



Revista Ciência Agronômica

ISSN: 0045-6888

ccarev@ufc.br

Universidade Federal do Ceará
Brasil

Carvalho Oliveira, Marcus Vanner; Pereira Baliza, Danielle; Souza, Genaina Aparecida; Pereira
Carvalho, Samuel; Bambine Assis, Luiz Henrique
Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites
Revista Ciência Agronômica, vol. 43, núm. 1, 2012, pp. 170-176
Universidade Federal do Ceará
Ceará, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195320077021>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites¹

Characterization of cassava clones using microsatellite markers

Marcus Vanner Carvalho Oliveira², Danielle Pereira Baliza^{3*}, Genaina Aparecida Souza⁴, Samuel Pereira Carvalho² e Luiz Henrique Bambine Assis²

Resumo - As características dos clones utilizados no cultivo da mandioca variam de acordo com a aptidão comercial da cultura, ou seja, para o processo industrial e consumo humano “in natura”. O presente trabalho objetivou identificar clones novos de mandioca obtidos por policruzamento na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em 1998 com relação a essas aptidões. Para tanto, procurou-se identificar clones com padrões moleculares semelhantes aos padrões apresentados pelos clones comerciais. A metodologia utilizada para a extração do DNA e obtenção dos padrões de bandas foi a mesma recomendada para a técnica de marcador molecular microssatélite. A caracterização molecular dos clones de mandiocas do acesso UFLA e clones comerciais apresentou uma distribuição de similaridade concentrada em dois grupos. Um grupo é composto pelos clones comerciais de consumo humano “in natura” Baiana, Casca-roxa e IAC 576-70, e os acessos UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 e UFLA 55. Outro grupo é composto pelos clones comerciais para processo industrial, FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15, e os acessos UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 e UFLA 64. A cultivar comercial Ouro-do-vale e os clones UFLA 38 e UFLA 69 sequer enquadraram-se em qualquer grupo, seja de mesa ou indústria, enquanto, que o clone Pão-da-china (de mesa) agrupou-se junto com os clones da indústria. Portanto, a utilização dos primers foi adequada para agrupar os clones com aptidão para uso “in natura”, mas não para indústria.

Palavras-chave - Mandioca. Agrupamento. Marcadores genéticos.

Abstract - The characteristics of the clones used in the cultivation of cassava vary according to the commercial suitability of the culture, that is, both for industrial processing and ‘in natura’ human consumption. This study aimed to identify new cassava clones obtained by crossbreeding at the Federal University of Lavras (UFLA) in 1998, with respect to this suitability. To this end an attempt was made to identify clones with molecular patterns similar to those displayed by commercial clones. The methodology used for the extraction of DNA and obtaining the banding patterns was the same as that recommended for the technique of microsatellite molecular markers. The molecular characterization of the cassava clones from UFLA stock and of commercial clones showed a similarity of distribution concentrated in two groups. One group consists of clones for human consumption ‘in natura’ Baiana, Casca-roxa and IAC 576-70, and of the stock clones UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 and UFLA 55. The other group consists of clones for industrial processing FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 and IAC 15, and of the stock clones UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 and UFLA 64. The commercial cultivar, Ouro-do-vale, and the clones UFLA 38 and UFLA 69 fitted well into either group, whether for consumption or industrial use, while the Pão-da-china clone (for consumption) grouped together with the industrial clones. Therefore the use of primers was sufficient to group those clones suitable for ‘in natura’ use but not those for industry.

Key words - *Manihot esculenta*. Grouping. Genetic markers.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 11/05/2010; aprovado em 28/07/2011

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras-UFLA

²Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3.037, Lavras-MG, Brasil, 37.200-000, marcus_vanner@hotmail.com, samuelpc@dag.ufla.br e lhbassis@yahoo.com.br

³Bolsista do CNPq, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia) com área de concentração em Cafeicultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3.037, Lavras-MG, Brasil, 37.200-000, danibaliza@yahoo.com.br

⁴Bolsista do CNPq, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (Ciências Agrárias) com área de concentração em Fisiologia e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil, 36.570-000, genainasouza@yahoo.com.br

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta elevada variabilidade genética e é cultivada em todas as regiões brasileiras, para os fins mais diversos, sendo considerada uma importante cultura de subsistência para muitas comunidades (FERREIRA et al., 2008; MKUMBIRA et al., 2003; TAKAHASHI; GONÇALO, 2005; VIEIRA et al., 2008).

Popularmente, suas variedades são classificadas em dois grupos: a) mandioca para mesa, conhecida também como aipim, macaxeira, mandioca mansa e mandioca doce; b) para indústria, também conhecida por mandioca brava (VALLE et al., 2004; VIEIRA et al., 2009). Essa classificação está relacionada à capacidade de liberação de ácido cianídrico (HCN), substância altamente tóxica se ingerida. A mandioca brava tem sabor amargo e as mansas são levemente adocicadas (MEZZETE et al., 2009). O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico da planta. Apesar de não haver caracteres morfológicos especificamente associados à distinção entre mandioca brava e mandioca de mesa, conjuntos de marcadores de DNA ou morfológicos, podem estabelecer uma distinção entre estes dois grupos (MÜHLEN et al., 2000).

No Brasil, diferentes variedades de mandioca são conservadas em bancos de germoplasmas (VIEIRA et al., 2007) ou em coleções de acesso, distribuídos em todo o país. Apesar da reconhecida variabilidade genética existente nesses locais, o germoplasma da mandioca ainda tem sido pouco estudado sob o ponto de vista genético. A escassez de informações, principalmente aquelas relacionadas à documentação e caracterização genética, e a carência de estudos sobre o conhecimento da diversidade genética das espécies com potencial econômico, fazem com que a conservação e caracterização de germoplasma se torne necessária para assegurar informações sobre essas fontes de genes para utilização futura (COSTA et al., 2003). Nesse contexto, os marcadores de DNA representam técnicas importantes nos estudos de evolução, domesticação, mapeamento genético e clonagem.

Vários estudos com marcadores moleculares têm sido realizados no Brasil e em outros países, com RADP (CARVALHO; SCHAAL, 2001; COLOMBO et al., 1998; COSTA et al., 2003; MÜHLEN et al., 2000; ZACARIAS et al., 2004), com AFLP (MÜHLEN et al., 2000) e com microssatélites (CARVALHO; SCHAAL, 2001; MKUMBIRA et al., 1998; MÜHLEN et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2009). Verifica-se que além da capacidade de gerar altos níveis de polimorfismo, os microssatélites apresentam: alta reprodutibilidade, simplicidade e rapidez da técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (OLIVEIRA et al., 2006), e ainda apresentam

variabilidade de locos bastante superior à detectada pelos marcadores RAPD ou AFLP (MÜHLEN et al., 2000).

O objetivo do trabalho foi detectar, em dez clones de mandioca obtidos por policruzamento no ano de 1998, a semelhança molecular com cultivares de mesa e indústria já consagradas no mercado, por meio de marcadores microssatélites.

Material e métodos

Avaliou-se, por meio do uso de marcadores microssatélites, o comportamento molecular em dez clones de mandioca da coleção de variedades da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em comparação com dez cultivares comerciais, sendo cinco de mesa e cinco de indústria. Os nomes e aptidão dos clones encontram-se na Tabela 1. Os clones novos foram obtidos em campo de policruzamento, como parte do programa de melhoramento da mandioca conduzido na UFLA. Foram utilizados no policruzamento, clones oriundos do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA.

A metodologia utilizada para extração de DNA foi a descrita por Dellaporta et al. (1983), com modificações de Mühlen (1999) e para a obtenção de bandas de microssatélites utilizou-se as metodologias de Chavarriga-Aguirre et al. (1998) e Roa et al. (2000) com modificações de Mühlen (1999).

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes da UFLA. Coletou-se, pelo período da manhã, folhas do terço superior das variedades de mandioca. As folhas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e armazenadas em recipientes plásticos em Freezer (-82 °C).

Para a extração, foram pesados 100 mg do material macerado e adicionado 800 µl de tampão de extração CTAB 2% com a seguinte composição: 46 ml de H₂O, 20 ml de Tris HCl 1M pH 7,5, 28 ml de NaCl 5M, 4 ml de EDTA 0,5M pH 8,0, 2g CTAB e 2 ml de β mercaptoetanol. As amostras foram colocadas em banho maria a 65 °C por 60 min e homogeneizadas a cada 10 min. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, foram adicionados 800 µl de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e homogeneizados levemente durante 5 min para obtenção de uma emulsão, que posteriormente, foi centrifugada a 14.000 rpm durante 10 min.

O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e novamente foi adicionado 800 µl de clorofórmio-álcool isoamílico repetindo-se as mesmas condições até a centrifugação a 14.000 rpm.

Tabela 1 - Clones obtidos na UFLA e cultivares comerciais utilizadas na determinação de similaridade genética

| Identificação | Nome | Aptidão |
|-------------------|--------------|-----------|
| Clones comerciais | | |
| C1 | Baiana | Mesa |
| C2 | Casca-roxa | Mesa |
| C3 | IAC 576/70 | Mesa |
| C4 | Pão-da-china | Mesa |
| C5 | Ouro-do-vale | Mesa |
| C6 | Fibra | Indústria |
| C7 | IAC 15 | Indústria |
| C8 | IAC 13 | Indústria |
| C9 | IAC 14 | Indústria |
| C10 | IAC 12 | Indústria |
| Clones novos | | |
| C11 | UFLA 7 | (1) |
| C12 | UFLA 38 | (1) |
| C13 | UFLA 64 | (1) |
| C14 | UFLA 36 | (1) |
| C15 | UFLA 20 | (1) |
| C16 | UFLA E | (1) |
| C17 | UFLA 69 | (1) |
| C18 | UFLA 22 | (1) |
| C19 | UFLA 33 | (1) |
| C20 | UFLA 55 | (1) |

(1): destinação ainda não estabelecida

O sobrenadante foi retirado, sendo adicionado isopropanol gelado na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. Os micro-tubos ficaram incubados a 4 °C durante 2 horas e posteriormente foram centrifugadas a 14.000 rpm/10 min. O precipitado foi secado por cerca de 20 minutos e então foram adicionados 50 µl de TE + 2 µl RNase (10 mg/ml), mantendo a temperatura de 37 °C durante 1 hora.

Após esse período, o DNA foi precipitado com 100 µl de etanol 95% e lavado com o etanol 70%. Após a eliminação do álcool etílico 70%, o precipitado foi secado e, posteriormente, diluído com 5 µl de TE e o DNA quantificado em fluorímetro Hoeffer Scientific TKO100.

Marcadores SSRs

Para amplificação de microssatélites foi seguida a metodologia descrita por Chavarriaga-Aguirre et al. (1998) e modificada por Mühlen (1999). Os pares de iniciadores foram desenvolvidos especialmente para mandioca ver

sequências em Chavarriaga-Aguirre et al., 1998. Foram marcados com fluorescência (por Research Genetics ou Perkin-Elmer) e analisados em equipamento ABI-Prism 377 e com os programas GeneScan e Genotyper.

Foram adquiridos 13 primers da MWG BIOTECH AG. Para as reações de PCR foram retirados 3 µl de DNA na concentração de 10 ng e acrescentados 4,8 µl água ultra pura, 0,3 µl de cada primer; 0,5 µl de dNTP, 1 µl tampão 10X e 0,1 µl da enzima Taq polimerase, em um volume total de 10 µl (TAB. 2). As amplificações foram realizadas no termociclador NJ RESEACH modelo PTC 200, em sete ciclos diferentes:

(1) 94 °C - 2 min. - (2) 94 °C - 20 seg. - (3) 56 °C - 20 seg. - (4) 72 °C - 20 seg. - (5) 94 °C - 19 ciclos - (6) 69 °C - 30 min. e (7) 4 °C.

Tabela 2 - Sequências dos primers (forward/reverse) usados em análises SSR

| Primer | Sequência dos primers 5' para 3' |
|--------|----------------------------------|
| 1 | F: TAA TGT CAT CGT CGG CTT CG |
| | R: GCT GAT AGC ACA GAA CAC AG |
| 2 | F: GAT TCC TCT AGC AGT TAA GC |
| | R: CGA TGA TGC TCT TCG GAG GG |
| 3 | F: TTC CCT CGC TAG AAC TTG TC |
| | R: CTA TTT GAC CGT CTT CGC CG |
| 4 | F: GTA CAT CAC CAC CAA CGG GC |
| | R: AGA GCG GTG GGG CGA AGA GC |
| 5 | F: GGC TTC ATC ATG GAA AAA CC |
| | R: CAA TGC TTT ACG GAA GAG CC |
| 6 | F: AGC AGA GCA TTT ACA GCA AGG |
| | R: TGT GGA GTT AAA GGT GTG AAT G |
| 7 | F: CAA TGC AGG TGA AGT GAA TAC C |
| | R: AGG GTG CTC TTC AGA GAA AGG |
| 8 | F: AGT GGA AAT AAG CCA TGT GAT G |
| | R: CCC ATA ATT GAT GCC AGG TT |
| 9 | F: CTC TAG CTA TGG ATT AGA TCT |
| | R: GAT GCT TCG AGT CGT GGG AGA |
| 10 | F: ACA ATG TCC CAA TTG GAG GA |
| | R: ACC ATG GAT AGA GCT CAC CG |
| 11 | F: CGT TGA TAA AGT GGA AAG AGC A |
| | R: ACT CCA CTC CCG ATG CTC GC |
| 12 | F: TTC AAG GAA GCC TTC AGC TC |
| | R: GAG CCA CAT CTA CTC GAC ACC |
| 13 | F: TGT TCT TGA TCT TCT GCT GCA |
| | R: TGA TTG TGG ACG TGG GTA GA |

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida por eletroforese a 100V por 2 horas. Para aplicação no gel, foi acrescentado ao DNA amplificado 3 µl de corante DAE e alíquotas de 13 µl do material foram aplicados.

Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e o gel foi imerso em 1 litro de solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5% e água destilada) e mantido sob agitação lenta por 15 minutos. Em seguida o gel foi submerso em 1 litro de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) sob agitação lenta por 15 minutos. O gel foi lavado com água destilada e posteriormente colocado em 1 litro de solução de NaOH 3%, formaldeído 0,5% e água destilada sob agitação lenta até a completa visualização das bandas.

Análise dos dados

Os fragmentos de DNA amplificados foram computados como presença ou ausência de bandas, e montada uma matriz com 1 representando presença e 0 representando ausência. Foram analisadas todas as bandas, tanto polimórficas como monomórficas. Foi estimada a similaridade genética (S) entre os clones de mandiocas do acesso UFLA e clones comerciais com base no índice de Jaccard, conforme Alfenas et al. (1991). Os cálculos foram feitos usando o programa NTSYS-PC 2.1 (ROHLF, 1992), foi gerado o dendrograma pelo método UPGMA.JACCARD.

As análises discriminantes, baseadas no método não paramétrico de k vizinhos mais próximos, foram aplicadas segundo Cruz e Carneiro (2006) utilizando o aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006). No método k vizinhos mais próximos, o valor de k é definido *a priori* de maneira arbitrária. Nesse trabalho foi pré-estabelecido um valor $k = 3$, no caso de ocorrência de empate entre probabilidades, a observação foi alocada numa população designada de ‘desconhecida’.

A classificação *a priori* dos clones em estudo foi realizada de acordo com a caracterização molecular (mesa e indústria), ficando assim estabelecida:

- a) Consumo humano “in natura” (mesa) - 7 clones;
- b) Processo industrial - 10 clones.

Os três clones restantes foram alocados *a posteriori*, por não atenderem aos critérios de inclusão nas populações pré-definidas.

Resultados e discussão

Observa-se no dendrograma gerado com base nas similaridades de Jaccard valores de similaridade variando de 0,15 a 0,75 (FIG. 1), esses resultados indicam elevada variabilidade genética entre os materiais em estudo. Siqueira et al. (2009), estimando a diversidade genética entre 42 acessos de mandioca, provenientes de cinco regiões brasileiras, por meio de microssatélites, também constataram alta variabilidade genética (valores de similaridade entre 0,19 a 0,83), ocorrendo formação de cinco grupos, conforme, os autores a alta variabilidade genética foi devido à polinização cruzada e a propagação vegetativa da cultura. No presente estudo a elevada variabilidade genética é justificada pela utilização de clones com diferentes aptidões comerciais (mesa e indústria).

Mühlen et al. (2000), estimando a diversidade genética de etnovarietades de mandioca, através de microssatélites, verificaram que esses marcadores detectaram uma possível compartimentalização do germoplasma de mandioca em dois grupos: variedades de indústria e variedades de mesa. Apresentando uma média de similaridade de 0,59, variando de 0,24 a 1,00. Mkumbira et al. (1998), utilizando microssatélite, também conseguiram uma boa separação entre genótipos de mandiocas bravas de mansas.

No presente estudo a caracterização molecular dos clones de mandiocas do acesso UFLA e clones comerciais já consagrados apresentou uma distribuição de similaridade concentrada em dois grupos. Um grupo é composto pelos clones comerciais de mesa Baiana, Casca-roxa e IAC 576-70, e os acessos UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 e UFLA 55. O outro grupo é composto pelos clones comerciais para indústria, FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15, e os acessos UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 e UFLA 64. Verifica-se que a cultivar comercial Ouro-do-vale e os clones UFLA 38 e UFLA 69 sequer enquadraram-se em qualquer grupo, seja de mesa ou indústria, enquanto, que o clone Pão-da-china (de mesa) agrupou-se junto com os clones da indústria. Portanto, a utilização de todos os primers utilizados não foi adequada para agrupar os clones com aptidão para indústria, o que não ocorreu com os clones para mesa. Somente após a identificação dos primers que realmente possibilitam a discriminação dos dois grupos (mesa e indústria) os clones novos devem ser analisados e alocados em seus grupos característicos.

Com base no dendrograma pode-se verificar que os clones UFLA 7, UFLA E, UFLA 22 e UFLA 55 possuem caracterização molecular para a utilização

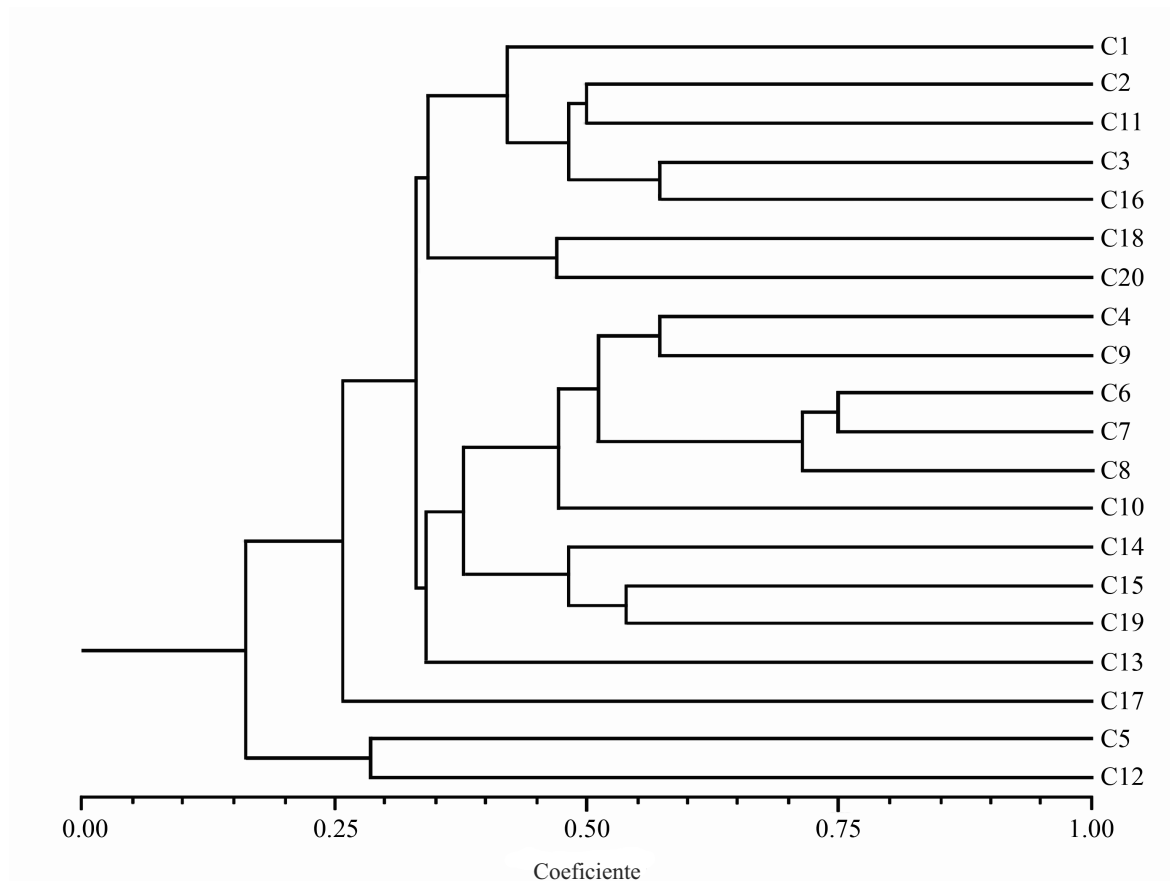


Figura 1 - Dendrograma dos acessos de mandioca estudados, com base no índice de similaridade de Jaccard

como mesa, devido seu agrupamento com as variedades comerciais tradicionalmente usadas para essa finalidade. Os demais clones UFLA 20, UFLA 33, UFLA 36 e UFLA 64, no entanto, possuem caracterização molecular para indústria por pertencerem ao mesmo grupo das cultivares FIBRA, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e IAC 15 de aptidão para a indústria.

Observa-se que a variedade Pão-da-China, de aptidão mesa, apresentou-se associada às cultivares comerciais de aptidão para indústria. Esse comportamento não era esperado, em relação ao teor cianogênico da mandioca. Contudo, a variedade assemelha-se às cultivares comerciais para mesa, em relação a outras caracteres (VALLE et al., 2004).

Conforme Alves et al. (2009), os marcadores moleculares constituem opções promissoras para interligar fontes de recursos genéticos e programas de melhoramento das espécies cultivadas. Assim, resultados obtidos com caracterização molecular

poderão ser utilizados em programas de melhoramento, visando o lançamento de novas cultivares.

Os resultados das análises discriminantes, baseadas em *k* vizinhos mais próximos são apresentados na Tabela 3. A discriminação dos clones em estudo segundo a caracterização molecular (mesa e indústria) evidencia que os clones dos grupos para consumo humano “in natura” (mesa) e processo industrial foram eficientemente alocados em seus grupos de origem.

A taxa de erro aparente foi de 5,88% com apenas uma classificação incorreta. Embora relativamente baixo este valor é resultante, da pouca eficiência dos primers em agrupar os clones para indústria.

Dos clones classificados *a posteriori*, dois, o acesso UFLA 38 e a cultivar comercial Ouro-do-vale, foram alocados no grupo para consumo humano “in natura” (mesa) e o acesso UFLA 69 no grupo para indústria.

Tabela 3 - Análise discriminante de clones de mandioca para mesa e indústria, baseada em k vizinhos mais próximos (k = 3). Os valores destacados em negrito referem-se aos percentuais de alocação dos clones nos seus respectivos grupos de origem

| Grupo de origem | Nº de acessos | Percentuais de alocação nos diferentes grupos | |
|-------------------------------------|---------------|---|-----------|
| | | Mesa | Indústria |
| Mesa | 7 | 100,00 | 0,00 |
| Indústria | 10 | 10,00 | 90,00 |
| Clones alocados a <i>posteriori</i> | 3 | 66,66 | 33,33 |
| Total de clones alocados | 20 | 9 | 11 |

Conclusão

Os marcadores microssatélites foram eficientes para identificar os novos clones de mandioca apropriados ao uso “in natura”, mas não para o processo industrial.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Referências

- ALFENAS, A. C. *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- ALVES, M. F. *et al.* Marcadores moleculares polimórficos entre algodoeiros mocós e herbáceos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 03, p. 406-411, 2009.
- CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, v. 120, n. 01, p. 133-142, 2001.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. *et al.* Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 03, p. 493-501, 1998.
- COLOMBO C. *et al.* Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I. RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 01, p. 105-113, 1998.
- COSTA M. R.; CARDOSO E. R.; OHAZE M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 01, p. 158-164, 2003.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: Estatística experimental e biometria**. Viçosa - MG: UFV, 2006. 285 p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. rev. Viçosa-MG: UFV, 2006. 585 p. v. 2.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. R. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology and Reproduction**, v. 01, n. 04, p. 19, 1983.
- FERREIRA C. F. Molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Genetics**, v. 08, n. 01, p. 23-29, 2008.
- MEZZETE, T. F. *et al.* Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agronômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, v. 63, n. 03, p. 601-605, 2009.
- MKUMBIRA, J.; MAHUNGU, N. M.; SALIPIRA, K. L. Distribution of hydrogen cyanide in cassava germplasm in Malawi. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 17, n. 01, p. 75, 1998. Suplemento.
- MKUMBIRA J. *et al.* Classification of cassava into ‘bitter’ and ‘cool’ in Malawi: From farmers’ perception to characterization by molecular markers. **Euphytica** v. 132, n. 01, p. 7-12, 2003.
- MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de ecotipos de Mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 02, p. 319-328, 2000.
- MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e microssatélites**. Piracicaba, 1999. 176 f. Tese (Doutorado em Genética) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 02, p. 294-307, 2006.
- ROA, A. C. *et al.* Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Applied Biostatistics, 1992. 237 p.
- SIQUEIRA, M. V. B. M. *et al.* Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 01, p. 104-110, 2009.
- TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S. **A Cultura da Mandioca**. 2. ed. Parnavaí: Ed. Olímpica, 2005. 116 p.

VALLE, T. L. *et al.* Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, v. 63, n. 02, p. 221-226, 2004.

VIEIRA, E. A. *et al.* **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do Cerrado acessada por meio de descritores morfológicos**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2007. 15 p.

VIEIRA, E. A. *et al.* Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, 2008.

VIEIRA, E. A. *et al.* Comportamento de genótipos de mandioca de mesa no Distrito Federal. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 01, p. 113-122, 2009.

ZACARIAS, A. M. *et al.* Characterization and genetic distance analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm from Mozambique using RAPD fingerprinting. **Euphytica**, v. 138, n. 01, p. 49-53, 2004.