

PRÉ-MELHORAMENTO DA GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.)  
VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS  
AO NORTE E NOROESTE FLUMINENSE

**PATRÍCIA GOMES DE OLIVEIRA PESSANHA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
SETEMBRO - 2011

PRÉ-MELHORAMENTO DA GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.)  
VISANDO AO DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS  
AO NORTE E NOROESTE FLUMINENSE

**PATRÍCIA GOMES DE OLIVEIRA PESSANHA**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Genética e Melhoramento  
de Plantas.

Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

SETEMBRO – 2011

PRÉ-MELHORAMENTO DA GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.)  
VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES ADAPTADAS  
AO NORTE E NOROESTE FLUMINENSE

**PATRÍCIA GOMES DE OLIVEIRA PESSANHA**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Genética e Melhoramento  
de Plantas.

Aprovada em 27 de setembro de 2011.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Antonio Teixeira do Amaral Junior (D.Sc. Melhoramento Vegetal) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Norma Eliane Pereira (D.Sc. Produção Vegetal) – UESC

---

Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF

---

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc. Melhoramento de Fruteiras) – UENF  
(Orientador)

Dedico esta conquista aos meus pais, Carlos da Conceição Pessanha e Cláudia Maria Gomes de Oliveira Pessanha, ao meu irmão Carlos Eduardo Gomes de Oliveira Pessanha, ao meu esposo Luiz Henrique Poley Victor Dias, à minha filha Maria Eduarda Gomes Poley Victor, pelo amor, pelo carinho e por compreenderem a minha ausência em alguns momentos da vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, guiando meus passos, dando-me paciência, saúde e sabedoria durante esta jornada.

À minha família: meu pai Carlos da Conceição Pessanha, minha mãe Cláudia Maria Gomes de Oliveira Pessanha, meu irmão Carlos Eduardo Gomes de Oliveira Pessanha, meu esposo Luiz Henrique Poley Victor Dias e minha filha Maria Eduarda Gomes Poley Victor, pelo apoio incondicional ao meu crescimento pessoal e profissional.

Em especial, ao professor Alexandre Pio Viana, por seu profissionalismo, por sua dedicação e por sua decisão. Fico honrada, ainda, por confiar a mim o trabalho e a oportunidade de crescer e de divulgar os resultados desta pesquisa.

À professora Telma Nair Santana Pereira, por me aceitar co-orientar e pela confiança depositada em mim e em meu trabalho.

Ao Técnico Geraldo Francisco de Carvalho e os funcionários de campo da UENF pelo auxílio nos trabalhos de campo.

À Técnica Vitória Régia Melo de Almeida Miranda pelo auxílio nas atividades do laboratório.

Ao secretário do LMGV José Daniel Valle de Almeida pelo auxílio nos compromissos acadêmicos.

A todos os amigos do LMGV; em especial, à Amanda, Aroldo, Bianca, Cíntia, Elba, Fernanda, Monique, Roberto, Rulfe, Sérgio e Silvana que me auxiliaram, diretamente, para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade pela oportunidade de realização do curso e à FAPERJ pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Msc. Milena Carvalho Teixeira pelo auxílio nas análises citogenéticas.

À estagiária Gleice Lima pelo auxílio nas atividades de campo e laboratório.

Aos professores do curso da pós-graduação LMGV pela transmissão de conhecimentos e de experiências. Em especial, a Antônio Teixeira do Amaral Júnior e a Messias Gonzaga Pereira.

Ao Professor Ricardo Moreira Souza, aos alunos e aos funcionários do LEF-UENF pela disponibilidade e contribuição de informações.

Ao Professor Ricardo Bressan pela obtenção dos preciosos artigos científicos para a realização deste trabalho.

Ao Professor Silvério Paiva Freitas Júnior pelo auxílio nos cruzamentos e transporte.

Ao Professor Marcelo Geraldo de Moraes Silva pelo auxílio nos transportes.

Ao Professor Pedro Damasceno, UFRural, pelo auxílio na coleta do material .

Aos proprietários e aos funcionários do Sítio Providência e Itamudas pela oportunidade de trabalhar em suas propriedades.

Aos meus grandes amigos que, com seu apoio e incentivo, contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
Objetivos .....	3
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1 Aspectos Gerais da Cultura.....	4
2.2 Biologia Reprodutiva.....	7
2.3 Características das Cultivares.....	12
2.4 Aspectos do melhoramento genético da goiabeira.....	14
2.5 Aplicação dos Marcadores Moleculares no melhoramento vegetal...	15
2.6 Diversidade Genética.....	19
3. Trabalhos.....	23
Trabalho 3.1: Avaliação da Diversidade Genética em acessos de <i>Psidium</i> ssp. via marcadores RAPD.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24



Introdução.....	24
Material e Métodos.....	26
Resultado e Discussão.....	28
Conclusão.....	31
Referências.....	32
Trabalho 3.2: Estudo do comportamento meiótico das espécies <i>Psidium guajava</i> L. (goiabeira) e <i>Psidium guienense</i> Sw (araçá do campo)...	37
Resumo.....	38
Abstract.....	39
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	41
Resultados e Discussão.....	43
Referências.....	47
Trabalho 3.3: Diversidade Genética de genitores e híbridos de <i>Psidium guajava</i> L. via marcadores microsatélite (SSR).....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	53
Material e Métodos.....	55
Resultado e Discussão.....	57
Referências.....	65
Resumo e Conclusões .....	68
Referências Bibliográficas.....	70

## LISTA DE FIGURAS

Trabalho 3.1: Avaliação da Diversidade Genética em acessos de *Psidium* ssp. via marcadores RAPD

Figura 1: Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética entre 20 acessos de *Psidium* spp. caracterizado por marcadores RAPD..... 35

Trabalho 3.2: Estudo do comportamento meiótico da espécie *Psidium guajava* L. (goiabeira)

Figura 1. Diferentes fases da meiose observadas em goiabeira..... 50

Figura 2. Irregularidades meióticas e produtos pós-meióticos observados durante a meiose de goiabeira..... 50

Figura 3. Produtos pós-meioticos observados durante a meiose do araçá do campo..... 51

Figura 4. Grãos de pólen viáveis e grãos de pólen inviáveis observados em botões na pré-antese de plantas de *Psidium* spp..... 51

Trabalho 3.3: Diversidade Genética de genitores e híbridos de *Psidium guajava* L. via marcadores microssatélite (SSR)

Figura 01: Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética entre os sete genitores e os nove híbridos de <i>Psidium spp</i> , caracterizado por marcadores SSR.....	60
Figura 02: Análise de estruturação genética dos sete genitores e dos nove híbridos de goiaba. ....	64
Figura 03: Gráfico obtido pelo programa <i>Structure Harvester</i> a partir das análises dos dados do Structure 2.3.3.....	64

## LISTA DE TABELAS

Trabalho 01: Avaliação da Diversidade Genética em acessos de *Psidium* ssp. via marcadores RAPD

Tabela 1: Acessos utilizados para estudo de RAPD e diversidade genética..... 36

Tabela 2: Lista dos códigos e das sequências dos *primers* e seus respectivos números de bandas polimórficas e monofórmicas obtidas na análise de DNA, molde extraído de acessos de goiaba e araçá..... 36

Tabela 3: Acessos de *Psidium spp.* caracterizados com marcadores moleculares RAPD e agrupados pelo método de otimização Tocher. .... 37

Trabalho 02: Estudo do comportamento meiótico da espécie *Psidium guajava* L. (goiabeira)

Tabela 1. Médias dos produtos pós-meióticos observados nas plantas de *P. guajava* L..... 49

Tabela 2. Número de grãos de pólen viáveis (GPV) e grãos de pólen inviáveis (GPI) observados em botões na pré-antese de plantas de *P. guajava* L..... 49

Trabalho 03: Diversidade Genética de genitores e híbridos de *Psidium guajava* L. via marcadores microssatélite (SSR)

Tabela 01: Frequências dos alelos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub> dos 10 locos microssatélite polimórficos avaliados em genitores e híbridos intraespecífico de *P. guajava* L..... 58

Tabela 02: Caracterização dos dez pares de iniciadores microssatélites utilizados na análise de setes genitores e nove híbridos intraespecíficos de *P. guajava* L. .... 62

## RESUMO

Pessanha, Patrícia Gomes de Oliveira, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Setembro de 2011, Pré-Melhoramento em goiabeira (*Psidium guajava* L.) visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas ao Norte e Noroeste Fluminense. Orientador: Alexandre Pio Viana. Co-Orientadores: Antonio Texeira do Amaral Júnior e Telma Nair Santana Pereira.

Atualmente, a região Sudeste é a segunda maior produtora de goiabas, com destaque para o Estado de São Paulo. Porém, observa-se um declínio, nos últimos anos, na área e na produção nacional da goiabeira, principalmente no Nordeste devido ao parasitismo do nematóide *Meloidogyne enterolobii*, que predispõe a goiabeira à podridão radicular causada pelo fungo *Fusarium solani*, doença complexa, chamada "declínio da goiabeira". Em geral, as melhores chances de sucesso no controle dos nematóides estão no uso de materiais resistentes, os quais podem ser obtidos pelo melhoramento genético. O programa de genética e melhoramento da goiabeira necessita de informações básicas para o desenvolvimento de novas cultivares superiores e resistentes às principais doenças e pragas. Assim, há necessidade de mais pesquisas em análises citogenéticas com níveis de *ploidia* das espécies de *myrtaceae*, viabilidade polínica dos grãos de pólen; diversidade entre espécies e divergência entre genótipos; além de desenvolvimento de novos iniciadores moleculares para se desenvolver materiais superiores e resistentes. Três trabalhos foram realizados para iniciar um programa de Melhoramento Genético para a Cultura da Goiaba na

UENF, visando à obtenção de novas variedades comerciais com atributos superiores e resistentes às principais doenças. O primeiro trabalho contempla a avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* ssp. via marcadores RAPD cujo objetivo foi estudar a diversidade genética entre vinte acessos para o direcionamento de cruzamentos e obtenção de novas variedades. Os resultados deste trabalho mostraram que os marcadores moleculares RAPD foram eficazes em relevar a existência de diversidade genética entre os vinte acessos de *Psidium* spp, e o método de agrupamento hierárquico UPGMA foi o que melhor explicou a diversidade genética entre os acessos. No segundo trabalho, realizou-se o estudo do comportamento meiótico da espécie *Psidium guajava* L. Estimaram-se o Índice Meiótico e a viabilidade polínica dos acessos de goiabeira. Conclui-se que algumas poucas anormalidades, tais como cromossomos retardatários e pegajosos, foram observadas, porém nada que comprometesse a fertilidade dos acessos de goiabeira. No último trabalho, utilizaram-se os marcadores moleculares microssatélites para estimar a diversidade de sete genitores e nove híbridos intraespecíficos de goiaba. Assim, pode-se estimar o potencial dos marcadores microssatélites em detectar polimorfismo entre pais e híbridos de goiabeira; realizar a caracterização genética, buscando estimar índices genotípicos para a quantificação e estruturação da variabilidade genética e estimar o nível de endogamia nos materiais genéticos estudados. Com base nos resultados deste trabalho, pode-se afirmar que os marcadores moleculares SSR foram eficazes em revelar a existência da diversidade genética entre genitores e as combinações híbridas de *P. guajava* L., assim como verificar a eficácia dos cruzamentos realizados para a obtenção de novos híbridos e composição de populações segregantes para avaliação e prosseguimento do programa de melhoramento da goiabeira ora em desenvolvimento na UENF.

## ABSTRACT

Pessanha, Patrícia Gomes de Oliveira, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Setembro de 2011, Guava (*Psidium guajava* L.) Pre-breeding for Development of Cultivars Adapted to Rio de Janeiro North and North-west Regions. Advisor: Alexandre Pio Viana. Committee: Antonio Texeira do Amaral Júnior e Telma Nair Santana Pereira.

Currently, Brazilian South-east Region presents the second major guava production, in which São Paulo state emerges. However, in past years a decrease in guava cultivated area and production is being observed, mainly in North-east Region due to the *Meloidogyne enterolobii* nematode, which predisposes guava tree to root decay caused by *Fusarium solani* fungi, a complex disease known as “guava decline”. In general, best success chances in nematode control are achieved with the use of resistant materials, which can be obtained through breeding. Guava genetics and breeding program need basic information for developing higher-yielding cultivars, resistant to diseases and pests. Thus, more research is needed in cytogenetic analysis with different ploid levels in *myrtaceae* species, in pollen grain viability, in diversity among species and in divergence among genotypes; besides further development of new primers for producing higher-yielding and resistant materials. Three studies were performed to start-up a Guava Breeding program in UENF, aiming to obtain new commercial varieties with superior attributes and resistant to major diseases. The first work describes genetic diversity assessment in *Psidium* ssp. genotypes via RAPD markers whose



objective was to study the genetic diversity among twenty accessions spp. to track crosses and obtain new varieties. The results of this study showed that RAPD markers were effective in revealing the existence of genetic diversity among the twenty accessions of *Psidium* spp. and hierarchical clustering method UPGMA was the one that best explained genetic diversity of accessions studied. In the second work, a study on the meiotic behavior of the species *Psidium guajava* L. was carried out. Meiotic index and pollen viability of accessions of guava were estimated. A few anomalies, such as sticky chromosomes and laggards were observed, but no evidence of guava genotype fertility changes was found. In the latter work, we used microsatellite markers to estimate the molecular diversity of seven guava parents and nine guava intraspecific hybrids. Thus, we could estimate the potential of microsatellite markers to detect polymorphism between parents and hybrids of guava, perform the genetic characterization seeking to estimate rates for the quantification and structuring of genetic variability and estimate the level of inbreeding in the genotypes studied. According to the results, we can affirm that the SSR markers were effective in reveal the existence of genetic diversity between parents and hybrids of *P. guajava* L., and verify the effectiveness of the crosses to obtain new hybrids and the segregating populations compositions in order to evaluate and continue the ongoing guava breeding program in UENF.

## 1. INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava*, L.) é originária da região tropical do continente americano, com centro de origem, provavelmente, na região compreendida entre o sul do México e o norte da América do Sul. Hoje, esta espécie encontra-se amplamente difundida por todas as regiões tropicais do mundo (Risterucci et. al., 2005).

A goiaba apresenta lugar de destaque entre as frutas tropicais, principalmente devido ao seu valor nutritivo, com elevados teores de vitamina C e A, e ao sabor e aroma característicos, que lhe conferem excelente qualidade organoléptica (Risterucci et al., 2005). Um único fruto, com aproximadamente 150 g, é capaz de suprir 100% da ingestão diária recomendada de vitamina C e licopeno (Queiroz et al., 2008).

Em 2010, o Brasil apresentava uma área plantada de 9.138.00 ha, com uma produção de 76.494.000 toneladas (IBGE, 2011), sendo as cultivares Paluma, Rica, Pedro Sato, Kumagai, Sassaoka, Ogawa, Yamamoto e Século XXI as mais plantadas no país.

A valorização do produto como matéria-prima para a indústria e o aumento de consumo na forma de fruta para mesa têm proporcionado mudanças no sistema de produção e de comercialização. Com isso, torna-se necessário o uso de variedades que atendam às exigências do mercado, tanto para mesa, quanto para a indústria (Mittra, 2010).

Um trabalho de melhoramento genético da goiabeira, por meio de seleção de plantas originadas por sementes, pode possibilitar a obtenção de cultivares com características adequadas para o consumo *in natura* e para a industrialização (Fernandes-Santos et al., 2010). Para Padilha-Ramírez et al. (2002), é necessário saber da variabilidade genética dos acessos cultivados nas regiões produtoras, com o objetivo de identificar populações superiores para as condições das áreas produtoras.

Com essa finalidade, são selecionadas plantas vigorosas e produtivas, com boa adaptação às regiões de estudo, produtoras de frutos de boa aparência, com polpa vermelha, e que apresentem grande valor nutritivo, especialmente, rico em açúcares, sais minerais e vitaminas A e C (Pereira, 2003).

Segundo Jaiswal e Jaiswal (2005), a Índia, o México e o Brasil são os principais produtores de goiaba no mundo, contudo os Estados Unidos são o maior importador de goiaba (pasta, purê e geléias) principalmente do Brasil, República Dominicana, Equador e México.

Atualmente, a região Sudeste é a segunda maior produtora de goiabas, com destaque para o Estado de São Paulo. Porém, observa-se um declínio nos últimos anos na área e na produção nacional da goiabeira, principalmente no nordeste devido ao parasitismo do nematóide *Meloidogyne enterolobii*, que predispõe a goiabeira à podridão radicular causada pelo fungo *Fusarium solani*, doença complexa, chamada "declínio da goiabeira" (Miranda et al., 2011). Em geral, as melhores chances de sucesso no controle dos nematóides estão no uso de materiais resistentes, os quais podem ser obtidos pelo melhoramento genético.

O programa de genética e melhoramento da goiabeira necessita de informações básicas para o desenvolvimento de novas cultivares superiores e resistentes às principais doenças e pragas. Assim, há necessidade de mais pesquisas em análises citogenéticas como níveis de *ploidia* das espécies de *myrtaceae*, viabilidade polínica dos grãos de pólen; diversidade entre espécies e divergência entre genótipos; além de desenvolvimento de novos indicadores moleculares para se desenvolver materiais superiores e resistentes.

Há cerca de quatro anos, a UENF iniciou o programa de melhoramento clássico da goiabeira; entretanto, leva-se muito tempo para se chegar a algum resultado prático, especialmente por se tratar de uma espécie perene que exige grandes áreas experimentais e alto custo financeiro. Para ganhar tempo e

aumentar a velocidade de resposta do programa, lançou-se mão de ferramentas auxiliares como os marcadores moleculares e análises citogenéticas. Entre as diversas classes de marcadores moleculares atualmente disponíveis, os microssatélites se destacam pelo seu alto poder informativo (Oliveira et al., 2006) e ampla distribuição pelo genoma (Rallo et al., 2000), permitindo uma boa amostragem em estudos genéticos. Por outro lado, embora dominante, o marcador RAPD possibilita rápida avaliação das diferenças na composição genética de indivíduos relacionados, contemplando regiões genômicas com histórias evolutivas substancialmente distintas, provendo diferentes informações (Saxena et al., 2005).

Nas análises citogenéticas, pode-se observar o comportamento meiótico que é altamente influenciado pelas condições edafoclimáticas. Assim, anormalidades que ocorrem durante a meiose podem levar à formação de gametas desbalanceados e inviáveis.

Frente ao exposto, na presente pesquisa, teve-se por objetivo do trabalho iniciar o programa de melhoramento genético da goiabeira, visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas ao Norte e Noroeste Fluminense. Assim, os objetivos específicos foram estudar a diversidade genética entre vinte acessos *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD para o direcionamento de cruzamentos e obtenção de novas variedades; sendo assim, realizaram-se os cruzamentos. Os marcadores SSR foram utilizados para detectar polimorfismo entre pais e híbridos de goiabeira e realizar a caracterização genética, buscando estimar índices genotípicos para a quantificação e estruturação da variabilidade genética e estimar o nível de endogamia nos materiais genéticos estudados. Além dos marcadores moleculares, o comportamento meiótico, o índice meiótico e a viabilidade polínica dos acessos foram utilizados para observar a influência do ambiente sobre a formação do grão de pólen.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais da Cultura

A goiabeira pertence à família Myrtaceae, gênero *Psidium* e a espécie *Psidium guajava*, e o araçá do campo pertence à espécie *Psidium guineense* Sw. A família Myrtaceae compreende mais de 70 gêneros e 2.800 espécies. A família Myrtaceae também inclui outras plantas agrícolas importantes que rendem produtos econômicos como temperos aromáticos (cravo-da-índia, canela, pimenta-da-jamaica), óleos aromáticos (eucalipto), plantas ornamentais (murta, Callistemon = bucha-de-garrafa) e várias frutas (jambo *Syzygium malaccense*, cereja de Suriname, ameixa de Java, jambo-do-norte, feijoa e muitas outras) (Kwee e Chong, 1990). O gênero *Psidium* apresenta, aproximadamente, 150 espécie, entre as quais se destacam *P. guajava* L. (goiaba,  $2n = 22$ ), *P. cattleianum* Sabine (araçá doce, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa) e *P. guineense* Swartz ou *P. araçá* Raddali (araçá verdadeiro ou araçá ácido) (Pereira, 1995; Manica, et al., 2000; Pereira e Nachtigal, 2002; Ray, 2002).

A disseminação da goiaba, no mundo, ocorreu através dos colonizadores espanhóis na época da colonização do Brasil, quando esses colonizadores levaram as sementes de goiaba para as outras colônias no velho mundo. E no continente americano, a disseminação ocorreu por meio de pássaros e animais pequenos que comiam a fruta e, depois, propagavam as sementes.

O modo reprodutivo de cada espécie é importante para assegurar a perpetuação de seus descendentes e para uma possível adaptação de novos

habitats, além de constituir a base para o desenvolvimento dos processos evolutivos naturais das espécies. Do ponto de vista financeiro, o sistema de reprodução das espécies é um dos principais pilares para se manter uma cultura economicamente viável, seja ela através da produção de frutos e de sementes ou pela propagação vegetativa. Portanto, as análises sobre a biologia floral, o mecanismo de polinização e os registros fenológicos mostram-se de extrema importância, tanto para o meio natural, quanto para a produção em escala comercial.

Estudos sobre a biologia reprodutiva de *Myrtaceae*, especialmente *Psidium guajava* L., no Brasil, são escassos, portanto pouco se sabe sobre as necessidades de polinização da goiabeira (planta hermafrodita) e de possíveis perdas de produtividade devido à falta de polinização adequada das flores.

Trabalhos encontrados na literatura são muito divergentes a respeito da receptividade do estigma. Por exemplo, Singh e Sehgal (1968) afirmam que o estigma já se torna receptivo dois dias antes da antese; Boti (2001) sugere que ele fica receptivo na pré-antese e, assim, permanece por trinta horas. Por outro lado, Soubihe Sobrinho (1951) alega que a receptividade do estigma inicia-se no tempo da antese, enquanto Dasarathy (1951) e Balasubrahmanyam (1959) afirmam que esta só acontece duas a três horas após a abertura da flor.

Observando-se a parte masculina da flor, verificou-se que o pólen mais frequentemente depositado nos estigmas de *P. guajava* é o da própria flor, havendo possibilidades de ocorrer a autopolinização, ou seja, a espécie se comportando como autógama (Soubihe Sobrinho, 1951; Singh e Seghal, 1968). Esse tipo de polinização seria possível, pois Boti (2001) afirma que a goiabeira não apresenta auto-incompatibilidade. Mas, Seth (1960) e Hirano e Nakasone (1969) encontraram auto-incompatibilidade parcial na goiabeira. Nenhuma outra forma de restrição à autopolinização em *P. guajava* foi encontrada na literatura.

A forma mais frequente de polinização em *P. guajava* é a polinização cruzada, segundo Dasarathy (1951) e Balasubrahmanyam (1959). Essa afirmação é reforçada por várias características: primeiro, a morfologia da flor da goiabeira aponta para uma tendência à melitofilia por serem as flores de cor branca, por terem antese durante o dia, por apresentarem odores adocicados, flores sem profundidade e anteras com bastante pólen (Faegri e Van Der Pijl, 1979), e a segunda característica é que, de fato, as flores da goiabeira são muito visitadas

por abelhas solitárias e sociais, como encontrado por Soubihe Sobrinho (1951), Soubihe Sobrinho e Gurgel (1962), Hedstrom (1988), Medina (1988), Heard (1999), Alves (2000) e Boti (2001).

A goiaba (*Psidium guajava* L.) apresenta grãos de pólen como recurso floral, assim como muitas outras espécies de *Myrtaceae* (Faegri e Pijl 1979; Proença e Gibbs 1994; Lughadha e Proença 1996). Os grãos de pólen são estruturas ricas em carboidratos, proteínas, vitaminas e lipídios e, por essa razão, são importantes fontes alimentares para diversos visitantes florais (Faegri e Pijl 1979; Free 1993; Roulston e Cane 2000; Thorp 2000; Jones e Jones 2001).

As espécies da família da *Myrtaceae* são visitadas por uma ampla variedade de insetos, incluindo abelhas, vespas, moscas e, até mesmo, mamíferos e pássaros, sendo as abelhas (*Apis mellifera* L.) os principais polinizadores (Beardsell et al. 1993; Proença e Gibbs 1994; Lughadha e Proença 1996). Na região neotropical, *Apidae* é a família de abelhas mais comum entre as visitantes de *Myrtaceae* (Lughadha e Proença, 1996). *Apis mellifera* L., espécie de origem africana e mundialmente disseminada pela ação humana (Michener, 1979), tem uma considerável interferência na biologia reprodutiva de muitas espécies vegetais, podendo favorecer ou dificultar seu sucesso reprodutivo, além de influenciar, direta ou indiretamente, a dinâmica de forrageio de polinizadores nativos (Paton 1993; Vaughton, 1996; Villanueva-G, 2002).

A alta produtividade de frutos, a produção de frutos de maior massa e o número de sementes são algumas das vantagens que uma polinização bem sucedida pode promover às culturas de importância econômica (Free, 1993). Sendo assim, essas características são muito usadas em estudos de requerimentos de polinização (Freitas, 1995; Freitas e Paxton, 1996; Pereira e Freitas, 2002). Entretanto, na goiabeira, somente Alves (2000) comparou diferentes tipos de polinização e constatou que a polinização cruzada produz, significativamente, mais frutos do que a autopolinização e a polinização natural.

Alves e Freitas (2007), estudando o requerimento da polinização em goiabeiras, concluíram que a goiabeira produz frutos quando polinizada por agentes bióticos ou pelo vento, porém este não é capaz de assegurar bons níveis de produtividade nessa cultura. Apesar de vingar frutos quando autopolinizada, a goiabeira beneficia-se mais da polinização cruzada, podendo incrementar sua produção em, até, 39,5% em relação à autopolinização, provavelmente devido a

fenômenos de auto-incompatibilidade. Assim, em função desses requerimentos de polinização, Alves e Freitas (2007) recomendam a presença de agentes polinizadores nos pomares, especialmente abelhas, cujos comportamentos de forrageamento promovem a polinização cruzada.

## 2.2 Biologia Reprodutiva

Sabendo-se que a separação das funções masculinas e femininas nas flores é um fator para evitar a autopolinização nas plantas, Dafni (1992) concluiu que os diversos sistemas sexuais podem influenciar, de maneiras diferentes, as taxas de cruzamento natural, assim como os mecanismos de polinização e o comportamento dos polinizadores.

O modo de reprodução e a taxa de cruzamento natural são, razoavelmente, bem conhecidos para a maioria das espécies agrícolas de importância. Para a goiabeira, essa informação é, entretanto, incompleta, em maior ou menor grau, especialmente no concernente à taxa de cruzamento natural, nas diferentes condições de ambiente. Para a condução eficiente de um programa de melhoramento genético vegetal, poderá, portanto, ser necessária a determinação das taxas de cruzamento natural para o ambiente em questão, no qual o programa de melhoramento deverá ser conduzido (Allard, 1960).

De acordo com Allard (1960), diferentes variedades, dentro da mesma espécie, podem exibir grandes diferenças nas proporções de cruzamentos naturais; também a taxa de cruzamento para uma dada variedade pode ser muito influenciada por mudanças do ambiente. Ainda segundo Allard (1960), as generalizações acerca das taxas de cruzamento natural esperadas em espécies autógamas são válidas, somente, dentro de limites definidos, em termos de variedades específicas e em condições ambientais delimitadas, e, sem dúvida, é desejável que estudos para a determinação da taxa de cruzamentos naturais sejam conduzidos, tanto quanto possível, para cada tipo de ambiente e com tantos genótipos quantos sejam viáveis.

Existe pouco estudo sobre as taxas de autogamia e alogamia das espécies de *Psidium*, ou seja, a goiaba apresenta-se como alógoma com alta taxa de autogamia ou vice-versa.



A conservação do grão de pólen é um procedimento muito utilizado pelos melhoristas, visando utilizá-los em cruzamentos que não podem se realizar no momento da floração e, de acordo com Towil e Walters (1988), grãos de pólen armazenados podem ser utilizados em cruzamentos em programas de melhoramento, preservação de genes, estudos em fisiologia, bioquímica e fertilidade, estudos em biotecnologia, envolvendo a expressão de genes, transformação e fertilização *in vitro*.

O sucesso da produção comercial de goiaba depende, grandemente, da disponibilidade e viabilidade dos grãos de pólen. Entretanto, a conservação depende de vários fatores, inclusive os ambientes, daí a necessidade de se conhecer o período de conservação do araçá e da goiaba, visando auxiliar o programa de melhoramento.

No armazenamento de grãos de pólen, o principal propósito é manter a viabilidade e funcionalidade dos grãos de pólen em uma alta porcentagem. Grãos de pólen para conservação de germoplasmas devem manter-se viáveis por vários anos (Towil e Walters, 1988).

Grãos de pólen bicelulares têm, frequentemente, maior tolerância a períodos prolongados de armazenamento, enquanto que grãos de pólen tricolares perdem a viabilidade mais rapidamente, após a maturidade e, por isso, têm menor tolerância ao armazenamento (Knox, 1984). Frankel e Galun (1977) citam que as reservas dos grãos de pólen tricelular são reduzidas após a segunda divisão mitótica, afetando, assim, sua germinação e longevidade. Para tanto, essas mudanças no metabolismo associado à germinação e longevidade não são ainda bem entendidas.

Segundo Dafni (1992), a avaliação da viabilidade do grão de pólen é o primeiro passo no entendimento das chances que ele tem de germinar no estigma da flor, sendo este um estágio crucial rumo à fertilização.

A viabilidade do grão de pólen, que é um fator chave no sucesso da polinização, pode ser estimada por vários métodos: solução de lugol, método de reação de fluorocromática (*Fluorochromatic Reaction- FCR*), solução tripla de Alexander, corantes vitais como sal de tetrazólio, e as germinações *in vivo* e *in vitro*. O diacetato de fluoresceína penetra na célula por meio de esterases não-específicas para formar a fluorescência (Heslop-Harrison e Heslop-Harrison, 1970). Heslop-Harrison e Heslop-Harrison (1970) sugerem que a principal

propriedade testada, a partir da presença da esterase, é a integridade da membrana celular, em que esta enzima exibe uma correlação próxima à viabilidade da célula vegetativa do grão de pólen. O teste FRC apresenta alta correlação com o potencial de germinação, refletindo uma situação real *in vivo*.

A solução tripla de Alexander é um corante diferencial que confere uma boa distinção de coloração entre grãos de pólen viáveis e inviáveis; essa distinção depende da concentração de corantes, espessura da parede do grão de pólen e pH da solução. A solução de Alexander é composta por mistura de corantes com ação definida para coloração no grão de pólen; dessa forma, grãos de pólen inviáveis terão coloração verde, ocasionada pela atuação do corante verde malachita na parede do grão de pólen, e grãos de pólen viáveis terão coloração vermelha, devido à coloração por fucsina ácida no citoplasma. O corante *orange G* é responsável por melhorar a atuação dos corantes diferenciais, ou seja, tornar a distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis ainda visíveis (Alexander, 1969).

Segundo Cruden (1977), a relação pólen:óvulo (P:O) informa a probabilidade dos grãos de pólen atingirem o estigma, resultando em uma máxima produção de sementes; portanto, segundo o mesmo autor, a relação P:O reflete o sistema de reprodução das plantas. Existe uma diferença significativa entre as relações P:O de espécies que se desenvolvem em diferentes ambientes. A relação P:O é a melhor forma de predizer o sistema reprodutivo da planta, mais do que tamanho e morfologia floral (Cruden, 1977).

A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, como, por exemplo, a presença de exudado e a mudança de coloração no estigma; por testes para verificação de enzimas ativas, como a peroxidase e a esterase; e pela avaliação da germinação dos grãos de pólen, crescimento do tubo polínico e presença de sementes após polinização em diferentes horários do dia relativos à abertura da flor (Dafni, 1992).

Durante a história evolutiva, as espécies tiveram a maior parte do DNA organizada nos cromossomos, de maneira que fosse estabelecido um padrão típico, tanto no número, quanto na estrutura dos cromossomos que constituem o cariótipo das espécies. A maioria das espécies de plantas e dos animais superiores é de diplóides; portanto, apresentam dois conjuntos básicos de cromossomos (2n), sendo que um conjunto é proveniente do parental feminino e o

outro do parental masculino. Como os cromossomos armazenam a maior parte dos genes das espécies, os estudos citogenéticos levam à compreensão da sua morfologia, à organização, à função e à replicação (Guerra, 1988; Guerra e Souza, 2002).

Mesmo após o desenvolvimento de sofisticadas técnicas utilizadas para identificar seqüências de DNA, a cariotipagem continua tendo grande importância para o entendimento dos mecanismos de transmissão hereditária nos organismos. As informações fornecidas pela cariotipagem têm importância, até mesmo, para que sejam estabelecidas as estratégias de identificação das seqüências de DNA, onde se faz uso de modernos sequenciadores automatizados (Guerra, 1988; Guerra e Souza, 2002).

As partes morfológicas dos cromossomos são: cromátides, braços, centrômero, constrição secundária, telômero e satélite, sendo que constrição secundária e satélite só ocorrem em um ou em alguns cromossomos, dependendo da espécie. O conjunto de características cromossômicas de cada espécie, que constitui seu cariótipo, inclui o número e o tamanho dos cromossomos, a posição do centrômero nos mesmos, e, por meio destes últimos, pode-se estabelecer a relação de braços, o tamanho do complemento cromossômico total e outras características que permitem avaliar um cromossomo individualmente ou todo o conjunto (Guerra, 1988; Guerra e Souza, 2002).

A localização da região centromérica de um cromossomo, à qual se ligam as fibras do fuso mitótico, permite a sua classificação em um dos seguintes tipos: metacêntrico, os braços de comprimentos aproximadamente iguais (centrômero em posição intermediária); submetacêntrico, os braços de comprimentos um pouco desiguais (centrômero um pouco deslocado da posição mediana); acrocêntrico apresenta um braço longo e outro curto (centrômero próximo de uma extremidade) e o telocêntrico, um só braço (centrômero em uma extremidade) Viana et al. (2003).

Para a determinação citogenética dos cromossomos, é necessário o emprego de alguma técnica que permita visualizar essas estruturas. Dentre essas, destacam-se a coloração convencional, as técnicas de bandeamento cromossômico, como, por exemplo, bandeamento C, G e coloração com fluorocromos. Mais recentemente, o uso da técnica de FISH (hibridização *in situ* fluorescente) permitiu a identificação de seqüências gênicas diretamente nos

cromossomos. Constituindo-se, assim, em uma técnica útil nos programas de sequenciamento genômico (Guerra, 1988; Guerra e Souza, 2002).

No estudo citogenético de algumas espécies frutíferas no nordeste brasileiro, Éder-Silva et al. (2007) encontraram, na família Myrtaceae, *Psidium arboreum* (araçá-boi)  $2n=88$ , confirmando a tendência de poliploidia no gênero, porém *P. arboreum* é muito pouco utilizado como alimento pela população. O registro de  $2n=44$  em *Psidium acutangulum* DC., uma espécie do cerrado de São Paulo (Forni Martins e Martins, 2000), e, em *P. araça*, indica-se uma linhagem evolutiva no gênero *Psidium*, com base em  $x=11$ . *P. arboreum*, além de evolução por poliploidia, apresenta ganho aneuplóide de alguns pares cromossômicos, provavelmente resultantes de erros de disjunção meiótica. *Psidium araça* (araçá), com  $2n=44$ , apresentou cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos, medindo 0,8 a 2,1 $\mu$ m e um par de satélites longamente distendidos pela ocorrência de uma constrição secundária proximal. Essa contagem coincide, apenas, com duas outras contagens para o gênero (Atchison, 1947; Fedorov, 1969 e Éder-Silva et al. 2007) e diverge de *P. guajava*, com  $2n=22$  (Fedorov, 1969). O gênero é cariologicamente variável, com várias contagens com  $2n=22$ , 44 e 88 (Fedorov, 1969; Goldblatt, 1985), sugerindo a ocorrência de uma série poliplóide no gênero e um número básico  $x=11$ .

Vários são os genes que atuam durante a pré-meiose, meiose e pós-meiose; anormalidades ocorridas durante essas fases podem resultar no surgimento de grãos de pólen anormais ou inviáveis (Horner e Palmer, 1995). Grãos de pólen abortados podem ocorrer em função de aberrações estruturais. Segundo Singh (1993), translocações heterozigotas em espécies vegetais diplóides exibem, aproximadamente, 50% de grãos de pólen estéreis.

Segundo Souza et al (2000), o comportamento meiótico de uma planta reflete, diretamente, no seu grau de fertilidade e a ocorrência de falhas durante o processo com cromossomos retardatários ou desorganização dos fusos representam dificuldades na produção de híbridos, por ter, como consequência, a variação cromossômica em função da perda ou ganho de cromossomos nas novas gerações. Por isso, os estudos meióticos são de grande relevância, pois explicam fenômenos reprodutivos, mecanismos de hereditariedade e de variabilidade genética nas espécies. Afinal, a meiose se converte em uma das fontes de variabilidade genética utilizada pelos organismos para adaptação do

meio ambiente e assegura a perpetuação através da descendência (Muñoz et al., 2006).

O curso normal da meiose garante viabilidade do gameta; assim, a viabilidade do pólen se relaciona, diretamente, com a normalidade da microsporogênese (Muñoz et al., 2006). Muitas espécies de *Myrtaceae* têm grãos de pólen como recurso reprodutivo. Os grãos de pólen são estruturas ricas em carboidratos, proteínas, vitaminas e lipídios e, por essa razão, são importantes fontes alimentares para diversos visitantes florais (Silva, 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre as necessidades de polinização da família *Myrtaceae* e de possíveis perdas de produtividade devido à falta de polinização adequada das flores. Além disso, a viabilidade do grão de pólen diminui gradualmente com o tempo, o que reduz a eficiência na fertilização. Por isso, é de suma importância conhecer as características e o período de viabilidade do pólen das espécies em estudo, especialmente para utilizá-las em possíveis programas de hibridação.

Em diversas espécies, as análises citogenéticas têm sido usadas com sucesso na observação do comportamento floral de híbridos de mamoeiro (Damasceno Júnior et al., 2008): na provável identificação de mutante da autocompatibilidade do maracujá amarelo (Souza et al., 2010); no número de cromossomos, polissomatia e meiose em *Mimosa bimucronata* (DC.) (Olkashi e Schifino-Wittmann 2011), entre outros trabalhos.

### 2.3 Características das Cultivares

As principais cultivares comerciais no Brasil são: Paluma, Rica, Pedro Sato, Kumagai, Sassaoka, Ogawa, Yamamoto e Século XXI citadas por Pereira e Nachtigal (2002) e Pommer e Murakami (2006).

Paluma é a cultivar mais plantada, atualmente, no país. É utilizada tanto para indústria como para consumo *in natura*. Foi obtida através da polinização aberta de Rubi-Supreme, em programa de melhoramento genético realizado na UNESP/FCAV de Jaboticabal, SP. As plantas são altamente produtivas (mais de 50 t.ha<sup>-1</sup>), vigorosas, de crescimento lateral e com boa tolerância à ferrugem da goiabeira. Os frutos são grandes (acima de duzentos gramas, mesmo em plantas não desbastadas), piriformes, com pescoço curto; nos frutos maduros, a casca é

lisa e amarelada; a polpa é de cor vermelha intensa, firme e espessa; o sabor é agradável graças ao elevado teor de açúcares e à acidez equilibrada; as sementes apresentam-se em pequeno número.

Rica é a cultivar muito indicada para a indústria, também é resultado da polinização aberta da Supreme, no programa de melhoramento genético realizado na UNESP/FCAV de Jaboticabal, SP. As plantas são vigorosas e muito produtivas (50 t.ha<sup>-1</sup>). Os frutos são ovalados a levemente piriformes, com pescoço curto, de tamanho médio (entre cem e duzentos e cinquenta gramas); a casca é verde-amarelada e levemente rugosa; a polpa é vermelha, espessa e firme; o sabor é muito agradável, devido ao °Brix e à baixa acidez; as sementes são poucas e pequenas.

Pedro Sato é a cultivar de mesa de casca rugosa mais difundida no Estado de São Paulo. É a cultivar selecionada a partir de pés-francos, provavelmente originários de Ogawa N°1 vermelha, no Rio de Janeiro. As plantas são vigorosas, de crescimento vertical e razoavelmente produtivo. Os frutos são levemente ovalados, de boa aparência, de tamanho variável entre cento e cinquenta a duzentos e oitenta gramas, podendo atingir tamanho superior a quatrocentos gramas quando desbastados; a casca é bem rugosa; a polpa rosada, espessa, firme e com cavidade central cheia; o sabor é agradável; apresenta poucas sementes.

Sassaoka originário de uma planta de pé-franco de uma goiaba comum vermelha, no município de Valinhos, SP. As plantas apresentam bom vigor, são produtivas e de crescimento vertical. Os frutos são grandes (superior a trezentos gramas quando desbastados), arredondados e com a casca bem rugosa; a polpa é rosado-clara, espessa, firme e com poucas sementes; o sabor é leve.

Kumagai é de origem incerta, possivelmente resultante de seleção realizada no bairro Pedra Branca, município de Campinas. Foi a cultivar mais plantada para mesa no Estado de São Paulo, durante a década de 80. A planta apresenta vigor médio, com ramos longos e esparramados, e é muito produtiva. Os frutos são grandes (trezentos a quatrocentos gramas), arredondados a oblongos; possuem a casca lisa, resistente e verde-amareladas quando maduros; a polpa é branca ou vermelha, de boa espessura, firme, saborosa, levemente ácida e com a cavidade cheia; apresentam poucas sementes. Sua boa

conservação pós-colheita permite a comercialização à longa distância, podendo ser exportada.

Ogawa é a cultivar que apresenta várias origens e variações na morfologia da planta e fruto. As plantas são grandes (trezentos a quatrocentos gramas), podendo atingir setecentos gramas quando raleados, e com formato oblongo; a casca é levemente rugosa; a polpa é branca ou vermelha, espessa, firme e com cavidade cheia; o sabor é adocicado, apresenta poucas sementes.

Século XXI é a cultivar que se desenvolveu no programa de melhoramento genético da goiabeira da UNESP/FCAV, *Campus* de Jaboticabal, cujas principais características são: planta muito produtiva com ciclo precoce (130 dias da floração à colheita), frutos grandes, com polpa espessa, róseo-avermelhada, ótimo sabor e com poucas e pequenas sementes (Pereira et al., 2003).

#### 2.4 Aspecto do Melhoramento Genético da Goiabeira

Os objetivos do melhoramento genético vegetal são: adaptação a diferentes condições ambientais de acordo com as condições edafoclimáticas; aumento da produtividade; produção em várias épocas, estendendo, assim, o período de oferta; resistência a pragas, doenças e problemas fisiológicos; tamanho, coloração e formato do fruto; ausência de sementes; melhores características para industrialização; resistência ao transporte e ao manuseio; melhorias no paladar e no valor nutritivo; e redução do porte da planta.

Quando o objetivo é o melhoramento do fruto, os aspectos mais importantes, segundo Pereira e Nachtigal (2002), são: acidez total titulável de 1,5 a 2,0%. Frutos mais ácidos permitem melhor conservação e controle de qualidade dos produtos industrializados; polpa de cor rosa-escura. A cor do produto final é importante para aceitação pelos consumidores; sabor e aroma característicos da goiaba fresca; teor de sólidos solúveis totais de 10 a 12 °Brix; frutos com tamanho médio de 198 a 340 g; frutos com poucas sementes e com a cavidade da polpa bem cheia, com elevado aproveitamento para purê (80% de aproveitamento é considerado bom); conteúdo de vitamina C de 300 mg.100g<sup>-1</sup> de peso fresco; mínimo de células petrificadas, embora estas possam ser eliminadas por filtração.

Os objetivos para as plantas de goiabeira, segundo Pereira e Nachtigal (2002), são: plantas de crescimento baixo e aberto; plantas resistentes a pragas e doenças; plantas com altas produções ( $227 \text{ kg.planta}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$  ou mais).

Os métodos aplicáveis às espécies frutíferas de melhoramento genético são mutação, poliplodia, hibridação e seleção. Segundo Pereira e Nachtigal (2002), na goiabeira, os métodos de melhoramento aplicados à cultura são, basicamente, seleção e hibridização. Para se alcançar o sucesso em um programa de melhoramento de plantas, há necessidade de se dispor de informações básicas relativas à herança dos principais caracteres agrônômicos que se pretende melhorar, bem como a divergência genética disponível para o melhoramento (Pereira, 2003).

Atualmente, no Brasil, há poucos programas de melhoramento genético para a cultura da goiabeira. A cultivar lançada recentemente foi a Século XXI pelo programa de melhoramento da UNESP (Pereira et al., 2003). Os trabalhos de melhoramento, no Brasil e no mundo, são, basicamente, com os objetivos do melhoramento do fruto (consumo *in natura* e indústria) com o lançamento de variedades superiores.

## 2.5 Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal

Para Milach (1998), os marcadores são características de DNA (ácido desoxirribonucléico), que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Já Ferreira e Grattapaglia (1998) definem como marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como, por exemplo, as isoenzimas, ou de um segmento de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma).

Diversas técnicas de marcadores moleculares estão disponíveis, atualmente, para detecção de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcas moleculares, cobrindo, praticamente, todo o genoma da espécie em estudo (Gonçalves, 2007).

Os estudos com marcadores moleculares trazem contribuições significativas para a compreensão da diversidade genética (Spooner et al., 2005). O benefício principal de usar marcadores moleculares é que estes são bons



indicadores da distância genética entre acessos por causa da sua neutralidade seletiva. Assim, os marcadores moleculares são usados para identificar evolução das espécies como, por exemplo, em milho (Matsuoka et al., 2002), feijão comum (Gepts, 1988) e trigo (Heun et al., 1997). Os marcadores moleculares, também, são usados para identificar raças ecogeográficas dentro dos complexos gênicos domésticos ou silvestres das espécies cultivadas (Liviero et al.; 2002; Yu et al., 2003). Além disso, os marcadores moleculares estão sendo usados para auxiliar o curador nas atividades de manutenção, caracterização e avaliação de germoplasma (Rao e Riley, 1994).

A perspectiva de uso de marcadores genéticos em larga escala surgiu no cenário científico, nas décadas de 60 e 70, com o desenvolvimento de marcadores tais como isoenzimas, proteínas totais e proteínas específicas, que são, de certa forma, indicadores diretos da variação existente dentro do DNA. Com o surgimento das novas técnicas moleculares, aumentaram os diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). As novas técnicas podem ser separadas em duas grandes categorias: a) métodos baseados em análise de restrição; b) métodos baseados na amplificação do DNA.

Na primeira categoria, inclui-se a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA ("*Restriction Fragment Length Polymorphism*"-RFLP). Essa técnica requer grandes quantidades de DNA, e as análises são, em geral, demoradas e trabalhosas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A outra categoria de análises utiliza a reação de polimerização em cadeia (PCR) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987). Essa categoria revolucionou os métodos tradicionais de obtenção de marcadores moleculares em níveis de DNA. Essa técnica consiste na amplificação, *in vitro*, de fragmentos de DNA, utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores, que são complementares às extremidades do segmento a ser amplificado. Cada reação envolve três etapas: denaturação do DNA molde através de aquecimento; hibridização dos iniciadores no DNA molde; e síntese do DNA pela ação da DNA polimerase. Esse ciclo é repetido várias vezes, havendo amplificação do DNA alvo em progressão geométrica (Saiki et al. 1985; Mullis e Faloona 1987). Exemplos dessas técnicas são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o SSR (microsatélite ou *Simple Sequence Repeat*), e o AFLP.

O grande impulso na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu na década de 90 ao serem utilizados iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a região de amplificação, eliminando, assim, a necessidade do conhecimento prévio da sequência a ser amplificada. A técnica RAPD originou uma grande expansão da análise de polimorfismo molecular ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os idealizadores da técnica batizaram-na com o nome de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990), que é a denominação mais utilizada, e AP-PCR (*Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction*) (Welsh e McClelland, 1990; Caixeta et al., 2006).

Segundo Caixeta et al. (2006), as vantagens dos marcadores RAPD são simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo baixo comparado com outras técnicas moleculares e aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. Requerem pequenas quantidades de DNA comparados com outras técnicas e não utilizam marcação radioativa, podem ser utilizados para a identificação rápida e eficiente de muitos polimorfismos e, como tais, apresentam enorme potencial na identificação de cultivares.

Contudo, os marcadores moleculares RAPD, ainda, são criticados pela baixa reprodutibilidade entre os laboratórios e, até mesmo, dentro do mesmo laboratório (Freid e Bered, 2003). Sendo assim, a técnica requer certa experiência do pesquisador com procedimentos moleculares, como, por exemplo, cuidados no preparo de soluções estoques e componentes da reação, na manipulação de termocicladores (Caixeta et al., 2006). Portanto, em virtude da técnica de RAPD ser sensível a pequenas modificações na concentração dos componentes de reação e na programação do termociclador, é recomendável a otimização cuidadosa das condições experimentais para que os resultados sejam mais confiáveis e reproduzíveis (Caixeta et al., 2006).

Padilha-Ramírez et al. (2002) utilizaram RAPD na análise da variabilidade genética em goiaba (*Psidium guajava* L.), no México; portanto, os marcadores RAPD permitiram detectar uma grande similaridade genotípica e fenotípica dos acessos estudados. Os resultados obtidos a partir de marcadores de DNA podem auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas nos programas de melhoramento da goiabeira, no México. Gomes Filho et al. (2010),

também, utilizaram RAPD para avaliar a diversidade genética de acessos de goiabeira no Noroeste Fluminense; nesse trabalho, os autores concluíram que a população de goiabeira estudada apresenta ampla variabilidade genética. Em outras espécies frutíferas, os marcadores RAPD, também, têm sido usados com sucesso na detecção de diversidade como na pera (Sawazoki et al., 2002), no pêssogo (Zimback et al., 2003), na uva (Karatas e Agoaglu, 2010), etc.

Os marcadores moleculares codominantes, oriundos de sequências simples repetidas (*SSR-simple sequence repeats*), conhecidas como microssatélites, constituem-se em pequenas sequencias com um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*. Em genomas eucariotos, essas seqüências são mais comuns, melhor distribuídas ao acaso e formam *locos* mais polimórficos (Wang et al., 1994).

Regiões contendo microssatélites são amplamente individualizadas através do PCR, utilizando-se um par de iniciadores específicos com 20 a 30 nucleotídeos complementar às seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado possui tamanho distinto, composto por várias dezenas até algumas centenas de pares de nucleotídeos, representando, assim, um alelo diferente em cada *loco*.

Vários *primers* já foram desenvolvidos para amplificar segmentos de DNA específico e direcionados a variados tipos de estudo genéticos. Geralmente, em cada reação de PCR, um par de *primers* é utilizado e representado em, apenas, um *loco* de microssatélite. Entretanto, quando se utilizam vários pares de *primers* em uma mesma reação de PCR, denominamos a técnica de *multiplex*.

Os SSRs são uma alternativa promissora de marcadores, por se tratar de uma técnica relativamente simples, com resolução adequada em matriz de agarose, necessidade de pequena quantidade de DNA para análise e por não exigir conhecimento aprofundado de biologia molecular por parte do analista, nem instalações sofisticadas de laboratório (Oliveira et al., 2006). Uma limitação relevante para a aplicação desse tipo de marcador é a necessidade de conhecimento prévio das sequências genômicas para o desenvolvimento de iniciadores. No entanto, essa limitação vem diminuindo na cultura da goiabeira devido ao grande esforço que tem sido direcionado ao sequenciamento genômico e ao desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para a espécie (Risterucci et al., 2005).

Nos programas de melhoramento da goiabeira, os marcadores moleculares microssatélite vêm sendo empregados com diferentes propósitos. Eles têm sido utilizados para avaliação de diversidade genética (Valdés-Infante et al. 2010), construção de mapas genéticos de ligação (Rodríguez et al. 2007; Lepetre et al. 2010; Ritter et al. 2010), caracterização de germoplasma (Valdés-Infante et al. 2007), entre outros. Em outras espécies frutíferas, os marcadores SSR têm sido usados, com sucesso, na diversidade genética de cereja (Ercisli et al., 2011), na caracterização de retocruzamentos de mamão (Ramos et al., 2011), na caracterização de cultivares de banana (Jesus et al., 2009), entre outros.

## 2.6 Diversidade Genética

A diversidade genética expressa a diferença entre as frequências alélicas às populações (Falconer, 1987). Pode, também, ser definido como a distância entre as populações, indivíduos ou organismo, com base em uma série de características de aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999).

A maioria das espécies exploradas agronomicamente teve sua diversidade reduzida em consequência da domesticação e dos processos de seleção e melhoramento de plantas. A diversidade genética é considerada mais baixa em cultivares modernas de espécies autógamas devido ao seu sistema de fecundação e também da sua domesticação fora do centro de origem, onde um número limitado de sementes (ou acessos) foi levado pelos exploradores e serviram como a base genética das cultivares modernas de hoje (Saavedra e Spoor, 2002).

Além disso, muitos genótipos foram perdidos pela substituição por novas cultivares ocasionando, muitas vezes, o desaparecimento de variedades locais. Em geral, essas novas cultivares apresentam base genética muito estreita, isto é, são muito aparentadas entre si, e a predominância de um restrito número de genótipos ocupando grandes áreas de plantio tem sido considerada um risco para a agricultura, podendo ocasionar uma erosão genética (Borém e Miranda, 2005). Uma excessiva dependência dessas novas variedades, contudo, poderá causar vários problemas ambientais se o clima mudar, se ocorrer escassez de energia e

de substâncias químicas necessárias para a manutenção dessas variedades, ou se novas doenças e pragas forem infectar uma variedade vulnerável (Odum, 1988).

O banco de germoplasma é de fundamental importância para a manutenção da diversidade genética. As espécies silvestres, as variedades locais e as obsoletas fornecem genes que conferem adaptação a estresses ambientais, além de possuírem genes que conferem resistência a inúmeras doenças e pragas (Freitas e Bered, 2003). A busca de resistência ou tolerância genética aos estresses bióticos e abióticos pode diminuir o uso dos muitos produtos de contaminação e de poluição usados na agricultura moderna (Gepts, 2006).

Segundo Tanksley e McCouth (1997), o banco de germoplasma não pode ser visto como fonte de genótipos, mas sim como fonte de genes, uma vez que grande parte dos genes de interesse agrônômico já se encontra nas cultivares modernas. Entretanto, genes relacionados a características como resistência a pragas e doenças, adaptação e estresses abióticos e características nutricionais podem estar contidos em coleções de germoplasma.

Em programas de melhoramento, a importância do conhecimento da diversidade genética está no fato de que cruzamentos que envolvam genitores geneticamente divergentes são os mais eficientes em produzir híbridos com maior efeito heterótico na progênie e maior variabilidade genética nas gerações segregantes (Falconer, 1987).

Essa diversidade pode ser avaliada a partir de uma série de marcadores que podem ser morfológicos, fisiológicos, citológicos, protéicos, bioquímicos e moleculares (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999). As informações múltiplas de cada acesso ou cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade em relação ao conjunto de acessos (Cruz e Carneiro, 2003).

Diversos coeficientes de dissimilaridade têm sido propostos para expressar a distância entre genótipos (Cruz e Regazzi, 2001). Alguns desses coeficientes baseiam-se nas frequências alélicas estimadas, enquanto outros utilizam variáveis binárias, sendo ausência (0) ou presença (1) da marca. As distâncias genéticas são determinadas pelos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade e são apresentados na forma de matriz de dissimilaridade.

O procedimento de avaliação da diversidade genética entre acessos, a partir de dados binários, permite que sejam utilizados diversos coeficientes de similaridade, entre eles os mais utilizados são os coeficientes de coincidência simples, Jaccard e Nei e Li e (Cruz e Carneiro, 2003). O quadrado da distância euclidiana média, embora idêntico ao coeficiente, apresenta a desvantagem de considerar o fator de similaridade de coincidência do tipo (0-0) categoria ausente nos dois indivíduos. Em contrapartida, nos índices de Jaccard, Nei e Li, é excluído este tipo de coincidência e considerada, apenas, a coincidência do tipo (1-1), presença da categoria em ambos os indivíduos.

O coeficiente de Nei e Li é utilizado quando se trabalha com acessos exóticos ou espécies diferentes, enquanto o coeficiente de Jaccard é indicado para estudo dentro de uma população ou mesma espécie (Cruz e Carneiro, 2003).

Quando o número de genótipos é relativamente alto, torna-se praticamente inviável o reconhecimento dos grupos que apresentam semelhanças a partir da matriz de dissimilaridade. Contudo, com o uso de técnicas de agrupamento, podem-se classificar os genótipos em vários grupos de forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos, seguindo o critério de similaridade ou de dissimilaridade (Cruz e Carneiro, 2003).

Segundo Cruz e Regazzi (2001), existem vários métodos de agrupamento, porém, no melhoramento, os mais usuais são classificados em dois tipos: método hierárquico, que tem como objetivo agrupar os genótipos por um processo que se repete em vários níveis até que se estabeleça um dendrograma; e métodos de otimização, em que os genótipos são incluídos no mesmo grupo com o objetivo de estabelecer máxima ou mínima participação que otimize alguma medida predefinida.

O método hierárquico das medidas da dissimilaridade ponderada (UPGMA) é o mais utilizado em diversidade, tendo vantagem sobre os demais métodos por considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os genótipos (Cruz e Carneiro, 2003).

Entre os vários métodos de agrupamento de otimização, o mais utilizado no melhoramento genético é o método de Tocher (Rao, 1952). Esse método consiste, a partir da obtenção da matriz de dissimilaridade, na identificação do par

dos indivíduos mais similares, em que esses indivíduos formarão o grupo inicial. Posteriormente, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade, dentro de cada grupo, deve ser menor que a distância média de quaisquer grupos (Cruz e Carneiro, 2003). Esse método tem como vantagem principal a fácil interpretação dos grupos formados.

Em diversas espécies frutíferas, as análises de diversidade genética têm sido usadas com sucesso, como o caso do maracujá doce (Bellon et al., 2009), no cajazeiro (Silva et al., 2009), na acerola (Oliveira et al. 2009), dentro outros.

### 3. TRABALHOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Psidium* spp. VIA MARCADORES RAPD<sup>1</sup>

##### 3.1.1 RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética entre 20 acessos de *Psidium* spp. (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF1830 a UENF 1849) por marcadores RAPD. Vinte e oito iniciadores foram utilizados, gerando um total de 157 bandas. Os marcadores moleculares RAPD foram capazes de revelar a existência de diversidade entre os 20 acessos de *Psidium*. Para a interpretação dos dados, o índice de Nei e Li foi utilizado com base na análise do agrupamento hierárquico UPGMA e o método de otimização Tocher; essa diversidade pôde ser observada pela presença de acessos similares e divergentes

Temos para indexação: dissimilaridade, marcador molecular, análise multivariada

<sup>1</sup>Trabalho publicado na Revista Brasileira de Fruticultura 2011 (33: 129-136) com modificações sugeridas pelos membros da banca



### 3.1.2 ABSTRACT

The objective of the present work was to analyze the genetic diversity among 20 guava access (Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF1830 a UENF 1849) through the use of RAPD molecular markers. Twenty-eight primers were used, generating a total of 200 bands. The RAPD molecular markers were able to accurately reveal the existence of diversity among the 20 guava accessions. For data analysis, the Nei and Li index was used. Based on hierarchical clustering analysis UPGMA and Tocher Method, the dissimilarity could be observed by the presence of similar and dissimilar access.

Index Terms: dissimilarity, molecular marker, multivariate analysis

### 3.1.3 INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma entre muitas espécies cultivadas que tem alta diversidade genética. Primeiro, devido à fecundação cruzada preferencialmente da espécie, segundo Alves & Freitas (2007) e, além disso, pela utilização de sementes originárias de genitores heterozigotos na produção de mudas, a qual leva a uma ampla diversidade genética. Dentro do gênero *Psidium*, há o araçá (*Psidium guineense* SW), uma planta silvestre encontrada no Norte Fluminense que tem mostrado resistência ao nematóide *Meloidogyne enterolobii*.

O estudo da divergência genética entre acessos fornece informações de potenciais genitores a serem utilizados em programa de melhoramento genético vegetal. A forma preditiva de determinar a diversidade genética apresenta, como principal vantagem, o fato de não ser necessária a obtenção prévia de combinações híbridas, como ocorre em dialelos (Coimbra et al., 2001).

O conhecimento do grau de variabilidade genética, por meio dos estudos de divergência, torna-se vantajoso no processo de identificação de genes de interesse (Mohammadi & Prasanna, 2003). Outra vantagem é o fato de que, por

meio da diversidade genética, podem-se indicar genitores geneticamente distantes para cruzamentos nos quais procure obter o efeito heterótico na geração híbrida e maior probabilidade de recuperação de segregantes superiores em gerações avançadas (Hallauer & Miranda Filho, 1981, Mohammad & Prasanna, 2003 e Cruz et al., 2004).

Para estudos de diversidade genética, a análise por agrupamento, enquanto método preditivo da heterose, tem sido empregada tanto para características expressas por variáveis quantitativas quanto qualitativas (Gower, 1971; Franco et al., 1998; Gonçalves et al., 2008; Gonçalves et al., 2009). Dentre os métodos de agrupamento, UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) tem tido maior utilização em estudos envolvendo recursos genéticos (Mohammad & Prasanna, 2003).

A tecnologia de marcadores moleculares pode contribuir, significativamente, para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, além da geração e desenvolvimento de produtos melhorados (Ferreira & Grattapaglia, 1998, Borém & Caixeta, 2009). Nesse caso específico, são obtidos dados binários, cujo complemento aritmético da medida de similaridade Jaccard tem maior aceitação pela comunidade científica para acessos pertencentes à mesma espécie (Mingoti, 2007; Sudré et al., 2006).

Welsh e McClelland (1990) e Williams et al. (1990) introduziram uma técnica que se baseia na detecção de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD *Randon Amplified Polymorphic DNA*), usando oligonucleotídeos de dez bases. As análises de RAPD estão baseadas no fato de que cada iniciador dirige a síntese de vários segmentos de DNA, simultaneamente, em diversos pontos no genoma, resultando, assim, em várias bandas com pesos moleculares diferentes, a depender do tamanho do segmento do DNA amplificado. Essa técnica tem se mostrado eficiente na identificação da variabilidade genética em diversos grupos de plantas e pode ser usada como uma ferramenta auxiliar em programas de melhoramento.

Padilha-Ramírez et al. (2002) empregaram os marcadores tipo RAPD para diferenciação molecular de acessos de *Psidium guajava* L.. Os marcadores permitiram constatar baixa variabilidade genotípica dos acessos pertencentes ao banco de germoplasma do México.

O objetivo desse trabalho foi o estudo da diversidade genética entre vinte acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD.

### 3.1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais genéticos foram coletados nos municípios de São João da Barra-RJ e Bom Jesus do Itabapoana-RJ (Tabela 1).

Cinco folhas jovens de cada acesso foram colhidas em amostras compostas, compreendendo 01 planta/acesso. As cinco folhas correspondentes a cada acesso foram rapidamente reunidas, enroladas em papel alumínio, identificadas e mergulhadas em gelo seco para que não ocorresse a degradação do DNA. Uma vez no laboratório, esse material foi acondicionado em ultrafreezer a uma temperatura de -86 °C. Posteriormente, essas folhas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e acondicionadas em tubos de 15 ml com tampa, devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer.

Cerca de 300 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de 2,0 ml e imersos em N<sub>2</sub> líquido para a extração de DNA de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1999), com as modificações descritas a seguir.

Foi adicionado a cada tubo 1 ml do tampão de extração pré-aquecido, contendo 2% CTAB, 104 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 20 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCL (pH 8,0), 1% PVP e 2% β- mercaptoetanol. Esse material foi incubado a 65 °C por 45 min e agitado, suavemente, a cada 10 min. Em seguida, foi centrifugado a 13200 rpm durante 5 min. O sobrenadante (cerca de 800 µl) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado ao qual foi adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isomílico (24:1) por 10 min aproximadamente até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 13200 rpm, por cinco min.

O sobrenadante foi recolhido e desproteíndizado mais uma vez com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo os ácidos nucleicos precipitados pela diluição de dois terços do volume de isopropanol gelado e incubados por 2 h a -20 °C. O precipitado foi sedimentado por centrifugação a 13200 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 300 µl etanol a 70%, para retirada de sal presente e uma vez com 300 µl etanol a 95%

(entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 13200 rpm durante 10 min). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais; posteriormente, o material foi ressuscitado em 300 µl de solução TE (Tris-EDTA-10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCL, 1 mmol L<sup>-1</sup>EDTA, pH 8,0) com RNase numa concentração final de 40 µg.ml<sup>-1</sup> e incubado em banho-maria a 37 °C por 30 min. Em seguida, adicionaram-se 30 µl de NaCl 5 mol L<sup>-1</sup> e 220 µl de isopropanol gelado para precipitar o DNA novamente, incubando-se os tubos, por 2 h, a -20 °C. Logo após, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 13200 rpm, por 10 min, e lavado duas vezes com etanol a 70% e uma vez com etanol a 95%. Após seco, o precipitado final foi suspenso em 150 µl de água ultrapura (milli q).

A quantificação foi realizada em géis de agarose 0,8% (p/v) submetidos à eletroforese. Alíquotas de DNA de cada amostra foram aplicadas nos poços do gel, com um marcador com concentração conhecida (λ). A concentração das amostras foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas do DNA (λ). Os géis foram visualizados no equipamento *Eagle Eye II* (*Stratagene*), após a coloração com 10 µl de brometo de etídeo (10 mg ml<sup>-1</sup>), diluídos em 100 ml de tampão TEB 1X. Posteriormente, o DNA foi diluído (10 mg µL<sup>-1</sup>) para as reações de RAPD.

Após a quantificação do DNA, as reações de amplificação foram feitas em termociclador modelo *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*), num volume de 20 µl contendo: 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris HCL, pH 8,3; 50 mmol L<sup>-1</sup> KCl; 2,4 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 100 µM dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,4 µM de iniciadores; 20 ng de DNA genômico e 0,75 unidade de Taq DNA polimerase. Foram utilizados microtubos nos quais foram adicionados todos os demais reagentes nas concentrações mencionadas, cada mix com um iniciador diferente. Dessa solução, foram retirados 18 µl e adicionados aos microtubos, totalizando os 20 µl da reação.

As reações foram submetidas a 45 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 95 °C, por 4 min. Cada ciclo se constitui de 1 min a 94 °C, 1 min a 36 °C e 2 min a 72 °C. Ao final de 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (100 V por 90 min) em géis de agarose 1,4% (p/v), utilizando o tampão de corrida TAB 1X. Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV (*Eagle Eye II – Stratagene*).

Foi realizada, previamente, uma triagem de iniciadores, utilizando-se cinquenta e um, tendo, como critérios de escolha, em ordem decrescente de prioridade, um grande número de bandas totais e polimórficas. Assim, selecionaram-se, como polimórficos, os iniciadores da Operon Technologies, Inc. OPA3, OPA5, OPA6, OPA8, OPA9, OPA10, OPA12, OPA15, OPA18, OPA19, OPA20, OPAB3, OPAB4, OPAB8, OPAC4, OPAC6, OPAC7, OPAW2, OPAW7, OPAW9, OPAW10, OPAW20, OPD2, OPD12, OPD13, OPS7, OPV6 e OPV12.

Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas mais evidentes e consistentes nos 20 indivíduos avaliados. Foi elaborada uma matriz de dados binários, em que o número 1 corresponde à presença da banda, o zero, à ausência da banda e, quando não era possível determinar se a banda estava presente ou não em função da não amplificação de um acesso para aquele iniciador, foi computado como 2.

Na interpretação das análises moleculares, foi utilizado o complemento aritmético do índice Nei e Li (Cruz & Carneiro, 2003). Posteriormente, foi adotado o método hierárquico UPGMA para o agrupamento. No procedimento analítico, partindo-se da matriz de distância genética, procedeu-se a sucessivas identificações dos genótipos mais próximos, a partir do par mais semelhante, até que se estabeleceu o dendrograma. E o método de otimização Tocher com a formação de grupos.

Os dados foram analisados pelo Programa Genes (Cruz, 2006), dendrograma obtido pelo método UPGMA, gerado com auxílio do Programa Mega 4 (Kumar et al., 2008), as correlações cofenéticas (Sokal & Rohlf, 1962) pelo Programa R (Reis & Ribeiro Junior, 2007) e o Pseudo  $t^2$  e Pseudo  $F_2$  conforme preconizado por Duda & Hart (1973) e Calinski & Harabasz (1974) pelo Programa SAS (Mingoti, 2007).

### 3.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada iniciador produziu bandas de intensidade variável, facilmente detectadas e bandas inespecíficas que foram descartadas. Os 28 iniciadores produziram 200 bandas. Destas, 155 foram polimórficas, ou seja, em média, cada

iniciador gerou, aproximadamente, 5 bandas polimórficas. O número total de bandas polimórficas por iniciadores variou de 1 a 7, sendo o iniciador OPA3 o mais polimórfico, gerando 7 bandas.

Para Gomes Filho et al. (2010), os iniciadores OPA 03, OPA 05, OPA 10, OPA 12 e OPC 19 são indicados para estudos de diversidade em goiabeiras, utilizando-se o marcador do tipo RAPD, pois apresentaram mais polimorfismo.

Detectou-se divergência genética entre acessos de goiabeira com base na técnica do RAPD, semelhança obtida por Padilha-Ramírez et al. (2002) com goiaba no México. Utilizando o índice de Nei e Li, identificaram-se, como mais distantes, os acessos UENF1835 e UENF1841, enquanto os acessos UENF1835 e UENF1847 foram os mais similares (Figura 1).

Padilha-Ramírez et al. (2002), utilizando-se de marcadores RAPD, observaram reduzida variabilidade genotípica dos acessos, ou seja, os acessos pertencentes ao banco de germoplasma do México apresentaram 60% de bandas polimórficas de polimorfismo, enquanto, no presente trabalho, o polimorfismo foi de 97,5%.

O ponto de corte do dendrograma obtido pelo programa SAS, através do Pseudo F e Pseudo  $t^2$ , possibilitou a formação de dois grupos (Figura1). O grupo I foi constituído pelo maior número de acessos, totalizando 14 acessos, ou seja, 70% do total. Este foi o grupo que apresentou maior número de bandas polimórficas, evidenciando uma maior variabilidade genética em relação ao outro grupo. Embora formados, exclusivamente, a partir dos perfis moleculares, os dois grupos apresentaram algumas características peculiares.

No método de agrupamento hierárquico UPGMA, o grupo I reuniu os acessos UENF1830, UENF1831, UENF1832, UENF1833, UENF1834, UENF1835, UENF1836, UENF1837, UENF1838, UENF1843, UENF1844, UENF1846, UENF1847 e UENF1849, pertencentes à espécie *Psidium guajava* L., provenientes do município de Bom Jesus do Itabapoana, RJ. Devido ao grande número de acessos no grupo I, formaram-se subgrupos. O subgrupo I.I reuniu os acessos UENF 1835, UENF 1847, UENF 1836, UENF 1834 e UENF1832; o subgrupo I.II reuniu os acessos UENF 1833, UENF1837 e UENF 1846; o subgrupo I.III reuniu os acessos UENF 1838 e UENF 1849; o subgrupo I.IV reuniu os acessos UENF 1843 e UENF 1844 e, por fim, o subgrupo I.V reuniu os acessos UENF 1831 e UENF 1830.

As características dos acessos do subgrupo I.I são plantas com folhas finas e rugosas e frutos de polpa vermelha e amadurecimento uniforme. Os acessos do subgrupo I.II apresentam plantas de ciclo tardio e frutos de polpa vermelha, o subgrupo I.III são frutos de penca unitária e polpa vermelha e roxa, o subgrupo I.IV são frutos de polpa vermelha, grandes, periformes e a planta de crescimento horizontal e o subgrupo I.V apresenta plantas de ciclo precoce e frutos de polpa vermelha. O alto grau de diversidade genética dos acessos encontrada no grupo I deve-se ao sistema reprodutivo da espécie *Psidium guajava* L., pois, segundo Alves & Freitas (2007), a forma mais frequente de polinização em goiaba é a fecundação cruzada, ou seja, a goiaba possui maior taxa de fecundação cruzada quando comparada à autofecundação. Além disso, a utilização de sementes originárias de genitores heterozigotos na produção de mudas leva a uma ampla diversidade genética devido à população  $F_1$  estar se comportando como  $F_2$  (população segregante).

O grupo II reuniu os acessos UENF1839, UENF1840, UENF1841, UENF1842, UENF1845 e UENF1848, pertencentes à espécie *Psidium guineense* SW, e o acesso UENF1845, que deveria enquadrar-se melhor no grupo I. Segundo Costa & Forni-Martins (2007), diversos *Psidium* neotropicais têm sua origem na hibridização do *P. guajava* L. e *P. guineense* Sw.. O acesso UENF1845 pode apresentar uma similaridade genética maior ao *P. guineense* SW entre os demais acessos de *P. guajava* L. O acesso UENF1848 apresenta resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne enterolobii* e os acessos UENF1839, UENF1840, UENF1841 e UENF1842 são plantas procedentes do acesso UENF 1848 via semente. Esse baixo grau de diversidade do grupo II pode estar relacionado com barreiras pré e pós-zigóticas; portanto, necessita-se de mais estudos sobre o sistema reprodutivo da família Myrtaceae, principalmente das espécies silvestres para possibilitar a introgressão de genes de interesse.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) (Sokal & Rohlf, 1962) obtido no UPGMA foi o máximo (0,92) em relação aos métodos hierárquicos de Ward (0,82) e vizinho mais próximo (SL) (0,90). Gonçalves et al. (2008), trabalhando com quarenta acessos de tomates no banco de germoplasma da UENF, obtiveram CCC maiores no método de agrupamento UPGMA em relação aos métodos de agrupamento SL e Ward. Segundo Mohammad & Prasanna (2003), quanto maior CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os acessos.

Portanto, o método hierárquico UPGMA foi o que melhor explicou a diversidade genética entre os acessos de goiaba e araçá, porque apresentou maior CCC dentro dos métodos hierárquicos.

O método de otimização de Tocher possibilitou a formação de seis grupos (Tabela 3). Comparando-se o resultado obtido pelo método hierárquico UPGMA com o Tocher, não se observou concordância entre os números de grupos; sendo assim, o número de acessos, a cada método, foi discordante.

No método de otimização Tocher, o grupo I foi constituído pelo maior grupo de acessos, totalizando doze acessos, ou seja, 60% do total (Tabela 1); o grupo II por quatro acessos provenientes da planta UENF 1848; os demais grupos apresentaram, apenas, um acesso (Tabela 3). Para Vieira et al. (2005), os grupos formados por, apenas, um indivíduo apontam na direção de que tais acessos sejam mais divergentes em relação aos demais, como pôde ser observado neste trabalho. As espécies analisadas ficaram dispostas em grupos diferentes. Os acessos de *Psidium guineense* SW ficaram no grupo II (UENF 1839, UENF 1840, UENF 1841 e UENF 1842), no grupo V o acesso UENF 1848 e os acessos de *Psidium guajava* L. nos demais grupos.

Quanto ao cruzamento entre os acessos, é possível indicá-lo entre UENF 1844 e UENF 1848, sendo o acesso UENF 1844 com frutos de polpa vermelha e altamente suscetível ao *Meloidogyne enterolobii* e o acesso UENF 1848, silvestre, resistente ao *Meloidogyne enterolobii*. Porém, além da distância genética, é necessário saber se os acessos escolhidos formarão híbridos viáveis. Outros cruzamentos indicados são os cruzamentos intraespecíficos entre os acessos do grupo I.

### 3.1.6 CONCLUSÃO

1. Os resultados mostraram que os marcadores moleculares RAPD foram eficazes em revelar a existência de diversidade genética entre os vinte acessos de *Psidium spp.*
2. O método de agrupamento hierárquico UPGMA foi o que melhor explicou a diversidade genética dos acessos neste trabalho.



## 3.1.7 REFERÊNCIAS

- ALVES, J.E.; FREITAS, B.M. Requerimento de polinização da goiaberia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.5, p.1281-1286, 2007.
- BORÉM, A. CAIXETA, E. T. Marcadores Moleculares, Viçosa: UFV, v.2, 2009. p. 585
- CALINSKI, T.; Harabasz, J. A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics*, Londres, v.3,1974. p.1-27
- COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; MOREIRA, G,R,; SILVA, D.J.H.; CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S.; SOUZA, L.V.; GUIMARÃES, L.J.M.; MARCASSO, R.C.; CANIATO, F.F. Divergência genética de cultivares de milho baseada em descritores qualitativos. In: SIMPÓSIO DE RECURSO GENÉTICO PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3.; Londrina, 2001. p.401-402.
- COSTA, I.R.da; FORNI-MARTINS, E. R. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 155,p. 571-580,2007.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos bimétricos aplicados ao melhoramento de genético. Viçosa: UFV, v.2, 2003. p.585.
- CRUZ, C.D. Programa genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, p.648,2006.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos Biométricos aplicados ao Melhoramento Genético.v.1; Viçosa: UFV, p.480,2004.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Nairobi, v., p.13-15,1 990.
- DUDA, R.O.; HART, P.E. Pattern classification and scene analysis. John Wiley & Sons: New York, 1973.p.189–225
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. v. 3, Brasília: EMBRAPA/ CENARGEN, p.220,1998.
- FRANCO, J.; CROSSA, J.; VILLASENÖR, J.; TABA, S. Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, Madison, v.38, p.1688-1696, 1998.

- GOMES FILHO, A.; OLIVEIRA, J.O.de; VIANA, A.P.; SIQUEIRA, A.P. de O.; OLIVIERA, M.G.; PEREIRA, M.G. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v.32, n. 4, 2010. p.627-633.
- GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JUNIOR, A.T. DO; KARASAWA, M. ; SUDRE, C.P. Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p.364-374, 2009.
- GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C.P.; Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v.7, n.4, p.1289-1297, 2008.
- GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties, *Biometrics*, Hoboken, v. 27 p.857–874, 1971.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. Quantitative genetics in maize breeding. Ames:Iowa State University Press, 1981, p.468.
- KUMAR, S.; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, Oxford, v. 9, p.299-306,2008.
- MINGOTI, S. A. Análise de agrupamento (cluster) In: Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: UFMG, 2005,p.155-211.
- MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada. Belo Horizonte, UFMG, 2007, p. 295.
- MOHAMMAD, S.A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, Madison, v.43, p.1235-1248, 2003.
- PADILHA-RAMÍREZ, J.S.; GONZÁLEZ-GAONA, E.; ESQUIVEL-VILLAGRANA, F.; MERCADO-SILVA, E.; HERNANDEZ-DELGADO, S.; MAYEK-PÉREZ, N. Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Canõnes, Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Chapinga, v.25, n.4, p.393-399, 2002.

REIS, G.M.; RIBEIRO JR, J. I. Como baixar e instalar o Programa R. Viçosa, 2007.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendograms by objective methods. *Taxonomy*, Berlim, v.11, p.33-40, 1962.

SUDRÉ, C.P; CRUZ, C.D; RODRIGUES, R; RIVA, E.M; AMARAL JÚNIOR, A.T; SILVA, D.J.H; PEREIRA, T.N.S. Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. *Horticultura Brasileira*, Campinas, v. 24, p. 88-93, 2006.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; FALEIRO, F.G.; FUKUDA, W.M.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Variabilidade genética para caracteres morfológicos entre acessos do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados (2005). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 11., Campo Grande-MS, 2005, CD-ROM.

WESH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBERLIK, A.R.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorfism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

Figura 1: Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética entre 20 acessos de *Psidium spp.* caracterizado por marcadores RAPD.

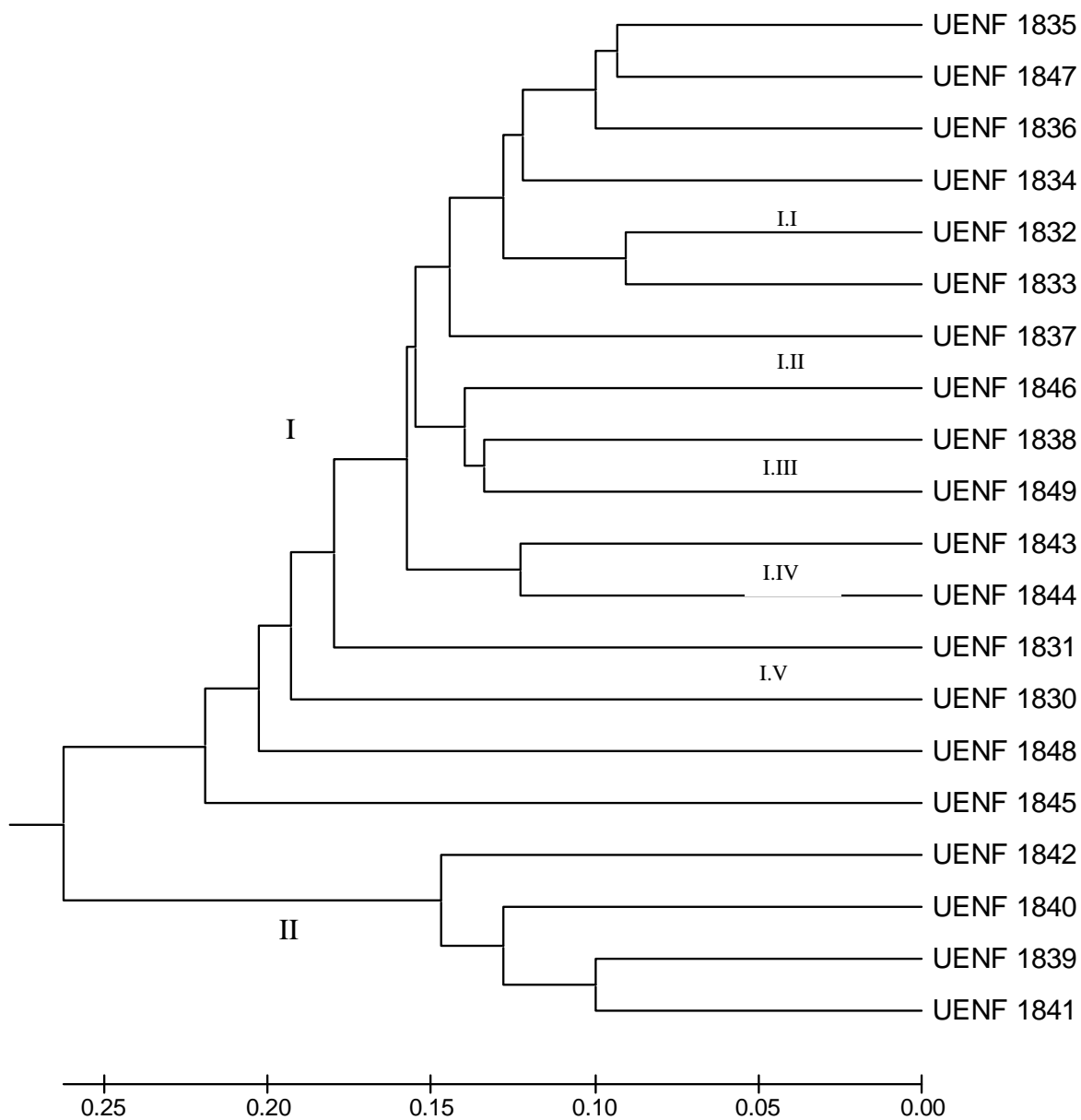


Tabela 1: Acessos utilizados para estudo de RAPD e diversidade genética

Código	Características	Espécie	Fonte do material
UENF 1830, UENF 1831, UENF 1832, UENF 1833, UENF 1834, UENF 1835, UENF 1836, UENF 1837, UENF 1839 e UENF 1849.	Cor de polpa vermelha	<i>Psidium guajava</i> L	A
UENF 1843, UENF 1844, UENF 1845, UENF 1846 e UENF 1847	Cor de polpa vermelha	<i>Psidium guajava</i> L	B
UENF1838	Cor de polpa branca	<i>Psidium guajava</i> L	A
UENF 1840, UENF 1841 e UENF 1842.	Resistente a nematóide	<i>Psidium guineense</i> SW	B
UENF 1848	Resistente a nematóide	<i>Psidium guineense</i> SW	C

A- Sítio Providência, Bom Jesus do Itabapoana, RJ; B- Viveiro Itamudas, Bom Jesus do Itabapoana, RJ; C- São João da Barra, RJ.

Tabela 2: Lista dos códigos e as seqüências dos iniciadores e seus respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas obtidas na análise de DNA, molde extraído de acessos de goiaba e araçá.

Primers	Seqüência dos Iniciadores 5' → 3'	Bandas Polimórficas	Bandas monomórficas
OPA03	AGTCAGCCAC	7	0
OPA05	AGGGGTCTTG	5	0
OPA06	AGGGGTCTTG	6	0
OPA08	GAAACGGGTG	3	0
OPA09	GTGACGTAGG	2	0
OPA10	GGGTAACGCC	3	0
OPA12	CAATCGCCGT	5	0
OPA15	TCTGTGCTGG	3	0
OPA18	GACCGCTTGT	4	0
OPA19	AGGTGACCGT	5	0
OPA20	CAAACGTCGG	2	0
OPAB03	TGGCGCACAC	5	0
OPAB04	GGCACGCGTT	4	1
OPAB08	GTTACGGACC	5	0
OPAC04	ACGGGACCTG	5	0
OPAC06	CCAGAACGGA	4	0
OPAC07	GTGGCCGATG	4	0
OPAW02	TCGCAGGTTC	5	0
OPAW07	AGCCCCAAG	5	0
OPAW009	ACTGGGTCGG	5	0
OPAW10	GGTGTGTTGCC	4	1

Cont. Tabela 2

OPAW20	TGTCCTAGCC	4	0
OPD02	GGACCCAACC	4	0
OPD12	CACCGTATCC	6	0
OPD13	GGGGTGACGA	5	0
OPS07	TCCGATGCTG	3	0
OPV06	ACGCCCAGGT	4	0
OPV12	ACCCCCACT	5	0
Total		155	2

Tabela 3: Acessos de *Psidium spp.* caracterizados com marcadores moleculares RAPD e agrupados pelo método de otimização Tocher.

Grupos	Acessos
I	UENF1832, UENF1833, UENF1834, UENF1835, UENF1836, UENF1837, UENF1838, UENF1843, UENF1844, UENF1846, UENF1847 e UENF1849
II	UENF1839, UENF1840, UENF1841 e UENF1842
III	UENF1831
IV	UENF1845
V	UENF1848
VI	UENF1830

### 3.2 ESTUDO DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO DAS ESPÉCIES *Psidium guajava* L. (goiabeira) E *Psidium guinnense* Sw (araçá do campo)

#### 3.2.1 RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento meiótico; estimar o Índice Meiótico; estimar a viabilidade polínica dos genótipos de goiabeira e araçá. Para a análise meiótica, botões florais, em diferentes estágios de desenvolvimento, foram coletados e fixados em solução 3:1 (3 álcool e 1 ácido acético). O índice meiótico foi estimado com base nos produtos pós-meióticos normais (tétrades) e anormais (tríades, díades e mônades). Para estimar a viabilidade polínica, botões florais de goiaba, na antese foram coletados, ao acaso, em etanol 70%. Anteras foram maceradas em solução de Alexander, e os grãos de pólen foram classificados em viáveis e inviáveis. A divisão celular foi, de um modo geral, normal, confirmando que a goiabeira é diplóide com 11 pares de cromossomos. As viabilidades polínicas das espécies estudadas apresentaram porcentagem superior (90%) de grãos de polens viáveis. Algumas poucas anormalidades, tais como cromossomos retardatários foram observados, porém nada que comprometesse a fertilidade dos acessos de goiabeira. Entretanto, nas condições edafoclimáticas da coleta do araçá, não foi possível observar as fases da meiose nessa espécie.

Palavras-chave: cromossomos; viabilidade polínica; meiose

### 3.2.2 ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate meiotic behavior; to estimate meiotic index; to estimate pollen viability of guava and “araça” genotypes. For meiotic analysis, flower buds in different development stages were collected and fixed in 3:1 solution (3 alcohol:1 acetic acid). Meiotic index was estimated from normal (tetrads) and abnormal (triads, dyads e monads) post-meiotic products. For estimating pollen viability, guava flower buds in anthesis were picked-up, randomly, from 70% ethanol. Anthers were macerated in Alexander solution and pollen grains were classified in viable or non-viable. Cell division was normal, confirming that guava is diploid with 11 chromosome pairs. Pollen viabilities of studied species showed higher viable pollen grains. A few abnormalities, such as laggards were observed with no effects on guava accessions fertility. However, in “araça” due to edaphoclimatic conditions during sampling, it was not possible to observe meiotic phases.

Key words: chromosomes, pollen viability, meiosis

### 3.2.3 INTRODUÇÃO

*Psidium* é um dos gêneros mais importantes economicamente da família *Myrtaceae*, que inclui a goiabeira (*Psidium guajava* L.), nativa das regiões tropicais do continente americano. A goiabeira é a principal espécie comercial, conhecida e apreciada pelas características de seus frutos, que podem ser consumidos *in natura* ou industrializados. Porém, observa-se um declínio, nos últimos anos, na área e na produção nacional da goiabeira, principalmente no Nordeste devido ao parasitismo do nematóide (*Meloidogyne enterolobii*), que predispõe a goiabeira à podridão radicular causada pelo fungo (*Fusarium solani*), doença complexa, chamada "declínio da goiabeira". Em geral, as melhores chances de sucesso, no controle dos nematóides, estão no uso de materiais resistentes, os quais podem ser obtidos pelo melhoramento genético.



O programa de melhoramento genético de goiabeira, no Brasil, até o momento, está voltado, basicamente, para o desenvolvimento de cultivares comerciais superiores. Para Silva e Pinheiro (2007), estudos sobre a biologia reprodutiva da família *Myrtaceae*, especialmente a goiabeira no Brasil, necessitam de maior estudo, pois pouco se sabe sobre o modo reprodutivo, biologia floral, cariótipo, relação pólen: óvulo, conservação e viabilidade polínica do grão de pólen, etc. da espécie. Sendo assim, informações importantes da cultura, para se iniciar um programa de melhoramento, são necessárias para se obter êxito no lançamento de materiais genéticos superiores e resistentes às principais doenças.

Segundo Souza et al.(2000), o comportamento meiótico de uma planta reflete diretamente no seu grau de fertilidade e a ocorrência de falhas durante o processo, como cromossomos retardatários ou desorganização dos fusos representam dificuldades na produção de híbridos, por ter, como consequência, a variação cromossômica em função da perda ou ganho de cromossomos nas novas gerações. Por isso, os estudos meióticos são importantes, pois explicam fenômenos reprodutivos, mecanismos de hereditariedade e de variabilidade genética nas espécies. Afinal, a meiose é uma das fontes de variabilidade genética utilizada pelos organismos para adaptação ao meio ambiente e assegura a perpetuação através da descendência (Muñoz et al. 2006).

Segundo Dafni (1992), a avaliação da viabilidade do grão de pólen é o primeiro passo no entendimento da germinação no estigma na flor, sendo este um estágio crucial rumo à fertilização. De acordo com a autora, a viabilidade do grão de pólen, que é um fator chave no sucesso da fertilização, pode ser estimada por vários métodos como através da solução tripla de Alexander, da solução de lugol, do método de reação de fluorocromática ((Fluorochromatic Reaction- FCR), corantes vitais como sal de tetrazólio, e as germinações *in vivo* e *in vitro*.

Cada uma das soluções citadas a cima tem vantagens e desvantagens, e a escolha de uma ou outra vai depender da eficácia do corante, da natureza do grão de pólen e das possibilidades do pesquisador. Por exemplo, a solução tripla de Alexander é um corante diferencial que confere uma boa distinção de coloração entre grãos de pólen viáveis e inviáveis; entretanto, essa distinção depende da concentração de corantes, espessura da parede do grão de pólen e pH da solução. A solução é composta por mistura de corantes com ação definida para coloração no grão de pólen; dessa forma, grãos de pólen inviáveis terão

coloração verde, devido à atuação do corante verde malachita na parede do grão de pólen, e grãos de pólen viáveis terão coloração vermelha, devido à coloração por fucsina ácida no citoplasma. O corante *orange G* é responsável por melhorar a atuação dos corantes diferenciais, ou seja, tornar a distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis ainda visíveis (Alexander 1969).

Há cerca de quatro anos, a UENF iniciou o programa de melhoramento da goiabeira; entretanto, leva-se muito tempo para chegar a algum resultado prático, especialmente por se tratar de uma espécie perene em que se exigem grandes áreas experimentais e alto custo financeiro. Para ganhar tempo e aumentar a velocidade de resposta do programa, lançou-se mão de várias ferramentas auxiliares entre elas as análises citogenéticas. O comportamento meiótico é altamente influenciado pelas condições climáticas (temperatura). Assim, anormalidades que ocorrem durante a meiose podem levar à formação de gametas desbalanceados e inviáveis.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento meiótico, estimar o Índice Meiótico e a viabilidade polínica dos acessos de goiabeira.

### 3.2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### Material Genético

Botões florais, em diferentes estágios (antese dos botões) de desenvolvimento, foram coletados, em janeiro de 2010, em plantas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) cultivadas no campo, no município de Bom Jesus do Itabapoana-RJ (lat.21°11'57,7" S, long. 41°34'19,9" W e 1016m de altitude) e araçá do campo *Psidium guineense* Sw (lat. 21°41'22"S, long. 41° 3'20"), planta silvestre localizada no município de São João da Barra. As plantas de goiabeira foram obtidas de sementes e estão plantas sob o espaçamento de três metros entre as linhas e de dois metros entre plantas metro. Todos os tratos culturais foram dispensados conforme o recomendado.

## Análise Meiótica

Para a meiose, botões florais (pré-antese), em diferentes fases de desenvolvimento, foram coletados em plantas ao acaso e foram fixados em solução 3:1 (3 álcool e 1 ácido acético) e conservados a 4°C. A lâmina foi preparada, utilizando-se a técnica de esmagamento (*squash*), onde anteras foram maceradas em solução do corante carmim acético 1%. Após o preparo das lâminas, as mesmas foram observadas sob microscópio ótico e as diferentes fases da meiose foram analisadas e as imagens capturadas.

## Índice Meiótico

Para o índice meiótico, botões próximos à antese foram coletados em solução 3:1 de etanol e ácido acético, anteras foram maceradas em solução do corante carmim acético 1% e as lâminas foram observadas em microscópio ótico. Foram preparadas 5 lâminas/botão, onde foram contabilizadas 300 células/lâmina de produtos pós-meióticos normais (tétrades) e anormais (tríades, díades, mônades). O índice meiótico (IM) foi calculado conforme Love (1951) onde,

$$IM = \frac{\text{Número Total de Tétrades Normais}}{\text{Somatório de Produtos Pós - Meióticos}} \times 100$$

## Viabilidade Polínica

Botões florais próximos da abertura da flor foram coletados, ao acaso, fixados em etanol 70%, e armazenados à 4°C. No preparo da lâmina, os botões foram cortados, transversalmente, em duas seções, superior e inferior, e foram feitas duas lâminas/botão/seção; em cada lâmina, foram maceradas cinco anteras e foram contados e classificados em viáveis e não viáveis num total de 250 grãos de pólen/lâmina. Para o preparo da lâmina, as anteras foram maceradas em três gotas do corante Alexander, (pH = 2,75) e esmagadas para liberação do grão de pólen. Em seguida, foram retirados os debris (os resíduos) da lâmina, sobrepostos à lamínula, retirado o excesso do corante com papel filtro e, após cinco minutos, foi observada sob microscópio ótico Olympus BX60 campo claro.

Essa análise consistiu em classificar os grãos de pólen como normais/viáveis ou anormais/inviáveis, baseados na reação do grão de pólen com solução onde foram distinguidos grãos de pólen viáveis (vermelhos-púrpura) de inviáveis (verdes) (Alexander 1969).

### Captura de Imagens

Após o preparo das lâminas, as mesmas foram observadas sob microscópio ótico Olympus BX 60 e as imagens foram capturadas, utilizando-se o programa Image Pro-Plus versão 5.1 (*Media Cybenetics*).

### Análise Estatística

Os dados de viabilidade polínica e índice meiótico foram submetidos à análise de variância com o teste F a 5% de probabilidade e, para a comparação das plantas, foi aplicado às médias o teste Tukey, utilizando-se o programa estatístico GENES (Cruz 2006).

## 3.2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise Meiótica

Apesar de serem considerados pequenos (Costa e Forni-Martins 2007), os cromossomos da goiabeira, no paquíteno, apresentaram-se bastante condensados, sendo possível observar os cromômeros, que são regiões muito condensadas de heterocromatina e, possivelmente, “knobs” (Figura 1A).

As observações realizadas possibilitaram confirmar o número de cromossomos e o nível de ploidia, visto que foram observados, no diplóteno e na diacinese, onze pares de cromossomos, conforme já se menciona na literatura (Costa e Forni-Martins 2007 e Costa et al. 2008), para a espécie ( $2n=2x=22$ ) (Figuras 1B e 1C).

De um modo geral, a meiose foi normal (Figuras 1D a 1J), resultando, no final, células com os quatro núcleos ou tétrades (Figura 2D); entretanto foram observadas algumas anormalidades meióticas durante a divisão como falta de sincronia dentro da célula (Figura 2A), cromossomos retardatários (Figura 2B) e problemas de fibras (Figura 2C). Além disso, observou-se que a meiose não foi sincronizada no interior de um mesmo botão, já que, em uma mesma lâmina, foram visualizadas diferentes fases. A falta de sincronismo é caracterizada quando duas fases distintas da divisão celular são observadas na mesma célula (Figura 2A).

Segundo Picoli et al. (2003), as próprias condições de manejo das plantas e climáticas podem alterar a meiose, visto que situações de estresse interferem no metabolismo das plantas. Assim, a presença de cromossomos retardatários pode gerar gametas desbalanceados ou aneuplóides, já que, usualmente, cromossomos retardatários podem ficar retidos no citoplasma, não acompanhando o conjunto de cromossomos que segue a divisão celular normalmente e, no final, serem eliminados na forma de micronúcleos (Koduru e Rao 1981), conforme se pode observar na Figura 2E, onde se verifica a presença de micronúcleo (seta).

Irregularidades nos produtos pós-meióticos (tríades, díades e monades), também, foram observadas em outros estudos com espécies da família *Myrtaceae*, apesar do pareamento regular dos cromossomos (Louguercio e Battistin 2004 e Costa e Forni-Martins 2007).

### Índice Meiótico

A análise de variância não foi significativa, apesar de a meiose apresentar algumas anormalidades (díades e tríades), as médias não diferiram, ou seja, não houve diferença significativa entre as plantas e os produtos pós-meióticos (Tabela 1).

Houve uma grande formação de tétrades normais (Figura 2D) e poucos produtos pós-meióticos anormais, o que resultou em um Índice Meiótico (IM) de 97,64% (Tabela 1) e, segundo LOVE (1951), espécies com IM acima de 90% são consideradas estáveis meioticamente; portanto, as plantas representantes da goiabeira, aqui avaliadas, podem ser classificadas como estáveis meioticamente.

Esses resultados já eram esperados, considerando a baixa frequência de anomalias durante a divisão meiótica. Esses resultados são importantes, pois indicam que as plantas geram gametas balanceados, podendo ser usadas em programas de hibridização já que gametas desbalanceados do tipo aneuplóides são indesejáveis.

Como pode ser verificado, foram observadas algumas tríades, díades, que foram consequências das anormalidades verificadas durante o processo de meiose da goiabeira e do araçá do campo (Figura 2 E-F e Figura 3 A, B, D). As díades e tríades são originadas, provavelmente, a partir de falhas ocorridas durante a divisão do núcleo devido a problemas das fibras do fuso acromático e, também, da divisão do citoplasma (citocinese). Assim, é esperado que haja a formação de alguns poucos gametas não reduzidos do tipo  $2n$  e, até, gametas aneuplóides com um cromossomo a mais (trissômico) ou a menos (monossômico), devido à presença de cromossomos retardatários que foram perdidos durante a divisão (Wittmann e Agnol 2001).

O estudo do comportamento meiótico das espécies é importante, pois o mesmo reflete o grau de fertilidade. As alterações observadas durante a divisão celular deverão, teoricamente, influenciar na viabilidade dos gametas dos grãos de pólen, pois a viabilidade dos gametas depende de um comportamento meiótico regular (Defani-Scoarize et al. 1996).

#### Viabilidade polínica da goiaba

Em relação à viabilidade dos os grãos de pólen (Tabela 4 A-B-C-D) as diferentes plantas de goiabeira e araçá apresentaram viabilidade polínica superior a 90%. Em todas as plantas a porcentagem de grãos de pólen viáveis foram superiores aos inviáveis. Segundo Corrêa et al. (2005), a grande quantidade de tétrades normais corrobora os resultados e é um fator indicativo de ocorrência de um processo meiótico regular, que conseqüentemente leva ao desenvolvimento de grãos de pólen viáveis.

A viabilidade polínica pode ser determinada por métodos diretos, como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e por métodos indiretos, que se baseiam em características citológicas, como a coloração, com o uso de corantes

químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro (Oliveira et al. 2001).

Um dos métodos indiretos mais utilizados é a solução tripla de Alexander, que tem, na sua composição, três corantes: a fucsina básica, o verde malachita e o Orange G. A fucsina básica, que é um corante para DNA, cora o citoplasma de vermelho ou púrpuro; o verde malachita colore de verde a parede do grão de pólen e o Orange G é um intensificador. Assim, sob efeito dessa solução, os grãos de pólen viáveis/normais apresentam o citoplasma cor púrpura e a parede de cor verde; enquanto que grãos de pólen não viáveis/anormais colorem de verde por apresentarem, apenas, a parede (Alexander 1969).

A viabilidade do pólen se relaciona, diretamente, com a normalidade da formação do grão de pólen (microsporogênese e microgametogênese) e com a eficácia dos cruzamentos, tanto entre cultivares quanto entre espécies. Uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular (Tecchio et al. 2006).

Em um estudo sobre a biologia floral e reprodutiva da goiabeira, no Vale Irrigado do São Francisco, foi encontrado resultado semelhante, no qual duzentas (200) lâminas foram coradas e os grãos de pólen mostraram-se viáveis na pré-antese, apresentando 98% de viabilidade no momento da abertura da flor e permanecendo viáveis por, aproximadamente, 10 horas após a abertura da flor (Leal et al. 2005). Caraballo (2001), também, encontrou alta viabilidade polínica em goiabeira, em torno de 97% em flor aberta, apesar de o estudo ter sido feito com outro corante, o carmin acético.

Esta alta viabilidade dos grãos de pólen das plantas de goiabeira significa uma alta fertilidade masculina e indica que a mesma pode ser utilizada, como genitor masculino (doador de pólen), em programas de melhoramento.

A viabilidade polínica é um fator importante para o melhoramento de plantas, pois cada grão de pólen leva consigo a carga genética que será transmitida para a próxima geração. Assim, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade de cruzamentos serem bem sucedidos.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os botões florais de goiabeira e araçá podem ser coletados na pré-antese para análise da viabilidade polínica. Segundo Alves (2007), a viabilidade do pólen e a receptividade do

estigma da goiaba ocorrem desde a pré-antese, mas com seus respectivos picos durante a abertura da flor. Os resultados indicam, também, que as irregularidades, observadas na meiose, não comprometeram a viabilidade das plantas de goiabeira estudadas. Entretanto, nas condições edafoclimáticas da coleta do araçá, não foi possível observar as fases da meiose.

### 3.2.6 REFERÊNCIAS

- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Tech* 44: 111-122.
- Alves JE and Freitas BM (2007) Requerimento da polinização da goiaba. *Ciência Rural* 37 (5): 1281-1286.
- Caraballo BM (2001) Biología floral del guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo, Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía* 18: 41-55.
- Corrêa MGS, VIEGAS J, SILVA JB da, ÁVILA PFV de, BUSATO GC and Lemes JS (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botânica Brasileira* 19(2): 295-303.
- Costa IR, Dornelas MC and Forni-Martins ER (2008) Nuclear genome size variation in fleshy-fruited neotropical myrtaceae. *Plant Systematics and Evolution* 276 (3): 209-217.
- Costa IR and Forni-Martins ER (2007) Karyotype analysis in South American species of myrtaceae. *Botanical Journal of Linnean Society* 155: 571-580.
- Cruz CD (2006) Programa genes- Estatística experimental e Matrizes. 1 ed., UFV, Viçosa, 285p.
- Dafni A (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press Inc, New York, 250p.
- Defani-Scoarize MA, Pagliarini MS and Aguiar CG (1996) Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Nucleus* 39:10-18.
- Loguercio AP and Battistin A (2004) Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil. *Revista da FZWA* 11(1): 95-106.



- Love RM (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal* 43:72-76.
- Muñoz AM, Caetano CM., Vallejo FA and Sanchez MS (2006) Comportamiento meiótico y descripción morfológica del pólen de pronto alivio. *Acta Agronomica* 1: 1-9.
- Oliveira MSP, Maués MM and Kalume MA (2001) Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de Açaizeiro. *Acta botânica Brasileira* 15(1):27-33.
- Picoli EAT, Carvalho CR, Fári M and Otoni WC. (2003) Associação de fases meióticas e estágio dos micróscoporo com características morfológicas de botões florais de pimentão. *Ciência e Agrotecnologia* 27(3): 708-713
- Schifino-Wittmann MT and Dall'Agnol M (2001) Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas . *Ciência Rural* 31(1): 169-175.
- Silva ALG and Pinheiro MCB (2007) Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia L. (Myrtaceae)*. *Acta Botânica Brasileira* 21(1): 235-247.
- Souza MM, Pereira TNS, Rodrigues R, Dutra GA and Sudré CP (2000) Irregularidades meiótica em pimenta. *Horticultura Brasileira* (18): 748-749.
- Tecchio VH, Davide LC and Pereira AV (2006) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (*Poaceae, Poales*) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 29 (2): 353-362.

Tabela 1. Médias dos produtos pós-meióticos observados nas plantas de *Psidium spp.*

Média das Plantas	Produtos Pós-meióticos				IM (%)
	Tétrades	Tríades	Díades	Mônades	
UENF1830	286,6 a	5,4 a	8 a	0a	95,53
UENF1831	291,0 a	7 a	2 a	0a	97,00
UENF1832	294,4 a	5,6 a	0 a	0a	98,13
UENF1834	297,6 a	2,4 a	0 a	0a	99,20
UENF1835	295,0 a	5 a	0 a	0a	98,33
UENF1848	281,5 a	3,75a	0 a	59 b	82,01

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Índice meiótico (IM%).

Tabela 2. Número de grãos de pólen viáveis (GPV) e grãos de pólen inviáveis (GPI) observados em botões na pré-antese de plantas de *Psidium spp.*

Média das Plantas	GPV	GPI
UENF1830	491,0 a	9,0 b
UENF1831	493,0 a	7,0 b
UENF1832	490,6 a	7,4 b
UENF1834	486,8 a	13,2 b
UENF1835	493,8 a	6,2 b
UENF1836	496,8 a	3,4 b
UENF1837	496,4 a	3,6 b
UENF1838	487,4 a	12,6 b
UENF1843	487,8 a	12,2 b
UENF1844	491,0 a	9,0 b
UENF1845	486,2 a	13,8 b
UENF1846	408,5 b	91,4 a
Média	484,1	15,73
Porcentagem de Viabilidade	96,82%	3,15%
UENF1848	290,2	9,8

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

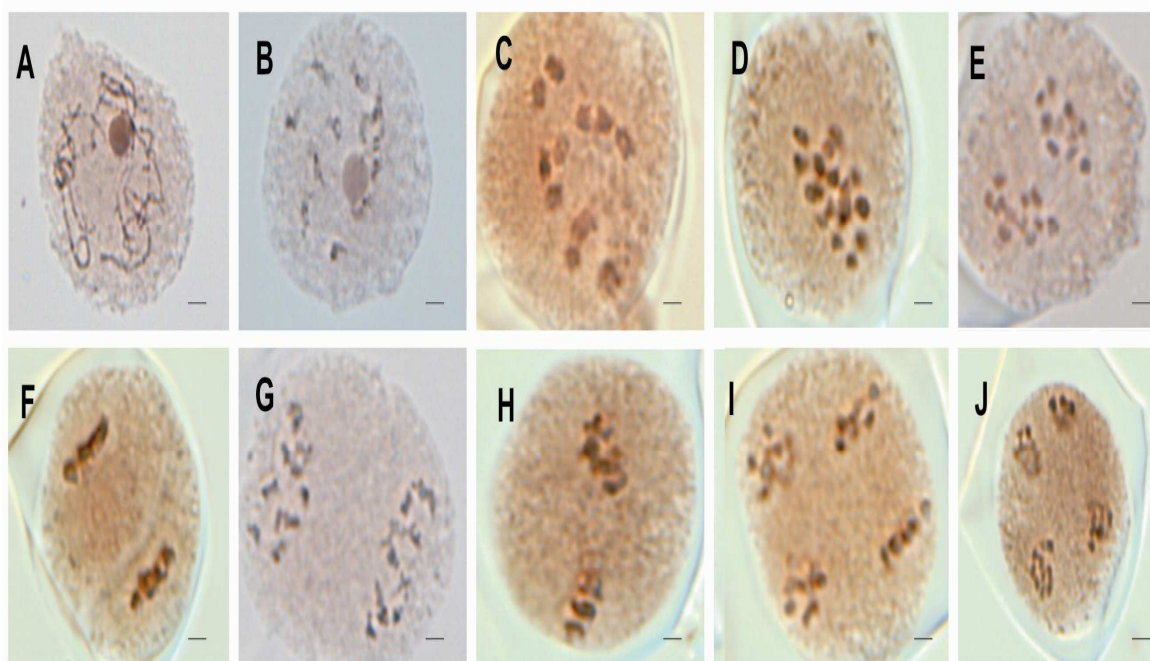


Figura 1. Diferentes fases da meiose observadas em goiabeira. A - Prófase I subfase Paquíteno; B - Prófase I subfase diplóteno; C – Prófase I subfase diacinese onde se observam os 11 pares de cromossomos; D - Metáfase I; E – Anáfase I onde se observa a segregação normal dos cromossomos; F - Telófase I; G- Prófase II; H- Metáfase II; I - Anáfase II onde se observa um grupo de cromossomos já separados (final de anáfase) e outro em fase de separação (início de anáfase); J – Telófase II onde se observam quatro grupos de cromossomos. (Barra = 5µm).

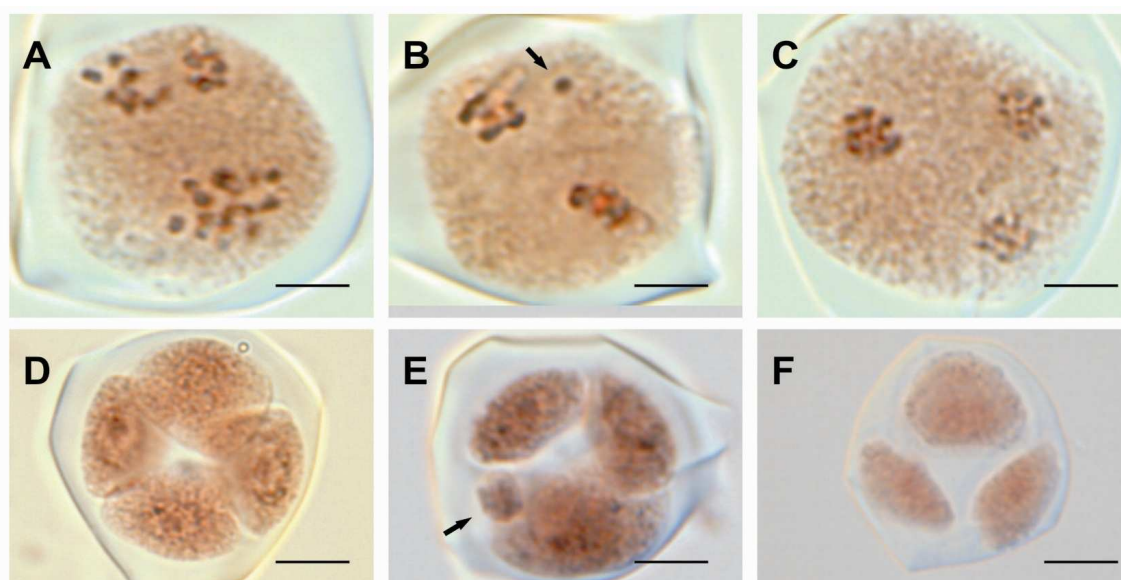


Figura 2. Irregularidades meióticas e produtos pós-meióticos observados durante a meiose de goiabeira. A – Falta de sincronia da divisão em célula onde se observa um grupo de cromossomos em prometáfase e outro grupo em anáfase; B – Metáfase II com um cromossomo retardatário (seta); C – Célula com três núcleos provavelmente com problemas de formação das fibras do fuso; D - Tétrade normal com quatro núcleos haplóides; E- Tétrade com a presença de micronúcleo (seta); F – Tríade. (Barra = 5µm).

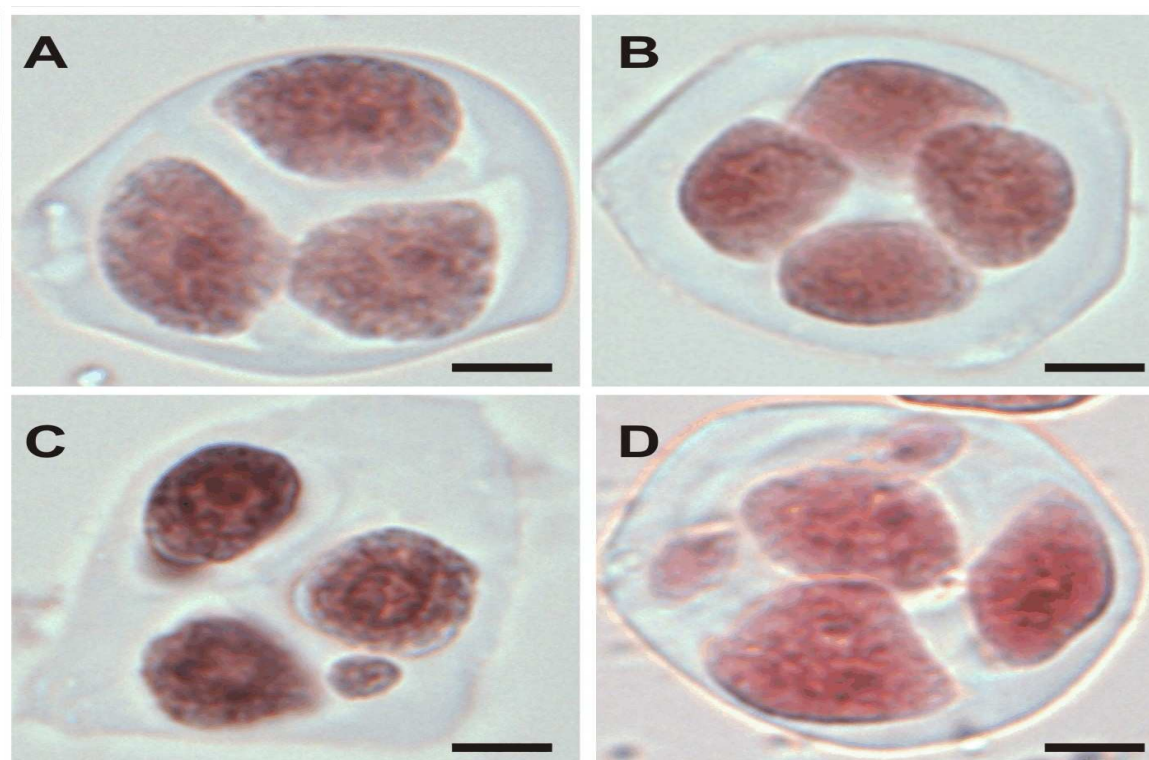


Figura 3. Produtos pós-meióticos observados durante a meiose do araçá do campo. A - Tríade; B - Tétrade normal com quatro núcleos haplóides; C - Tríade com a presença de micronúcleo (seta); D - Tríade com a presença dois micronúcleos (seta). (Barra = 5µm).

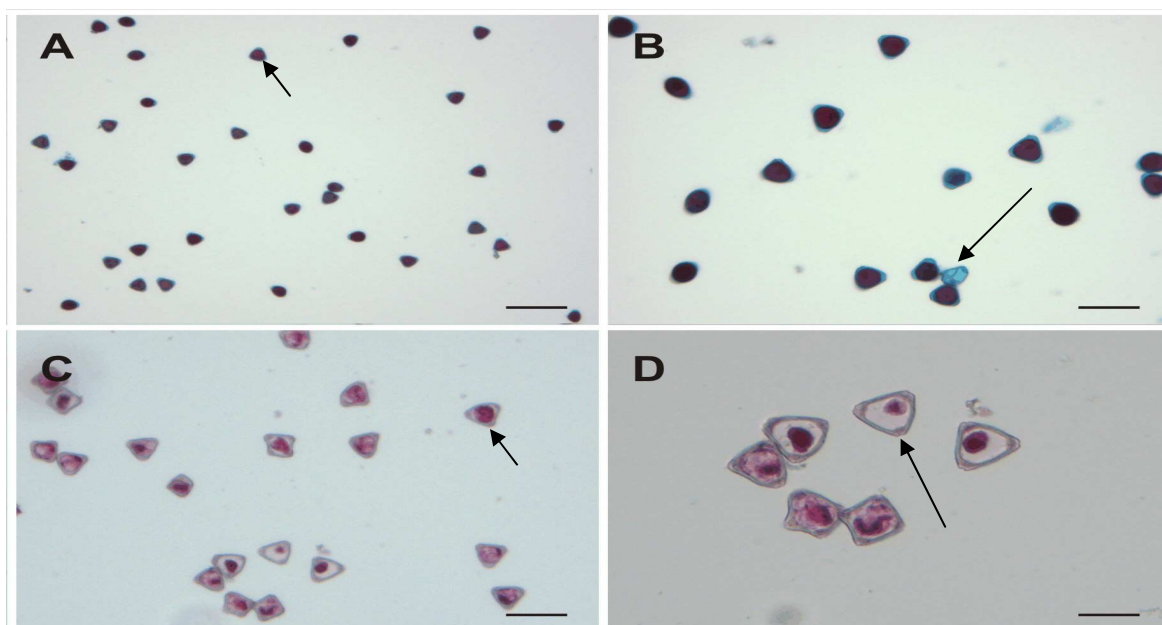


Figura 4. Grãos de pólen viáveis e grãos de pólen inviáveis observados em botões na pré-antese de plantas de *Psidium spp.*. A e B – Grãos de pólen viáveis (seta pequena) e inviáveis (seta grande) de goiabeira; C e D - Grãos de pólen viáveis (seta pequena) e inviáveis (seta grande) de araçá do campo. (Barra = 5µm).

### 3.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE GENITORES E HÍBRIDO DE *Psidium guajava* L. VIA MARCADORES MICROSSATÉLITE (SSR)

#### 3.3.1 RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram estimar o potencial dos marcadores microssatélites em detectar polimorfismo entre sete genitores e nove híbridos intraespecíficos de goiabeira, realizar a caracterização genética, estimar índices genotípicos para a quantificação e estruturação da variabilidade genética e aquilatar o nível de endogamia nos genótipos estudados. Foram utilizados vinte e três marcadores SSR da série mPgCIR. Na análise dos dados, utilizaram-se os programas *GENES*, *Mega 5*, *Programa R*, *POPGENE*, *PowerMarker* e *Structure*. Com base nos resultados, concluiu-se que os marcadores moleculares SSR foram eficazes em revelar a existência da diversidade genética entre genitores e os híbridos de *P. guajava* L., assim como verificar a eficácia dos cruzamentos realizados na obtenção de novos híbridos para composição de populações segregantes, visando à avaliação e prosseguimento do programa de melhoramento da goiabeira da UENF.

Palavra-chave: *Psidium guajava* L., marcadores moleculares, microssatélites, SSR.

### 3.3.2 ABSTRACT

Aims of this work were to estimate microsatellite markers potential to detect polymorphism among seven guava parents and nine guava intraspecific hybrids, to perform genetic characterization, to estimate genotype indexes for quantifying and structuring genetic variability. Twenty-three SSR markers from mPgCIR series were used. Data analysis was performed using software packages GENES, Mega-5, Programa R, POPGENE, PowerMarker and Structure. According to results, it was concluded that SSR molecular markers were able to reveal the existence of genetic diversity among *P. guajava* L. parents and hybrids as well to verify the efficacy of crosses in order to obtain new hybrids for composing segregating populations and thus evaluate and continue UENF guava breeding program.

Key words: guava, intraspecific crosses, microsatellite markers

### 3.3.3 INTRODUÇÃO

Goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma espécie nativa do Norte da América do Sul e está distribuída por toda a região da América Tropical (Risterucci et al., 2005). Trata-se da espécie de *Psidium* mais importante economicamente devido ao seu alto conteúdo de vitaminas A e C, além do elevado teor de fibras.

O Brasil é o terceiro maior produtor do fruto de goiaba do mundo, sendo a Índia e o México, respectivamente, primeiro e segundo lugar (Jaiswal e Jaiswal, 2005). A produção nacional de goiaba é de 76.494.000,00 toneladas em uma área equivalente a 9.138.000,00 hectares, segundos dados do IBGE (IBGE, 2011).

A goiabeira é uma entre muitas espécies cultivadas que tem alta diversidade genética. Primeiro, devido ao sistema misto de cruzamento, segundo Alves e Freitas (2007), e, além disso, pela utilização de sementes originárias de genitores heterozigotos na produção de mudas, a qual leva a uma ampla diversidade genética.

O estudo da divergência genética entre acessos de plantas fornece informações de potenciais genitores a serem utilizados em programa de

melhoramento genético vegetal. A forma preditiva de determinar a diversidade genética apresenta, como principal vantagem, o fato de não ser necessária a obtenção prévia de combinações híbridas, como ocorre em dialelos; além disso, o monitoramento de cruzamentos realizados entre diferentes genótipos pode ser checado pelo uso de marcadores de DNA (Coimbra et al. 2001).

A tecnologia de marcadores moleculares pode contribuir, significativamente, para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, além da geração e desenvolvimento de produtos melhorados (Ferreira e Grattapaglia 1998; Borém e Caixeta 2009).

Os marcadores moleculares codominantes, oriundos de sequências simples repetidas (*SSR-simple sequence repeats*), conhecidas como microssatélites, constituem-se em pequenas sequências com um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*. Em genomas eucariotos, essas sequências são mais comuns, melhor distribuídas ao acaso e formam locos mais polimórficos (Wang et al., 1994).

Regiões contendo microssatélites são amplamente individualizadas através do PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos com 20 a 30 nucleotídeos complementares às sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado possui tamanho distinto, composto por várias dezenas e, até, algumas centenas de pares de nucleotídeos, representando, assim, um alelo diferente em cada *loco*.

A natureza altamente mutável dos microssatélites os torna marcadores potencialmente poderosos para distinguir polimorfismo de DNA entre genótipos intimamente relacionados (Eustice et al. 2008). Outros atributos desses marcadores são a sua natureza multialélica, reprodutibilidade, alto conteúdo informativo, herança codominante, alta abundância e extensa cobertura do genoma (Gupta e Varshney, 2000). Em goiabeira, dezenas de microssatélites já foram identificados e caracterizados (Risterucciet al., 2005 e 2010 e Valdes-Infante et al. 2010), sendo a localização genômica de muitos desses determinada por mapeamento genético (Ritter et al., 2010).

Os objetivos deste trabalho foram estimar o potencial dos marcadores microssatélites em detectar polimorfismo entre genitores e híbridos de goiabeira; realizar a caracterização genética; estimar índices genotípicos para a

quantificação e estruturação da variabilidade genética e quantificar o nível de endogamia nos materiais genéticos estudados.

### 3.3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os sete genitores (UENF 1830, UENF 1831, UENF 1832, UENF 1833, UENF 1834, UENF 1835 e UENF 1836) foram coletados no município de Bom Jesus do Itabapoana, RJ. Nessa cidade, foram realizados os cruzamentos intraespecíficos entre os acessos de *P. guajava* L.

Para a realização dos cruzamentos, primeiramente, selecionaram-se os genitores superiores e contratantes, segundo Pessanha et al. (2011); logo em seguida, realizaram-se os cruzamentos. As plantas receptoras de pólen tinham suas flores emasculadas na pré-antese, antes dos cruzamentos. As flores foram delicadamente ensacadas e etiquetadas para não haver contaminação de pólen de outra planta. Assim, depois da coleta dos frutos maduros, dos nove híbridos, retiraram-se as sementes, as quais foram colocadas para geminar e, depois de três meses de idade, as mudas foram levadas para a área experimental (Escola Técnica Antônio Sarlo, RJ).

Aos dezoito meses de idade, coletaram-se amostras foliares do S1 (UENF1831\*UENF1831) e das combinações híbridos intraespecíficos (UENF1834\*UENF1833, UENF1831\*UENF1830, UENF1831\*UENF1836, UENF1833\*UENF1832, UENF1835\*UENF1834, UENF1836\*UENF1835, UENF1832\*UENF1833 e UENF1834\*UENF1831) em *bulk*, ou seja, foi constituído por uma amostra de doze plantas de cada cruzamento, com o objetivo de tentar amostrar o maior número possível de formas alélicas presentes em cada um dos genitores para cada loco analisado.

O DNA genômico foi extraído das folhas dos genitores e dos híbridos de goiaba, utilizando-se o kit Hiyied™ genomic DNA mini Kit (Plant).

A quantificação do DNA, após a extração, foi realizada pelo espectrofotômetro: nanodrop 2000/2000c, *Thermo Scientific*.

Foram utilizados 23 iniciadores microssatélites pertencentes a série mPgCIR, desenvolvidos por Risterucci et al. (2005). Os *primers* utilizados foram



mPgCIR01, mPgCIR02, mPgCIR03, mPgCIR04, mPgCIR05, mPgCIR07, mPgCIR08, mPgCIR09, mPgCIR10, mPgCIR11, mPgCIR13, mPgCIR14, mPgCIR15, mPgCIR16, mPgCIR18, mPgCIR19, mPgCIR20, mPgCIR21, mPgCIR22, mPgCIR23, mPgCIR25, mPgCIR26. Foram testadas diversas temperaturas para amplificação dos *primers* (Tabela 02).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (100 V por 90 min) em géis de agarose a 1,0% (p/v), utilizando-se o tampão de corrida TAE 1X.

As amplificações foram realizadas em Termociclador Modelo PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA, EUA). Para cada *primer*, utilizou-se uma temperatura específica de anelamento (Tabela 02). O programa básico foi constituído por uma denaturação inicial de 94°C por 4 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min; 60°C por 1 min; 72°C por 3 min; e uma extensão final de 7min a 72°C.

#### Análise dos dados

Os dados obtidos a partir da amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código numérico para cada alelo por *loco*. Tal matriz numérica foi desenvolvida, atribuindo-se valores de 1 até o número máximo de alelos no *loco*, como descrito a seguir: para um *loco* que apresenta três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 para as formas homozigotas (A1A1, A2A2 e A3A3) e 12, 13 e 23 para as heterozigotas (A1A2, A1A3 e A2A3). A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados, com o auxílio do programa *GENES* (Cruz, 2008). A análise de agrupamento dos genótipos via dendrograma foi feita por meio do método hierárquico UPGMA (Saitou e Nei, 1987), com auxílio do programa Mega versão 5 (Tamura et al. 2011). As correlações cofenéticas (Sokal; Rohlf, 1962) pelo Programa R (Reis; Ribeiro Junior, 2007). O Pseudo T<sub>2</sub> e Pseudo F, conforme preconizado por Duda e Hart (1973) e Calinski e Harabasz (1974) pelo Programa SAS (Mingoti, 2007).

Os programas *PowerMarker* versão 3.25 (Liu e Muse, 2005) e *Popgene* versão 1.31 (Yeh et al., 1999) foram utilizados para estimar os valores do conteúdo de polimorfismo (PIC), índice de *Shannon-Wiener* (H'), heterozigose esperada (HE) estimada por meio da proporção esperada de heterozigotos sobre acasalamento ao acaso; heterozigose observada (HO) estimada a partir da proporção de heterozigotos observados em um dado *loco*; e o coeficiente de endogamia (*f*). Os genótipos ainda foram avaliados quanto à estruturação

genética. Para tanto, utilizou-se o método bayesiano através do programa *Structure* 2.3.3 (Pritchard et al., 2000). Empregou-se o modelo de presença de mistura (“*admixture model*”) e frequências alélicas correlacionadas, usando-se “*Burnin Period = 1.000*”, seguido de extensão de 10.000 repetições durante a análise. Contudo, para a afirmação do melhor k (número de populações presumidas) gerado pelo *structure*, utilizou-se o programa *Structure Harvester*.

### 3.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 23 iniciadores analisados, oito foram monomórficos (mPgCIR01, mPgCIR02, mPgCIR08, mPgCIR10, mPgCIR14, mPgCIR16, mPgCIR18 e mPgCIR19) e dez polimórficos (mPgCIR03, mPgCIR04, mPgCIR05, mPgCIR09, mPgCIR11, mPgCIR13, mPgCIR22, mPgCIR23, mPgCIR25 e mPgCIR26) e os demais não amplificaram (mPgCIR07, mPgCIR15, mPgCIR20 e mPgCIR21) em nenhuma das temperaturas testadas (Tabela 02). Desses iniciadores, dez (43,47%) revelaram diferença entre os genitores e os híbridos e, portanto, foram utilizados na análise de todos os acessos avaliados neste trabalho. Tais locos SSR geraram um total de 25 alelos SSR, gerando uma média de 2,5 alelos/loco (Tabela 02). Observa-se que o número de alelos por loco encontrado foi próximo do valor mínimo possível, o que está relacionado com a natureza bi-parental dos cruzamentos que originou os híbridos em estudo.

Tabela 01: Frequências dos alelos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub> dos 10 locos microssatélite polimórficos avaliados em genitores e híbridos intraespecífico de *P. guajava* L.

<i>Locos/Alelos</i>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>
mPgCIR03	0,1250	0,8125	0,0625	-
mPgCIR04	0,4062	0,5938	-	-
mPgCIR05	0,2812	0,7188	-	-
mPgCIR09	0,4375	0,5625	0,0312	-
mPgCIR11	0,2818	0,6875	-	0,1875
mPgCIR13	0,3125	0,6875	0,0625	-
mPgCIR22	0,3438	0,6562	-	-
mPgCIR23	0,1250	0,6250	.	-
mPgCIR25	0,1875	0,7188	0,0938	-
mPgCIR26	0,7188	0,2812	-	-

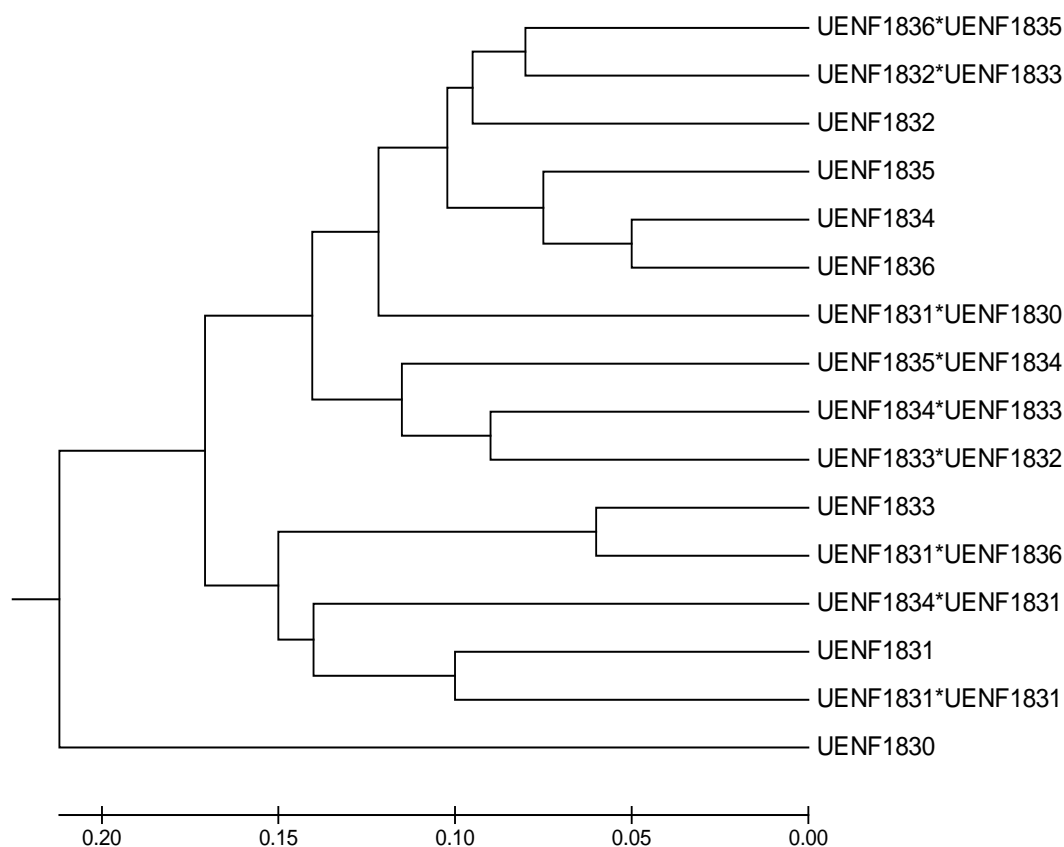
Valdes-Infante et al. (2007) encontraram uma variação de três a sete alelos por *loco* nas análises de acessos de *P. guajava* L. na coleção de germoplasma de Cuba. Neste presente trabalho, também foi encontrada a média de 2,5 de alelos/*loco*. Esperava-se, porém, maior número de alelos/*loco* devido à natureza segregante dos genitores, ou seja, detectou-se divergência genética entre os genitores e os híbridos de goiaba com base na técnica do SSR, Segundo Cruz et al. (2011), é importante dispor de locos polimórficos que apresentam grande quantidade de alelos para que se possa inferir a diversidade de uma população em relação a outra ou dela própria ao longo do tempo, principalmente quando submetida a forças evolutivas que promovam diferenciações.

Utilizando-se o método de agrupamento hierárquico UPGMA, conseguiu-se distinguir os genitores dos híbridos. O ponto de corte do dendrograma, obtido pelo programa SAS através do Pseudo F e Pseudo  $t^2$ , possibilitou a formação de três grupos (Figura 01). O grupo I foi constituído pelas combinações híbridas UENF 1836x UENF1835 a UENF1836, o segundo grupo foi formado pelas combinações UENF1831 a UENF1833 e o terceiro grupo foi formado pelas combinações UENF1831 a UENF 1830 (Figura 01). Embora formados exclusivamente a partir dos perfis moleculares, os três grupos apresentaram algumas características peculiares. A combinação UENF 1831xUENF 1831(S1) ficou próxima do seu genitor UENF 1831, porque esse acesso foi proveniente da autofecundação do genitor UENF 1831. Entretanto, o genitor UENF 1830 ficou distante do seu híbrido UENF 1831xUENF 1830 (Figura 01), estando esses resultados de acordo com o esperado, pois os genitores são divergentes entre si.

Pode-se verificar cruzamentos recíprocos UENF1832xUENF1833 e UENF1833 x UENF1832, entretanto os genótipos apresentaram-se em grupos distintos. Assim se observa a natureza heterozigota e segregante dos genitores. O genitor UENF1832 apresenta ciclo tardio, folhas rugosas e provenientes de estaquia e o genitor UENF1833 apresenta ciclo normal, crescimento horizontal e frutos grandes, entretanto ambos genitores possuem a mesma procedência.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) (Sokal e Rohlf, 1962) obtido no UPGMA foi o máximo (0,7545) em relação aos métodos hierárquicos vizinhos mais próximos (SL) (0,7098) e Ward (0,6571). Pessanha et al. (2011), trabalhando com marcadores RAPD e acessos de *Psidium*, obtiveram estimativa de CCC maior no método de agrupamento UPGMA em relação aos métodos de agrupamento SL e Ward. Segundo Mohammad e Prasanna (2003), quanto maior CCC, menor será a distorção provocada ao agrupar os acessos. Portanto, o método hierárquico UPGMA foi o que melhor explicou a diversidade genética entre os acessos, porque apresentou maior CCC dentro dos métodos hierárquicos.

Figura 01: Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética entre os sete genitores e os nove híbridos de *Psidium* spp. caracterizados por marcadores SSR.



Na busca pela quantificação da diversidade genética dentro de populações, muitas medidas descritivas vêm sendo utilizadas, possibilitando inferir sobre a estrutura da população, além da capacidade informativa e discriminatória das diversas classes de marcadores moleculares no processo de identificação genotípica e análise da diversidade. A partir da análise dos *locos* SSR, verificou-se que a heterozigose esperada ( $H_e$ ) na população variou de 0,3306 a 0,5625, com média de 0,4623, enquanto a heterozigose observada ( $H_o$ ) variou de 0,3750 a 0,8125, com média 0,5875 (Tabela 02). Os valores encontrados de heterozigosidade dos acessos eram esperados e estão relacionados com a origem heterozigótica dos genitores e da resposta  $F_2$  dos híbridos  $F_1$ . Valdes-Infante et al. (2007 e 2010) obtiveram a média de 0,3780 para heterozigosidade/loco, inferior à média encontrada neste trabalho, sendo que, para o loco mPgCIR09, houve maior valor ( $H=0,5455$ ), ao passo que, para o loco mPgCIR10, foi detectado menor valor ( $H=0,0882$ ) no trabalho com germoplasma de goiaba cubano.

Assim como a heterozigiosidade, o conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) também pode ser empregado para quantificar o polimorfismo genético de cada *loco* na população. O maior valor para o PIC foi encontrado para o *loco* mPgCIR 11 (0,8508) e o menor valor para o mPgCIR 04 (0,0025), com média de 0,4234. Os valores do PIC demonstram que o *loco* mPgCIR 11 possui o maior poder discriminatório entre os *locos* analisados, dado corroborado pelo maior número de alelos encontrados para esta região genômica. Cruz et al. (2011) mencionam que quanto maior o número de alelos, mais o valor do PIC se aproximará da heterozigose esperada, ou seja, PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório. Verifica-se, na Tabela 01, que a menor diferença entre PIC e He foi apresentada pelo *loco* mPgCIR 25.

O índice de *Shannon* tem sido empregado em estudos genéticos como medida de diversidade dentro de populações e se assemelha a um índice de riqueza genotípica. Tal índice define que a diversidade será tanto maior quanto mais próximos da unidade forem os valores estimados. Considerando todos os acessos analisados, os valores desse índice variaram de 0,5941 a 1,0408. O valor médio de 0,6952 revelou a existência de moderada variabilidade nesta os genitores e híbridos, porém, suficiente para a continuidade deste programa de melhoramento.

Em programas de melhoramento que visam ao desenvolvimento de cultivares superiores, a análise do coeficiente de endogamia, ou índice de fixação, torna-se um parâmetro de grande importância por permitir mensurar o nível de homozigose e heterozigose na população. Entre os genótipos utilizados neste estudo, os valores dos índices de fixação/*loco* variam de -0,0821 a -0,6842 (Tabela 02), estando próximo ao esperado dada à natureza genética dos mesmos. Contudo, Cruz et al. (2011) afirmam que os valores negativos do coeficiente de endogamia são comuns quando os resultados da heterozigiosidade observada é maior que a heterozigiosidade esperada, sugerindo excesso de *locos* em heterozigose, ou seja, os valores negativos de *f* devem ser interpretados como estimativas de endogamia nula, isto é, na população, não houve cruzamento entre indivíduos aparentados, como se pode observar nos *locos* na Tabela 02.

O coeficiente médio de endogamia computados por individuo foi de 0,2705, sendo que a média dos genitores foi de 0,2190 e para os híbridos intraespecífico foi de 0,2688. O UENF1831\*UENF1831(S1), proveniente de autofecundação

natural, apresentou  $f$  de 0,2430 inferior ao seu genitor UENF1831 ( $f=0,3164$ ), todavia se esperava um aumento de  $f$  na geração 1 após a primeira autofecundação, porém o indivíduo UENF1831 é heterozigoto e se encontra em segregação.

Tabela 02: Caracterização dos dez pares de iniciadores microssatélites utilizados na análise de setes genitores e nove híbridos intraespecíficos de *P. guajava* L.

Loco	Seqüência do primer ((5' → 3')	Ta (°C)	Nº de alelo	Ho	He	$f$	PIC	H'
mPgCIR 03	F:TAGTGCTTTGGTTGCTT R:GCAGGTGGATATAAGGTC	50,7	03	0,3750	0,3306	-0,1707	0,7912	0,6019
mPgCIR 04	F: AGTGAACGACTGAAGACC R: ATTACACATTCAGCCACTT	60,0	02	0,8125	0,4980	-0,6842	0,0025	0,6755
mPgCIR 05	F:CCTTTTTCCCGACCATTACA R: TCGCACTGAGATTTTGTGCT	48,0	02	0,5625	0,4173	-0,3913	0,0725	0,5941
mPgCIR 09	F: TCTAATCCCTGAGTTTC R: CCGATCATCTCTTTCTTT	45,4	02	0,7500	0,5625	-0,5238	0,0402	0,6853
mPgCIR 11	F: TATACCACACGCTGAAAC R: TTCCCCATAAACATCTCT	55,4	03	0,5000	0,4617	0,1179	0,8508	0,7227
mPgCIR 13	F: TGCCCTTCTAAGTATAACAG R: AGCTACAAACCTTCCTAAA	50,7	02	0,5000	0,4435	-0,1636	0,5862	0,6211
mPgCIR 22	F: CATAAGGACATTTGAGGAA R:AATAAGAAAAGCGAGCAGA	50,7	02	0,6875	0,4657	-0,5238	0,0186	0,6435
mPgCIR 23	F: GTCTATACCTAATGCTCTGG R: CCCAGGAAAATCTATCAC	59,5	04	0,6875	0,5726	-0,1268	0,6772	1,0408
mPgCIR 25	F: GACAATCCAATCTCACTTT R: TGTGTCAAGCATACCTTC	60,0	03	0,5625	0,4536	-0,2800	0,3583	0,7731
mPgCIR 26	F: CTACCAAGGAGATAGCAAG R:GAAATGGAGACTTTGGAG	59,5	02	0,4375	0,4173	-0,0821	0,8374	0,5941
			2,5	0,5875	0,46228	-0,28284	0,42349	0,69521

Temperatura de anelamento (Ta), Heterozigose esperada (He), Heterozigose observada (Ho), coeficiente de endogamia ( $f$ ), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e índice Shannon-Wiener (H').

A análise da estrutura dos genitores e dos híbridos intraespecífico também foi realizada com o auxílio do programa *Structure* (Figura 02). O *Structure* é um *software* livre, em que se usam dados multilócos dos genotípicos para investigar a estrutura da população.

A partir dessa análise, foi possível verificar a distinção dos acessos através das cinco cores, tendo os genitores UENF 1835 (codificado como 6) apresentado maior similaridade como o outro genitor UENF1836 (codificado como 7). Verificou-se, também, que o genitor UENF1831 (codificado como 10) e o híbrido originário da autofecundação (codificado como 2) mantiveram-se um pouco distante. Tais resultados confirmam o fato de que os genitores em estudo sejam provenientes de polinização natural, sem controle, sendo, assim, uma população em segregação. Contudo, a afirmação do melhor número de população presumida foi obtida pelo programa *Structure Harvester* (Figura 03); assim, após realizar a análise de k2 a k8

pelo *Structure*, o número  $K=5$  (cinco cores) através do pico do gráfico foi o que melhor explicou a divergência dos materiais em estudo, pois tanto os genitores quanto os híbridos são indivíduos heterogêneos e heterozigotos.



Figura 02: Análise de estruturação genética dos sete genitores e dos nove híbridos de goiaba. Os valores abaixo da figura representam a ordem de aproximação dos acessos.

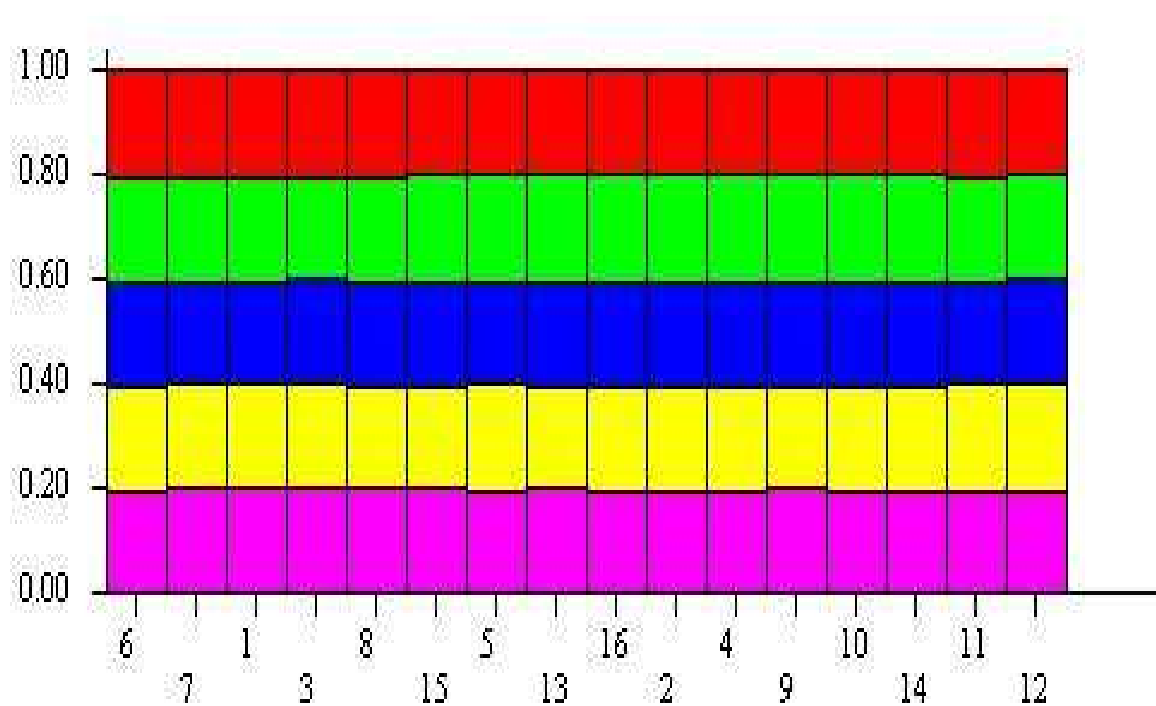
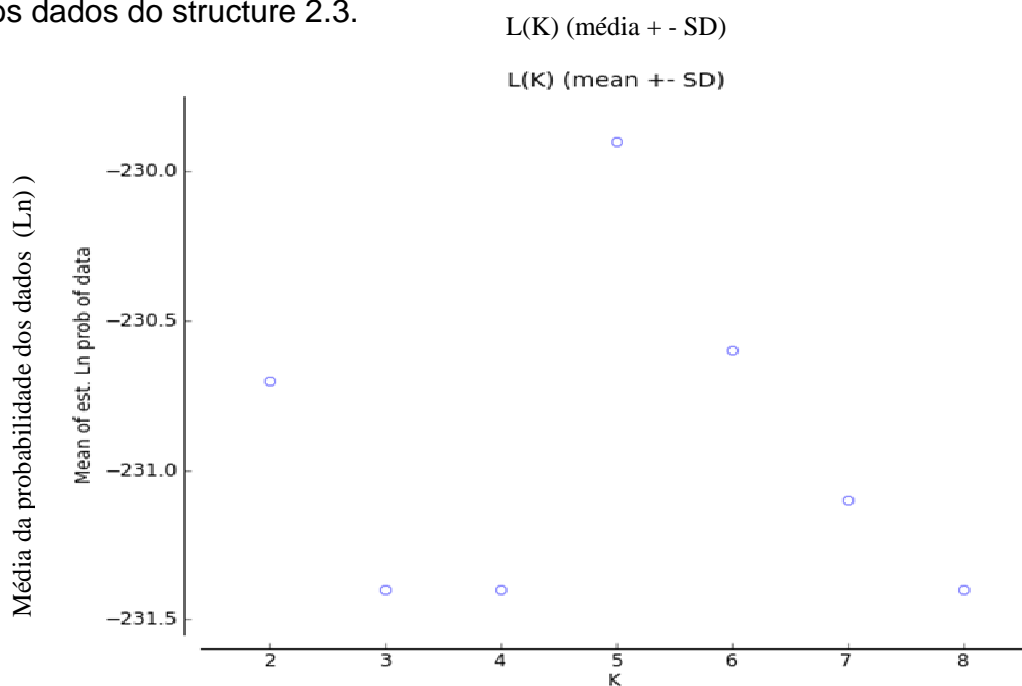


Figura 03: Gráfico obtido pelo programa *structure harvester* a partir das análises dos dados do *structure* 2.3.



Os resultados mostraram que os marcadores moleculares microssatélites SSR foram eficazes em demonstrar a existência da divergência genética entre os genitores e as combinações híbridos de *P. guajava* L., assim como verificar a eficácia dos cruzamentos realizados para a obtenção de novos híbridos e composição de populações segregantes para avaliação e prosseguimento do programa de melhoramento da goiabeira em desenvolvimento na UENF.

### 3.3.6 AGRADECIMENTOS

À UENF, à FAPERJ e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

### 3.3.7 REFERÊNCIAS

- Alves JE and Freitas BM (2007). Requerimento de polinização da goiabeira. *Ciência Rural* 37: 1281-1286.
- Borém A and Caixeta ET (2009). Marcadores moleculares. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Calinski T, Harabasz J (1974) A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics*. 3:1-27.
- Coimbra RR, Miranda GV, Moreira GR, Silva DJH, Cruz CD, Carneiro PCS, Souza LV, Guimarães LJM, Marcasso RC and Caniato FF (2001) Divergência genética de cultivares de milho baseada em descritores qualitativos. In: Anais do Simpósio de Recurso Genético para América Latina e Caribe.
- Cruz CD (2008) Programa GENES: diversidade genética. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Cruz CD (2006) Programa genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Universidade Federal de Viçosa,
- Cruz CD, Ferreira FM, Pessoni L A (2011). Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- Duda RO, Hart PE (1973). Pattern classification and scene analysis. John Wiley & Sons, New York
- Eustice M, Yu Q, Lai CW, Hou S, Thimmapuram J, Liu L, Alam M, Moore PH, Presting GG, Ming R (2008). Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. *Tree Genetics and Genomes*. 4: 333-341.
- Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA/ CENARGEN, Brasília.
- Gupta, PK, Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on Bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.
- Jaiswal U and Jaiswal VS (2005). *Psidium guajava* Guava. In: Biotechnology of Fruit and Nut Crops ( R.E. Litz) CAB International, Cambridge, 394-401.
- Liu K, Muse SV (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 21: 2128–2129.
- Mingoti AS (2007). Análise de dados através de métodos de estatística multivariada. Universidade Federal do Mato Grosso, Belo Horizonte.
- Mohammad AS, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- Pessanha, PGO, Viana AP, Amaral Júnior AT, Souza RM, Texeira MC, Pereira, MG (2011) Avaliação da Diversidade Genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33: 129-136.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Reis GM, Ribeiro JR, J I (2007). Como baixar e instalar o Programa R. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Risturecci AM, Duval MF, Rohde W and Billotte N (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes* 5:745-748.
- Ritter E, Herran A, Valdés-Infante J, Rodríguez-Medina NN, Briceño A, Fermin G, Sanchez-Teyer F, O'Connor-Sanchez A, Muth J, Boike J, Prüfer D (2010). Comparative Linkage Mapping in Three Guava Mapping Populations and Construction of an Integrated Reference Map in Guava. *Acta Horticulturae*. 849:175-182.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.

- Sokal RR, Rohlf FJ (1962). The comparison of dendograms by objective methods. *Taxonomy*.11:33-40.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 10:1093/121.
- Valdes-Infante J, Rodriguez NN, Becker D, Velázquez B, Sourd D, Espinhosa G and Rohde W (2007) Microsatellite Characterization of guava (*Psidium guajava* L) Germoplasm Collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28: 61-67
- Valdés-Infante J, Rodríguez NN, Velásquez B, Rivero D, Martínez F, Espinosa G, Risterucci AM, Billotte N, Becker D, Rohde W (2010). Simple Sequence Repeats (SSRs) for Diversity Characterization of Guava (*Psidium guajava* L.) *Acta Horticulturae*. 849:152-162.
- Wang J (1997). Effective size and F-statistics of subdivided populations. I. Monoecious species with partial selfing. *Genetics*. 46:1453-1463
- Yeh FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Xiyun JM (1999) *POPGENE*. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Version 1.31, Manual.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor do fruto de goiaba do mundo. Porém, observa-se um declínio nos últimos anos na área e na produção nacional da goiabeira, principalmente no Nordeste devido ao parasitismo do nematóide (*Meloidogyne enterolobii*), que predispõe a goiabeira à podridão radicular causada pelo fungo (*Fusarium solani*), doença complexa, chamada "declínio da goiabeira". Em geral, as melhores chances de sucesso no controle dos nematóides estão no uso de materiais resistentes, os quais podem ser obtidos pelo melhoramento genético. O programa de genética e melhoramento da goiabeira necessita de informações básicas para o desenvolvimento de novas cultivares superiores e resistentes às principais doenças e pragas. Assim, há necessidade de mais pesquisas em análises citogenéticas como níveis de ploidia das espécies de *myrtaceae*, viabilidade polínica dos grãos de pólen; diversidade entre espécies e divergência entre genótipos; além de desenvolvimento de novos iniciadores moleculares para se desenvolver materiais superiores e resistentes. Assim, nesta pesquisa, teve-se por objetivo iniciar um programa de Melhoramento Genético para a Cultura da Goiaba na UENF, visando à obtenção de variedades resistentes ao nematóide, assim como novas variedades comerciais com atributos superiores.

Os três trabalhos, aqui apresentados, permitiram detectar a diversidade genética dos genótipos de goiaba do Norte e Noroeste Fluminense. No primeiro trabalho, utilizaram-se iniciadores de RAPD para a avaliação da diversidade

genética em acessos de *Psidium* ssp. , cujo objetivo foi estudar a diversidade genética entre genótipos de goiabeira e araçá-do-campo, via marcadores moleculares RAPD, para o direcionamento de cruzamentos e obtenção de novas variedades. Os resultados deste trabalho mostraram que os marcadores moleculares RAPD foram eficazes em relevar a existência de diversidade genética entre os vinte acessos de *Psidium* spp. , e o método de agrupamento hierárquico UPGMA foi o que melhor demonstrou a diversidade genética dos acessos neste trabalho.

O estudo do comportamento meiótico da espécie *Psidium guajava* L. , onde se avaliou o comportamento meiótico, estimou o Índice Meiótico e a viabilidade polínica dos acessos de goiabeira. Conclui-se que os botões florais de goiabeira e araçá apresentaram viabilidade polínica superior a 90%; a solução tripla de Alexander foi eficaz para a avaliação da viabilidade dos grãos de pólen da goiabeira e pode ser recomendada quando se desejar rapidez para acessar a viabilidade dos grãos de pólen dessas espécies e, além disso, os resultados demonstram que as irregularidades presentes na meiose não comprometeram a viabilidade dos genótipos de goiaba.

Os marcadores moleculares microssatélite foram utilizados para estimar a diversidade de sete genitores e nove híbridos intreespecífico de goiaba, contudo, os objetivos deste trabalho foram estimar o potencial dos marcadores microssatélites em detectar polimorfismo entre pais e híbridos de goiabeira; realizar a caracterização genética, buscando estimar índices genotípicos para a quantificação e estruturação da variabilidade genética e estimar o nível de endogamia nos materiais genéticos estudados. Com base nos resultados deste trabalho, pode-se afirmar que os marcadores moleculares SSR foram eficazes em relevar a existência da diversidade genética entre genitores e os híbridos de *P. guajava* L., assim como verificar a eficácia dos cruzamentos realizados para a obtenção de novos híbridos e composição de populações segregantes para avaliação e prosseguimento do programa de melhoramento da goiabeira ora em desenvolvimento na UENF.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Tech*, 44: 111-122.
- Allard, R. W. (1960) *Princípios do Melhoramento Genético de plantas*. São Paulo, Melhoramentos.
- Alves, J. E., Freitas, B. M. (2007) Requerimento de polinização da goiaberia. *Ciência Rural*, 37(5) 1281-1286.
- Alves, J. E. (2000) Eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas na polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.). 140f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará.
- Amaral Júnior, A. T., Thiébaud, J. T. L. (1999) *Análise Miltvariada na avaliação da diversidade genética em recursos genéticos vegetais*. Apostila: CCTA – Uenf, 55p.
- Balasubrahmanyam, V. R. (1959) Studies on blossom biology of guava. *Indian Journal of Horticulture*, 16: 69-75.
- Beardsell, D. V.; O'Brien, S.P.; Williams, E. G.; Knox, R. B., Calder, D. M. (1993). Reproductive biology of Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany* 41: 511-526.

- Bellon, G., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., Junqueira, K. P., Jungueira, N. T. V., Fonsceca, K. G., Braga, M. F. (2009) Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivares e silvestres de maracujazeiros-doce com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31 (1): 197-202.
- Borém, A., Caixeta, E. T. (2009). *Marcadores moleculares*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Borém, A. (1999). *Melhoramento de Espécies Cultivadas*. ed. Viçosa, UFV. 679-714 p.
- Borém, A., Miranda, G. V. (2005) *Melhoramento de plantas*. 4ed. Viçosa: UFV 552p.
- Boti, J. B. (2001). Polinização entomófila da goiabeira (*Psidium guajava* L., Myrtaceae): Influência da distância de fragmentos florestais em Santa Teresa, Espírito Santo. 57f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) -Universidade Federal de Viçosa.
- Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B., Brito, G. G., Sakiyama, N. S. (2006) Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A., Ciaxeita, E. T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, p. 9-78.
- Calinski, T, Harabasz, J (1974) A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics*, 3:1-27.
- Caraballo, B. M. (2001) Biología floral del guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo, Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 18: 41-55.
- Coimbra, R. R., Miranda, G. V., Moreira, G. R., Silva, D. J. H., Cruz, C. D., Carneiro, P. C. S, Souza, L. V., Guimarães, L. J. M., Marcasso, R. C., Caniato, F. F. (2001) Divergência genética de cultivares de milho baseada em descritores qualitativos. In: Anais do Simpósio de Recurso Genético para América Latina e Caribe.



- Corrêa, M. G. S., Viegas, J., Silva, J. B. da, Ávila, P. F. V. de, Busato, G., Lemes, J. S. (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Botânica Brasileira*, 19(2): 295-303.
- Costa, I. R., Dornelas, M. C., Forni-Martins, E. R. (2008) Nuclear genome size variation in fleshy-fruited neotropical myrtaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 276 (3): 209-217.
- Costa, I. R. da, Forni-Martins, E. R. (2007) Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155, 571-580.
- Cruden, R. W. (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants *Evolution*, March, 31: 32-46p.
- Cruz, C. D. (2006) Programa genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Cruz, C. D., (2008) Programa GENES: diversidade genética. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Cruz, C. D., Ferreira, F. M, Pessoni L A (2011). Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Cruz, C. D. (2006) *Programa genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.
- Cruz, C. D., Carneiro, P. C. S. (2004) *Modelos bimétricos aplicados ao melhoramento de genético*. Viçosa: UFV, 585p.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J. (2001) *Modelos bimétricos aplicados ao melhoramento de genético*. Viçosa: UFV, 390p.
- Dafni, A. (1992). Pollination ecology – a practical approach. New York: Orford University Press Inc., 250p.

- Damasceno Júnior, P. C., Pereira, T. N. S., Silva, F. F., Viana, A. V., Pereira, M. G. (2008). Comportamento floral de híbridos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) avaliados no verão e na primavera. *Ceres*, 55(4): 310-316.
- Dasarathy, T. B. (1951). The guava. *Madras Agriculture Journal*, 38: 521-527.
- Defani-Scoarize, M. A., Pagliarini, M. S., Aguiar, C.G. (1996) Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Nucleus* 39:10-18.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. J. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Duda, R. O.; Hart, P. E. (1973) *Pattern classification and scene analysis*. John Wiley & Sons: New York, p.189–225.
- Eder-Silva, E., Felix, L. P., Bruno, R. de L. A. (2007). Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29 (1): 110-114.
- Eustice, M., Yu, Q., Lai, C. W, Hou, S., Thimmapuram, J., Liu, L., Alam, M., Moore, P. H., Presting, G. G., Ming, R. (2008). Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. *Tree Genetics and Genomes*. 4: 333-341.
- Ercislin, S. Agar, G. Yildirim, Duralija, B., Vokurkas, Karlidag, H. (2011) Genetic diversity in wild sweet cherries (*Prunus avium*) in Turkey revealed by SSR markers. *Genetics and Molecular Research* 10 (2): 1211-1219.
- Faegri, K., Pijl, L. van der. (1979). The principles of pollination ecology. Oxford, Pergamon Press.
- Falconer, D. S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos da Silva. Viçosa: UFV, 279p.

- Ferriera, M. E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ed. Brasília: EMBRAPA/ CENARGEN, 220p.
- Fedorov, A. A. (1969) Kromosomnye chisla tsvetkovykh rastenii. *Chromosome numbers of flowering plants*. Leningrad: Komarov Botanical Institute.
- Fernandes-Santos, C. A., Cunha-Castro, J. M., França-Souza, F., Alcantra-Vilarinho, A., Ferreira, F. R., Gomes-Pádua, J., Estigarriba-Borges, R. M., Barbieris, R. L., Claret de Souza, A. D, G., Amorin-Rodrigues, M. (2010) Prospecting and Morphological Characterization of Brazilian *Psidium* Germplasm. *Acta Hort* 849: 63-68.
- Franco, J.; Crossa, J.; Villasenõr, J.; Taba, S. (1998). Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, 38: 1688-1696.
- Frankel, R., Galun, E. (1977) *Pollination mechanisms, reproduction, and plant breeding*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Free, J. B. (1993) *Insect pollination of crops*. 2.ed. London: Academic. 684p.
- Freitas, B. M. (1995). The pollination efficiency of foraging bees on apple (*Malus domestica* Borkh) and cashew (*Anacardium occidentale* L.). 197p. Tese (PhD em Apicultura e Polinização) - University of Wales.
- Freitas, B. M.; Paxton, R. J. (1996). The role of wind and insects in cashew (*Anacardium occidentale* L.) pollination in NE Brazil. *Journal of Agricultural Science*, 126: 319-326.
- Freitas, L. B., Bered, F. (2003) *Genética e Evolução vegetal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 463p

- Gepts, P. (2006) Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Science*, 46: 2278-2292.
- Gepts, P. (1988) Phaseolin as an evolutionary marker. In: Gepts, P. (org) *Genetic resources of Phaseolus beans*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, 215-241.
- Goldblatt, P. (1985) *Index to plant chromosome numbers*. Missouri Botanical Garden. St. Louis, 1982-1983.
- Gomes filho, A.; Oliveira, J.O.de; Viana, A.P.; Siqueira, A.P. de O.; Oliviera, M.G.; pereira, M.G. (2010) Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, 32 (4):627-633.
- Gomes. V. M. (2007). Meloidoginose da goiabeira: estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença a campo. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF- 67p.
- Gonçalves, L. S. A. (2007) Estimativa da divergência genética entre acessos de tomateiro por marcadores RAPD. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF- 65p.
- Gonçalves, L. S. A.; Rodrigues, R.; Amaral Júnior, A. T.; Karasawa, M.; Sudré, C.P.; (2008) Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, 7(4):1289-1297.
- Gonçalves, L. S. A.; Rodrigues, R.; Amaral Junior, A.T. do; Karasawa, M. ; Sudre, C.P. (2009). Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based

on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, 8 (1) 364-374.

Gower, J. C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties, *Biometrics*, Hoboken, 27: 857–874.

Guerra, M. (1988) *Introdução à Citogenética Geral*, ed. Koogan,

Guerra, M., Souza, M. J. (2002) Como observar cromossomos: Um guia de práticas em citogenética vegetal, animal e humana. ed. Funpec.

Gupta, P. K, Varshney, R. K. (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on Bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.

Hallauer, A. R.; Miranda Filho, J. B. (1981) *Quantitative genetics in maize breeding*. Ames:Iowa State University Press, p.468.

Heard, T. A. (1999) *The role of stingless bees in crop pollination*. Annual Review of Entomology, 44: 83-206.

Hedstrom, I. (1988). Pollen carriers and fruit development of *Psidium guajava* L. Hedstrom, I. (1988). Pollen carriers and fruit development of *Psidium guajava* L (Myrtaceae) in the Neotropical region. *Revista de Biologia Tropical*, 36 (2B): 551–553.

Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. (1970). Evolution of pollen viability by enzymatical induced fluorescerence, intracelular hydrolysis of flurescein diacetate. *Stain Technol.*, 45: 115-120.

Heun, M. Schafer-Pregi, R., Klawn, D., Castagna, R., Accerbi, M. Borghi, B., Salamini, F. (1997) Site of einkom wheat domenstication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278: 1312-1314.

- Hirano, R. T.; Nakasone, H. Y. (1969) Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 94 (2):83-86.
- Horne, H. T., Palemer, R. G. (1995). Mechanisms of genec male sterility. *Crop Science*,35(6): 1527-1535.
- IBGE. (2010) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acessado em 4 de julho de 2011.
- Jaiswal, U., Jaiswal, V. S. (2005). *Psidium guajava* Guava. In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops* ( R.E. Litz) CAB International, Cambridge, 394-401.
- Jesus, O. N. de, Ferreira, C. F., Silva, S. de O., Câmara, T. L. S., Pestana. K. N. (2009). Characterization of recommended banana cultivars using morphological molecular descriptors. *Crop Breeding Applied Biotechnology*. 9:164-173.
- Jones, G. D., Jones, S. D. (2001). The uses of pollen and its implication for entomology Neotropical. *Entomology* 30(3): 341-350.
- Karatas, H. Agaoglu, Y. S. (2010) RAPD analysis of selected local Turkish grape cultivars (*Vitis vinifera*). *Genetics and Molecular Resaerch* 9(4):1980-1986.
- Knox, R. B. (1984). The pollen grain. In: Johri, B. M. (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Heidelberg, 197-271p.
- Kodoru, P. R. K., Rao, M. K. (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theoretical and Applied Genetics* 59:197-214.
- Kumar, S.; Dudley, J.; Nei, M.; Tamura, K. (2008) Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics, Oxford*, 9: 299-306.
- Lipitre, V., Nansoti, G., Grangeoni, R., Pomies, V., Rivallan, R., Rosterucci, A. M., Váldez-Infante, J., Rodríguez-Medina, N. N., Muth, J. ,Boike, J. ,Prüfer, D.,

- Becker, D., Rohde, W., Ritters, E., Billotte, N. (2010). The Microsatellite (SSR)/AFLP Reference Linkage Map of Guava. *Acta Hort* 849: 183-192.
- Liu, K.; Muse, S.V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 21: 2128–2129.
- Liviero, L., E. Maestri, M. Gulli, E. Nevo, N. Marmioli (2002). Ecogeographic adaptation and genetic variation in wild barley, application of molecular markers targeted to environmentally regulated genes, *Genet. Resources and Crop Evol.*, 49, 133–144.
- Loguercio, A. P., Battistin, A. (2004) Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul – Brasil. *Revista da FZWA* 11(1): 95-106.
- Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, 43:72-76.
- Lughadha, E. N., Proença, C. (1996). A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 480-503.
- Manica, I. (2000) *Frutas nativas, silvestres e exóticas* 1. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora. 327p.
- Matsuaka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez, G.J., Buckler, E., Doebley, J. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl. Acad. Sci.* 99: 6080-6084.
- Medina, J. C. (1988). Goiaba I – Cultura. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, SP). *Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos*. ed. 2 rev. ampl. Campinas: ITAL, 1-120p.
- Michener, C. D. (1979). Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66: 277-347p.

- Milach, S. C. K. (1998). Principais Tipos de Marcadores e suas Características. In: Milach, S. *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre: S. C. K. Milach, p. 17-28.
- Mingoti, A. S. (2007). *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada*. Universidade Federal do Mato Grosso, Belo Horizonte.
- Mingoti, S. A. (2005) Análise de agrupamento (cluster) In: *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada*. UFMG, p.155-211.
- Miranda, G. B., Souza, R. M., Viana, A. P. (2011) Assessment of methods and criteria for Screening *Psidium* spp. for resistance to *Meloidogyne enterolobii*. *Nematologia Brasileira*, 34: 211-219.
- Mitra, S. K. (2010) Important *Myrtaceae* Fruit Crops. *Acta Hort* 849: 33-38.
- Mohammad, A. S., Prasanna, B. M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Muñoz, A. M., Caetano, C. M., Vallejo, F. A., Sanchez, M. S. (2006). Comportamiento meiótico y descripción morfológica del pólen de pronto alivio. Bogotá. *Acta Agronomica*, 1: 1-9.
- Oliveira, M. S. P., Maués, M. M., Kalume, M. A. (2001) Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de Açaizeiro. *Acta botânica Brasileira* 15(1):27-33.
- Oliveira, M. G., Oliveira, J. G. de, Gomes Filho, A., Pereira, M.G., Viana, A. P., Souza Filho, G. A. de, Lopes, G. E. M. (2009) Diversidade genética de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.), tlizando marcadores moleculares



- RAPD e características morfoagronômicas. *Revista Brasileira de fruticultura*, 31(1): 162-170.
- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Vieira, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- Padilha-Ramírez, J. S., González-Gaona, E., Esquivel-Villagrana, F., Mercado-Silva, E., Hernandez-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. (2002). Caracterización de Germoplasma Sobresaliente de Guayabo de Lá Región. *Rev. Fitotec. Mex.* 24 (4): 393-399p.
- Paton, D.C. (1993). Honeybees in the australian environment. Does *Apis mellifera* disrupt or benefit the native biota. *Bioscience* 43(2): 95-103.
- Pereira, F. O. M., Souza, R. M., Souza, P. M., Dolinski, C., Santos, G. K. (2009). Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogybe mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 33(2): 176-181.
- Pereira, F. M. (1995). *Cultura da Goiabeira*. Jaboticabal, SP: Funep. 47p.
- Pereira, F. M., Natchtigal, J. C. (2003). Goiabeira. In: *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*, C. H. Brucker, ed. Viçosa, UFV. 267-289p.
- Pereira, J. O. P.; Freitas, B. M. (2002.) Estudo da biologia floral e requerimentos de polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). *Ciência Agronômica*, 33: 55-60.
- Pessanha, P. G. O., Viana, A. P., Amaral Júnior, A. T., Souza, R. M., Texeira, M. C., Pereira, M. G. (2011) Avaliação da Diversidade Genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33: 129-136.
- Picoli, E, A, T., Carvalho, C. R., Fári, M., Otoni, W. C. (2003) Associação de fases meióticas e estágio dos micróscoporo com características morfológicas de botões florais de pimentão. *Ciência e Agrotecnologia* 27(3): 708

- Pommer, C. V., Murakami, K. R. N., Watlington, F. (2006) Goiaba no mundo. *O Agrônômico*, 22-26p.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Proença, C., Gibbs, P. E. (1994). Reproductive biology of eight sympatric Mirtaceae from Central Brazil. *New Phytologist* 126: 343-354.
- Queiroz, V. A. V., Berbert, P. A., Molina, M. A. B. de, Gravina, G. de A., Queiroz, L. R. Silva, J. A. da. Qualidade nutricional de goiabas submetidas aos processos de desidratação por imersão-impregnação e secagem complementar por convecção. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. 28 (2): 329-340.
- Rallo, P.; Dorado, G.; Martín, A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101:984-989.
- Ramos, H. C. C., Pereira, M. G., Silva, F. F., Gonçalves, L. S. A., Pinto, F. O., Souza Filho, G. A. de. (2011). Genetic characterization of papaya plants (*Carica papaya* L.) derived from the first backcross generation. *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 393-403.
- Rao, R. C. (1952) Advanced statistical methods in biometric research. New York: John Wiley, 390p.
- Rao, V. R. Riley, K. W. (1994) The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97:3-20.
- Ray, P. K. (2002) Guava. In: *Breeding Tropical and Subtropical Fruits*. Springer, New Delhi. p.143-154.

- Reis, G. M, Ribeiro, J. R, J. I. (2007). *Como baixar e instalar o Programa R*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Risturecci, A. M., Duva, I. M. F., Rohde, W., Billotte, N. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes* 5:745-748.
- Ritter, E., Herran, A., Valdés-Infante, J., Rodríguez-Medina, N. N., Briceño, A., Fermin, G., Sanchez-Teyer, F., O'Connor-Sanchez, A., Muth, J., Boike, J., Prüfer, D. (2010). Comparative Linkage Mapping in Three Guava Mapping Populations and Construction of an Integrated Reference Map in Guava. *Acta Horticulturae*.849:175-182.
- Rodríguez, N., Valdés-Infante, J., Becker, D., Valázquez, B., González, G., Sourdi, D., Rodríguez, Billotte, N., Ristterucci, A. M., Ritter, E., Rohde, W. (2007). Characterization of guava accessions by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. *Acta hort.* 735: 201-216.
- Roulston, T. H., Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematic and Evolution*, 222 (1-4): 187-209p.
- Saavedra, G., Spoor, W. (2002) Genetic base broadening in autogamous crops: *Lycopersicon esculentum* Mill. As a Model. *Managing Plant Genetic Diversity*. 443:292-299.
- Saiki, R. k., Scharf S., Faloona F., Mullis, K. B., Horn, G. T. Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1400.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.

- Sawazaki, H. E., Borbosa, W., Colombo, C. A. (2002) Caracterização e identificação de cultivares e seleção de pereiras através de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(2): 447-452.
- Saxena, S.; Chandra, R.; Srivastava, A. P.; Mishra, M.; Pathak, R. K.; Ranade, S. A. (2005) Analysis of genetic diversity among papaya cultivars using Single Primer Amplification Reaction (SPAR) methods. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80: 291-296.
- Schifino-Wittmann, M.T., Dall'Agnol, M. (2001) Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. *Ciência Rural*, 31(1): 169-175.
- Seth, J. N. (1960) Varietal cross-incompatibility in guava (*Psidium guajava* L.). *Horticulture Adversity*, 4: 161-164.
- Silva, A. L. G., Pinheiro, M. C. B. (2007). Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botânica Brasileira*, São Paulo, 21(1): 235-247.
- Silva, E. F. da, Martins, L. S. S., Oliveira, V. R. de (2009) Diversity and genetic structure in cajá tree (*Spondias mombin* L.) populations in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31 (1): 171-181.
- Singh, R. J. (1993). *Plant cyhtogenetics*. United States: CRC Press. Inc., 361p.
- Singh, R.; Sehgal, O. P. (1968). Studies on the blossom biology of *Psidium guajava* L. (guava); 2, Pollen studies stigmatal receptivity pollination and fruit set. *Indian Journal of Horticulture*, 25: 52-59.
- Sokal, R. R, Rohlf, F. J. (1962). The comparison of dendograms by objective methods. *Taxonomy*.11:33-40.
- Spooner D; Van Treuren R; De Vicent MC 2005. Molecular markers for genebank management. *IPGRI*. Disponível em <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/1082.pdf>. Acessado em 12 de junho de 2011 (Technical Bulletin No. 10).

- Soubiê Sobrinho, J.(1951) Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (*Psidium guajava* L). 1951. 166f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – ESALQ.
- Soubiê Sobrinho, J.; Gurgel, J. T. A. (1962). Taxa de panmixia na goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Bragantia*, 21(2): 15-20.
- Souza, M. M. de, Pereira, T. N. S., Martins, E. R. (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*). *Ciências agrotecnica*, 26 (6):1209-1217.
- Souza, M. M., Martins, E. R., Pereira, T. N. S., Oliveira, L. O. (2006) Reproductive studies on Ipecac (*Cephaelis ipecacuanha (BROT) A. Rich., Rubiaceae*). Meiotic behavior and pollenviability. *Brazilian Journal of Biology* 66(1): 151-159.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Rodrigues, R., Dutra, G. A, Sudré, C. P. (2000) Irregularidades meiótica em pimenta. *Horticultura Brasileira* (18): 748-749.
- Souza, M. M., Viana, A. P., Pereira, T. N. (2010) A putative mutant of self-compatible yellow passion fruit with the corona color as a phenotypic marker. *Bragantia*, 69 (1): 9-16.
- Sudré, C. P; Cruz, C. D; Rodrigues, R; Riva, E. M; Amaral Júnior, A. T; Silva, D. J. H; Pereira, T. N. S. (2006) Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. *Horticultura Brasileira*, 24:88-93.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher ,G., Nei, M., Kumar, S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 10:1093/121.
- Tanksley, S. D., McCouth, S. R. (1997) Seed Banks molecular maps: unlocking genetic from the wild. *Science*, 227:1063-1066.

- Tecchio, V. H., Davide, L. C., Pereira, A. V., (2006) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (*Poaceae*, *Poales*) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2): 353-362.
- Towill, L. E., Walters, C. (1988). Cryopreservation of pollen. In: *International Plant Genetic Resources Institute. Cryopreservation of tropical plant germplasm Current research progress and applications*, 115-129p.
- Valdes-Infante, J., Rodriguez, N. N., Becker, D., Velázquez, B., Sourd, D., Espinhosa, G., Rohde, W. (2007) Microsatellite Characterization of guava (*Psidium guajava* L) Germoplasm Collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28: 61-67
- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N. N., Velásquez, B., Rivero, D., Martínez, F., Espinosa, G., Risterucci, A. M., Billotte, N., Becker, D., Rohde, W. (2010). Simple Sequence Repeats (SSRs) for Diversity Characterization of Guava (*Psidium guajava* L.) *Acta Horticulturae*, 849:152-162.
- Vaughton, G. (1996). Pollination disruption by European honeybees in the Australian bird-pollinated shrub *Grevillea barklyna* (*Proteaceae*). *Plant Systematic and Evolution*, 200: 89-100.
- Viana, J. M. S., Cruz, C. D., Barros, E. G. de (2003) *Genética*. ed. 2, Viçosa: UFV. 25-30p.
- Vieira, E. A.; Fialho, J. F.; Faleiro, F. G.; Fukuda, W. M. G.; Junqueira, N. T. V. Variabilidade genética para caracteres morfológicos entre acessos do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados (2005). In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA*, 11., Campo Grande-MS, 2005, CD-ROM.
- Villanueva-G., R. (2002). Polliniferous plants and foraging strategies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Yucatán Peninsula, México. *Revista de Biología Tropical*, 50(3/4): 1035-1044p.

- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M. R. (2007) Heat tolerance in plantas: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 99-223.
- Wang, Z.; Weber, J. L.; Zhong, G.; Tanksley, S. D. (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 88:1–6.
- Wang, J. (1997). Effective size and F-statistics of subdivided populations. I. Monoecious species with partial selfing. *Genetics*. 46:1453-1463
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.
- Willians, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J.A., Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Yeh, F. C, Boyle, T., Rongca, Y., Ye, Z., Xiyang, J. M. (1999) *POPGENE*. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Version 1.31, Manual.
- Yu, S. B., Xu, W. J., Vijayakumar, C. H. M., Ali, J., Fu, B. Y., Xu, J. L., Jiang, Y. Z. Marghirang, R., Domingo, J., Aquino, C., Virmani, S. S., Li, Z. K. (2003) Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the international Rice molecular breeding program. *Theor. Appl. Genet.* 108:131-140.
- Zimback, L., Barbosa, W., Mori, E. S., Veiga, R. F. A. (2003). Caracterização e identificação das cultivares de pessegueiro tropical e douradão através de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25 (2): 352-354.