

ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM *BRACHIARIA DICTYONEURA* POR MARCADORES RAPD

STUDY OF GENETIC VARIABILITY IN *BRACHIARIA DICTYONEURA* BY RAPD MARKERS

Cristiane Zorzatto; Lucimara Chiari*; Cacilda Borges do Valle; Gisele Olivas de Campos Leguizámon****

* Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. E-mail: cristiane@uol.com.br

** Autor para correspondência- Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

e-mail: lchiari@cnpqc.embrapa.br, F.: Telefone: (67) 3368-2079;

cacilda@cnpqc.embrapa.br; gisele@cnpqc.embrapa.br

Recebido para publicação em 03/03/2009

Aceito para publicação em 09/05/2009

RESUMO

Brachiaria dictyoneura é uma gramínea forrageira originária das savanas do leste africano. Por ter valor forrageiro igual ao de *B. humidicola*, ser uma espécie adaptada aos solos mal drenados, ácidos e de baixa fertilidade, há um grande interesse em incorporá-la ao programa de melhoramento genético de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte. O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética e a distância genética entre oito acessos de *B. dictyoneura* disponíveis no banco ativo de germoplasma desse centro de pesquisa, usando marcadores RAPD. Para tanto, 11 *primers* foram utilizados e os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5%. Uma matriz de similaridade genética foi gerada pelo coeficiente de Jaccard e os métodos Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average (UPGMA) e Tocher foram utilizados para agrupamento dos acessos. O dendrograma gerado pelo método UPGMA foi testado com 400 repetições randômicas (*bootstrap*). Um total de 87 bandas foi analisado, das quais 84% foram polimórficas. Uma alta variabilidade genética foi observada entre os acessos, com uma similaridade genética média de 0,53. Esses acessos foram separados em quatro grupos por ambos os métodos usados e os valores de *bootstraps* para os grupos formados no dendrograma foram superiores a 85%. Os resultados obtidos no presente trabalho podem auxiliar o programa de melhoramento dessa espécie visando à obtenção de cultivares através de cruzamentos controlados e seleção.

Palavras chaves: *Brachiaria*. Forrageiras tropicais. Marcadores moleculares. Polimorfismos de DNA.

ABSTRACT

Brachiaria dictyoneura is a native forage grass from the savannas in East Africa. Due to its forage value similar to the of *B. humidicola* and it is a species adapted to waterlogged, acid and poor soils, there is great interest in its use in the breeding program of tropical forages at Embrapa Beef Cattle. The objective of this work was to evaluate the genetic variability and the genetic distance among eight accessions of *B. dictyoneura* available in this active germoplasm bank from Embrapa, using RAPD markers. For this, 11 primers were used and the amplified products were separated in agarose gel at 1.5%. A matrix was generated by Jaccard's genetic similarity coefficient. The cluster analyses were made by Tocher and Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average (UPGMA) methods. The dendrogram generated by UPGMA method was tested with 400 random repeats (bootstrap). A total of 87 bands was analyzed, 84% of which were polymorphic. High genetic variability was observed among the accessions with a medium genetic similarity of 0.53. The accessions were separated in four groups by both methods and the values of bootstraps for groups formed by dendrogram were greater than 85%. The results obtained may help the breeding program of this species in developing new cultivars through controlled crosses and selection.

Keywords: *Brachiaria*. Molecular markers. Polymorphisms of DNA. Tropical forage.

Introdução

O crescimento populacional, associado ao desenvolvimento de novas tecnologias, está promovendo mudanças rápidas na sociedade, com profundos impactos sobre a agropecuária. As cadeias produtivas e segmentos agrícolas que não incorporarem técnicas modernas e uma visão de mercado, a fim de se tornarem mais eficientes e sustentáveis, provavelmente não persistirão.

Neste contexto, as pastagens, que sempre foram relegadas a um plano secundário e normalmente ocupando solos de menor fertilidade, vêm merecendo crescente destaque e competindo com a agricultura por insumos e tecnologias. A intensificação da atividade pressupõe o desenvolvimento de novos cultivares de forrageiras com melhor desempenho e eficiência na utilização dos insumos. Abrem-se, então, espaços para cultivares melhorados e adaptados aos diversos ecossistemas pastoris do país.

A pecuária bovina brasileira baseia-se, essencialmente, na utilização de pastagens para a produção animal. Graças aos milhões de hectares ocupados por forrageiras cultivadas, destinadas à

alimentação de um rebanho de aproximadamente 188 milhões de bovinos, o Brasil detém o maior rebanho comercial do mundo, consagrando-se, em 2003, como o maior exportador mundial de carne bovina. (FERREIRA; PEREIRA, 2005).

Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* alcançaram grande importância econômica no Brasil nos últimos 30 anos, viabilizando a atividade pecuária nos solos pobres e ácidos dos cerrados, criando novos polos de desenvolvimento e colonização no Brasil Central. Estima-se que 85% das áreas de pastagens cultivadas sejam ocupadas por gramíneas forrageiras deste gênero (MACEDO, 2006).

Brachiaria dictyoneura é uma das espécies que compõem o banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Gado de Corte, localizada no município de Campo Grande, no estado de Mato Grosso do Sul, que possui um BAG com 455 acessos de 11 espécies. (VALLE et al., 2008). É originária das savanas do leste africano e taxonomicamente próxima à *B. humidicola* (RENVOIZE et al., 1996). Por ser uma espécie forrageira adaptada aos solos mal drenados, ácidos e de baixa fertilidade (MILES; VALLE, 1996), há um grande interesse em incorporá-la ao programa de melhoramento genético do gênero. Seu valor nutritivo é comparável ao da *B.*

humidicola e, assim como esta, é tolerante, mas não resistente, às cigarrinhas-das-pastagens, principal praga que ataca espécies do gênero (KELLER-GREIN, et al., 1996).

Para a utilização de *B. dictyoneura* no programa de melhoramento de forrageiras tropicais da Embrapa Gado de Corte, são necessárias informações básicas que incluem o número cromossômico, nível de ploidia e a variabilidade genética dos acessos do BAG, tanto para o planejamento de cruzamentos, bem como para orientar novas coletas ou intercâmbio. Neste sentido, estudos recentes realizados por Risso-Pascotto et al. (2006a) em cinco acessos desse BAG mostraram que, diferentemente das demais espécies do gênero, o número básico de cromossomos em *B. dictyoneura* é igual a seis ($x=6$), e estudos de pareamento cromossômico nesses mesmos indivíduos revelaram típicos tetraploides ($2n=4x=24$) (RISSO-PASCOTTO, et al., 2006b).

Estudos sobre variabilidade genética ainda não foram realizados nessa coleção de *B. dictyoneura* e também não há relatos de estudos nessa espécie que utilizaram marcadores moleculares. Esses marcadores têm sido considerados ferramentas poderosas no estudo da variabilidade genética em diversas espécies de plantas nativas ou cultivadas, destacando-se os marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) pela simplicidade na execução, rapidez, custo e, principalmente, porque não necessita de conhecimento prévio da sequência de DNA alvo e amplifica as sequências de DNA a partir de um único iniciador de sequência arbitrária (WILLIAMS et al., 1990). Tal fato torna essa ferramenta muito útil para estudos de diversidade em espécies de gramíneas forrageiras cujos genomas não são conhecidos (DAHER et al., 2002; DONG et al., 2003; CHANDRA et al., 2004; PASSOS et al., 2005; YANAKA et al., 2005), incluindo *B. dictyoneura*.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética e a distância genética entre os acessos de *B. dictyoneura* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, usando marcadores RAPD.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram analisados oito acessos de *B. dictyoneura* disponíveis no BAG da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, todos tetraploides e com $x=6$, sete deles apomíticos (Dt150, Dt154, Dt155, Dt157, Dt159, Dt160, Dt161) e um com reprodução sexual (Dt158).

Extração de DNA

O DNA foi extraído de amostras de folhas jovens (folhas do segundo nó), de plantas individuais, segundo o protocolo de Bonato et al. (2002), conforme descrito a seguir.

Aproximadamente 300 mg de folhas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana. O pó fino obtido foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL, tomando-se cuidado para não descongelar. Foram adicionados 900 μ L de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2- β -mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8; 1% PVP 40). As amostras foram incubadas a 65°C por 60 minutos, invertendo-as suavemente a cada dez minutos e, posteriormente, foram centrifugadas a 13.400 g por dez minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e adicionou-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram invertidos suavemente durante dez minutos e, depois, centrifugados. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e esse procedimento foi repetido mais uma vez. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado. As amostras foram invertidas suavemente, incubadas a -20°C por 30 minutos e centrifugadas a 13.400 g por dez minutos, para obtenção do precipitado contendo DNA. Os DNAs foram lavados duas vezes com etanol 70% gelado, secos à temperatura ambiente (TA) e ressuspensos em 400 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA pH 8). Às amostras de DNA adicionou-se RNase na concentração final de 10 μ g/mL e incubou-se por

30 minutos a 37°C, para degradação do RNA. Para nova precipitação do DNA, foram adicionados 20 µL NaCl 5M e 800 µL de etanol absoluto gelado. Após suave inversão, as amostras foram incubadas a -20°C por duas horas e centrifugadas a 13.400 g por dez minutos. Os precipitados foram lavados duas vezes com etanol 70% gelado, secos à TA e ressuspensos em 100 µL de tampão TE.

Quantificação de DNA

As amostras de DNA obtidas foram diluídas 1:10 (v:v) e suas concentrações foram estimadas em gel de agarose 0,8%, pré-corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), por comparação com bandas de padrões do DNA lambda (Invitrogen) de concentrações conhecidas (100 ng/µL, 200 ng/µL e 300 ng/µL). A eletroforese foi realizada a 100 V por aproximadamente 30 minutos, os géis foram visualizados em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em sistema digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia). Depois de quantificadas, amostras dos DNAs extraídos foram diluídas para a concentração de 5 ng/µL (concentração de uso) e mantidas a 4°C para a realização das reações de amplificação, e o restante foi estocado a -20°C.

Reações de amplificação

As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 µL, contendo 0,4 µM de *primer*; 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1x tampão da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 30 ng de DNA. Os 11 *primers* de RAPD utilizados encontram-se na Tabela 1. Uma reação contendo todos os reagentes, exceto o DNA (controle ou branco), foi feita para cada *primer* a fim de se verificar se não havia contaminação dos reagentes com DNA e dar maior confiabilidade aos resultados.

Para as amplificações foi utilizado um termociclador PTC 100 (MJ Research), programado para uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida por 40 ciclos de 94°C por um minuto (desnaturação), 35°C por um minuto (pareamento dos

primers) e 72°C por dois minutos (extensão); e uma extensão final a 72°C por sete minutos. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5%, pré-corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada a 100 V por cerca de três horas. O tampão utilizado para o preparo do gel e na cuba de eletroforese foi o TBE 1x (0,89M Tris; 0,89M Borato e 0,08M EDTA).

Terminada a eletroforese, os géis foram visualizados em luz ultravioleta e suas imagens foram capturadas por sistema de fotodocumentação digital L.Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Tabela 1 - Lista dos *primers* de RAPD utilizados para a análise dos oito acessos de *B. dictyonera* com suas sequências de nucleotídeos

<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos	<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos
A20	GTT GCG ATC C	AD02	CTG AAC CGC T
D18	GAG AGC CAA C	AJ06	CTC GGA GTG G
E02	GGT GCG GGA A	AK04	AGG GTC GGT C
E03	CCA GAT GCA C	BA02	TGC TCG GCT C
AB01	CCG TCG GTA G	BB02	CCCCCG TTA G
AB02	GGA AAC CCC T		

Análise dos dados

Os perfis de RAPD obtidos foram analisados para cada acesso pela presença “1” ou ausência “0” de bandas (fragmentos de DNA amplificados). Somente bandas reproduzíveis e não ambíguas na faixa entre 400 e 2000 pb foram consideradas nas análises.

Uma matriz de similaridade genética (S) foi construída utilizando-se o coeficiente de Jaccard: $S=N/P$, onde N é o número de concordâncias positivas e P é o total de variáveis menos as concordâncias negativas. A partir dos dados de dissimilaridade genética ($D=1-S$), foram feitas as análises de agrupamento por dois métodos: Unweighted Pair-group Method with Arithmetical Average (UPGMA) e Tocher. O dendrograma gerado pelo método UPGMA foi testado com 400 repetições randômicas (*bootstrap*). Para essas análises foi utilizado o programa GENES para Windows (Cruz, 1997), versão 2005.

Resultados

Os 11 *primers* utilizados em *B. dictyoneura* amplificaram 87 bandas claras e reproduzíveis na faixa de 400 a 2000 pb. O número de bandas amplificadas por *primer* variou de 3 a 14, e foi em média 7,9. Dessas bandas amplificadas, 84% foram polimórficas, todos os *primers* amplificaram pelo menos uma banda polimórfica.

A média de S entre os oito acessos foi 0,53, denotando alta variabilidade interacessos. Os valores obtidos para S variaram de 0,211 a 0,956, ou seja, existem acessos muito similares, Dt150 e Dt154 (S = 0,96), e acessos muito divergentes, Dt154 e Dt159 (S = 0,211) (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz de similaridade genética, estimada pelo coeficiente de Jaccard, entre os acessos de *B. dictyoneura*.

	Dt150	Dt154	Dt155	Dt157	Dt158	Dt159	Dt160	Dt161
Dt150	1							
Dt154	0,956	1						
Dt155	0,260	0,273	1					
Dt157	0,259	0,265	0,740	1				
Dt158	0,270	0,277	0,680	0,854	1			
Dt159	0,215	0,211	0,686	0,685	0,725	1		
Dt160	0,237	0,239	0,787	0,679	0,654	0,660	1	
Dt161	0,271	0,279	0,625	0,844	0,778	0,708	0,702	1

Os resultados das análises de agrupamento obtidos pelos métodos UPGMA e Tocher foram os mesmos, como pode ser observado na Figura 1 e na Tabela 3, respectivamente. Os acessos apomíticos Dt150 e Dt154 ficaram agrupados no topo do dendrograma e formaram o Grupo 1 da tabela de Tocher. Logo após, no dendrograma, foram agrupados os acessos apomíticos Dt155 e Dt160, que formaram o Grupo 3 na tabela de Tocher. Os acessos apomíticos Dt157, Dt161 e o acesso sexual Dt158, ficaram agrupados pelo dendrograma e formaram o Grupo 2 de Tocher. Por último, o acesso apomítico Dt159 formou um grupo a parte por ambos os métodos, o que pode ser comprovado pelo baixo valor de *bootstrap* na intercessão com o grupo anterior no dendrograma. Os grupos formados no dendrograma apresentaram altos valores de *bootstraps*, com mais de 85% de repetibilidade.

Tabela 3 - Agrupamento dos oito acessos de *Brachiaria humidicola* obtido pelo método de Tocher.

GRUPOS	ACESSOS		
<1>	Dt150	Dt154	
<2>	Dt157	Dt158	Dt161
<3>	Dt155	Dt160	
<4>	Dt159		

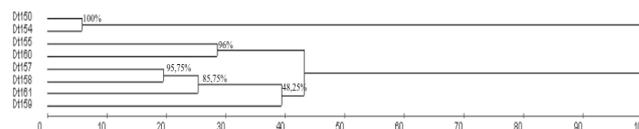


Figura 1 - Dendrograma das dissimilaridades genéticas entre os oito acessos de *B. dictyoneura*. As porcentagens correspondem aos valores de *bootstrap* obtidos de 400 reamostragens randômicas.

Discussão

A técnica de RAPD tem sido empregada para avaliar a variabilidade genética em diversas espécies, utilizando diferente número de *primers*. Em gramíneas forrageiras a maioria dos trabalhos utiliza pelo menos dez *primers*, mas o número médio de marcadores (bandas) gerados por *primer* varia muito. Daher et al. (2002), encontraram uma média de 4,5 bandas/*primer* em *Pennisetum purpureum* (capim-elefante), enquanto Salgado et al. (2006) relataram em *B. humidicola* uma média bem maior (10). Neste trabalho, a média de bandas/*primer* (7,9) foi intermediária entre os dois trabalhos citados.

Das 87 bandas amplificadas nos acessos de *B. dictyoneura*, 73 foram polimórficas, denotando significativo polimorfismo entre esses oito acessos estudados. Além disso, os valores de S obtidos reforçam que existe uma variabilidade genética interacessos significativa, comparável à encontrada em *B. humidicola*, espécie taxonomicamente próxima a *B. dictyoneura*, conforme Salgado et al. (2006). Esses autores utilizaram 100 marcadores RADP para o estudo de 58 acessos dessa espécie e os valores de S variaram de 0,14 a 0,97. Neste trabalho, apesar de um número bem menor de acessos estudados, a variação foi parecida, sendo de 0,21 a 0,96.

O dendrograma mostra a separação dos oito acessos de *B. dictyoneura* em quatro *clusters* com

alta repetibilidade. O mesmo resultado foi observado com a análise de agrupamento de Tocher. A formação de quatro *clusters* por ambos os métodos reforça a existência de grande diversidade interacessos.

Estes resultados indicam que, apesar de pequeno, este germoplasma é valioso, e a variabilidade genética aqui detectada poderá ser explorada no programa de melhoramento genético do gênero, visando à seleção de genótipos apomíticos para lançamento como cultivares ou à escolha de genitores para realização de cruzamentos e seleção, visto que existe um acesso sexual neste germoplasma e, portanto, há possibilidade de hibridação. Os resultados também mostraram que não há duplicadas nessa pequena coleção.

Por fim, este estudo mostrou a facilidade e rapidez da técnica de RAPD para obtenção de resultados sobre variabilidade genética em uma espécie nunca antes estudada e geneticamente melhorada.

Conclusões

- Os marcadores RAPD possibilitaram a discriminação dos oito acessos estudados, indicando que não há duplicadas no germoplasma analisado.
- Os métodos de agrupamento utilizados separaram os acessos em quatro *clusters* com diferentes níveis de variabilidade genética.
- Existe uma variabilidade genética significativa entre os acessos estudados, que poderá ser explorada pelo melhorista, orientando cruzamentos e seleção.

Agradecimentos: os autores agradecem à Associação para Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais – UNIPASTO, pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BONATO, A. L. V.; VALLE, C. B. do.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; LEGUIZAMON, G. O. C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002, 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79).
- BOWDITCH, B. M.; ALBRIGHT, D. G.; WILLIAMS, J. G. K., BRAUN, M. J. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. **Methods in Enzymology**, v.224, p.294-309, 1993.
- CHANDRA, A.; SAXENA, R.; ROY, A. K.; PATHAK, P. S. Estimation of genetic variation in *Dichanthium annulatum* genotypes by the RAPD technique. **Tropical Grasslands**, v.38, p.245-258, 2004.
- CRUZ, Cosme Damião. **Programa Genes Aplicativos Computacional em Genética e Estatística**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 435 p.
- DAHER, R. F.; PEREIRA, M. G.; PEREIRA, A. V.; AMARAL JÚNIOR., A. T. Genetic divergence among elephant grass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. **Scientia Agricola**, v.59, n.4, p.623-627, 2002.
- DONG, Z.; XIE, X.; LU, X.; GUO, H.; SUN, X. Study on the Genetic Diversity of Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*). In: XU, L. Y. **Vetiver and water: an eco-technology for water quality improvement, land stabilization, and environmental enhancement**. Chine: Chinese Academy of Sciences, 2003. p. 524-531.
- FERREIRA, R. P.; PEREIRA, A. V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 781-812.
- KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, J.W.; MASS, B.L.; VALLE, C.B.do. ***Brachiaria*: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 16-42.
- MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R.A. **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa, 2006. p. 35-63.
- MIGNOUMA, H. D.; NG, N. Q.; IKEA, J.; THOTTAPILLY, G. Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. **Journal of Genetics & Breeding**, v.53, p.151- 59, 1998.
- MILES, J. W.; VALLE, C. B. do. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: _____; MAASS, B.L.; VALLE, B.C.do. ***Brachiaria*: biology, agronomy, and improvement**. Colômbia: CIAT, 1996. p. 164-177.
- PASSOS, L. P.; MACHADO, M. A.; VIDIGAL, M. C.; CAMPOS, A. L. Molecular characterization of elephant grass ac-

cessions through RAPD markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.3, p.568-574, 2005.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B.do. **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 147-163.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources Crop Evolution**, v.53, p.7-10, 2006a.

_____. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetic and Molecular Research**, v.5, n.4, p.837-845, 2006b.

SALGADO, L. R.; VALLE, C. B. do.; DOURADO, D. M.; CANÇADO, L. J.; VALLE, J. V. R.; LEGUIZAMÓN, G. O. C.; CHIARI, L. Variabilidade genética de acessos de *Brachiaria humidicola* utilizando a técnica de RAPD. In: ARRUDA, C.C.P.de.; DOURADO, D.M.; ILHA, I.M.N.; MATIAS, R. **Bio(in)Formação: monografias 2005**. Campo Grande, 2006. p. 459-469.

VALLE, C. B. do.; SIMIONI, C.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Melhoria genética de *Brachiaria*. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.do.; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 13-53.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RA-FALSKI, J. A.; TINGEY, S. A. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

YANAKA, F. Y.; DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DIAS, P. M. B.; GOMES, K. E. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* trin. Ex Nees (Poaceae) com base em isoenzimas e marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1897-1904, 2005.