Sree Lekha et al. (2010, 2011), números superiores de alelos por *locus* foram encontrados por Asare et al. (2011). Em análise da diversidade genética e estrutura populacional de 43 acessos de mandioca de Gana, utilizando 14 descritores morfológicos, e 20 primers microssatélites foram encontrados 5 alelos por *locus*. Todos os *loci* microssatélites analisados foram considerados polimórficos e foram em média altamente informativos, superando os marcadores morfológicos na diferenciação dos acessos de mandioca analisados. Similarmente, Turyagyenda et al. (2012) detectaram níveis de polimorfismo de 100% tanto para as cultivares comerciais como para as cultivares tradicionais. Nesse trabalho, realizado com 51 *landraces* e 15 acessos elite de mandioca, de Uganda, utilizando 26 marcadores microssatélites, evidenciaram um total de 154 alelos, sendo que 24% deles estavam contidos apenas nas *landraces*.

Altos níveis de polimorfismo também foram detectados em estudo realizado por Costa et al. (2013). Neste trabalho, foi determinada a estrutura populacional e a diversidade genética de 66 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa coletadas no município de Maringá, Paraná, utilizando como ferramenta 13 pares de *primers* microssatélites. Todos os *loci* SSR analisados foram considerados polimórficos e os acessos foram divididos em dois grupos distintos pelo método probabilístico utilizado.

O estudo de Costa et al. (2013) reforça a ideia da possível influência dos intercâmbios de cultivares tradicionais entre produtores e do reduzido número de genitores de uma população em sua diversidade genética, assim como possibilita a determinação de possíveis cruzamentos entre indivíduos divergentes que podem ser utilizados em programas de melhoramento.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e plantio das cultivares tradicionais

Neste estudo, foram utilizadas 121 cultivares tradicionais, coletadas em áreas urbanas e periurbanas de municípios do Estado do Paraná, e uma cultivar comercial, totalizando 122 cultivares de mandioca-de-mesa. A cultivar comercial utilizada como padrão para a comparação com as demais cultivares tradicionais foi IAC 576/70, originária do cruzamento entre a cultivar SRT 797–Ouro do Vale e o clone IAC 14-18 (Villela et al., 1985). Ela foi utilizada devido à sua ampla distribuição na Região Centro-Sul do Brasil, além de seu bom desempenho agrícola, considerando sua produtividade e resistência à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) (Aguiar et al., 2011) e excelentes características organolépticas (Mezette et al., 2009).

As cultivares tradicionais utilizadas (Quadro 1) foram coletados por Zuin (2006), no município de Cianorte (26) e em Maringá, por Kvitschal (2008) e Costa et al. (2013) (66), ambas as localidades situadas na região Noroeste do Paraná. Ainda foram utilizadas outras 29 cultivares tradicionais coletadas por Silva (2010) na localidade de Toledo, região Oeste do Estado. Na Figura 1, encontra-se a localização geográfica dos municípios de Maringá, Cianorte e Toledo.

O município de Maringá está localizado a 23° 25' de latitude Sul e 51° 57' de longitude Oeste, com uma altitude média de 540 m. Apresenta um clima predominantemente mesotérmico úmido, com chuvas de verão e de outono e com verão quente (Godoy et al., 1976). Por sua vez, o município de Cianorte está localizado a 23° 40' de latitude Sul, 52° 38' de longitude Oeste, a uma altitude média de 490 m. O clima predominante é subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes (temperatura média superior a 22° C) e tendência de concentração de chuvas. Apresenta ocorrência de geadas esporádicas nos invernos (temperatura média inferior a 18° C, sem estação seca definida (Godoy et al., 1976). Toledo está situado na região Oeste do Paraná, a 24° 45' de latitude Sul e 53° 41' de longitude Oeste, e altitude média de 547 m. Apresenta clima subtropical úmido, mesotérmico com verões quentes e tendência à concentração de chuvas. A temperatura média

máxima é superior a 22°C, possuindo invernos com geadas frequentes e temperatura média mínima inferior a 18°C, sem estação seca definida (Godoy et al., 1976).

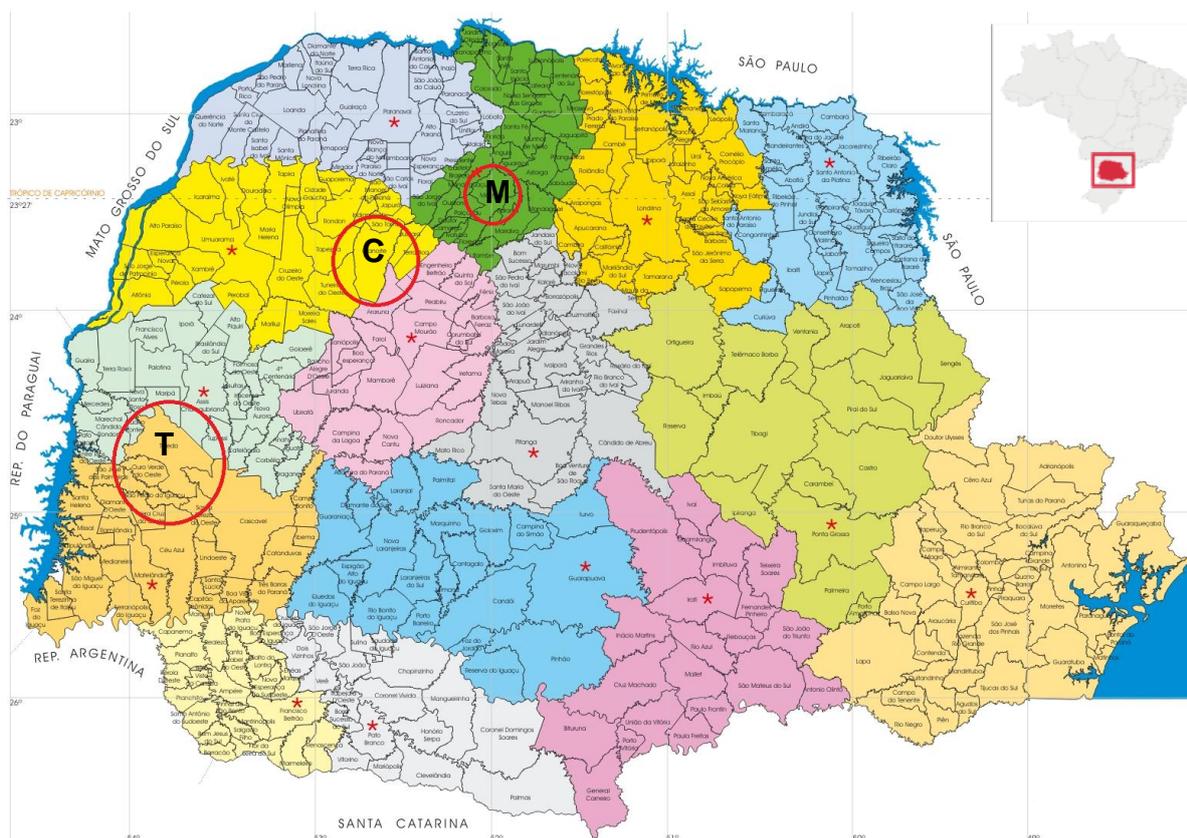
Quadro 1 – Local de coleta das 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa avaliadas

Cultivar	Origem	Cidade	Cultivar	Origem	Cidade
BGM 430T	Jd. Laranjeiras	Toledo	BGM 86C	R. Niterói, 553	Cianorte
BGM 432T	Vila Boa Esperança	Toledo	BGM 125C	Frente AABB	Cianorte
BGM 434T	Vila Boa Esperança	Toledo	BGM 126C	R. Franc. Tourinho, 459	Cianorte
BGM 439T	Jd. Santa Clara IV	Toledo	BGM 130C	R. Manduí, 1328	Cianorte
BGM 441T	Jd. Santa Maria	Toledo	BGM 144C	R. Cuiabá, 420	Cianorte
BGM 443T	Jd. Santa Maria	Toledo	BGM 154C	R. dos Bandeirantes, 381	Cianorte
BGM 444T	Vila Panorama	Toledo	BGM 170C	R. Cuiabá, 420	Cianorte
BGM 445T	Vila Panorama	Toledo	BGM 173C	R. Maringá, 629	Cianorte
BGM 449T	Vila Panorama	Toledo	BGM 5M	Jd. Império do Sol	Maringá
BGM 454T	Jd. São Francisco	Toledo	BGM 12M	Jd. Império do Sol	Maringá
BGM 455T	Jd. São Francisco	Toledo	BGM 13M	Pq. Industrial	Maringá
BGM 458T	Jd. Filadélfia	Toledo	BGM 15M	Jd. Do Carmo	Maringá
BGM 459T	Jd. Filadélfia	Toledo	BGM 16FEM	Jd. Santa Mônica	Maringá
BGM 460T	Vila Becker	Toledo	BGM 16FLM	Jd. Santa Mônica	Maringá
BGM 461T	Vila Becker	Toledo	BGM 17M	Jd. Santa Mônica	Maringá
BGM 467T	Jd. Coopagro	Toledo	BGM 18M	Jd. Ouro Cola	Maringá
BGM 468T	Jd. Coopagro	Toledo	BGM 20M	Jd. Pais I	Maringá
BGM 469T	Jd. Faquine	Toledo	BGM 25M	Jd. Paris I	Maringá
BGM 470T	Jd. Faquine	Toledo	BGM 30M	Jd. Grajaú II	Maringá
BGM 478T	Jd. Gisela	Toledo	BGM 31M	Jd. Seminário IV	Maringá
BGM 480T	Jd. Gisela	Toledo	BGM 33M	Jd. Alvorada	Maringá
BGM 482T	Vila Industrial	Toledo	BGM 34M	Jd. Alvorada	Maringá
BGM 483T	Jd. Concórdia	Toledo	BGM 36M	Cj. João Paulino	Maringá
BGM 487T	Jd. Porto Alegre	Toledo	BGM 37M	Vila Morangueirinha	Maringá
BGM 488T	Jd. Porto Alegre	Toledo	BGM 40M	Cj. João Paulino	Maringá
BGM 493T	Jd. Porto Alegre	Toledo	BGM 43M	Jd. Planville	Maringá
BGM 494T	Vila Pioneiro	Toledo	BGM 50M	Jd. Laranjeiras V	Maringá
BGM 495T	Vila Pioneiro	Toledo	BGM 51M	Jd. Grajaú-Lote II	Maringá
BGM 496T	Vila Pioneiro	Toledo	BGM 56M	Jd. Ebenezer I	Maringá
IAC 576/70	IAC	Toledo	BGM 58M	Jd. Seminário II	Maringá
BGM 35C	Av. Brasil, 272	Cianorte	BGM 59M	Jd. do Carmo	Maringá
BGM 39C	Av. Pará, 786	Cianorte	BGM 62M	Jd. Laranjeiras IV	Maringá
BGM 47C	R. Franc. Tourinho	Cianorte	BGM 77M	Jd. Paris III	Maringá
BGM 48C	R. Vitória, 1594	Cianorte	BGM 80M	Jd. Real	Maringá
BGM 55C	Superm. Dia-a-dia	Cianorte	BGM 81M	Jd. Real	Maringá
BGM 63C	R. Niterói, 553	Cianorte	BGM 82M	Jd. Real	Maringá
BGM 64C	Proximo a UEM	Cianorte	BGM 84M	Jd. Laranjeiras X	Maringá
BGM 66C	Chácara Zuin	Cianorte	BGM 88M	Jd. Ebenezer II	Maringá
BGM 67C	Av. Pardo, 217	Cianorte	BGM 89M	Residencial Tuiuti II	Maringá
BGM 70C	Rua Paiaguás, 592	Cianorte	BGM 90M	Jd. Pinheiros I	Maringá
BGM 72C	R. Uruguaiana, 144	Cianorte	BGM 91M	Jd. Real	Maringá
BGM 73C	Av. R. G. do Norte	Cianorte	BGM 92M	Jd. Paris II	Maringá
BGM 74C	R. Uruguaiana, 118	Cianorte	BGM 93M	Jd. Seminário I	Maringá
BGM 75C	R. Propiá, 281	Cianorte	BGM 95M	Jd. Grajaú-Lote II	Maringá

Quadro 1, Cont.

BGM 119M	Jd. Batel I	Maringá	BGM 218M	Iguatemi	Maringá
BGM 121M	Sítio Framesqui	Maringá	BGM 222M	Iguatemi	Maringá
BGM 124M	Sítio Pinguim	Maringá	BGM 223M	Iguatemi	Maringá
BGM 139M	Jd. Oásis	Maringá	BGM 232M	Iguatemi	Maringá
BGM 161M	Jd. Paris V	Maringá	BGM 236M	Jd. Monte Rei	Maringá
BGM 162M	Jd. Paris V	Maringá	BGM 252M	Jd. Monte Rei	Maringá
BGM 163M	Jd. Paris V	Maringá	BGM 289M	Cj. Três Meninos	Maringá
BGM 164M	Jd. Paris V	Maringá	BGM 296M	Jd. Paris I	Maringá
BGM 178M	Pq. Industrial	Maringá	BGM 317M	Jd. Paris I	Maringá
BGM 179M	Jd. Dourado	Maringá	BGM 322M	Vila Morangueirinha	Maringá
BGM 198M	Iguatemi	Maringá	BGM 323M	Jd. Ebenezer I	Maringá
BGM 201M	Iguatemi	Maringá	BGM 324M	Jd. Ebenezer I	Maringá
BGM 214M	Iguatemi	Maringá	BGM 326M	Jd. Real	Maringá

BGM=Banco de germoplasma de mandioca; FE=Folha estreita; FL=Folha larga; IAC= Instituto Agrônômico de Campinas.



Fonte: SEAB, 2008.

Figura 1 – Localização geográfica dos municípios de Maringá (M), Cianorte (C) e Toledo (T), Paraná.

No local de coleta, em cada localidade, as cultivares tradicionais foram identificadas e foi observada a variabilidade fenotípica entre plantas, ou seja, a presença de diferenças morfológicas entre elas. Das plantas que apresentavam

características diferenciadas, foram coletadas aproximadamente de cinco a dez ramas adultas, as quais foram identificadas individualmente e amarradas em feixes.

As ramas de cada cultivar coletada foram armazenadas na posição vertical sob ambiente protegido de radiação solar, precipitação pluvial direta e temperaturas elevadas, até o momento do plantio, para evitar a desidratação das mesmas. Posteriormente, elas foram identificadas *in situ* no Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca do Departamento de Agronomia, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Por ocasião do plantio, após uma seleção prévia, procedeu-se o corte do material de propagação (manivas) em segmentos de 0,15 a 0,20 m de comprimento. As manivas foram cortadas com o auxílio de uma serra circular, assegurando-se que pelo menos cinco gemas fossem deixadas em cada propágulo, que foi colocado em cova e coberto por uma camada de aproximadamente 10 cm de terra (Lorenzi e Dias, 1993).

## **3.2. Extração e quantificação de DNA**

### **3.2.1. Extração do DNA**

As ramas de cada uma das 122 cultivares tradicionais, quando maduras, foram coletadas, identificadas, seccionadas em manivas de aproximadamente 0,20m de comprimento, plantadas em caixas com areia lavada e mantidas em casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri-UEM).

Posteriormente, por ocasião da brotação das manivas, efetuou-se a coleta das folhas jovens de cada cultivar tradicional, as quais foram acondicionadas em pacotes de papel alumínio previamente identificados. Os pacotes contendo as folhas coletadas foram imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido. Em seguida, estas amostras foram transportadas ao Laboratório de Melhoramento do Feijoeiro Comum e Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), onde foi feita a extração de DNA, utilizando o protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983).

### **3.2.2. Quantificação, amplificação do DNA e eletroforese**

O DNA extraído de cada uma das 122 cultivares tradicionais foi quantificado por meio das leituras de concentração obtidas via Fluorímetro Qubit® (Qubit

Fluorometer Invitrogen). Após a quantificação do DNA, procedeu-se a diluição de cada uma das amostras a uma concentração final de  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA (Sawazaki et al., 2002; Xia et al., 2005).

A amplificação deste material genético, mediante PCR, foi realizada com a aplicação das amostras de DNA diluído em tiras de oito tubos específicos, com parede translúcida e capacidade para  $6,0 \mu\text{L}$ . Em cada tubo, foi aplicada uma alíquota homogeneizada da solução de trabalho da ordem de  $5,0 \mu\text{L}$ , adicionando-se, posteriormente, os outros componentes para a reação, em forma de um *mix*, com volume final de  $20 \mu\text{L}$  (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998; Mba et al., 2001).

Dessa forma, cada reação ( $25 \mu\text{L}$ ) foi composta por:  $50 \text{ ng}$  de DNA;  $0,25 \text{ mM}$  de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);  $1,5 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ ;  $10 \text{ mM}$  de tampão PCR *Buffer* 10x -  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen);  $0,08 \mu\text{M}$  de cada *primer* (senso e antisenso), uma unidade de Taq polimerase (Perkin Elmer-Cetus Corp.) e água ultrapura (q.s.p.). As reações de PCR foram conduzidas mediante programas específicos, em termociclador (Techne Endurance TC-512, Analítica).

Neste estudo, foram utilizados 13 pares de *primers* microssatélites das séries: GA desenvolvidos por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e SSRY, desenvolvidos por Mba et al. (2001), utilizados com sucesso por Costa et al. (2013) no estudo desenvolvido com as cultivares tradicionais coletadas em área urbana de Maringá (Quadro 2).

Os ciclos de amplificação para os *primers* “SSRY” foram constituídos das seguintes etapas: uma etapa de desnaturação inicial a  $94^\circ\text{C}$ , por 5 minutos, seguida por 30 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a  $95^\circ\text{C}$ , por um minuto, uma etapa de ligação do *primer* ao DNA, com temperatura variável de acordo com o *primer* e duração de dois minutos e uma etapa de alongação da fita, a  $72^\circ\text{C}$ , por dois minutos. Ao final dos 30 ciclos, uma última etapa de alongação foi realizada, a  $72^\circ\text{C}$  por 5 minutos (Mba et al., 2001).

Os programas de amplificação para os *primers* “GA”, por suas vez, foram constituídos das seguintes etapas: uma etapa de  $94^\circ\text{C}$ , por 10 minutos; uma etapa de desnaturação do DNA a  $95^\circ\text{C}$ , por 4 minutos; 25 ciclos de  $95^\circ\text{C}$ , por 1 minuto, 2 minutos para anelamento do *primer* ao DNA, variando entre  $45$  e  $56^\circ\text{C}$  e extensão, a  $72^\circ\text{C}$ , por 2 minutos, e uma quarta etapa de  $72^\circ\text{C}$ , por 10 minutos, após o término dos ciclos (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998).

Quadro 2 – Loci microssatélites analisados nas 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa de Maringá, Cianorte e Toledo, Estado do Paraná

Loci	GL <sup>1</sup>	Motif	Primer (5' - 3') <sup>2</sup>	MgCl <sub>2</sub> (μL)	RA <sup>3</sup> (pb)	TA <sup>4</sup> (°C)	Ref <sup>5</sup>
GA 21	nd <sup>6</sup>	NP <sup>7</sup>	F': GGCTTCATCATGGAAAAACC R': CAATGCTTTACGGAAGAGCC	1,25	104-126	58,0	A
GA 57	nd	NP	F': AGCAGAGCATTTACAGCAAGG R': TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG	2,00	153-183	59,0	A
GA 126	K	NP	F': AGTGGAAATAAGCCATGTGATG R': CCCATAATTGATGCCAGGTT	0,75	178-214	58,0	A
GA 127	K	NP	F': CTCTAGCTATGGATTAGATCT R': GTAGCTTCGAGTCGTGGGAGA	3,00	203-239	57,0	A
GA 134	nd	NP	F': ACAATGTCCCAATTGGAGGA R': ACCATGGATAGAGCTCACCG	3,00	309-337	59,0	A
GA 136	nd	NP	F': CGTTGATAAAGTGGAAAGAGCA R': ACTCCACTCCCGATGCTCGC	2,00	145-161	55,0	A
GA 140	nd	NP	F': TTCAAAGGAAGCCTTCAGCTC R': GAGCCACATCTACTGCACACC	4,00	154-164	55,0	A
SSRY 13	1	(CT) <sub>29</sub>	F': GCAAGAATTCCACCAGGAAG R': CAATGATGGTAAGATGGTGCAG	0,75	234	55,0	B
SSRY 19	V	(CT) <sub>8</sub> (CA) <sub>18</sub>	F': TGTAAGGCATTCCAAGAATTATCA R': TCTCCTGTGAAAAGTGCATGA	0,75	214	55,0	B
SSRY 21	B	(GA) <sub>26</sub>	F': CCTGCCACAATATTGAAATGG R': CAACAATTGGACTAAGCAGCA	0,75	192	55,0	B
SSRY 45	2	(CT) <sub>27</sub>	F': TGAAACTGTTTGCAAATTACGA R': TCCAGTTCACATGTAGTTGGCT	0,75	228	55,0	B
SSRY 101	20	(GCT) <sub>13</sub>	F': GGAGAATACCACCGACAGGA R': ACAGCAGCAATCACCATTTC	0,75	213	55,0	B
SSRY 135	G	(CT) <sub>16</sub>	F': CCAGAACTGAAATGCATCG R': AACATGTGCGACAGTGATTG	0,75	253	45,0	B

<sup>1</sup> Grupo de Ligação (Chavariaga-Aguirre et al., 1998; Mba et al., 2001; Sraphet et al., 2011); <sup>2</sup> Forward (F') e Reverse (R'); <sup>3</sup> Região de amplificação, em pares de bases (pb); <sup>4</sup> Temperatura de anelamento utilizada; <sup>5</sup> Referência: A - Chavariaga-Aguirre et al. (1998); B - Mba et al. (2001); <sup>6</sup> Não determinado; <sup>7</sup> Motif não publicado.

Os fragmentos amplificados foram separados por meio do processo de eletroforese, utilizando como base o gel de poliacrilamida não desnaturante, em concentração de 10%. Após polimerização do gel, as amostras foram previamente preparadas, misturando-se 8,0 µL do tampão de carregamento *Loading Buffer 6x* em cada tubo de PCR contendo o produto amplificado, e aplicadas na proporção de uma amostra por poço. Uma alíquota de 10 µL do DNA juntamente com o Buffer foi aplicada em cada poço.

As amostras, em conjunto com o marcador molecular padrão de 100 pb (*Ladder* – Invitrogen), passaram pelo processo de migração em cuba vertical de eletroforese, por aproximadamente 3 horas e 30 minutos, em voltagem de 100 V. O tampão, condutor da corrente elétrica na cuba utilizado, foi o TBE 1X (Trisborato EDTA).

Finalizando o processo, os géis obtidos foram submetidos à coloração por SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies™) e digitalizados (arquivados em formato JPEG), utilizando o Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX (Loccus biotecnologia). As imagens foram identificadas de acordo com o *primer* e gravadas para posterior análise e conferência.

### **3.3. Análises estatísticas**

As imagens obtidas a partir dos géis com os fragmentos de DNA, amplificados e separados, foram submetidas à verificação de alturas de bandas para obtenção de dados sobre os alelos, por meio da comparação realizada entre as bandas e o padrão (*Ladder*) de 100 pares de bases (pb). Esta avaliação foi realizada por meio do programa de fotodocumentação LABIMAGE 1D, Revisão 1.10 (Loccus Biotecnologia).

Na análise de estrutura populacional das 122 cultivares de mandioca-de-mesa em estudo foi utilizado o Programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Esta análise foi realizada com 10.000 repetições em *burn-in* e 100.000 repetições na Cadeia de Markov-Monte Carlo – MCMV (Pritchard et al., 2000; Evanno et al., 2005). Com os parâmetros padrão do programa e mantendo o modelo de mistura populacional (*admixture model*), foram efetuadas 14 simulações de agrupamento, com o fator *K* (número de grupos ou populações) variando de 2 a 15, tendo sido avaliadas, no arquivo de saída, as probabilidades  $P(K)$  dos indivíduos pertencerem

ao  $k$ -ésimo grupo, tanto numericamente como na forma gráfica (*bar plot*) gerada pelo programa (Kwak e Gepts, 2009).

Na análise de estrutura das populações, foi realizada a Análise de Coordenadas Principais – PCoA, empregando-se o Programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2006, 2012). Também por meio do programa GenAlEx 6.5, foram determinadas as frequências alélicas por *locus* avaliado (Peakall e Smouse, 2006, 2012).

Os demais parâmetros de diversidade genética foram calculados com o emprego do Programa PowerMarker 3.25 (Liu e Muse, 2005). Além disso, a diversidade genética entre as cultivares tradicionais também foi avaliada mediante a construção da matriz de distâncias, com base na distância de C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) e implementada pelo programa PowerMarker 3.25 (Liu e Muse, 2005).

## 4. RESULTADOS E DICUSSÃO

### 4.1. Diversidade genética

O Quadro 3 apresenta os índices de diversidade genética estimados. Observa-se, nas frequências alélicas encontradas, que todos os 13 *loci* foram considerados polimórficos, tendo em vista que, em todos, a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 0,95 (Clark et al., 1981). A média dos alelos mais frequentes foi de 0,5539 e os valores de frequência encontrados para os alelos mais comuns variaram entre 0,4342 para GA 140 e 0,8051 para GA 21. Estes resultados condizem com a maioria dos trabalhos utilizando microssatélites na determinação da diversidade genética em acessos de mandioca, nos quais aproximadamente 100% dos *loci* são polimórficos (Fregene et al., 2003; Lokko et al., 2006; Kizito et al., 2007; Moyib et al., 2007; Peroni et al., 2007; Raghu et al., 2007; Siqueira et al., 2009; Turyagyenda et al., 2012; Costa et al., 2013).

Entre os 13 *loci* microssatélites avaliados, foi obtido um total de 40 alelos, com uma média de 3,07 alelos por *locus* (Quadro 3). O número de alelos por *locus* variou de 2 (GA 21, GA 57, GA 134 e GA 136) a 4 (GA 126, GA 140, SSRY 21, SSRY 45 e SSRY 101). A média de alelos por *locus* superou alguns estudos como Moyib et al. (2007), Sree Lekha et al. (2010), Sree Lekha et al. (2011) e Costa et al. (2013) que variaram entre 1,78 e 2,53. Porém, ficou um pouco aquém da maioria dos trabalhos de Mühlen et al. (2000), Fregene et al. (2003), Mkumbira et al. (2003), Elias et al. (2004), Lokko et al. (2006), Raghu et al. (2007), Peroni et al. (2007), Siqueira et al. (2009), Asare et al. (2011) e Turyagyenda et al. (2012) que variaram de 4 a 6 alelos por *locus*. Este fator pode ser um indicativo da estreita base genética da população como um todo (Costa et al., 2013).

No Quadro 3 pode-se observar a ocorrência de alelos raros em alguns dos *loci*. Alelos raros são aqueles que estão presentes na população com frequências inferiores a 0,05 (Siqueira et al., 2009). Neste trabalho, eles foram encontrados em todos os *loci* microssatélites que apresentaram quatro alelos distintos. Destaca-se o alelo de 242 pares de bases do *locus* GA 126, de 147 pb em GA 140, de 150 pb em SSRY 21, de 214 pb em SSRY 45 e de 195 pb em SSRY 101.

Quadro 3 – Índices estimados de diversidade genética por *locus* microssatélite avaliado

GL <sup>1</sup>	Loci	Nº. de alelos	Alelo (pb)	Frequência	PIC <sup>2</sup>	H <sub>o</sub> <sup>3</sup>	Diversidade genética
nd <sup>4</sup>	GA 21	2	102	0,8051	0,2646	0,3559	0,3138
			108	0,1949			
nd	GA 57	2	146	0,2375	0,2966	0,4750	0,3622
			171	0,7625			
K			183	0,4955			
	GA 126	4	190	0,0714	0,5027	0,6786	0,5869
			228	0,4018			
			242	0,0313*			
K			200	0,2679			
	GA 127	3	227	0,1071	0,4595	0,2679	0,5261
			242	0,6250			
			317	0,5631			
nd	GA 134	2	324	0,4369	0,3710	0,0270	0,4920
			147	0,5880			
nd	GA 136	2	158	0,4120	0,3671	0,3611	0,4845
			147	0,0439*			
nd	GA 140	4	148	0,1535	0,5824	0,3333	0,6502
			158	0,4342			
			162	0,3684			
			223	0,2193			
1	SSRY 13	3	237	0,2588	0,5434	0,6053	0,6125
			252	0,5219			
V			194	0,1102			
	SSRY 19	3	218	0,5042	0,4995	0,6695	0,5849
			236	0,3856			
B			150	0,0045*			
	SSRY 21	4	165	0,1071	0,5047	0,6250	0,5903
			174	0,4866			
			190	0,4018			
2			185	0,1282			
	SSRY 45	4	204	0,4744	0,5315	0,8718	0,6105
			214	0,0128*			
			218	0,3846			
20	SSRY 101	4	174	0,4914	0,5582	0,2931	0,6287
			177	0,2888			
			189	0,2155			
			195	0,0043*			
G	SSRY 135	3	249	0,44915	0,4964	0,6271	0,5862
			263	0,10170			
			284	0,44915			
Média		3,0769		0,5539 <sup>5</sup>	0,4598	0,4762	0,5407

<sup>1</sup> Grupo de ligação (Chavarriaga-Aguirre et al., 1998; Mba et al., 2001; Sraphet et al., 2011).

<sup>2</sup> Conteúdo de informação de polimorfismo.

<sup>3</sup> Heterozigosidade por *locus*.

<sup>4</sup> Não determinado.

<sup>5</sup> Medida das maiores frequências alélicas.

\* Alelos raros: Frequência < 0,05, segundo Siqueira et al. (2009).

Alelos raros podem ser utilizados na diferenciação de indivíduos devido ao fato de elevarem os valores de PIC dos *primers*, de forma a aumentar o potencial discriminativo dos mesmos (Botstein et al., 1980). Neste trabalho, o alelo de 242 pb de GA 126 esteve presente nas cultivares BGM 454T, BGM 488T, BGM 47C, BGM 55C, BGM 76C, BGM 78C e BGM 92M; o alelo de 147 pb de GA 140 esteve presente nas cultivares BGM 252M, BGM 323M, BGM 17M, BGM 18M, BGM 51M, BGM 56M e BGM 62M; o alelo de 150 pb de SSRY 21 foi exclusivo de BGM 73C; o alelo de 214 pb foi encontrado em BGM 73C, BGM 74C e BGM 75C; e o alelo de 195 pb foi exclusivo de BGM 488M. Além disso, alelos raros são úteis em seleção assistida por marcadores moleculares, quando encontrado algum gene de interesse agrônômico ligado aos mesmos (Reis et al., 2011), constituindo, portanto, oportunidades para trabalhos futuros.

Em adição, foram identificados alelos de baixa frequência (Quadro 3) que, segundo Viegas et al. (2011), estão presentes em taxas entre 0,05 e 0,25. Pode-se observar no Quadro 3 os alelos: 108 pb em GA 21, 146 pb em GA 57, 190 pb em GA 126, 227 pb em GA 127, 148 pb em GA 140, 223 pb em SSRY 13, 194 pb em SSRY 19, 165 pb em SSRY 21, 185 pb em SSRY 45, 189 pb em SSRY 101 e 263 pb em SSRY 135.

Os resultados encontrados para alelos raros e de baixa frequência estão de acordo com diversos trabalhos realizados com mandioca e registrados na literatura (Peroni et al., 2007; Rocha et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Asare et al., 2011; Turyagienda et al. 2012). É importante destacar que, nos estudos realizados por Rocha et al. (2008), analisando a variabilidade genética de cultivares tradicionais de mandioca de comunidades indígenas locais na Costa Rica, foram encontrados alelos raros e de baixa frequência entre os primers GA 21, GA 126, GA 127 e GA 140, também utilizados neste trabalho. Resultados similares foram encontrados para o *primer* GA 126 por Peroni et al. (2007) e Siqueira et al. (2009). Ainda pode-se observar (Quadro 3) alelos raros para os primers SSRY 21, SSRY 101 (Asare et al., 2011) e para SSRY 135 e SSRY 21 (Turyagienda et al., 2012). Ressalte-se o *locus* SSRY 101, que apresentou o alelo de 195 pb com frequência de 0,0043, sendo esta a menor entre todos os alelos encontrados neste estudo (Quadro 3). Adicionalmente, o *primer* SSRY 101 apresenta um baixo valor de heterozigosidade observada ( $H_o=0,2931$ ). Isto leva a crer que este alelo se encontra altamente suscetível às forças evolutivas, principalmente à deriva genética que pode gerar a

eventual eliminação desse alelo da população (Reed e Frankham, 2003) e consequentemente, de genes de interesse que possam estar ligados a ele.

O *locus* GA 134 também apresentou um grande desvio com relação à heterozigosidade esperada. Para este *locus*, o baixo valor de  $H_o$  de 0,0270 está ligado à forte tendência à homozigose entre as cultivares tradicionais analisadas (Quadro 3). Apesar do baixo valor de heterozigose, nenhum dos alelos (317 pb e 324 pb) tende a fixação na população, uma vez que ambos apresentam frequências similares: para o alelo de 317 pb a frequência foi de 0,5631; para o alelo de 324 pb foi de 0,4369. Siqueira et al. (2009) também atingiram valores baixos para  $H_o$  (0,095) para este *locus*.

O alelo de 102 pb presente em GA 21 (Quadro 3) apresentou a maior frequência entre todos os demais (0,8051). Este alelo apresenta uma tendência à fixação na população (Costa et al., 2013), pois, com o valor de heterozigosidade observada (0,3559) somado à alta frequência do alelo de 102 pb (Quadro 3), este *locus* se torna mais suscetível às forças evolutivas, principalmente deriva genética (Reed e Frankham, 2003).

No Quadro 3, encontra-se, também, o valores de heterozigosidade média observada: 0,4762. Estes resultados foram comparáveis àqueles de Rocha et al. (2008) que, ao estudar populações de mandioca de duas reservas indígenas da Costa Rica, além de cultivares comerciais, constataram valores de heterozigosidade média observada que variaram entre 0,4241 e 0,4757. Estes valores também estão de acordo com os trabalhos de Mühlen et al. (2000), que encontraram heterozigosidade média de 0,56; de Fregene et al. (2003), que encontraram o valor de 0,5136; de Elias et al. (2004), com 0,506; e de Costa et al. (2013), com 0,5580. Outros estudos com mandioca identificaram médias maiores para  $H_o$  como Asare et al. (2011), os quais, trabalhando com acessos de mandioca de Gana, encontraram 0,78; e Turyagyenda et al. (2012) que encontraram  $H_o$  de 0,726 em acessos de Uganda. Todavia, existem ainda trabalhos como os de Siqueira et al. (2009) e de Sree Lekha et al. (2010) que obtiveram médias de heterozigosidade observada mais baixa, com valores de 0,265 e 0,2255, respectivamente. Avaliando-se os valores de heterozigosidade encontrados no presente estudo, em sua maioria elevados (Quadro 3), pode-se afirmar que existe ampla heterozigose entre as plantas de mandioca cultivadas pelos agricultores. Esta é uma característica típica de plantas

como a mandioca, que apresentam propagação vegetativa somada a um sistema de fecundação cruzada (alogamia) (Fregene et al., 2003).

Com relação à diversidade genética, os *loci* GA 140, SSRY 101 e SSRY 13 foram aqueles que apresentaram os maiores valores: 0,6502; 0,6287 e 0,6125 respectivamente. Por sua vez, os menores valores de diversidade encontrados vieram de GA 21 e GA 57 e foram 0,3138 e 0,3622 (Quadro 3).

Excluindo-se os *primers* GA 21 e GA 57 que apresentaram valores mais reduzidos de diversidade (Quadro 3), os demais *primers* tiveram um comportamento similar com relação à diversidade genética, apresentando valores elevados com pouca variação em torno da média, conforme ocorre na maioria dos estudos (Peroni et al., 2007; Siqueira et al. 2009; Turyagyenda et al., 2012).

Os *primers* GA 21 e GA 57 apresentaram um comportamento similar ao apresentado por GA 134 no trabalho de Mühlen et al. (2000). O desequilíbrio entre as frequências alélicas faz com que o *locus* apresente uma baixa estimativa para diversidade genética, principalmente em *loci* com reduzido número de alelos. Comportamentos similares também são relatados por Elias et al. (2004) e Ribeiro et al. (2011) com o primer GA 16, e por Asare et al. (2011) com o primer SSRY 181.

No Quadro 3, encontram-se os valores de PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) (Botstein et al., 1980), que é um indicativo do conteúdo informativo de cada *primer*. Ou seja, do poder discriminatório que eles possuem entre cada cultivar tradicional de mandioca (Moyib et al., 2007). Valores superiores a 0,5 indicam que o *locus* é altamente informativo; entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos; e inferiores a 0,25 levemente informativos (Botstein et al., 1980).

O valor médio de PIC encontrado foi de 0,4598 e, na média, os *primers* podem ser considerados medianamente informativos, apesar da proximidade entre o valor encontrado e o valor limite de 0,5, acima do qual se encontram os *loci* altamente informativos. Segundo Xia et al. (2005), os valores de PIC para marcadores SSR utilizados na cultura da mandioca variam entre 0,5 e 0,7, logo, o parâmetro PIC médio encontrado foi reduzido para SSR em mandioca. O valor médio de PIC encontrado foi reduzido em comparação à maioria dos estudos encontrados na literatura (Raghu et al., 2007; Asare et al., 2011; Turyagyenda, 2012), seguindo, porém, a mesma tendência de apresentar *primers* tanto com alto quanto com mediano conteúdo informativo (Quadro 3).

Desta forma, seis dos 13 *primers* utilizados foram considerados altamente informativos, sendo os de maior valor de PIC GA 140 com 0,5824, SSRY 101 com 0,5582 e SSRY 13 com 0,5434. Os demais *loci* SSR utilizados foram enquadrados como medianamente informativos, sendo que os menos informativos foram os *loci* GA 21 e GA 57, com valores de 0,2646 e 0,2966, respectivamente (Quadro 3).

Moazami-Goudarzi et al. (1994) afirmam que o valor de PIC é diretamente dependente do número de alelos encontrados por *locus*, assim como de suas frequências. Este fato explica tanto os *loci* com os mais baixos valores informativos encontrados e que apresentaram apenas 2 alelos (Quadro 3), como os *loci* que apresentaram os maiores valores de conteúdo informativo, possuindo 4 alelos.

O estudo realizado por Asare et al. (2011) relatou uma média superior para PIC em torno de 0,53. Porém, nesse caso, foi observada uma alta variação para os valores de PIC entre os *primers* (de 0,07 até 0,68). Um valor médio de PIC superior foi encontrado também por Turyagyenda et al. (2012), os quais encontraram um valor de 0,611. Os valores encontrados no presente estudo foram, porém, superiores aos obtidos por Moyib et al. (2007), que encontraram um valor médio para PIC de 0,4206. Além disso, os estudos de Costa et al. (2013) com as mesmas cultivares tradicionais de mandioca de Maringá utilizadas no presente estudo, apontam o valor de 0,4040. Este fato pode ser explicado, pois, ao adicionarem-se à análise genético-estatística as populações de Cianorte e de Toledo, procedeu-se um aumento na diversidade genética do conjunto, aumenta o número de alelos por *primer* e, conseqüentemente, as médias de divergência genética e de PIC. Deste modo, pode-se dizer que populações maiores e menos homogêneas tendem a apresentar valores mais altos de conteúdo informativo por *locus* (Moazami-Goudarzi et al., 1994).

No Quadro 4, encontram-se as frequências alélicas obtidas para cada local de coleta. Pôde-se constatar grande divergência nas taxas de ocorrência dos alelos, além da ocorrência de alguns alelos únicos em alguns locais. Alguns exemplos que podem ser detectados são os dos alelos de 146 pb do *locus* GA 57, e de 147 pb de GA 140, que ocorreram exclusivamente em Maringá. Também os alelos de 150 pb de SSRY 21 e de 214 pb de SSRY 45, exclusivos de Cianorte; e o alelo de 195 pb de SSRY 101, exclusivo de Toledo.

Quadro 4 – Frequências alélicas e conteúdo de informação de polimorfismo para cada um dos loci SSR por local de coleta

Loci	Alelo (pb)	Toledo	PIC	Cianorte	PIC	Maringá	PIC
GA 21	102	1,0000		0,8462		0,6936	
	108	-	0,0000	0,1538	0,2265	0,3064	0,3347
GA 57	146	-		-		0,4453	
	171	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,5547	0,3720
	183	0,4821		0,3600		0,5593	
GA 126	190	0,1786		0,1200		-	
	228	0,3036	0,5778	0,4400	0,5922	0,4322	0,3833
	242	0,0357		0,0800		0,0085	
	200	-		-		0,5263	
GA 127	227	0,3667	0,3566	0,0400	0,0739	-	0,3743
	242	0,6333		0,9600		0,4737	
	317	0,4286	0,3698	0,4231	0,3690	0,4474	0,3722
GA 134	324	0,5714		0,5769		0,5526	
	147	0,7593	0,2987	0,5625	0,3711	0,5175	0,3747
GA 136	158	0,2407		0,4375		0,4825	
	147	-		-		0,0833	
GA 140	148	0,3750		0,2692		-	
	158	0,4821	0,5259	0,2500	0,5624	0,4917	0,4775
	162	0,1429		0,4808		0,4250	
	223	0,2222		0,2826		0,1953	
SSRY 13	237	0,2963	0,5587	0,3044	0,5832	0,2266	0,5126
	252	0,4815		0,4130		0,5781	
	194	0,2500		0,0577		0,0703	
SSRY 19	218	0,3929	0,5810	0,8269	0,2767	0,4219	0,4631
	236	0,3571		0,1154		0,5078	
	150	-		0,0217		-	
SSRY 21	165	0,3913		0,1087		0,0076	
	174	0,2173	0,5707	0,6957	0,4316	0,5076	0,3860
	190	0,3914		0,1739		0,4849	
						0	
				0		0,0781	
SSRY 45	185	0,1786		0,2000			
	204	0,4286	0,5519	0,4600	0,6076	0,5000	0,4717
	214	-		0,0600		-	
	218	0,3928		0,2800		0,4219	
SSRY 101	174	0,1607		0,2400		0,7381	
	177	0,5893	0,5143	0,5600	0,5230	0,0476	0,3543
	189	0,2321		0,2000		0,2143	
	195	0,0179		-		-	
	249	0,3889		0,3800		0,5000	
SSRY 135	263	0,3704	0,5787	0,0800	0,4678	-	0,3750
	284	0,2407		0,5400		0,5000	
Média	-	0,5847	0,4219	0,6432	0,3912	0,5559	0,4040

Desta forma, fica evidente a diferenciação entre as cultivares tradicionais dos três locais de origem, fato que demonstra uma possível estruturação da população em diferentes grupos. Em decorrência das diferentes frequências alélicas, também se pode observar que alguns *loci* não foram informativos nas populações em que não houve polimorfismo, tal como ocorreu com o *locus* GA 21 na população de Toledo (Quadro 4).

Encontram-se, no Quadro 5, as combinações mais divergentes e mais similares, obtidas pela distância de C. S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) e que demonstram a divergência entre as cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa pelo programa PowerMarker 3.25 (Liu e Muse, 2005).

No Quadro 5, observa-se as combinações mais divergentes encontradas e pode-se destacar BGM 434T x BGM 20M, com a distância de 0,7809, seguida por BGM 35C x BGM 20M, BGM 430T x BGM 232M e BGM 430T x BGM 164M, com 0,7773, 0,7669 e 0,7556, respectivamente. Cabe ressaltar que todas as combinações exibidas no Quadro 5 podem ser consideradas altamente divergentes, sendo aquelas que contêm os indivíduos mais geneticamente distantes entre as 7381 possíveis combinações de cruzamentos entre as 122 cultivares tradicionais analisadas.

Das 33 combinações mais divergentes exibidas, 58% foram entre cultivares tradicionais de Maringá e de Toledo, 30% entre Cianorte e Maringá, 9% entre Toledo e Cianorte e 3% exclusivamente de Toledo. Isso reflete a tendência geral observada entre as 122 cultivares de uma maior dissimilaridade entre as populações de Toledo e de Maringá.

A cultivar tradicional BGM 20M, que apareceu na combinação mais divergente no presente estudo, esteve entre as de mais elevada divergência para com as demais cultivares de Maringá estudadas por Costa et al. (2013). No presente estudo, porém, as combinações mais divergentes ficaram em sua grande maioria entre cultivares de locais diferentes. Isso indica a conexão entre características genotípicas e local de origem da cultivar tradicional, sugerindo a formação de mais de um grupo dentro da população, separando cultivares tradicionais de locais distintos, assim como as cultivares tradicionais mais divergentes dentro de um mesmo local (Quadro 5).

Quadro 5 – Combinações divergentes e similares entre as 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa coletados no Estado do Paraná, resultantes da avaliação por meio da Distância C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967)

Combinações mais divergentes	Combinações mais similares
BGM 434T* x BGM 20M = 0,7809	BGM 460T x BGM 467T = 0,0000
BGM 35C x BGM 20M = 0,7773	BGM 441T x BGM 444T = 0,0000
BGM 430T x BGM 232M = 0,7669	BGM 39C x BGM 47C = 0,0000
BGM 430T x BGM 164M = 0,7556	BGM 48C x BGM 55C = 0,0000
BGM 430T x BGM 322M = 0,7441	BGM 48C x BGM 63C = 0,0000
BGM 35C x BGM 164M = 0,7441	BGM 25M x BGM 30M = 0,0000
BGM 66C x BGM 322M = 0,7441	BGM 25M x BGM 31M = 0,0000
BGM 432T x BGM 460T = 0,7386	BGM 36M x BGM 37M = 0,0000
BGM 495T x BGM 20M = 0,7361	BGM 59M x BGM 162M = 0,0375
BGM 434T x BGM 34M = 0,7357	BGM 5M x BGM 16FE M = 0,0375
BGM 434T x BGM 36M = 0,7357	BGM 30M x BGM 33M = 0,0375
BGM 495T x BGM 322M = 0,7351	BGM 31M x BGM 33M = 0,0375
BGM 434T x BGM 56M = 0,7326	BGM 34M x BGM 36M = 0,0375
BGM 449T x BGM 56M = 0,7326	BGM 12M x BGM 139M = 0,0487
BGM 430T x BGM 323M = 0,7311	BGM 25M x BGM 37M = 0,0443
BGM 430T x BGM 326M = 0,7311	BGM 25M x BGM 33M = 0,0406
BGM 63C x BGM 222M = 0,7267	BGM 34M x BGM 37M = 0,0406
BGM 73C x BGM 236M = 0,7261	BGM 444T x BGM 445T = 0,0538
BGM 460T x BGM 35C = 0,7249	BGM 161M x BGM 214M = 0,0541
BGM 66C x BGM 164M = 0,7239	BGM 162M x BGM 214M = 0,0541
BGM 495T x BGM 164M = 0,7237	BGM 163M x BGM 214M = 0,0541
BGM 434T x BGM 37M = 0,7220	BGM 59M x BGM 214M = 0,0541
BGM 449T x BGM 50M = 0,7187	BGM 222M x BGM 232M = 0,0541
BGM 35C x BGM 179M = 0,7187	BGM 121M x BGM 124M = 0,0541
BGM 483T x BGM 214M = 0,7167	BGM 12M x BGM 90M = 0,0541
BGM 430T x BGM 222M = 0,7157	BGM 441T x BGM 445T = 0,0579
BGM 73C x BGM 33M = 0,7124	BGM 59M x BGM 161M = 0,0693
BGM 66C x BGM 323M = 0,7092	BGM 461T x BGM 467T = 0,0693
BGM 461T x BGM 35C = 0,7067	BGM 467T x BGM 496T = 0,0693
BGM 461T x BGM 35C = 0,7067	BGM 434T x BGM 449T = 0,0693
BGM 443T x BGM 50M = 0,7062	BGM 67C x BGM 48C = 0,0693
BGM 430T x BGM 214M = 0,7040	BGM 67C x BGM 63C = 0,0693
BGM 70C x BGM 236M = 0,7022	BGM 47C x BGM 63C = 0,0693

\*Cultivares tradicionais seguidas da letra T são originários de Toledo, C de Cianorte e M de Maringá.

Da mesma forma, algumas cultivares tradicionais que figuram entre as mais divergentes, oriundas de Cianorte, também o foram no trabalho de Zuin (2006), como as mais divergentes dentro do local. As cultivares BGM 63C, BGM 70C e BGM 73C são citadas por Zuin (2006), entre as combinações mais divergentes determinadas pelo complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Jaccard, utilizando o método de RAPD, em 43 cultivares tradicionais de mandioca coletadas em Cianorte, das quais 26 foram analisadas no presente estudo. Além dessas cultivares tradicionais, Zuin (2006) também cita a cultivar BGM 35C entre as mais divergentes. Isso demonstra o fato de que, em Cianorte, existem cultivares tradicionais divergentes, não excluindo a chance de cultivares similares às de Maringá.

Com relação às cultivares tradicionais oriundas de Toledo, no trabalho realizado por Silva (2010), utilizando marcadores RAPD para a determinação da divergência genética entre 66 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa, também observa-se um padrão claro entre as mesmas cultivares tradicionais de Toledo incluídas neste trabalho entre as combinações mais divergentes. As cultivares tradicionais BGM 430T, BGM 432T e BGM 434T estão entre as cultivares mais similares entre si, dentro das combinações de cultivares obtidas por Silva (2010). Logo, é um fato natural que as três estejam citadas nas combinações mais divergentes neste trabalho, todas combinadas com cultivares tradicionais de Maringá. Além disso, em Silva (2010), observa-se, também, que as cultivares tradicionais BGM 461T e BGM 483T são bastante similares entre si e às cultivares BGM 430T, BGM 432T e BGM 434T. Isso se deve aos coeficientes de dissimilaridade calculados a partir dos coeficientes de similaridade de Jaccard, determinados por meio de marcadores RAPD.

As cultivares tradicionais mais divergentes encontradas neste estudo podem ser utilizadas em programas de melhoramento como parentais na formação de clones heteróticos (Gonçalves-Vidigal et al., 1997) desde que os parentais sejam geneticamente complementares (Nick et al., 2010). Para tanto, é necessário que sejam determinadas suas características agrônômicas referentes ao conteúdo de matéria seca, produtividade, características organolépticas e presença de floração.

Os cruzamentos mais indicados para a região de Maringá são aqueles envolvendo as cultivares tradicionais BGM 20M, BGM 232M, BGM 164M, BGM 322M, BGM 56M, BGM 323M e BGM 222M, pois, segundo Kvitschal (2008), estas

apresentam floração. Ainda segundo Kvitschal (2008), pode-se observar que, entre as cultivares que apresentam floração, BGM 20M apresenta as características mais interessantes em um cruzamento, como o teor de amido superior ao da média encontrada em seu trabalho ( $300,96 \text{ g.kg}^{-1}$ ) além de apresentar tolerância ao superalongamento e à bacteriose.

Conforme dados do Quadro 5, as cultivares menos divergentes encontradas e consideradas prováveis duplicatas são: BGM 460T e BGM 467T; BGM 441T e BGM 444T; BGM 39C e BGM 47C; BGM 48C, BGM 55C e BGM 63C; BGM 25M, BGM 30M e BGM 31M e BGM 36M com BGM 37M.

As cultivares tradicionais originárias de Maringá BGM 25M, BGM 30M e BGM 31M estão entre as mais similares no presente estudo e, segundo Costa et al. (2013), também podem ser consideradas como possíveis duplicatas utilizando-se marcadores SSR. Os resultados obtidos para estas cultivares tradicionais de Maringá utilizando marcadores moleculares RAPD por Silva (2010) apresentaram correlação com resultados obtidos por marcadores SSR no presente estudo. No estudo realizado por Silva (2010) os coeficientes de similaridade de Jaccard para BGM 25M foram 0,7164 e 0,6957 entre BGM 30M e BGM 31M, respectivamente. O coeficiente de similaridade entre BGM 30M e BGM 31M também foi considerado elevado (0,8636). Este fato pode ser observado entre as cultivares tradicionais BGM 36M e BGM 37M que, pela técnica de RAPD, apresentaram coeficiente de similaridade de 0,8393.

Com relação aos resultados obtidos para as demais cultivares tradicionais, oriundas de Toledo e Cianorte, não houve uma correlação direta entre as distâncias de C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) obtidas no presente estudo e os coeficientes de similaridade obtidos nos trabalhos de Silva (2010) e Zuin (2006) utilizando marcadores moleculares RAPD, características qualitativas e quantitativas.

Os marcadores morfoagronômicos exibem uma alta influência ambiental em sua expressão (Chakravarthi e Naravaneni, 2006) e, portanto, podem ter seus resultados influenciados por alterações fenotípicas que não traduzam o conteúdo genotípico da cultivar. Além disso, existem efeitos pleiotrópicos e epistáticos capazes de mascarar as características genotípicas (Agarwal et al., 2008). Os marcadores moleculares, tais como RAPD e SSR, por outro lado, apresentam resultados que traduzem diretamente as características presentes no genoma da

espécie (Collard et al., 2005; Kalia et al., 2011). Isso pode explicar as diferenças entre os resultados obtidos para estrutura populacional e diversidade genética entre as cultivares tradicionais dos estudos de Zuin et al. (2009) e Silva (2010), utilizando marcadores morfoagonômicos, e aos resultados do presente estudo, baseados em marcadores SSR.

As diferenças entre os resultados observados no presente estudo, o qual se baseou na utilização de marcadores SSR, e os trabalhos estudando as mesmas cultivares tradicionais via marcadores RAPD (Zuin, 2006; Silva, 2010), residem na diferença informativa entre estes dois tipos de marcadores (Palombi e Damiano, 2002). Os marcadores RAPD são dominantes, portanto não apresentam a capacidade de diferenciar homo e heterozigotos (Palombi e Damiano, 2002; Collard et al., 2005). Isso reduz a capacidade de diferenciação entre as cultivares. Já os marcadores SSR são codominantes (Palombi e Damiano, 2002; Kalia et al., 2011) e diferenciam homo e heterozigotos, possuindo um maior poder discriminativo. Apesar disso, para que se afirme que dois acessos são realmente duplicatas, é necessário que sejam utilizados marcadores com altos valores de PIC em quantidade suficiente para cobrir todos os grupos de ligação. Portanto, novos trabalhos devem ser realizados, utilizando preferencialmente *primers* utilizados em trabalhos determinantes de mapa de ligação da cultura da mandioca (Sraphet et al., 2011), garantindo maior cobertura do genoma.

#### **4.2. Estrutura da população**

Inicialmente, a análise de estrutura populacional foi realizada pelo programa Structure 2.3.4 e pelo método probabilístico (Pritchard et al., 2000). Este método, utilizando *burn-in* de 10.000 ciclos, 100.000 repetições e simulando a distribuição das cultivares tradicionais de K=2 até K=15 grupos, apresentou como arquivo de saída as pressuposições de distribuição da população. Algumas delas podem ser observadas na Figura 2, que apresenta as simulações de K=2 até K=5 grupos.

Assim, baseando-se nos resultados de saída do programa Structure, foi utilizado o aplicativo Structure Harvester (Earl e vonHoldt, 2012) para a obtenção do valor de  $\Delta K$  e, conseqüentemente, a determinação do valor ótimo de K que representa a quantidade de grupos que melhor se adéqua à distribuição das cultivares tradicionais mais similares (Figura 3).

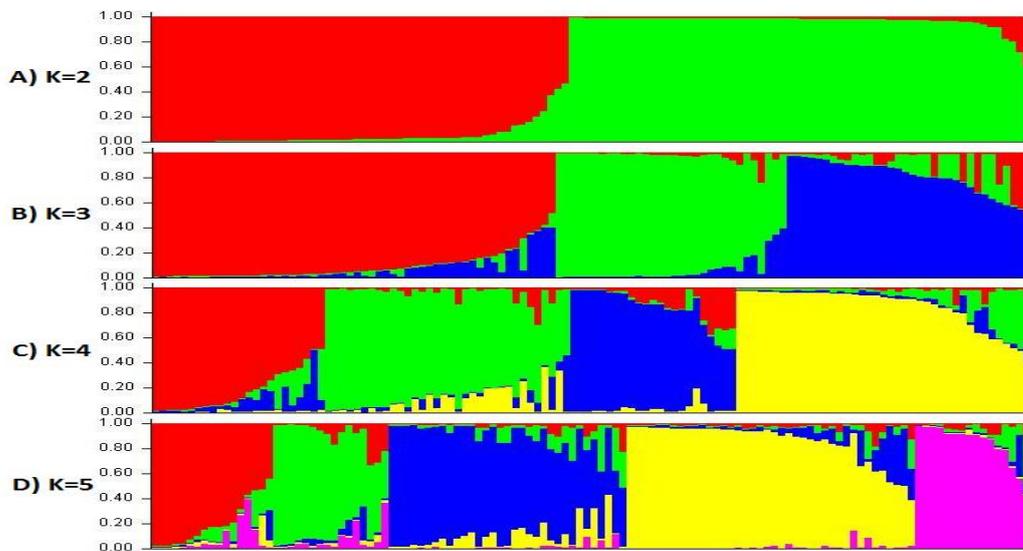


Figura 2 – Estrutura populacional das cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa do Paraná, supondo a formação de 2, 3, 4 e 5 grupos (A, B, C e D, respectivamente), dada pelo programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).

Observou-se a formação de 4 grupos na população formada pelas 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa analisadas coletadas nos municípios de Maringá, Cianorte e Toledo (Figura 3).

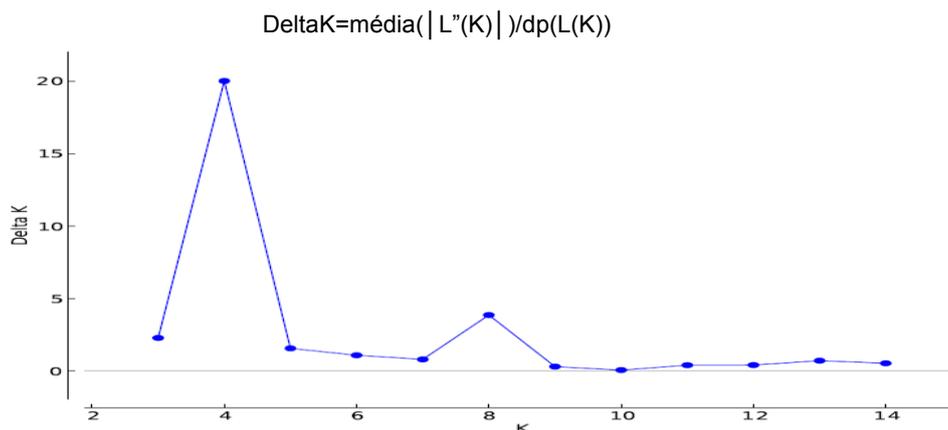


Figura 3 – Estrutura populacional das cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa do Paraná: inferência do número de  $K$  grupos da população em estudo obtido por meio do programa Structure Harvester (Earl e vonHoldt, 2012).

Baseando-se nos resultados obtidos (Figura 4), pode-se observar com detalhes como as cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa foram agrupadas

entre os quatro grupos definidos pelo programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). O eixo das ordenadas demonstra as probabilidades dos indivíduos pertencerem ao  $k$ -ésimo grupo, enquanto no eixo das abscissas está cada cultivar tradicional em sua respectiva barra.

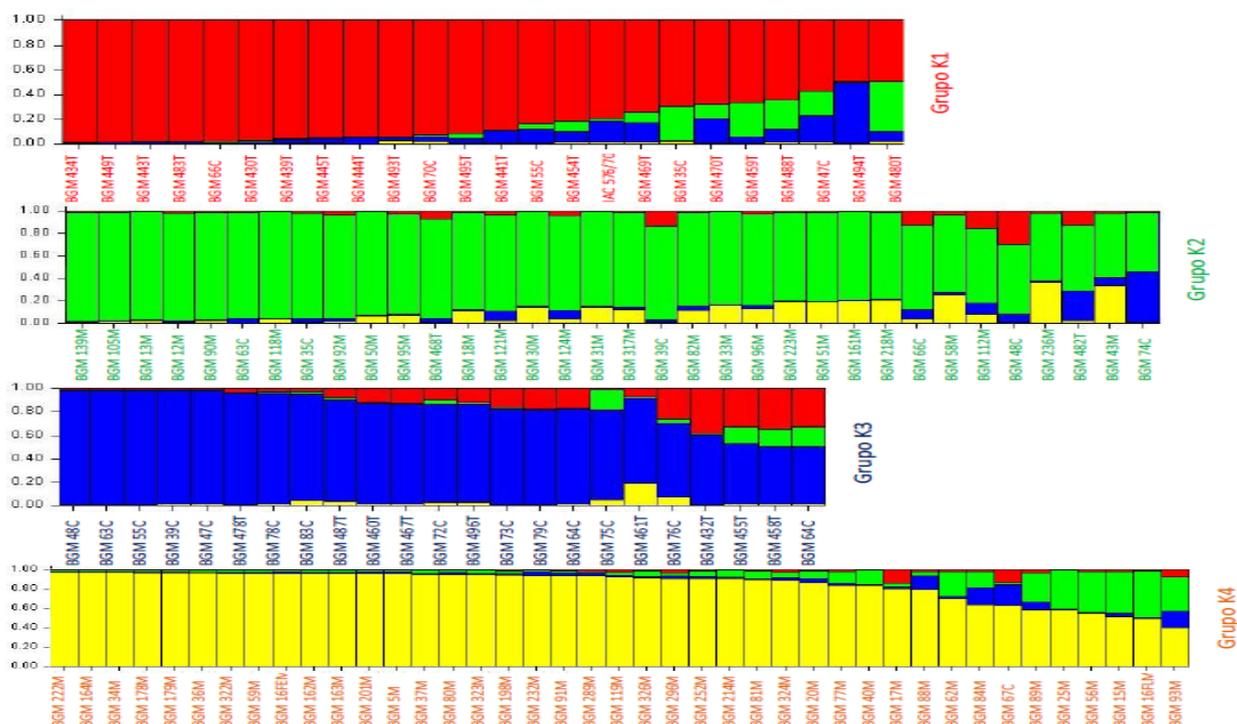


Figura 4 – Estrutura populacional e probabilidades de alocação das cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa de Maringá, Cianorte e de Toledo, no Paraná para  $K = 4$  grupos, dada pelo programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).

Houve uma coincidência entre a estrutura populacional encontrada pelo programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) e a divergência entre as combinações mais e menos similares calculadas pelo programa PowerMarker 3.25 (Liu e Muse, 2005). Assim, conforme as Figuras 4 e 5, as cultivares tradicionais mais divergentes, tais como BGM 434T e BGM 20M, encontram-se em grupos diferentes (K1 e K4). O mesmo pode ser visto pelas cultivares mais similares e enquadradas nos mesmos grupos: BGM 460T e BGM 467T no grupo K3 e BGM 441T e BGM 444T no grupo K1 (Quadro 5).

No Quadro 6 encontram-se todas as 122 cultivares tradicionais avaliadas, numeradas de 1 a 122, com seus correspondentes nomes de passaporte no Banco de Germoplasma da Fazenda Experimental de Iguatemi. Observam-se, no Quadro 6, as cultivares tradicionais acompanhadas do grupo ao qual pertencem, e da probabilidade de pertencerem ao mesmo. Nota-se que cada cultivar foi destinada a

um grupo, de acordo com a maior probabilidade encontrada de pertencer a um k-ésimo grupo.

Pode-se observar, na Figura 4 e no Quadro 6, que as cultivares tradicionais foram divididas em um número de grupos maior que o número de locais. Além disso, algumas cultivares de Toledo e de Cianorte foram agrupadas juntamente com cultivares tradicionais de Maringá, que em sua totalidade se encontram distribuídas entre os grupos K2 e K4 (Figura 5).

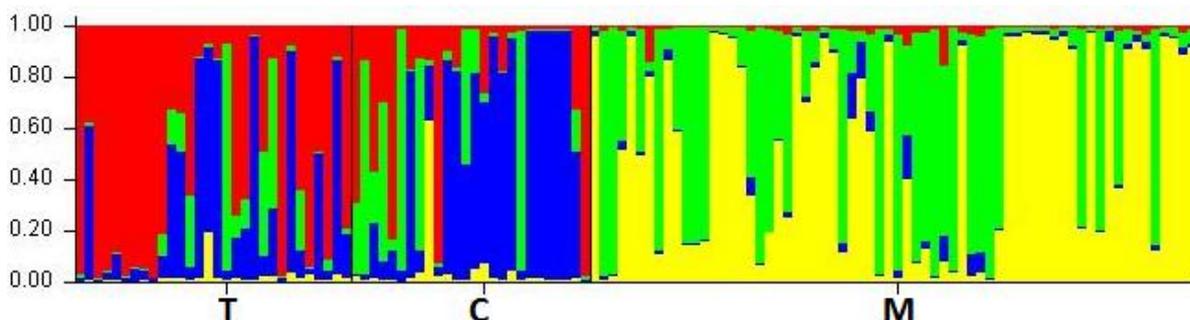


Figura 5 – Estrutura populacional das cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa de Maringá (M), Cianorte (C) e Toledo (T), no Paraná, ordenados em seus locais de origem para K = 4 grupos dada pelo programa Structure 2.3.4.

Cabe ressaltar ainda que a cultivar melhorada IAC 576/70, utilizada para fins comparativos, se enquadrou no Grupo 1 (Quadro 6). Deste modo, pode-se dizer que, de maneira geral, esta cultivar se aproxima das demais pertencentes a este grupo, predominantemente oriundas de Toledo. Sabe-se que esta cultivar é proveniente do cruzamento entre o clone IAC 14-18 e a cultivar SRT 797-Ouro do Vale. Segundo Valle<sup>1</sup>, o genitor Ouro do Vale era comumente encontrado no Estado do Paraná. Portanto, seus alelos podem ter sido compartilhados entre as cultivares da região de Toledo, levando a uma maior similaridade genética para com as cultivares tradicionais coletadas neste local.

Na Figura 5, podem-se observar as cultivares tradicionais, ordenadas em cada um dos locais, com as probabilidades de pertencerem a cada um dos grupos (Grupo 1 em vermelho, Grupo 2 em verde, Grupo 3 em azul e Grupo 4 em amarelo). A análise das Figuras 4 e 5 e do Quadro 6 mostra que as proporções de cultivares em cada grupo K se deram da seguinte forma: Toledo obteve 63% (19 cultivares tradicionais) no Grupo 1; 7% (2) no Grupo 2 e 30% (9) no Grupo 3; Cianorte obteve

<sup>1</sup> Comunicação pessoal: Valle, Teresa Losada. Pesquisadora do Instituto Agronômico de Campinas, Brasil.

19% (5) no Grupo 1; 23% (6) no Grupo 2; 54% (14) no Grupo 3 e 4% (1) no Grupo 4. Maringá obteve 39% (26) das cultivares tradicionais no Grupo 2 e 61% (40) no Grupo 4.

Os dados obtidos reforçaram os resultados apresentados por Costa et al. (2013) em seus estudos com relação ao agrupamento das cultivares tradicionais de Maringá. Em seu trabalho, Costa et al. (2013) dividiram as cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa maringaenses entre dois grupos, de acordo com a divergência genética entre os indivíduos. O mesmo foi observado no presente trabalho. Aqui a constituição destes dois grupos foi seguida, com exceção de algumas cultivares que, no trabalho de Costa et al. (2013), encontravam-se em grupos distintos, porém com probabilidades equilibradas de separação entre os grupos. Assim como no presente estudo, procedeu-se à inclusão das populações de Toledo e Cianorte, houve a formação de outros dois grupos (1 e 3), causando a mudança de algumas cultivares para um grupo distinto, mantendo, porém, as cultivares de Maringá exclusivamente em dois grupos (Figura 5).

O Grupo K1, obtido no trabalho de Costa et al. (2013), foi praticamente equivalente ao Grupo K2, obtido neste trabalho, e o Grupo K2, de Costa et al. (2013) foi semelhante ao Grupo K4 do presente estudo. A distribuição entre as cultivares tradicionais de Costa et al. (2013) pode ser observada no Quadro 7.

Quadro 6 – Cultivares, grupo  $K$  e probabilidades  $P(K)$  de alocação no  $k$ -ésimo grupo, considerando as 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa do Paraná e a formação de  $K = 4$  grupos

Nº de ordem	Cultivar	Grupo K	P (K)	Nº de ordem	Cultivar	Grupo K	P (K)
1	BGM 430T*	1	0,965	16	BGM 467T	3	0,849
2	BGM 432T	3	0,597	17	BGM 468T	2	0,885
3	BGM 434T	1	0,982	18	BGM 469T	1	0,740
4	BGM 439T	1	0,952	19	BGM 470T	1	0,672
5	BGM 441T	1	0,879	20	BGM 478T	3	0,950
6	BGM 443T	1	0,977	21	BGM 480T	1	0,488
7	BGM 444T	1	0,941	22	BGM 482T	2	0,585
8	BGM 445T	1	0,945	23	BGM 483T	1	0,977
9	BGM 449T	1	0,979	24	BGM 487T	3	0,865
10	BGM 454T	1	0,808	25	BGM 488T	1	0,639
11	BGM 455T	3	0,522	26	BGM 493T	1	0,936
12	BGM 458T	3	0,496	27	BGM 494T	1	0,490
13	BGM 459T	1	0,664	28	BGM 495T	1	0,908
14	BGM 460T	3	0,858	29	BGM 496T	3	0,835
15	BGM 461T	3	0,723	30	IAC 576/70	1	0,791

Quadro 6, Cont.

31	BGM 35C	1	0,689	77	BGM 56M	4	0,554
32	BGM 39C	2	0,836	78	BGM 58M	2	0,697
33	BGM 47C	1	0,568	79	BGM 59M	4	0,964
34	BGM 48C	2	0,620	80	BGM 62M	4	0,705
35	BGM 55C	1	0,832	81	BGM 77M	4	0,840
36	BGM 63C	2	0,945	82	BGM 80M	4	0,950
37	BGM 64C	3	0,806	83	BGM 81M	4	0,893
38	BGM 66C	2	0,751	84	BGM 82M	2	0,836
39	BGM 67C	4	0,631	85	BGM 84M	4	0,641
40	BGM 70C	1	0,925	86	BGM 88M	4	0,800
41	BGM 72C	3	0,836	87	BGM 89M	4	0,590
42	BGM 73C	3	0,815	88	BGM 90M	2	0,954
43	BGM 74C	2	0,530	89	BGM 91M	4	0,939
44	BGM 75C	3	0,764	90	BGM 92M	2	0,920
45	BGM 76C	3	0,627	91	BGM 93M	4	0,406
46	BGM 78C	3	0,939	92	BGM 95M	2	0,888
47	BGM 79C	3	0,809	93	BGM 96M	2	0,817
48	BGM 83C	3	0,900	94	BGM 105M	2	0,964
49	BGM 86C	2	0,935	95	BGM 112M	2	0,668
50	BGM 125C	3	0,964	96	BGM 118M	2	0,944
51	BGM 126C	3	0,964	97	BGM 119M	4	0,927
52	BGM 130C	3	0,975	98	BGM 121M	2	0,855
53	BGM 144C	3	0,973	99	BGM 124M	2	0,841
54	BGM 154C	3	0,975	100	BGM 139M	2	0,971
55	BGM 170C	3	0,492	101	BGM 161M	2	0,784
56	BGM 173C	1	0,973	102	BGM 162M	4	0,963
57	BGM 5M	4	0,959	103	BGM 163M	4	0,961
58	BGM 12M	2	0,961	104	BGM 164M	4	0,974
59	BGM 13M	2	0,962	105	BGM 178M	4	0,971
60	BGM 15M	4	0,520	106	BGM 179M	4	0,971
61	BGM 16FEM	4	0,963	107	BGM 198M	4	0,946
62	BGM 16FLM	4	0,496	108	BGM 201M	4	0,961
63	BGM 17M	4	0,805	109	BGM 214M	4	0,910
64	BGM 18M	2	0,866	110	BGM 218M	2	0,771
65	BGM 20M	4	0,870	111	BGM 222M	4	0,975
66	BGM 25M	4	0,588	112	BGM 223M	2	0,787
67	BGM 30M	2	0,841	113	BGM 232M	4	0,940
68	BGM 31M	2	0,839	114	BGM 236M	2	0,597
69	BGM 33M	2	0,826	115	BGM 252M	4	0,911
70	BGM 34M	4	0,972	116	BGM 289M	4	0,936
71	BGM 36M	4	0,969	117	BGM 296M	4	0,913
72	BGM 37M	4	0,952	118	BGM 317M	2	0,839
73	BGM 40M	4	0,836	119	BGM 322M	4	0,965
74	BGM 43M	2	0,571	120	BGM 323M	4	0,950
75	BGM 50M	2	0,917	121	BGM 324M	4	0,886
76	BGM 51M	2	0,786	122	BGM 326M	4	0,918

BGM=Banco de germoplasma de mandioca; FE=Folha estreita; FL=Folha larga; IAC= Instituto Agrônomo de Campinas; \*Acessos seguidos pela letra T são originários de Toledo, C de Cianorte e M de Maringá.

Comparando-se os resultados obtidos para as cultivares tradicionais de Maringá no presente estudo e no estudo de Costa et al. (2013), pode-se dizer que 92,4% delas foram separadas em grupos de maneira similar, tendo sido divididas em apenas dois grupos. As demais cultivares (5) que apresentaram mudança de grupo foram todas trocadas do Grupo 2 para o Grupo 4, ou seja, pertenciam ao

Grupo 1 no trabalho de Costa et al. (2013). Apesar da pequena variação observada no agrupamento das cultivares tradicionais, em ambos os estudos, os resultados obtidos por Costa et al. (2013) justificam os resultados obtidos no presente estudo com relação à divisão das cultivares tradicionais de Maringá em dois grupos, assim como a constituição de cada grupo.

Quadro 7 – Acessos, grupo K e probabilidades P(K) de alocação no k-ésimo grupo, considerando os 66 acessos de mandioca-de-mesa de Maringá, Paraná, em análise realizada por Costa et al. (2013)

Nº de ordem	Cultivar	Grupo K	P (K)	Nº de ordem	Cultivar	Grupo K	P (K)
1	BGM 5M	2	0,93	34	BGM 92M	1	0,95
2	BGM 12M	1	0,97	35	BGM 93M	2	0,57
3	BGM 13M	1	0,96	36	BGM 95M	1	0,94
4	BGM 15M	1	0,58	37	BGM 96M	1	0,87
5	BGM 16FEM	2	0,93	38	BGM 105M	1	0,96
6	BGM 16FLM	1	0,55	39	BGM 112M	1	0,95
7	BGM 17M	2	0,64	40	BGM 118M	1	0,93
8	BGM 18M	1	0,91	41	BGM 119M	2	0,83
9	BGM 20M	2	0,81	42	BGM 121M	1	0,96
10	BGM 25M	2	0,53	43	BGM 124M	1	0,95
11	BGM 30M	1	0,87	44	BGM 139M	1	0,97
12	BGM 31M	1	0,87	45	BGM 161M	1	0,86
13	BGM 33M	1	0,85	46	BGM 162M	2	0,90
14	BGM 34M	2	0,91	47	BGM 163M	2	0,93
15	BGM 36M	2	0,90	48	BGM 164M	2	0,97
16	BGM 37M	2	0,85	49	BGM 178M	2	0,95
17	BGM 40M	2	0,73	50	BGM 179M	2	0,95
18	BGM 43M	1	0,63	51	BGM 198M	2	0,85
19	BGM 50M	1	0,93	52	BGM 201M	2	0,95
20	BGM 51M	1	0,93	53	BGM 214M	2	0,78
21	BGM 56M	1	0,80	54	BGM 218M	1	0,84
22	BGM 58M	1	0,86	55	BGM 222M	2	0,97
23	BGM 59M	1	0,90	56	BGM 223M	1	0,86
24	BGM 62M	1	0,73	57	BGM 232M	2	0,95
25	BGM 77M	2	0,64	58	BGM 236M	1	0,75
26	BGM 80M	2	0,91	59	BGM 252M	2	0,68
27	BGM 81M	2	0,76	60	BGM 289M	2	0,92
28	BGM 82M	1	0,78	61	BGM 296M	2	0,85
29	BGM 84M	2	0,75	62	BGM 317M	1	0,86
30	BGM 88M	2	0,84	63	BGM 322M	2	0,93
31	BGM 89M	2	0,55	64	BGM 323M	2	0,75
32	BGM 90M	1	0,95	65	BGM 324M	2	0,80
33	BGM 91M	2	0,90	66	BGM 326M	2	0,81

Diversos estudos (Lokko et al., 2006; Kizito et al., 2007; Costa et al., 2013) ressaltam a influência dos intercâmbios de cultivares tradicionais entre produtores de mandioca de diferentes locais sobre a estrutura da população, fazendo com que cultivares de regiões próximas possam ser alocadas em grupos diferentes e

cultivares de locais distantes possam ser alocadas no mesmo grupo. A comparação de diferentes cultivares tradicionais visando à identificação da estrutura genética deve ser feita entre elas, individualmente, e não entre locais. Somente baseando-se nos dados obtidos, pode-se fazer a inferência da estrutura populacional embasada na diferenciação genética, que pode ou não refletir a localização geográfica (Jorgensen e Mauricio, 2004; Nordborg et al., 2005). Isso depende principalmente das características da população com relação ao isolamento destes acessos, o que pode impossibilitar a troca de alelos entre eles, causando a separação em diferentes grupos (Thomas et al., 2003).

As relações de proximidade genética obtidas neste trabalho entre as cultivares tradicionais dos três locais pode ser explicada pelos intercâmbios e pelo transporte de propágulos, assim como pela origem dos produtores que colonizaram cada uma das regiões. As plantas coletadas no município de Maringá apresentaram-se mais distantes geneticamente daquelas coletadas em Cianorte e Toledo, que por sua vez foram relativamente próximos entre si (Quadro 6). Isso indica que algum evento no processo de implementação, pelos colonos, da cultura da mandioca na região Noroeste do Paraná fez com que houvesse menos intercâmbios de cultivares tradicionais de Maringá com as outras duas localidades. Isso contraria a localização geográfica das mesmas, considerando que Maringá fica a 81 Km de Cianorte, enquanto Toledo e Cianorte estão a 215 Km (DER, 2013). Este processo pode estar ligado à crise cafeeira na década de 70, que fez com que na região produtora de café, que envolvia o município de Cianorte, ocorresse êxodo rural e subsequente reocupação das áreas agrícolas. Conseqüentemente, houve a migração de pessoas de várias regiões do Estado, entre elas o Oeste do Paraná, para a região de Cianorte (Camarano e Abramovay, 1999). Durante esta migração, cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa da região de Toledo podem ter sido introduzidas, resultando na troca de alelos com populações de mandioca da região de Cianorte, reduzindo, assim, as distâncias genéticas entre as populações de ambos os locais. Além disso, existe fluxo migratório constante entre as regiões Oeste e Norte do Estado do Paraná (Kleinke et al., 1999), que culmina no intercâmbio de cultivares tradicionais entre as regiões.

Os resultados obtidos servem como indicadores da real estrutura populacional das cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa nas regiões de onde os mesmos são nativos, já que estas não são conhecidas, tendo por base o fato de

que não se tem informações sobre a origem dos materiais nos períodos pré-coleta. Além disso, a estrutura populacional é influenciada diretamente pelas trocas de alelos entre as cultivares, ocasionadas pelo trânsito e intercâmbio de materiais entre os pequenos produtores, somado à fecundação cruzada típica das plantas alógamas, como *M. esculenta* (Lokko et al., 2006, Kizito et al., 2007).

Além do método probabilístico (Pritchard et al., 2000), procedeu-se à análise da diversidade genética por meio de uma árvore de dispersão. No presente estudo, foi utilizada a Árvore do Vizinho mais Próximo (Figura 6), construída com base nas distâncias de C. S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) e implementadas pelo programa PowerMarker 3.25 (Liu e Muse, 2005).

Os resultados apresentados na Figura 6 apontam o maior distanciamento entre os grupos predominantemente ocupados por cultivares tradicionais de Maringá (K2 e K4) dos grupos onde predominam cultivares de Cianorte e Toledo. Pode-se observar, também, a ocorrência de indivíduos semelhantes, de acordo com sua proximidade na árvore. Como era de se esperar, a semelhança concorda com a metodologia de C. S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) e as cultivares tradicionais dadas como semelhantes pertencem aos mesmos grupos salientados pelo programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Pode-se destacar os indivíduos BGM 460T e BGM 467T, BGM 441T e BGM 444T, BGM 39C e BGM 47C e BGM 48C, BGM 55C e BGM 63C, considerados possíveis duplicatas pela metodologia probabilística (Pritchard et al., 2000), assim como pela Árvore do Vizinho mais Próximo.

Ainda na Figura 6, pode-se perceber que os indivíduos que apresentam maior divergência entre si pertencem principalmente aos grupos K1 e K4. Alguns indivíduos que seguem esse padrão, e compõem as combinações mais divergentes, são: BGM 430T x BGM 164M, BGM 322M x BGM 323M, BGM 66C x BGM 322M, BGM 495T x BGM 20M e BGM 495T x BGM 322M, entre muitos outros. Novamente, pode ser citado BGM 20M como possível parental em programas de melhoramento por aparecer em local de destaque como indivíduo divergente dos demais, além de apresentar características agrônômicas interessantes, como tolerância à bacteriose e ao superalongamento (Kivitschal, 2008).

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 7), produzida pelo programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2006, 2012), foi capaz de indicar a tendência aparente de agrupamento das cultivares tradicionais, além da divergência



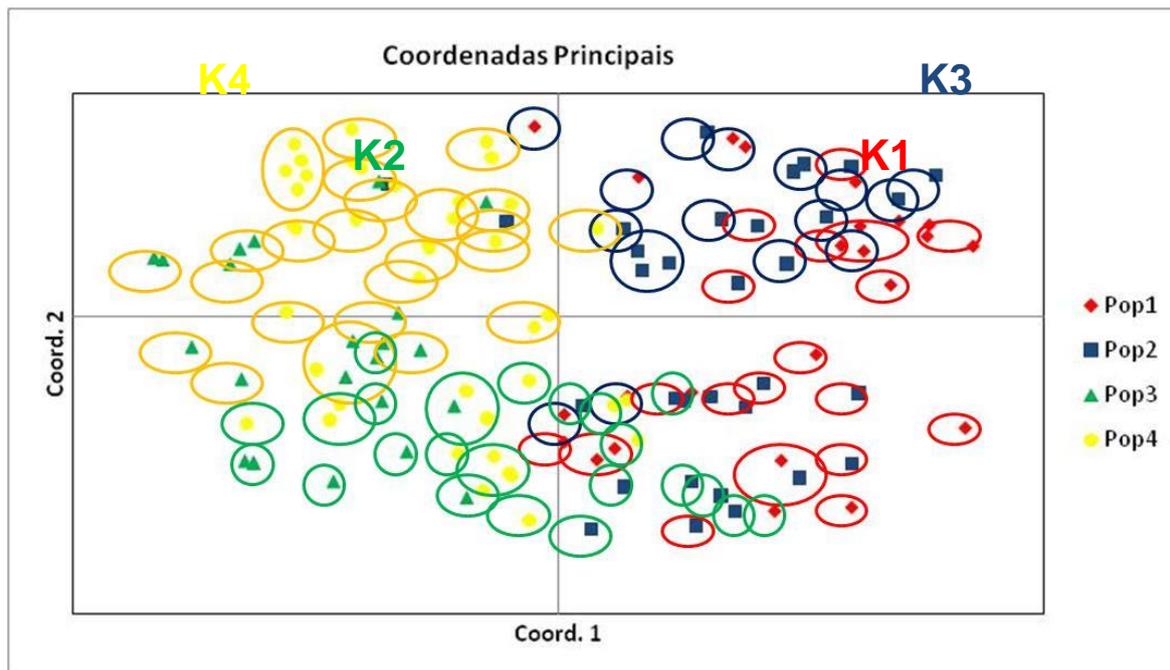


Figura 7 – Comparação da estrutura populacional entre cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa, dada pela Análise de Coordenadas Principais (PCo1 vs PCo2) e pelo método probabilístico. K1 (círculos vermelhos), K2 (círculos verdes), K3 (círculos azuis) e K4 (círculos amarelos) – nomenclatura dos grupos correspondente ao método probabilístico; Pop1, Pop2, Pop3 e Pop4 – nomenclatura dos grupos determinados pela análise de PCoA.

Existe também a aproximação dos pontos no caso das cultivares tradicionais, consideradas similares ou mesmo duplicatas, como BGM 460T x BGM 467T, que ficaram bastante próximos graficamente e foram consideradas similares na análise, com base na distância de C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967).

A maioria das cultivares tradicionais foram consideradas pela Análise de Coordenadas Principais como pertencentes ao mesmo grupo determinado pelo programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Essas duas coordenadas principais, demonstradas graficamente, foram capazes de explicar 52,84% da variação acumulada observada. Adicionar-se à terceira coordenada proporcionou um total acumulado de 66,92%. Individualmente, as três primeiras coordenadas explicaram 28,77; 25,07 e 14,08% da variação, respectivamente (Quadro 8).

Quadro 8 – Variação absoluta e acumulada (%) absorvidas pelas três primeiras Coordenadas Principais em análise realizada entre as 122 cultivares de mandioca-de-mesa do Paraná, com o auxílio de marcadores microssatélites

Variação (%)	Coordenada Principal		
	1	2	3
Absoluta	28,77	24,07	14,08
Acumulada	28,77	52,84	66,92

Algumas cultivares tradicionais, porém, foram enquadradas em grupos distintos entre a técnica baseada em distâncias PCoA e o método probabilístico (Pritchard et al., 2000). A maioria delas foram realocadas do Grupo K3 probabilístico para o Grupo K2 (Pop2 de PCoA), como BGM 460T e BGM 467T. Pode-se observar ainda que estas cultivares estavam filogeneticamente próximas de ambos os grupos segundo a Árvore do Vizinho mais Próximo (Figura 6).?

Outra informação que pode ser aferida na Figura 7 é que a grande dispersão dos pontos no plano cartesiano demonstra variação entre as cultivares tradicionais coletadas, principalmente entre as de Maringá e de Toledo, mais especificamente entre aquelas dentro dos Grupos 4 e 1, localizados em quadrantes em diagonais opostas.

Pode-se enfatizar, ainda, que tanto a metodologia de Pritchard et al. (2000) (Figura 4), a Árvore do Vizinho mais Próximo (Figura 6), baseada na matriz distâncias de C.S. Chord (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967), quanto a metodologia de PCoA (Figura 7) foram eficientes em determinar a estrutura da população estudada, analisando sua diversidade genética e divergindo em poucos aspectos.

Resultados similares quanto à comparação destas técnicas foram observados no trabalho de Inghelandt et al. (2010) que, comparando as técnicas de PCoA e o método probabilístico de Pritchard et al. (2000) na análise da diversidade genética entre linhagens elite de milho por meio de marcadores SSR e SNP (*Single nucleotide polymorphism*), concluíram que ambas as técnicas são igualmente adequadas. Outros estudos desenvolvidos com feijoeiro comum e milho reportaram resultados similares, comparando duas ou mais das técnicas utilizadas neste trabalho, como Maurer et al. (2006), Zhang et al. (2007), Kwak et al. (2009) e Gepts (2009).

O Quadro 9 apresenta os resultados obtidos pela Análise de Variância Molecular realizada pelo programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2006, 2012). Esta análise permite quantificar a variação alocada entre populações e dentro de populações. A variação contida entre indivíduos dentro de cada subpopulação (grupo), entre indivíduos na população total e entre subpopulações (Wright, 1951), está demonstrada no Quadro 10.

Quadro 9 - Análise molecular de variância (AMOVA), considerando os grupos K1, K2, K3 e K4, em análise realizada entre as 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa, com o auxílio de marcadores microssatélites

Fonte de variação	GL <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	VE <sup>4</sup>	%	PhiPT	PMS <sup>5</sup>
Entre grupos	3	176,560	58,853	1,692	17%	0,170**	0,001
Dentro dos grupos	118	974,399	8,258	8,258	83%		
Total	121	1150,959		9,950	100%		

<sup>1</sup> Graus de Liberdade; <sup>2</sup> Soma de Quadrados; <sup>3</sup> Quadrado Médio; <sup>4</sup> Variância Estimada; <sup>5</sup> Probabilidade Mínima de Significância; \*\* Significativo a 1% de probabilidade.

Segundo a AMOVA (Quadro 9), a maior parte da variação encontrada ficou contida dentro dos grupos, devido à alta variabilidade entre as cultivares tradicionais. O valor de 17 % de variação entre os grupos, ou seja, o valor de PhiPT (análogo ao  $F_{st}$  de Wright) de 0,17, significativo a 1% de probabilidade, é indicativo do nível de variação existente entre os grupos formados na população, sendo esta variação considerada moderada (Jacometo et al., 2010).

No Quadro 10, pode-se observar uma segunda análise de variância realizada, contendo os índices de fixação de Wright (1951). Pode-se observar que separando os componentes da variação genética entre indivíduos dentro de grupos e como uma só população, como era de se esperar, a variação maior encontra-se entre indivíduos (74%). Outros 15% ficam na diferenciação de indivíduos dentro das subpopulações (grupos), mostrando que, mesmo entre indivíduos agrupados por proximidade genética, ainda permanece uma alta variabilidade. Os 11% restantes da variabilidade encontrada é ocasionada pela divisão da população em grupos, que tendem a ser mais homogêneos que a população como um todo (Maringá, Cianorte e Toledo), porém heterogêneos quando comparados uns com os outros.

Quadro 10 - Análise molecular de variância (AMOVA), considerando os grupos K1, K2, K3 e K4, em análise realizada entre as 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa, com o auxílio de marcadores microssatélites, calculando os índices F

Fonte de variação	GL <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	VE <sup>4</sup>	%	F	PMS <sup>5</sup>
Entre grupos	3	88,280	29,427	0,423	11	$F_{st}=0,107^{**}$	0,001
Entre indivíduos dentro de grupos	118	487,200	4,129	0,599	15	$F_{is}=0,170^{**}$	
Entre indivíduos na população total	122	357,500	2,930	2,930	74	$F_{it}=0,259^{**}$	
Total	243	932,980		9,950	100%		

<sup>1</sup> Graus de liberdade; <sup>2</sup> Soma de Quadrados; <sup>3</sup> Quadrado Médio; <sup>4</sup> Variância Estimada; <sup>5</sup> Probabilidade Mínima de Significância; \*\* Significativo a 1% de probabilidade.

A quantidade de diferenciação entre os grupos pode ser comparada pelo índice  $F_{st}$ . O valor obtido de 0,107 ou, aproximadamente, 11% indica uma diferenciação moderada entre os grupos (Jacometo et al., 2010). Isso pode ser observado no presente estudo, onde filogeneticamente os grupos apresentam considerável diferenciação (Figura 6), porém com trocas de indivíduos entre os grupos determinados pelas diferentes metodologias.

Os valores obtidos de  $F_{is}$  e  $F_{it}$  (Quadro 10) indicam, respectivamente, que há uma deficiência de 17 e 26% na taxa de heterozigotos esperada dentro dos grupos, e, também, na população de forma geral, considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Raji et al., 2009b). Este pode ser um indicativo da estreita base genética da população (Turyagyenda et al., 2012).

### 4.3. Considerações finais

A estrutura populacional das 122 cultivares tradicionais de mandioca-de-mesa analisadas foi dividida em quatro grupos, sendo que vários indivíduos de Cianorte e de Toledo se agregaram nos mesmos grupos, embora, também, tenham ocupado os grupos pertencentes às cultivares tradicionais de Maringá. Em média, as cultivares de Maringá ocuparam os Grupos 2 e 4, enquanto as de Toledo, em sua maioria, ocuparam o Grupo 1 e as de Cianorte predominaram no Grupo 3.

Este fator fica comprovado pelo valor mais alto de PIC e principalmente de diversidade genética (Quadro 3) encontrada na população, não sendo, porém, superior à maioria dos experimentos encontrados na literatura, devido ao

intercâmbio de cultivares tradicionais entre os agricultores, assim como as trocas alélicas entre elas, que tendem a reduzir a variabilidade entre regiões. Apesar do valor de conteúdo informativo de polimorfismo médio ter sido mais baixo que alguns dados encontrados na literatura (Fregene et al.; 2003; Asare et al.,2011; Turyagyenda et al.; 2012), pode-se afirmar, pela elevada ocorrência de *primers* com alto conteúdo informativo e com mediano conteúdo informativo, que os 13 *loci* analisados foram suficientes para a caracterização genética da população.

Assim, com estes *loci* foi possível caracterizar a diversidade genética presente na população (Quadro 5), tal como as cultivares tradicionais com maior e menor divergência. Baseando-se na elevada divergência encontrada entre algumas cultivares, é possível realizar recomendações das mesmas como parentais de programas de melhoramento, como é o caso dos cruzamentos envolvendo a cultivar tradicional BGM 20M que, além de floração, apresenta características agrônômicas desejáveis.

## 5. CONCLUSÕES

a) A variabilidade genética entre as cultivares tradicionais foi ampla, sendo que os grupos que mais se distanciaram foram os oriundos de Toledo e de Maringá.

b) A heterozigosidade média observada foi de 0,4762 e a diversidade genética média 0,5407, indicando ampla variabilidade genética entre as cultivares tradicionais avaliadas.

c) Os primers GA 126, GA 140, SSRY 13, SSRY 21, SSRY 45, e SSRY 101 foram considerados altamente informativos.

d) As 122 cultivares tradicionais foram alocadas em quatro grupos.

e) Da variação genética encontrada, 74% foi atribuída à variação genética entre indivíduos, 15% à variação genética entre indivíduos dentro de cada grupo e 11% entre grupos.

f) O valor de  $F_{st}$  encontrado de 0,107 indica uma diferenciação moderada entre os grupos.

g) As combinações mais divergentes encontradas estão entre as cultivares tradicionais BGM 434T x BGM 20M, seguida por BGM 35C x BGM 20M, BGM 430T x BGM 232M, BGM 430T x BGM 164M, BGM430T x BGM 322M, BGM 35C x BGM 164M, BGM66C x BGM 322M, BGM432T x BGM460T, BGM495T x BGM20M e BGM434T x BGM34M.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, 27:617-631, 2008.
- AGUIAR, E.B.; VALLE, T.L.; LORENZI, J.O.; KANTHACK, R.A.D.; MIRANDA, H.; GRANJA, M.P.; Efeito da densidade populacional e época de colheita na produção de raízes de mandioca de mesa. **Bragantia**, 70:561-569, 2011.
- AKANO, A.; DIXON, A.; MBA, C.; BARRERA, E.; FREGENE, M. Genetic mapping of dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. **Theoretical and Applied Genetics**, 105:521-525, 2002.
- ALLEM, A.C. A reappraisal on the geographical origin of cassava (*Manihot esculenta*, *Euphorbiaceae*). In: VEIGA, R.F.A.; BOVI, M.L.A.; BETTI, J.A.; VOLTAN, R.B.Q. In: I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS. Campinas, 1997. **Resumos...** São Paulo: IAC/Embrapa-Cenargem, 1997. p. 86-87.
- ALLEM, A.C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (*Euphorbiaceae*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 41:133-150, 1994.
- ALLEM, A.C. The closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, 107:123-133, 1999.
- ALLEM, A.C. The origins and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R.J.; THRESH, J.M.; BELLOTTI, A.C. (eds.) **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 01-16.
- ASARE, P.A.; GALYUON, I.K.A.; SARFO, J.K.; TETTEH, J.P. Morphological and molecular based diversity studies of some cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm in Ghana. **African Journal of Biotechnology**, 10:13900-13908, 2011.

BALAGOPALAN, C. Cassava utilization in food, feed and industry. In: HILLOCKS, R.J.; THRESH, J.M.; BELLOTTI, A.C. (eds.) **Cassava: biology, production and utilization**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 301-318.

BALAGOPALAN, C.; PADMAJA, G.; NANDA, S.K.; MOORTHY, S.N. **Cassava in food, feed and industry**. Florida: CRC Press, 1988. 219p.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J.F.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, 27:513-520, 1997.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKALNICK, M.H.; DAVIES, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, **American Journal of Human Genetics**, 32:314-331, 1980.

BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P.H.N.; MORAIS, O.P. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:399-407, 1999.

CAMARANO, A.A.; ABRAMOVAY, R. **Êxodo rural, envelhecimento e masculinização no Brasil: panorama dos últimos 50 anos**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Ipea. 1999. Disponível em: [http://www.ipea.gov.br/pub/td/1999/td\\_0621.pdf](http://www.ipea.gov.br/pub/td/1999/td_0621.pdf) Acesso em: 18, janeiro, 2013.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.; SOUZA, F.V.D.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, 7:30-60, 2011.

CARVALHO, L.P.; LANZA, M.A.; FALLIERI, J.; SANTOS, J.W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:1149-1155, 2003.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, 136:159-168, 2002.

- CASTRO, J.A.; NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. **Scientia Horticulturae**, 145:17-22, 2012.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, 19:233-257, 1967.
- CHAKRAVARTHI, B.K.; NARAVANENI, R. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa*. L). **African Journal of Biotechnology**, 5:684-688, 2006.
- 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.
- CHAVEZ, A.L.; SANCHEZ, T.; JARAMILLO, G.; BEDOYA, J.M.; ECHEVERRY, J.; BOLAÑOS, E.A.; CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C.A. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces and improved clones. **Euphytica**, 143:125-133, 2005.
- CHEN, Y.; NELSON, R.L. Genetic variation and relationships among cultivated, wild and semi wild soybean. **Crop Science**, 44:316-325, 2004.
- CLARK, R.L.; TEMPLETON, A.R.; SING, C.F. Studies of enzyme polymorphisms in the Kamuela population of *D. mercatorum*. I. Estimation of the level of polymorphism. **Genetics**, 98:597-611, 1981.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, 142:169-196, 2005.
- COSTA, M.R.; CARDOSO, E.R.; OHAZE, M.M.M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:158-164, 2003.

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**, 12:1040-1048, 2013.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**, Viçosa: UFV, 2001. 309p.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1:19-21, 1983.

DER, **Malha rodoviária – distâncias rodoviárias das principais cidades**. Disponível em: [http://www.der.pr.gov.br/arquivos/File/malha\\_distancia.pdf](http://www.der.pr.gov.br/arquivos/File/malha_distancia.pdf) Acesso em: 25, setembro, 2013.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4:359-361, 2012. Disponível em: <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/papers/2012structureHarvester.pdf> Acesso em: 2, dezembro, 2012.

EFOMBAGN, M.I.B.; SOUNIGO, O.; ESKES, A.B.; MOTAMAYOR, J.C.; MANZANARES-DAULEUX, M.J.; SCHNELL, R.; NYASSE, S. Parentage analysis and outcrossing patterns in cacao (*Theobroma cacao* L.) farms in Cameroon. **Heredity**, 103:49-53, 2009.

EL-SHARKAWY, M.A. Cassava: biology and physiology. **Plant Molecular Biology**, 56:481-501, 2004.

ELIAS, H.T.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; GONELA, A.; VOGT, G.A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1443-1449, 2007.

ELIAS, M.; MÜHLEN, G.S.; MCKEY, D.; ROA, A.C.; TOHME, J.; Genetic diversity of traditional South American *landraces* of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. **Economic Botany**, 58:242–256, 2004.

ELIAS, M.; PANAUD, O.; ROBERT, T. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. **Heredity**, 85:219–230, 2000b.

ELIAS, M.; RIVA, L.; MCKEY, D. Perception and management of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diversity among Makushi Amerindians of Guyana (South America). **Journal of Ethnobiology**, 20:239-265, 2000a.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611-2620, 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat database gateway**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 20, setembro, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fao news room, 2008**. Disponível em: <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000899/index.html>. Acesso em: 16, maio, 2012.

FARALDO, M.I.F.; SILVA, M.R.; ANDO, A.; MARTINS, P.S. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. **Scientia Agricola**, 57:499-505, 2000.

FARIAS, F.J.C.; RAMALHO, M.A.P.; CARVALHO, L.P.; MOREIRA, J.A.N.; COSTA, J.N. Parâmetros de estabilidade propostos por Lin e Binns (1988) comparados com o método de regressão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32:407-414, 1997.

FONTES, J.R.M.; SAKIYAMA, N.S.; CARDOSO, A.A.; ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, A.A. Avaliação de híbridos f1 de café (*Coffea arábica*, L.) e respectivos progenitores com marcadores RAPD. **Ceres**, 49:283-294, 2002.

FREGENE, M.A.; ANGEL, F.; GOMEZ, R.; RODRIGUEZ, F.; CHAVARRIAGA, P.; ROCA, W.; TOHME, J.; BONIERBALE, M. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, 95:431-441, 1997.

FREGENE, M.A.; SUAREZ, M.; MKUMBIRA, J.; KULEMBEKA, H.; NDEDYA, E.; KULAYA, A.; MITCHEL, S.; GULLBERG, U.; ROSLING, H.; DIXON, A.G.O.; DEAN, R.; KRESOVICH, S. Simple sequence repeat marker diversity in cassava *landraces*: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:1083-1093, 2003.

FUKUDA, W.M.G.; IGLESIAS, C. Melhoramento genético. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. (eds.). **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. p. 324-363.

GENET, T.; VILJOEN, C.D.; LABUSCHAGNE, M.T. Genetic analysis of Ethiopian. **African Journal of Biotechnology**, 4:891-897, 2005.

GODOY, H.; CORREA, A.R.; SANTOS, D. Clima no Paraná. In: Instituto Agronômico do Paraná. **Manual agropecuário para o Paraná**. Londrina: Iapar, 1976. p. 17-36.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; AMARAL JÚNIO, A.T.; BRACCINI, A.L. Divergência genética entre cultivares de mandioca por meio de estatística multivariada. **Bragantia**, 56:263-271, 1997.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2009. 716p.

GROXKO, M. **Mandiocultura – Análise da conjuntura agropecuária**. Estado do Paraná, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento - Departamento de economia rural. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandiocultura\\_2012\\_13.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandiocultura_2012_13.pdf). Acesso em: 9, fevereiro, 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In: **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro. 150p. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2010**. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas\\_pdf/Brasil\\_tab\\_1\\_9.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/Brasil_tab_1_9.pdf). Acesso em: 28, outubro, 2013.

INGHELANDT, D.V.; MELCHINGER, A.E.; LEBRETON, C.; STICH, B. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 120:1289-1299, 2010.

JACOMETO, C.B.; BARRERO, N.M.L.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; GOMES, P.C.; POVH, J.A.; STREIT JUNIOR, D.P.; VARGAS, L.; RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P. Variabilidade genética em tambaquis (*Teleostei characidae*) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45:481-487, 2010.

JORGENSEN, S.; MAURICIO, R. Neutral genetic variation among wild North American populations of the weedy plant *Arabidopsis thaliana* is not geographically structured. **Molecular Ecology**, 13:3403-3413, 2004.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K.; Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, 177:309–334, 2011.

KAWANO, K. Thirty years of cassava breeding for productivity—biological and social factors for success. **Crop Science**, 43:1325–1335, 2003.

KAWUKI, S.R.; MORAG, F.; LABUSCHAGNE, M.; HERSELMAN, L.; KIM, D.J. Identification, characterization and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Molecular Breeding**, 23:669-684, 2009.

KHATTAK, J.Z.K.; CHRISTIANSEN, J.L.; TORP, A.M.; ANDERSEN, S.B. Genic microsatellite markers for discrimination of spinach cultivars. **Plant Breeding**, 126:454–456, 2007.

KIZITO, E.B.; CHIWONA-KARLTUN, L.; EGWANG, T.; FREGENE, M.; WESTERBERGH, A. Genetic diversity and variety composition of cassava on small-scale farms in Uganda: an interdisciplinary study using genetic markers and farmer interviews. **Genetics**, 130: 301–318, 2007.

KLEINKE, M.L.U.; DESCHAMPS, M.V.; MOURA, R. Movimento migratório no Paraná (1986-91 e 1991-96): origens distintas e destinos convergentes. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, 95:27-50, 1999.

KVITSCHAL, M.V. **Caracterização e divergência genética em germoplasma de mandioca-de-mesa da região urbana de Maringá, Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. 140p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

KWAK, M.; GEPTS, P. Structure of genetic diversity in two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Theoretical and Applied Genetics**, 118:979-992, 2009.

KWAK, M.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago basin of Mexico. **Crop Science**, 49:554-561, 2009.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M.P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce: um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18:343-345, 2002.

LEVEZIEL, H.; MARTIN, P. Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers résultats. **Genetics Selection and Evolution**, 26:55-165, 1994.

LI, H.Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I.; PUONTI-KAERLAS, J. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Nature Biotechnology**, 14:736-740, 1996.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:397-401, 1989.

LIU, K.J.; MUSE, S.V. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, 21:2128-2129, 2005.

LOKKO, Y.; DIXON, A.; OFFEI, S.; DANQUAH, E.; FREGENE, M. Assessment of genetic diversity among African cassava *Manihot esculenta* Crantz accessions

resistant to the cassava mosaic virus disease using SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 53:1441-1453, 2006.

LORENZI, J.O.; DIAS, C.A. **Cultura da mandioca**. Campinas: CATI, 1993. 41p. (Boletim Técnico, 211).

LURO, F.L.; COSTANTINO, G.; TEROL, J.; ARGOUT, X.; ALLARIO, T.; WINCKER, P.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules Clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. **BMC Genomics**, 9:287, 2008.

MAHALANOBIS, P.C. On the generalised distance in statistics. **Proceedings of the National Institute of Sciences of India**, 2:49-55, 1936.

MAURER, H.P.; KNAAK, C.; MELCHINGER, A.E.; OUZUNOVA, M.; FRISCH, M. Linkage disequilibrium between SSR markers in six pools of elite lines of an European breeding program for hybrid maize. **Maydica**, 51:269-279, 2006.

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 genetics map of cassava. **Theoretical Applied Genetics**, 12:21-31, 2001.

MEYER, R.S.; DUVAL, A.E.; JENSEN, H.R. Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. **New Phytologist**, 196:29-48, 2012.

MEZETTE, T.F.; CARVALHO, C.R.L.; MORGANO, M.A.; SILVA, M.G.; PARRA, E.S.B.; GALERA, J.M.S.V.; VALLE, T.L. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agronômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, 68:601-609, 2009.

MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A.; HERNANDEZ, C.J.; SZEWCMECFADDEN, A.K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, 37:617-624, 1997.

MKUMBIRA, J.; CHIWONA-KARLTUN, L.; LAGERCRANTZ, U.; MAHUNGU, N.M.; SAKA, J.; MHONE, A.; BOKANGA, M.; BRIMER, L.; GULLBERG, U.; ROSLING, H. Classification of cassava into 'bitter' and 'cool' in Malawi: from farmers' perception to characterisation by molecular markers. **Euphytica**, 132:7-22, 2003.

MOAZAMI-GOUDARZI, K.; VAIMAN, D.; MERCIER, D.; GROHS, C.; FURET, J.P.; LEVEZIEL, H.; MARTIN, P. Emploi de microsattellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers résultats. **Genetics Selection and Evolution**, 26:55-165, 1994.

MODESTI, C.F.; CORRÊA, A.D.; OLIVEIRA, E.D.; ABERU, C.M.P.; SANTOS, C.D. Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27:464-469, 2007.

MODESTO, E.C.; SANTOS, G.T.; VILELA, D.; SILVA, D.C.; FAUSTINO, J.O.; JOBIM, C.C.; DETMANN, E.; ZAMBOIM, M.A.; MARQUES, J.A. Caracterização químico-bromatológica da silagem do terço superior da rama de mandioca. **Acta Scientiarum**, 26:137-146, 2004.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, 3:87-103, 1997.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Journal of Biotechnology**, 1:83-84, 1998.

MOYIB, O.K.; ODUNOLA, O.A.; DIXON, A.G.O. SSR markers reveal genetic variation between improved cassava cultivars and landraces within a collection of Nigerian cassava germplasm. **African Journal of Biotechnology**, 6:2666-2674, 2007.

MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, 57:319-328, 2000. NASSAR, N.M.A.; HASHIMOTO, D.Y.C. Wild cassava, *Manihot*

spp.: A survey of useful species with reference to economic value. **Gene Conserve**, 5:284-295, 2006.

NAGELLA, P.; HOSAKATTE, N.M.; RAVISHANKAR, K.V.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Analysis of genetic diversity among Indian Niger [*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.] cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, 11:1-5, 2008.

NASSAR, N.M.A. Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*). Determination of wild species localities with emphasis on probable origin. **Economic Botany**, 32:311-320, 1978.

NASSAR, N.M.A. Attempts to hibridize wild *Manihot* species with cassava. **Economic Botany**, 34:13-15, 1980.

NASSAR, N.M.A. Collecting wild cassava in Northern Mexico. **FAO/IBPGR Plant Genetics Resource Newsletter**, 65:29-30, 1986.

NASSAR, N.M.A. Production of triploid cassava, *Manihot esculenta* Crantz by diploid hybrid gamete. **Field Crops Resource**, 30:173-182, 1992.

NASSAR, N.M.A. Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz and wild relatives. **Gene Conserve**, 4:64-79, 2002.

NASSAR, N.M.A. Cassava: some ecological and physiological aspects related to plant breeding. **Gene Conserve**, 13:229-245, 2004.

NASSAR, N.M.A.; HASHIMOTO, D.Y.C.; FERNANDES, S.D.C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, 7:16-28, 2008.

NASSAR, N.M.A.; MARQUES, A.O. Cassava leaves as a source of protein. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, 4:187-188, 2006.

NASSAR, N.M.A.; ORTIZ, R. Cassava improvement: challenges and impacts. **Journal of Agricultural Science**, 145: 163-171, 2007.

- NASSAR, N.M.A.; SILVA, J.R.; VIEIRA, C. Híbridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura - Journal of Brazilian Association for Advancement of Science**, 38:1050-1053, 1986.
- NICK, C.; CARVALHO, S.P.; JESUS, A.M.S.; CUSTÓDIO, T.N.; MARIM, B.G.; ASSIS, L.H.B. Divergência genética entre subamostras de mandioca. **Bragantia**, 69:289-298, 2010.
- NORDBORG, M.; HU, T.T.; ISHINO, Y.; JHAVERI, J.; TOOMAJIAN, C.; ZHENG, H.; BAKKER, E.; CALABRESE, P.; GLADSTONE, J.; GOYAL, R.; JAKOBSSON, M.; KIM, S.; MOROZOV, Y.; PADHUKASAHASRAM, B.; PLAGNOL, V.; ROSENBERG, N.A.; SHAH, C.; WALL, J.D.; WANG, J.; ZHAO, K.; KALBFLEISCH, T.; SHULZ, V.; KREITMAN, M.; BERGELSON, J. The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. **Plos Biology**, 3:1289-1299, 2005.
- OKOGBENIN, E.; MARIN, J.; FREGENE, M. An SSR-based molecular genetic map of cassava. **Euphytica**, 147:433-440, 2006.
- OLSEN, K.M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, 56:517-526, 2004.
- OLSEN, K.M.; SCHAAL, B.A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Evolution**, 96:5586-5591, 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. **The American Journal of Botany**, 88:131-142, 2001.
- PALOMBI, M.A.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**, 20:1061-1066, 2002.
- PATERNIANI, E. Uma percepção crítica sobre técnicas de manipulação genética. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 1: 77-84, 2002.

PEAKALL, R.; SMOUSSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSSE, P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, 28:2537-2539, 2012.

PEREIRA, H.S.; SANTOS, J.B.; SOUZA, T.P.; LIMA, I.A. Seleção fenotípica e assistida por marcadores moleculares de famílias de feijoeiro-comum com alta produtividade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43:1551-1558, 2008.

PERONI, N.; KAGEYAMA, Y.; BEGOSSI, A. 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**, 54:1333-1349, 2007.

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation of the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, 12:844-855, 1998.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENSAND, M.; DONELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945–959, 2000.

PROCHNIK, S.; MARRI, P.R.; DESANY, B.; RABINOWICZ, P.D.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN M.; RODRIGUEZ, F.; FAUQUET, C.; TOHME, J.; HARKINS, T.; ROKHSAR, D.S.; ROUNSLEY, S. The cassava genome: current progress, future directions. **Tropical Plant Biology**, 5:88-94, 2012.

RAGHU, D.; SENTHIL, N.; SARASWATHI, T.; RAVEENDRAN, M.; GNANAM, R.; VENKATACHALAM, R.; SHANMUGASUNDARAM, P.; MOHAN, C. Morphological and simple sequence repeats (SSR) based finger printing of south indian cassava germplasm. **International Journal of Integrative Biology**, 1:141-148, 2007.

RAJI, A.A.; ANDERSON, J.V.; KOLADE, O.; UGWU, C.D.; DIXON, A.G.O.; INGELBRECHT, I.L. Gene-based microsatellites for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms and cross-taxa utility. **BMC Plant Biology**, 9:118-129, 2009a.

RAJI, A.A.; FAWOLE, I.; GEDIL, M.; DIXON, A.G.O. Genetic differentiation analysis of African cassava (*Manihot esculenta*) landraces and elite germplasm using amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers. **Annals of Applied Biology**, 155:187-199, 2009b.

REED, D.H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, 17:230–237, 2003.

REIS, R.V.; OLIVEIRA, E.J.; VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SILVA, M.G.M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46:51-57, 2011.

RESENDE, A.G.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MACHADO, M.F. Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). **Biochemical Genetics**, 38:203-216, 2000.

RIBEIRO, M.N.O.; CARVALHO, S.P.; SANTOS, J.B.; ANTÔNIO, R.P. Genetic variability among cassava accessions based on SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 11:263-269, 2011.

RIMOLDI, F.; VIDIGAL FILHO, P.S.; KVITSCHAL, M.V.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, M.A.P.; COSTA, T.R. Genetic divergence in sweet cassava cultivars using morphological agronomics traits and RAPD molecular markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53:1477-1486, 2010.

ROCHA, O.J.; ZALDIVAR, M.E.; CASTRO, L.; CASTRO, E.; BARRANTES, R. Microsatellite variation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in home gardens of *Chibchan* Amerindians from Costa Rica. **Conservation Genetics**, 9:107-118, 2008.

ROGERS, D.J.; APPAN, S.G. ***Manihot and Manihotoides (Euphorbiaceae)***. A computer assisted study. New York: Hafner Press, 1973. 272p.

RONFORT, J.; BATAILLON, T.; SANTONI, S.; DELALANDE, M.; DAVID, J.L.; PROSPERI, J.M. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. **BMC Plant Biology**, 6:28-41, 2006.

SAGRILO, E.; VIDIGAL FILHO, P.S.; PEQUENO, M.G.; SCAPIM, C.A.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; DINIZ, S.P.S.S.; MODESTO, E.C.; KVITSCHAL, M.V. Effect of harvest period on the quality of storage roots and protein content of the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta*, Crantz). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46:295-305, 2003.

SARAWAT, P.; STODDARD, F.L.; MARSHALL, D.R. Genetic distance and its association with heterosis in peas. **Euphytica**, 73:255-264, 1994.

SAWAZAKI, H.E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C.A. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24:447-452, 2002.

SCHMIDT, C.B. A Mandioca: contribuição para o conhecimento de sua origem. **Boletim da Agricultura**, 1:56-56, 1951.

SERRA, C.A.T. Considerações acerca da evolução da propriedade da terra rural no Brasil. **Revista Alceu**, 4:231-248, 2003.

SHERIF, S.A.; NASSAR, N.M.A. Introducing Cassava into Egypt. **Gene Conserve**, 9:118-123, 2010.

SHOEMAKER, R.C.; GRANT D.; OLSON, T.; WARREN, W.C.; WING, R.; YU, Y.; KIM, H.; CREGAN, P.; JOSEPH, B.; FUTRELL-GRIGGS, M.; NELSON, W.; DAVITO, J.; WALKER, J.; WALLIS, J.; KREMITSKI, C.; SCHEER, D.; CLIFTON, S.W.; GRAVES, T.; NGUYEN, H.; WU, X.; LUO, M.; DVORAK, J.; NELSON, R.; CANNON, S.; TOMKINS, J.; SCHMUTZ, J.; STACEY, G.; JACKSON, S. Microsatellite discovery from BAC end sequences and genetic mapping to anchor the soybean physical and genetic maps. **Genome**, 51:294–302, 2008.

SILVA, L.I. **Utilização de marcadores moleculares RAPD na caracterização de germoplasma de mandioca de mesa coletadas nas regiões urbanas de Maringá e de Toledo, Paraná**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SIQUEIRA, M.V.B.M.; QUEIROZ-SILVA, J.R.; BRESSAN, E.A.; BORGES, A. PEREIRA, K.J.C.; PINTO, J.G.; VEASEY, E.A. Genetic characterization of cassava

(*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, 32:104-110, 2009.

SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Molecular Biology**, 56:661–669, 2004.

SRAPHET, S.; BOONCHANAWIWAT, A.; THANYASIRIWAT, T.; BOONSENG, O.; TABATA, S.; SASAMOTO, S.; SHIRASAWA, K.; ISOBE, S.; LIGHTFOOT, D. A.; TANGPHATSORNRUANG, S.; TRIWITAYAKORN, K. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, 122:1161–1170, 2011.

SREE LEKHA, S.; PILLAI S.V.; SREE KUMAR, J. Molecular genotyping of Indian cassava cultivars using SSR markers. **Advances in Environmental Biology** 4:224 – 233, 2010.

SREE LEKHA, S.; SILVA, J.A.T.; PILLAI S.V. Genetic variability studies between released varieties of cassava and central Kerala cassava collections using SSR markers. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, 2:79–92, 2011

TANTIADO, R.G.; Survey on ethnopharmacology of medicinal plants in Iloilo, Philippines. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, 4:11-26, 2012.

THAKUR, H.A.; PATIL, D.A. The family *Euphorbiaceae*: anatomical conspectus. **World Journal of Science and Technology**, 2:51-57, 2012.

THOMAS, Y.; BETHENOD, M.T.; PELOZUELO, L.; FRÉROT, B.; BOURGUET, D. Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. **Evolution**, 57:261-273, 2003.

TREUREN, R.V.; BIJLSMA, R.; DELDEN, W.V.; OUBORG, N.J.; The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. **Heredity**, 66:181-189, 1991.

TURYAGYENDA, L.F.; KIZITO, E.B.; FERGUSON, M.E; BAGUMA, Y.; HARVEY, J.W.; GIBSON, P.; WANJALA B.W.; OSIRU, D.S.O. Genetic diversity among farmer-preferred cassava *landraces* in Uganda. **African Crop Science Journal**, 20:15-30, 2012.

VALLE, T.L.; CARVALHO, C.R.L.; RAMOS, M.T.B.; MÜHLEN, G.S.; VILLELA, O.V. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, 63:221-226, 2004.

VAUGHAN, S.P.; RUSSELL, K. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. **Molecular Ecology Notes**, 4:429–431, 2004.

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. Start. **Chronica Botanica**, 13:1-366, 1951.

VIEGAS, M.P.; SILVA, C.L.S.P.; MOREIRA, J.P.; CARDIN, L.T.; AZEVEDO, V.C.R.; CIAMPI, A.Y.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Diversidade genética e tamanho efetivo de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob conservação ex situ. **Revista Árvore**, 35:769-779, 2011.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; SILVA, M.S.; FUKUDA, W.M.G.; SANTOS FILHO, M.O.S. Comportamento de genótipos de mandioca de mesa no Distrito Federal. **Revista Ciência Agronômica**, 40:113-122, 2009.

VILLELA, O.V.; PEREIRA, A.S.; LORENZI, J.O.; VALLE, T.L.; MONTEIRO, D.A.; RAMOS, M.T.B.; SCHMIDT, N.C. Competição de clones de mandioca selecionadas para mesa e indústria. **Bragantia**, 44:559-568, 1985.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class at human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, 44:388-396, 1989.

WRIGHT, S. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenics**, 15:323-354, 1951.

XIA, L.; PENG, K.; YANG, S.; WENZI, P.; CARMEM DE VICENTE, M.; FREGENE, M.; KILLIAN, A. DArT for high-throughput genotyping of cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. **Theoretical and Applied Genetics**, 110:1092-1098, 2005.

YEOH, H.H.; CHAW, M.Y. Protein content and amino acid composition of cassava leaf. **Phytochemistry**, 15:1597-1599, 1976.

ZHANG, D.; BOCCARA, M.; MOTILAL, L.; BUTLER, D.R.; UMAHARAN, P.; MISCHKE, S.; MEINHARDT, L. Microsatellite variation and population structure in the "Refractario" cacao of Ecuador. **Conservation Genetics**, 9:327-333, 2007.

ZUIN, G.C. **Divergência genética em cultivares de mandioca-de-mesa mediante caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares RAPD**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 105p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

ZUIN, G.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; KVITSCHAL, M.V.; VIDIGAL, M.C.G.; COIMBRA, G.K. Divergência genética entre acessos de mandioca-de-mesa coletados no município de Cianorte, região Noroeste do Estado do Paraná. **Semina - Ciências Agrárias**, 30:21-30, 2009.