

ASPECTOS REPRODUTIVOS DA GOIABEIRA (*Psidium guajava*) E  
DE ARAÇAZEIROS (*Psidium guineense* E *Psidium cattleyanum*)  
VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES

**MARIA LORRAINE FONSECA OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2018

ASPECTOS REPRODUTIVOS DA GOIABEIRA (*Psidium guajava*) E  
DE ARAÇAZEIROS (*Psidium guineense* E *Psidium cattleianum*)  
VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES

**MARIA LORRAINE FONSECA OLIVEIRA**

“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<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

055/2018

O48 Oliveira, Maria Lorraine Fonseca.

Aspectos reprodutivos da goiabeira (*Psidium guajava*) e de araçazeiros (*Psidium guineense* e *Psidium cattleyanum*) visando o desenvolvimento de cultivares / Maria Lorraine Fonseca Oliveira. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

110 f. : il.

Bibliografia: 81 – 97.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientadora: Telma Nair Santana Pereira.

1. Razão pólen:óvulo. 2. Viabilidade Polínica. 3. Receptividade do Estigma. 4. Crescimento do Tubo Polínico. 5. Diversidade Genética. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.421

ASPECTOS REPRODUTIVOS DA GOIABEIRA (*Psidium guajava*) E  
DE ARAÇAZEIROS (*Psidium guineense* E *Psidium cattleyanum*)  
VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES

**MARIA LORRAINE FONSECA OLIVEIRA**

“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.”

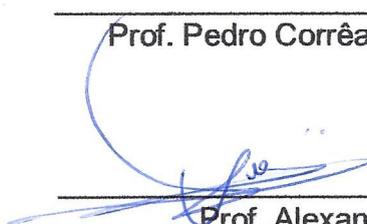
Aprovada em 21 de fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:



---

Prof. Pedro Corrêa Damasceno Junior (D.Sc., Genética e Melhoramento de  
Plantas) – UFRRJ



---

Prof. Alexandre Pio Viana (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF



---

Dr.ª. Elba Honorato Ribeiro (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF



---

Prof.ª. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF  
(Orientadora)

## **DEDICATÓRIA**

Às pessoas que transformaram meu sonho no delas, meus pais, Shandra e Alvane, e à minha irmã Lorenza.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus, a quem mais recorri nos piores momentos e aonde fui pedir força para terminar essa caminhada.

À minha mãe Shandra, irmã Lorenza e pai Alvane, são eles os maiores motivadores das minhas batalhas e torcedores da minha vitória. Obrigada por sempre me apoiarem, me ouvirem e por nunca me deixarem desistir. Obrigada por serem minha fortaleza, por sempre estarem presentes, por sempre estarem disponíveis pra mim. Amo vocês.

Ao meu namorado Douglas, que sempre me ouviu, me apoiou e acreditou em mim, mais até do que eu mesma. Obrigada pela paciência, atenção e por sempre estar disponível para me ajudar. Obrigada pela paz que me passa e pela confiança de que tudo dará certo.

Às minhas avós, em especial, à vovó Nenir, que tanto acredita em mim.

Aos meus amigos de república, Ingrid, Rodrigo, Leesi e Flor. Obrigada por sempre me ouvirem, me deixarem reclamar (pelo menos 1 semana antes dos grandes dias) e me apoiarem. Obrigada por discutirem meus dados enquanto fazemos almoço, por me ajudarem a distrair quando estava mais tensa, mesmo que fosse jogando Pokémon ou ir dar uma voltinha no supermercado. Obrigada pelo companheirismo e gargalhadas nesses dois anos, vocês foram muito importantes.

Às minhas amigas de laboratório, que viraram amigas da vida, Larissa, Nadia e Sara, Hellen e Milene. Sem vocês esses quatro anos seriam mais árduos.

À minha orientadora, professora Telma, que sempre acreditou em mim, puxou minha orelha quando necessário e me apoiou. Ela foi uma verdadeira mãe científica, obrigada por toda a ajuda para conseguir realizar meu sonho de ser doutora.

A todos os mestres que me passaram seus conhecimentos sem medir esforços para me fazer entender um pouco mais sobre genética e melhoramento de plantas, em especial, ao professor Messias, professor Alexandre, professor Gravina, professora Rosana, professor Amaral e professor Gonçalo.

Aos membros da banca que se dispuseram a ler a tese e fazerem valiosas considerações.

Ao secretário Daniel, que sempre está disponível para tirar dúvidas e ajudar da forma que pode.

Aos meus amigos Aline, Andrea, Mariana, Thainá, Predro, Jayme e Natiele, que sempre entenderam minhas ausências. Obrigada pela amizade e por sempre se fazerem presentes.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense e à CAPES, pela oportunidade para fazer o doutorado e pela bolsa de estudo.

E a todos que de alguma forma me ajudaram a realizar o sonho de ser doutora.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1. Objetivos específicos.....	3
3. CAPÍTULOS.....	4
3.1. REPRODUÇÃO PREFERENCIAL EM <i>Psidium</i> spp. PELA INTERPRETAÇÃO DA RAZÃO PÓLEN:ÓVULO.....	4
3.1.2 REVISÃO.....	6
3.1.2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Psidium</i> .....	6
3.1.2.1.1 A goiabeira <i>Psidium guajava</i> .....	7
3.1.2.1.2 Os araçazeiros- <i>Psidium cattleyanum</i> e <i>Psidium guineense</i> .....	8
3.1.2.2 Aspectos fenológicos de <i>P. guajava</i> , <i>P. cattleyanum</i> e <i>P. guineense</i> ..	9
3.1.2.3 Importância econômica.....	11
3.1.2.4 Modo de reprodução.....	13
3.1.2.5 Metodologia da razão pólen:óvulo (P:O).....	15
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1.3.1 Material Vegetal.....	17
3.1.3.2 Características avaliadas.....	18
3.1.4. RESULTADOS.....	20
3.1.5. DISCUSSÃO.....	24

3.1.6. CONCLUSÃO .....	27
3.2. AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO <i>IN VIVO</i> DOS GRÃOS DE PÓLEN EM TRÊS ESPÉCIES DE <i>Psidium</i> spp. ....	28
3.2.1. INTRODUÇÃO .....	28
3.2.2. REVISÃO .....	30
3.2.2.1. Viabilidade polínica.....	30
3.2.2.2. Receptividade do estigma .....	33
3.2.2.3. Análise de autoincompatibilidade pela germinação do grão de pólen <i>in vivo</i> .....	34
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2.3.1. Material Vegetal.....	36
3.2.3.2. Viabilidade polínica e receptividade do estigma .....	37
3.2.3.3. Teste de germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico <i>in vivo</i> .....	38
3.2.3.4. Análise estatística.....	39
3.2.4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	40
3.2.4.1. Análise da viabilidade polínica e receptividade do estigma.....	40
3.2.4.2. Germinação e crescimento do tubo polínico <i>in vivo</i> .....	47
3.2.5. CONCLUSÃO .....	53
3.3. ESTUDO DA DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Psidium</i> spp. ( <i>P. guajava</i> , <i>P. guineense</i> e <i>P. cattleyanum</i> ) BASEADO EM CARACTERES REPRODUTIVOS .....	54
3.3.1. INTRODUÇÃO .....	54
3.3.2. REVISÃO .....	56
3.3.2.1. Melhoramento de <i>Psidium</i> spp. ....	56
3.3.2.2. Melhoramento de goiabeira na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF .....	58
3.3.2.3. Diversidade Genética .....	60
3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.3.3.1. Material Vegetal.....	62
3.3.3.2. Características avaliadas .....	63
3.3.3.2.1. Número de grãos de pólen por antera (NGPA); .....	63
3.3.3.2.2. Número de antera por botão (NAB);.....	64
3.3.3.2.3. Número de grãos de pólen por botão (NGPB);.....	64

3.3.3.2.4.	Número de óvulos por botão (NOB);	64
3.3.3.2.5.	Razão Pólen: Óvulo (P:O)	64
3.3.3.2.6.	Viabilidade polínica na pré- antese (%VPPA) e viabilidade polínica na antese (%VPAT)	64
3.3.3.2.7.	Tamanho de grão de pólen (TGP- $\mu\text{m}$ ) e tamanho de óvulo (TO- $\mu\text{m}$ )	65
3.3.3.3.	Análise dos dados	65
3.3.3.3.1.	Análise de variância	65
3.3.3.3.2.	Estimativas dos componentes de variância e dos parâmetros	66
3.3.3.3.3.	Distâncias Genéticas e Análise de Agrupamento	67
3.3.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.3.4.1.	Análise de variância e parâmetros genéticos	68
3.3.4.2.	Análise de agrupamento pelo método UPGMA	73
3.3.4.3.	Contribuição relativa dos caracteres para divergência- Singh	78
3.3.5.	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

## RESUMO

OLIVEIRA, Maria Lorraine Fonseca; DSc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro, 2018; Aspectos reprodutivos da goiabeira (*Psidium guajava*) e de araçazeiros (*Psidium guineense* e *Psidium cattleianum*) visando o desenvolvimento de cultivares Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Geraldo de Amaral Gravina.

A associação entre o fitonematoide *Meloidogyne enterolobii* e o fungo *Fusarium solani* causou perdas diretas e indiretas em toda cadeia produtiva de goiaba no Brasil. Não existem goiabeiras resistentes a essa doença, a fonte de resistência é encontrada em acessos de araçazeiros, *Psidium guineense* e *Psidium cattleianum*. Sendo assim, os melhoristas necessitam transferir os genes de resistência dos araçazeiros para a goiabeira utilizando a hibridação interespecífica. Esses cruzamentos, embora já tenham sido realizados, ainda são pouco relatados, devido à dificuldade de obter híbrido, visto que a goiabeira é diploide, enquanto os araçazeiros são poliploides. Por isso, é necessário gerar informações sobre essas três espécies, para melhor utilizá-las nos programas de melhoramento. Para isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos reprodutivos de acessos das espécies *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Psidium guineense* SW (araçazeiro) e *Psidium cattleianum* (araçazeiro). A tese foi dividida em três capítulos. O primeiro visou estimar um parâmetro que está relacionado ao modo de reprodução das espécies, a razão pólen:óvulo (P:O). O segundo foi realizado a fim de observar a germinação *in vivo* do grão de pólen, para identificar possível autoincompatibilidade, bem como identificar se a maturação do pólen e do

estigma ocorrem simultaneamente, possibilitando a autopolinização. Já o terceiro capítulo é um estudo sobre a distância genética entre esses acessos com base em características reprodutivas, para poder identificar acessos interespecíficos mais próximos e indicar possíveis cruzamentos. Para as análises, botões florais de todos os acessos de *P. guajava*, *P. cattleyanum* e *P. guineense* foram coletados. As variáveis analisadas foram: número de grãos de pólen por botão floral, número de grão de pólen por antera, número de anteras por botão floral, número de óvulos por botão floral e razão P:O. O tamanho do grão de pólen, tamanho do óvulo, viabilidade polínica na pré-antese e na antese, e a receptividade do estigma nesses dois períodos, também foram analisados. Dessas variáveis foi estimada a distância genética entre os acessos com base na distância generalizada de Mahalanobs e o agrupamento foi realizado pelo método UPGMA. Foi observado ainda o crescimento do tubo polínico nessas espécies em cinco tratamentos diferentes: botões ensacados na pré antese e analisados: no dia da antese, 24h e 48h após a antese; e em botões mantidos em polinização aberta por 24h e 48h, e analisados após a antese. Pela estimativa da P:O, *P. guajava* e *P. cattleyanum* foram indicadas como xenógamas, enquanto o *P. guineense* foi indicado como xenógama facultativo. Em relação à viabilidade polínica, todos os acessos de goiabeira e dois acessos de *P. cattleyanum* tiveram a viabilidade polínica considerada elevada, entretanto, todos os acessos apresentaram pólen viáveis antes e no dia da antese. O estigma de todos os acessos também estava receptivo em ambos os períodos. Analisando a distância genética, pode-se sugerir cruzamentos entre as menores distâncias interespecíficas entre os acessos de *P. guajava* x *P. guineense*, *P. guajava* x *P. cattleyanum* e *P. guineense* x *P. cattleyanum*. Em relação ao crescimento do tubo polínico, nas goiabeiras não houve diferença no crescimento em botões ensacados (autopolinizados naturalmente) e botões de polinização aberta. Já em *P. cattleyanum*, apenas em botões de polinização aberta os tubos polínicos atingiram o fim do estilete. Em *P. guineense* nos botões ensacados poucos tubos polínicos atingiram o final do estilete, enquanto os botões com polinização aberta e os tubos polínicos atingiram o final do pistilo em 48h.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Maria Lorraine Fonseca; DSc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro, 2018; Reproductive aspects of guava tree (*Psidium guajava*) and araçazeiros (*Psidium guineense* and *Psidium cattleianum*) aiming at the development of cultivars Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Geraldo de Amaral Gravina.

The association between the phytonematode *Meloidogyne enterolobii* and the fungus *Fusarium solani* caused direct and indirect losses in the entire guava production chain in Brazil. There is no resistant guava to this disease, the source of resistance is found in the accesses of araçazeiros, *Psidium guineense* and *Psidium cattleianum*. Thus, breeders need to transfer the resistance genes from the araçazeiros to guava using interspecific hybridization. These crosses, although they have been realized, are still little reported, due to the difficulty of obtaining interspecific hybrid, since the guava is diploid, while the araçazeiros are polyploids. Therefore, it is necessary to generate information on these three species, to better use them in breeding programs. For this, the objective of this work was to evaluate reproductive aspects of *Psidium guajava* L. (guava), *Psidium guineense* SW (aráçazeiro) and *Psidium cattleianum* (aráçazeiro) species. The thesis was divided into three chapters. The first one had the objective to estimate a parameter that is related to the mode of reproduction of the species, the pollen: ovule ratio (P: O). The second was performed to observe the in vivo germination of the pollen grain, to identify possible self-incompatibility, as well as to identify whether pollen maturation and stigma occur simultaneously, allowing self-

pollination. The third chapter is a study on the genetic distance between these accesses based on reproductive characteristics, to identify near interspecific accesses and to indicate possible crossings. For the analyzes, flower buds of all accessions of *P. guajava*, *P. cattleyanum* and *P. guineense* were collected. The variables analyzed were: number of pollen grains per flower bud, number of pollen grains per anther, number of anthers per flower bud, number of ovule per flower bud and P: O ratio. Pollen grain size, ovule size, pollen viability in the pre-anthesis and anthesis, and the receptivity of the stigma in these two periods were also analyzed. From these variables the genetic distance between the accessions was estimated based on the generalized distance of Mahalanobis and the grouping was obtained by the UPGMA method. The growth of the pollen tube in these species was observed in five different treatments: flower buds bagged in pre-anthesis and analyzed: on the day of the anthesis, 24h and 48h after the anthesis; and in pollinators open kept for 24h and 48h, and analyzed after anthesis. By the estimation of P:O, *P. guajava* and *P. cattleyanum* were indicated as xenogamous, while *P. guineense* was indicated as facultative xenogama. In relation to pollen viability, all accessions of guava and two accessions of *P. cattleyanum* had pollen viability considered high, however, all accesses presented viable pollen before and on the day of anthesis. The stigma of all accesses was also receptive in both periods. Analyzing the genetic distance, it is possible to suggest interspecific crosses between the smaller distances between the accesses of *P. guajava* x *P. guineense*, *P. guajava* x *P. cattleyanum* and *P. guineense* x *P. cattleyanum*. Regarding to growth of the pollen tube, in the guava trees there was no difference in growth in bagged buds (naturally self-pollinated) and open pollinator buds. In *P. cattleyanum* only on open pollinator buds the pollen tubes reached the end of the stylet. In *P. guineense* on the bagged buds a few pollen tubes reached the end of the stylet, while the flower buds with open pollination the pollen tubes reached the end of the pistil in 48h.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Psidium* pertence a família Myrtaceae, que com cerca de 3.800 espécies é considerada uma das maiores famílias botânicas (Landrum e Kawasaki, 1997; Wilson et al., 2001). Dentro do gênero *Psidium*, uma das espécies de maior representatividade econômica no Brasil é a *Psidium guajava* (goiabeira), que com 414.960 mil toneladas de produção anual, classifica o Brasil, juntamente com outras fruteiras, como o terceiro maior produtor de frutas do mundo (SEBRAE, 2015; IBGE, 2016). Em se tratando apenas de goiabas vermelhas, o Brasil é o maior produtor mundial (Pommer e Murakami, 2009; FAO, 2013).

Entretanto, essa cultura está sofrendo com uma doença chamada “o declínio da goiabeira”. Essa doença é causada por uma associação de duas espécies, um nematoide (*Meloidogyne enterolobii*) e um fungo (*Fusarium solani*), que causam a morte progressiva da planta (Gomes et al., 2011). Até o momento não foram descobertos genótipos resistentes de goiabeira, estando esta, presente em espécies silvestres, os araçazeiros, como *P. cattleyanum* e *P. guineense* (Miranda et al., 2011; Costa et al., 2012; Freitas et al., 2014).

Uma possível solução seria utilizar essas espécies resistentes como porta-enxerto da goiabeira, entretanto essa alternativa está sendo testada sem sucesso efetivo, visto que existe uma incompatibilidade citológica entre essas espécies (Robaina et al., 2015). Isto ocorre porque a espécie *P. guajava* é diploide ( $2n=2x=22$ ), enquanto ambos araçazeiros são poliploides. O *P.*

*cattleyanum* possui uma variação da ploidia entre triploide a octaploide ( $2n=3x=33 - 2n=8x=82$ ), enquanto o *P. guineense* é tetraploide ( $2n=4x=44$ ) (Pereira, 1995; Souza et al., 2014; Souza et al., 2015; Barbosa, 2016).

Entretanto, estudos já mostraram que é possível realizar o cruzamento entre a goiabeira com os araçazeiros resultando em híbridos interespecíficos resistentes (Costa et al., 2016; Gomes et al., 2017). Contudo, vale ressaltar que esses estudos são poucos e existem ainda muitas dúvidas relacionadas a essas espécies, principalmente quanto ao modo de reprodução e informações básicas, para darem direcionamentos em programas de melhoramento da espécie, bem como para realizar hibridações.

Sabe-se que para condução eficaz de um programa de melhoramento, é necessário conhecer o sistema reprodutivo da espécie, visto que as metodologias aplicadas levam em conta principalmente como a espécie se reproduz (Allard, 1960). Essa informação na goiabeira ainda é motivo de questionamento, visto que alguns autores discutem que a espécie tem preferência pela alogamia (Dasarathy, 1951; Balasubrahmanyam, 1959), enquanto outros a consideram autógama (Soubihe Sobrinho, 1951; Soubihe Sobrinho e Gurgel 1962; São José e Pereira, 1987; Alves e Freitas, 2007). E em araçazeiros, tanto em *P. guineense* quanto em *P. cattleyanum* essa informação ainda é escassa.

Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo determinar o modo de reprodução dessas três espécies de *Psidium* (*P. guajava*, *P. cattleyanum*, *P. guineense*) e levantar informações importantes relacionadas a características reprodutivas dessas espécies.

Sendo assim, a tese foi dividida em três capítulos: o primeiro objetivou determinar um dos fatores que podem predizer a provável estratégia de reprodução de *P. guajava*, *P. cattleyanum* e *P. guineense*, a razão pólen:óvulo (P:O) estipulada por Cruden (1977); o segundo foi realizado a fim de verificar o resultado do primeiro capítulo, observando a germinação do pólen *in vivo* nas espécies e o crescimento do tubo polínico no estilete, identificando se existe autoincompatibilidade nas três espécies estudadas; e o terceiro capítulo visou direcionar possíveis cruzamentos interespecíficos com base na menor distância genética entre as espécies, estimada com base em características reprodutivas.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar aspectos reprodutivos de acessos representantes das espécies *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Psidium guineense* SW (Araçazeiro) e *Psidium cattleaynum* (Araçazeiro).

### 2.1. Objetivos específicos

- Determinar a razão pólen: óvulo (P:O) de *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Psidium guineenses* SW (Araçazeiro) e *Psidium cattleaynum* (Araçazeiro), e prever o modo preferencial de reprodução dessas espécies;
- Estudar a interação pólen/pistilo e observar germinação *in vivo* de grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico em botões autofecundados naturalmente;
- Estimar parâmetros genéticos das características reprodutivas das três espécies;
- Estimar a viabilidade polínica e a maturação do estigma para verificar a possibilidade de autofecundação;
- Estudar a distância genética entre os acessos, para identificar acessos interespecíficos mais próximos, a fim de indicar possíveis cruzamentos.

### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1. REPRODUÇÃO PREFERENCIAL EM *Psidium* spp. PELA INTERPRETAÇÃO DA RAZÃO PÓLEN:ÓVULO

##### 3.1.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Psidium* apresenta cerca de 150 espécies, com destaque para *P. guajava* (goiabeira) (diploide e possui 22 cromossomos nas células somáticas-  $2n=2x=22$ ), *P. guineense* (araçazeiro) (tetraploide, com 44 cromossomos nas células somáticas-  $2n=4x=44$ ) e *P. cattleyanum* (araçazeiro) (ploidia variando de triploide-  $2n=3x=33$  a octaploide, com o número de cromossomos variando de 33 a 82 nas células somáticas  $2n=8x=82$ ) (Pereira, 1995; Souza *et al.* 2014; Souza *et al.* 2015; Barbosa, 2016). A goiabeira, com uma produção anual de 414.960 toneladas e com rendimento médio de 24.240 Kg/ha (SEBRAE, 2015; IBGE, 2016), juntamente com outras fruteiras, torna o Brasil o terceiro maior produtor de frutas do mundo, atrás apenas da China e da Índia (SEBRAE, 2015).

Entretanto, a produção de goiaba está sendo prejudicada por uma doença complexa, chamada “o declínio da goiabeira”, causada pela associação sinérgica entre o nematoide *Meloidogyne enterolobii* e o fungo *Fusarium solani*, que causa apodrecimento progressivo do sistema radicular, queima das bordas,

amarelecimento e queda das folhas e, conseqüentemente, a morte da planta (Gomes *et al.* 2011). Essa doença já foi relatada em diversos estados brasileiros (Maranhão *et al.* 2001; Silva *et al.* 2008; Biazatti *et al.* 2016) e tem causado alto impacto econômico, sem haver ainda controle efetivo (Pereira *et al.* 2009; Almeida *et al.* 2012).

O uso de cultivares resistentes é a melhor alternativa de controle de doenças. Entretanto, ainda não foram encontrados genótipos de *P. guajava* resistentes ao declínio da goiabeira. Essa resistência já foi relatada em acessos de *P. cattleyanum* e *P. guineense* (Miranda *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2016). Porém, o uso como porta-enxerto para goiabeira tem se mostrado inviável (Robaina *et al.* 2015). Sendo assim, para a cultura da goiabeira, programas de melhoramento vegetal são importantes, visando o desenvolvimento de cultivares ou porta-enxertos com resistência genética e compatíveis para enxertia (Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.* 2009; Gomes *et al.* 2011; Miranda *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2012).

Segundo Allard (1960), a condução eficaz de um programa de melhoramento depende do conhecimento do modo reprodutivo da espécie, visto que, as metodologias de melhoramento são escolhidas de acordo com essa característica, ou seja, se a espécie é autógama ou alógama. Em goiabeira, essa informação ainda é controversa, pois estudos relatam que a goiabeira é alógama com alta taxa de autogamia ou vice-versa (Soubihe Sobrinho 1951; Dasarathy, 1951; Soubihe Sobrinho e Gurgel, 1962; Boti, 2001; Alves e Freitas, 2007). E para os araçazeiros essa informação ainda é escassa. Logo, o modo de reprodução de algumas espécies do gênero *Psidium* ainda precisam ser definidos.

Existem várias metodologias que podem ser utilizadas para determinar o modo de reprodução. De acordo com Cruden (1977), a razão pólen:óvulo (P:O) é uma boa característica para prever tal informação, visto que esta técnica é rápida e de custo baixo, quando comparados com técnicas de marcadores moleculares ou técnicas de cruzamentos (Cruden, 2000). Com isso, muitos pesquisadores têm utilizado a razão P:O para determinar a provável estratégia de polinização (Galloni *et al.*, 2007) ou a eficiência da polinização em algumas espécies (Chouteau *et al.*, 2006). Além disso, esta metodologia também já foi associada ao mecanismo de polinização em espécies com a forma de reprodução desconhecida (López *et al.* 1999).

A razão P:O, reflete a probabilidade de os grãos de pólen atingirem o estigma, resultando na produção máxima de sementes (Cruden, 1977). A transferência mais eficiente dos grãos de pólen irá resultar em uma menor razão P:O, assim, as plantas consideradas cleistogâmicas devem ter uma menor razão P:O. Enquanto as plantas autógamas devem ter uma razão P:O baixa, ao serem comparadas com as plantas alógamas. Deste modo, a razão P:O está diretamente relacionada com o modo de polinização e ao sistema reprodutivo das espécies (Cruden, 1977; Lenzi e Oth, 2004).

A razão P:O não foi estudada em *Psidium*, e ainda existe questionamentos quanto ao método de reprodução, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar características relacionadas à reprodução de três espécies de *Psidium* (*Psidium guajava* L., *Psidium cattleianum* Sabine e *Psidium guineense* Sw.) e saber como essas características se relacionam para estimar a relação P:O e indicar uma provável estratégia de reprodução, com base nesta relação.

### 3.1.2 REVISÃO

#### 3.1.2.1 Aspectos gerais do gênero *Psidium*

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae, a qual possui pelo menos 133 gêneros e 3.800 espécies, sendo considerada uma das maiores famílias botânicas. Seu centro de diversidade é na Austrália, sudeste da Ásia e da América Central à do Sul. No Brasil, essa família possui as seguintes características: árvores ou arbustos; folhas simples ou opostas, veias laterais geralmente facilmente visíveis, com glândulas translúcidas; flores tetrâmeras, pentâmeras ou hexâmeras, comumente brancas ou amareladas (raramente rosa, avermelhada ou púrpura) hermafroditas, odoríferas, diplo ou polistêmones; ovário ínfero, bi a multilocular; estigma simples; fruto bacoide (Landrum e Kawasaki, 1997; Wilson et al., 2001).

Bem como nas diferentes sub-tribos das Myrtaceae, o gênero *Psidium* tem uma predominância de  $2n=22$  cromossomos (com número básico de 11 cromossomos), embora haja uma grande variação no nível de ploidia (Costa e Forni-Martins, 2006; Éder-Silva et al., 2007). Das 150 espécies que o compõem, a

goiabeira (*Psidium guajava* L.), uma das mais importantes, é diploide com  $2n=2x=22$  cromossomos (Pereira, 1995; Costa e Forni-Martins, 2006; Costa e Forni-Martins, 2007), embora haja registro de uma variedade (Paluma) com  $2n=18$  cromossomos (Souza *et al.*, 2014).

Outras espécies que se destacam nesse gênero são *Psidium guineense* Swartz. (araçazeiro), tetraploide, com  $2n=4x=44$  cromossomos e *Psidium cattleyanum* Sabine (araçazeiro), com a ploidia variando de triploide-  $2n=3x=33$  a octaploide-  $2n=8x=82$  cromossomos (Pereira, 1995; Costa e Forni-Martins, 2006; Costa e Forni-Martins, 2007; Souza *et al.* 2014; Souza *et al.* 2015; Barbosa, 2016). Além dessas, muitas outras espécies produtoras de frutos comestíveis, madeiras e plantas ornamentais com grande potencial para exploração comercial fazem parte desse gênero (Bezerra *et al.*, 2006).

#### **3.1.2.1.1 A goiabeira (*Psidium guajava*)**

A goiabeira (*P. guajava*) é proveniente da região tropical do continente americano, com o provável centro de origem entre o sul do México e o norte da América do Sul, entretanto, essa espécie possui ampla distribuição geográfica (Medina, 1988). A goiabeira é uma árvore que atinge de 3 a 5 metros de altura e de 5 a 6 metros de copa (diâmetro), considerada de pequeno porte. Os troncos são tortuosos, as folhas possuem coloração verde-amarelada, pouco lustrosas, opostas, coreáceas, semicaducifólias e de formato elíptico-oblongo (Pommer e Murakami, 2009).

A goiaba, fruto da goiabeira, é uma baga de forma variável (arredondada, ovoide, ovalada-globosa, periforme ou globulosa), com 4 a 12 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura. O peso dos frutos varia muito, podendo-se encontrar frutos de 42 a 280 gramas. A casca do fruto pode ser fina ou grossa e a superfície lisa. O mesocarpo do fruto tem espessura variável, em que as sementes se localizam em uma massa consistente. A coloração da polpa pode ser amarelada, branca ou vermelha, e possui um aroma suave e agradável (Pommer e Murakami, 2009).

Essa fruta é bastante apreciada pelo seu sabor característico, e possui alto valor nutritivo, com elevados teores de vitamina C (níveis de quatro a cinco vezes superiores aos da laranja), vitamina A e B em níveis razoáveis, conter

compostos fenólicos, ascorbato,  $\beta$ -caroteno, licopeno e antioxidante (Oliveira *et al.*, 2012). Além do consumo *in natura*, utiliza-se essa fruta para goiabadas, doces, compotas, sucos, sorvetes e molhos salgados e agridoces (Oliveira *et al.*, 2012).

### 3.1.2.1.2 Os araçazeiros (*Psidium cattleyanum* e *Psidium guineense*)

*Psidium cattleyanum* é uma espécie tropical, conhecida como goiaba morango, goiaba chinesa, goiaba cereja, goiaba roxa, waiawi, guayaba ou araçá. Essa planta é nativa da costa atlântica do Brasil, entretanto, agora, é encontrada também em outros países tropicais, como Havaí e muitas ilhas do Caribe (Patel, 2012).

O arbusto ou árvore atinge a altura de 1,8 a 4 metros, possui galhos lisos e resistentes; as folhas são perenes, lustrosas, resistentes, glabras e de formato obovado ou elípticas; os frutos são abundantes, pequenos, com a polpa translúcida, formato obovados e com cor púrpura ou amarelo claro e inúmeras sementes (Mani *et al.*, 2011; Patel, 2012).

O fruto tem sabor doce e aroma agradável (Mani *et al.*, 2011); devido a isso, algumas pessoas gostam de comer o fruto *in natura*, ou mesmo em geleias, purê, molho, suco, cremes e sobremesa (Raseira e Raseira, 1996; Patel, 2012). Entretanto, a venda em mercado convencional torna-se um desafio, devido à elevada perecibilidade, durando apenas três a quatro dias à temperatura ambiente (Patel, 2012).

O *P. cattleyanum* tem um imenso potencial industrial e apresenta ótimas perspectivas de cultivo, devido ao alto teor de vitamina C e o baixo custo de produção, contudo, ainda é muito pouco conhecido devido à escassa atenção científica. As informações nutritivas e a importância farmacêutica ainda são muito preliminares (Patel, 2012), e demandam mais atenção da comunidade científica.

*Psidium guineense* tem semelhança com o *P. cattleyanum*, e é conhecido vulgarmente como goiaba brasileira (Mani *et al.*, 2011). É um arbusto ou uma árvore pequena, que atinge até seis metros de altura; as inflorescências, durante o crescimento inicial são cobertas com pêlos marrom-avermelhados, variando para cinza-amarelados, com cerca de 0,3 a 0,5 mm de comprimento (Landrum *et al.*, 1995; Mani *et al.*, 2011). Os brotos são aveludados, às vezes

glabros; a casca mais antiga é geralmente polida, escamosa e resistente; as folhas são largas, coriáceas e de formato elíptico, elíptico-oblongo ou obovado, com comprimento de 4 a 11,5 cm por 1 a 2 cm de largura e nervuras laterais são em números de 1 a 10 (Landrum et al., 1995; Mani et al., 2011).

O *P. guineense* teve origem na América do Sul (Brandão et al., 2002), entretanto, as informações sobre a diversidade e estrutura genética das populações dessa espécie são escassas (da Silva et al., 2016). Além disso, os recursos genéticos conservados são poucos, e poucos acessos desta espécie são mantidos em bancos de germoplasmas, e muitas vezes em coleções conjuntas com outras espécies do gênero *Psidium* (Bezerra et al., 2006).

Apesar disso, assim como o *P. cattleyanum*, apresenta importância na sua utilização, como o aproveitamento doméstico dos frutos e da madeira, e o uso da raiz, casca e folhas na medicina popular. Os incentivos ao consumo *in natura* dessas frutas, aliado a produção artesanal e agroindustrial de alimentos, podem beneficiar muitas comunidades locais (Bezerra et al., 2006).

Mesmo com os inúmeros recursos que os araçazeiros podem oferecer, sua expressão econômica no contexto da fruticultura nacional ainda é inexistente (Bezerra et al., 2006). Isso se deve ao fato, de que toda a utilização dessas espécies se deve a uma produção artesanal em pequenas unidades de base familiar, visto que não há plantios ordenados, nem técnicas agrícolas definidas para essas espécies, o que acarreta em baixa oferta da matéria prima. Além disso, existe uma erosão genética em araçazeiros em todo o Brasil, com uma acentuada perda de genes, devido à devastação dos ecossistemas nos quais a população ocorre de forma nativa (Bezerra et al., 2006; Franzon et al., 2009).

Com isso, é de extrema importância a conservação dessas espécies, bem como o desenvolvimento de pesquisa em recursos genéticos e melhoramento, além da coleta de germoplasma, visto que existem poucas coleções ativas mantidas em instituições de pesquisa do país e coleções didáticas em algumas universidades e organizações estaduais de pesquisa agropecuária (Bezerra et al., 2006).

### **3.1.2.2 Aspectos fenológicos de *P. guajava*, *P. cattleyanum* e *P. guineense***

A goiabeira (*P. guajava*) possui inflorescência do tipo dicásio ou triplo (em alguns ramos pode haver apenas uma ou duas flores), e normalmente emergem

das axilas das folhas. As flores são actinomorfas, hermafroditas e com tamanho médio de 3,5 cm de diâmetro. Quatro a cinco sépalas de formato oblongo-ovadas compõem o cálice, o qual possui coloração verde na face inferior e branca na face superior. (Soubihe Sobrinho, 1951; Pommer e Murakami, 2009; Oliveira et al., 2012).

A corola possui cinco pétalas brancas e ovais. O androceu é constituído de 160 a 400 estames (média); os filetes são brancos e finos, sendo maiores próximos às pétalas e menores perto do estilete; as anteras são brancas e bilobadas. Os grãos de pólen são amarelos, enquanto o estigma é esverdeado e a inserção do estilete no ovário é terminal; vale ressaltar que o estigma se posiciona cerca de 2 mm acima dos estames maiores. O ovário é ínfero, tri, tetra ou pentalocular e com muitos óvulos (Soubihe Sobrinho, 1951; Boti, 2001; Pommer e Murakami, 2009; Oliveira et al., 2012).

A abertura da flor na região serrana do Espírito Santo ocorre entre as 6 horas e as 7 horas e 30 minutos, posterior a isso, as pétalas iniciam sua queda, restando as sépalas, que são mais resistentes. Entretanto, em dias chuvosos ou úmidos, a antese pode se prolongar por cerca de 2 horas a mais. As flores exalam perfume adocicado no momento da antese, mais intenso nas primeiras horas da abertura. A flor dura em média dois dias, e no oitavo dia após a antese, pode-se identificar o início do desenvolvimento dos frutos (Boti, 2001).

As flores de *P. cattleyanum*, assim como as das goiabeiras, são brancas e hermafroditas, entretanto, se apresentam dispostas em pedúnculos. Os estames são filetes brancos, as anteras são amarelas e muito numerosas. O ovário é ínfero, com três a quatro lóculos, e muitos óvulos. O estilete é filiforme e o estigma é capitado (Raseira e Raseira, 1996).

Em condições naturais, no sul do Brasil, o *P. cattleyanum* floresce em duas épocas principais, entretanto, já foi observada também uma terceira época. A primeira ocorre entre os meses de setembro e outubro, a segunda em dezembro e a terceira floração, por vezes, ocorre em março. Contudo, vale ressaltar, que com a chegada do inverno nessa região, não ocorre amadurecimento dos frutos nessa terceira floração (Raseira e Raseira, 1996). Outro estudo na região litorânea do estado de São Paulo, relata apenas duas épocas de florescimento, uma entre os meses de novembro e janeiro e outra

entre os meses de março e abril, e em ambas florações, o fruto atinge a maturidade (Staggemeier et al., 2007).

Seguindo o padrão das flores descritas anteriormente, as flores da espécie *P. guineense* possuem pétalas brancas e são hermafroditas. O cálice, no estado inicial é completamente fechado e repartido longitudinalmente em cinco partes pequenas. Os botões medem de 10 a 13 mm de comprimento por 1 a 2 mm de espessura. Os estames são numerosos, entre 160 a 300; e o ovário pode ser tri, tetra ou pentalocular, com 50 a 100 óvulos por lóculo (Landrum et al., 1995; Pommer et al., 2013).

### 3.1.2.3 Importância econômica

A goiabeira se destaca entre as fruteiras tropicais principalmente devido ao seu valor nutritivo, sabor e aroma característicos (Oliveira et al., 2012). Por isso, nos últimos anos têm apresentado um aumento nas áreas destinadas ao plantio, onde a maioria dos frutos produzidos são voltados à industrialização. Além disso, houve um aumento no interesse por frutas tropicais e seus sucos pelos países europeus e pelos Estados Unidos, o que impulsionou o comércio da goiaba (Pereira e Nachtigal, 2002; Oliveira et al., 2012).

Com isso, em 2015 o Brasil assumiu a posição de terceiro maior produtor de frutas do mundo, atrás apenas da China e Índia (SEBRAE, 2015). Com uma área de 17.179 ha destinados à colheita da goiaba e com rendimento médio de 24.240 Kg/ha, o Brasil produziu no ano de 2016, 414.960 t de goiaba, o que acabou sendo 2,2% menor do que o ano anterior (2015) (IBGE, 2016).

No Brasil, a goiabeira possui grande distribuição geográfica e o cultivo mais significativo são nas regiões Nordeste e Sudeste (com 191.078 t e 186.100 t produzidas, respectivamente) (tabela 1). Os estados brasileiros com maior relevância para a produção dessa fruta é São Paulo, com 35,4% na participação no total da produção nacional, seguida de Pernambuco, com 31,4% (IBGE, 2016).

Embora as outras espécies do gênero também tenham potencial para exploração econômica, a goiabeira é praticamente a única que apresenta expressão econômica no contexto da fruticultura nacional (Bezerra et al., 2006). Com isso, as informações relativas ao cultivo do araçazeiro, beneficiamento da

sua polpa pela indústria e informações relativas aos custos da sua produção são, praticamente, inexistentes (Bezerra et al., 2006).

**Tabela 1-** Áreas destinadas à colheita e colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção de Goiaba, segundo as Grandes Regiões produtoras no Brasil em 2016

Grandes Regiões	Área destinada à colheita (ha)	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)	Rendimento médio (Kg/ha)	Valor (1000 R\$)
Norte	481	474	6.058	12.781	9.071
Nordeste	8.460	8.412	191.078	22.715	236.114
Sudeste	6.664	6.664	186.100	27.926	197.573
Sul	1.093	1.088	20.716	19.040	48.765
Centro-Oeste	481	481	11.008	22.886	17.051
<b>Brasil</b>	<b>17.179</b>	<b>17.119</b>	<b>414.960</b>	<b>24.240</b>	<b>508.573</b>

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção Agrícola Municipal 2016.

Entretanto, sabe-se que a principal forma de aproveitamento dos araçazeiros nativos ocorre em pequenas produções de base familiar na produção de doces e geleias (Bezerra et al., 2006; Franzon et al., 2009). O fruto *in natura* também vem sendo comercializado nas lojas das grandes redes de supermercado no Nordeste, durante o período da safra (Bezerra et al., 2006). Todavia, não é o suficiente para a geração de emprego e renda na agricultura familiar de forma representativa, visto que são poucas comunidades rurais nestas áreas que obtêm pela coleta do fruto, beneficiamento da polpa e comercialização dos seus produtos derivados, uma fonte de renda extra (Bezerra et al., 2006).

Em muitas partes do Brasil, a subsistência dessa atividade está ameaçada por um avanço da agricultura empresarial intensiva e ocupação do solo com outro tipo de cultivo, o que coloca em risco a existência e manutenção dessa espécie (Bezerra et al., 2006). Por isso, é importante o desenvolvimento de tecnologias de produção e de novos processos tecnológicos de aproveitamento industrial da polpa, além de estratégias de “*marketing*” que torne o produto mais conhecido do consumidor. Também deveria existir trabalhos de incentivo ao desenvolvimento da cultura com os agricultores nas áreas de ocorrência natural destas espécies (Bezerra et al., 2006).

### 3.1.2.4 Modo de reprodução

Para o melhoramento genético de qualquer espécie vegetal, é de suma importância conhecer o seu modo de reprodução, pois é a partir desse conhecimento que se escolhe o melhor método a ser utilizado (Allard, 1960). Em goiabeira, essa informação ainda é controversa, alguns autores consideram que a autopolinização é a principal forma de reprodução da goiabeira (Soubihe Sobrinho, 1951; Singh e Sehgal, 1968; São José e Pereira, 1987).

Esse tipo de reprodução é possível, pois Boti (2001) relata que o pólen da goiabeira é autocompatível, e a classifica como autógama facultativa. Entretanto, esse autor justifica que menor formação de frutos por autopolinização espontânea, comparada com a polinização cruzada, ocorre pelo fato do estigma ficar 2 mm acima dos estames, funcionando como uma barreira física (hercogamia).

Entretanto, Seth (1960) relata a ocorrência de autoincompatibilidade gametofítica nas goiabeiras, isso corrobora com o estudo de outros autores, que observaram que a polinização cruzada é o principal tipo de reprodução nessa espécie (Dasarathy, 1951; Balasubrahmanyam, 1959). Soubihe Sobrinho e Gurgel (1962) realizaram um experimento em um pomar com 30.000 árvores de goiabeira, e concluíram que a taxa de polinização cruzada estaria entre 25,7% até 41,3%, com uma média geral de 35,6%.

Estudos a fim de comparar porcentagem de frutificação em diferentes tipos de polinização (polinização aberta e autopolinização) foram conduzidos e corroboraram em afirmar que a polinização aberta produz significativamente mais frutos que a autopolinização (Boti et al., 2005; Alves e Freitas, 2007). Esses resultados confirmam que, de fato, o posicionamento do estigma acima das anteras pode dificultar a autopolinização espontânea (Boti et al., 2005).

Vale ressaltar ainda, que a polinização aberta, além de incrementar 39,5% a produção de frutos em relação à autopolinização, ela ainda resultou em maior produção de sementes. Provavelmente, devido ao maior número de grãos de pólen viáveis no estigma, o que acarreta a fecundação de mais óvulos (Alves e Freitas, 2007).

Embora o aumento do número de sementes no fruto não seja desejável no melhoramento dessa espécie, os autores relatam que para ocorrer o vingamento dos frutos, pode haver uma necessidade do desenvolvimento de um

número mínimo de sementes, que assegurem a produção de hormônios necessários à sua retenção (Alves e Freitas, 2007).

Devido a isso, os autores recomendam a presença de agentes polinizadores em pomares de goiabeiras, para assegurar a máxima produção de frutos (Boti et al., 2005; Alves e Freitas, 2007). Estudos mostram que as espécies mais eficientes para isso são as abelhas melíferas (*Apis mellifera*), jandaíra (*Melipona subnitida*) e mamangava (*Xylocopa frontalis*) (Alves e Freitas, 2006; Freitas e Alves, 2008).

A espécie *P. cattleyanum* tem resultado semelhante às goiabeiras ao comparar porcentagem de frutificação obtida com autopolinização e com polinização cruzada, em que a segunda apresentou resultados superiores (Raseira e Raseira, 1996).

Nesse mesmo estudo, os autores observaram que ao emasculiar e ensacar os botões florais, sem polinizá-los, também obtiveram frutos, provavelmente oriundos de partenocarpia ou apomixia. Como os frutos apresentaram sementes e a progênie, originária de uma mesma planta mãe, teve uniformidade, a apomixia é a explicação mais provável, demonstrando que essa espécie pode ter apomixia facultativa (Raseira e Raseira, 1996).

Em seu trabalho, Raseira e Raseira (1996) também observaram a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico *in vivo* e concluíram que é provável que exista autoincompatibilidade em *P. cattleyanum*, visto que o tubo polínico cresce sem direção definida, e em apenas em poucos pistilos pode-se assegurar a penetração do tubo polínico no óvulo.

Da Silva et al. (2016) sugerem que a espécie *P. guineense* possui a alogamia como principal modo de reprodução, visto que, ao analisar a diversidade genética em quatro populações naturais pelo método de isoenzimas, relataram uma ausência de endogamia e o excesso de heterozigiosidade nessas populações. Levando em conta que a endogamia é resultado de cruzamentos que aumentam a homozigose (cruzamento de indivíduos aparentados e autofecundação) (Borém e Miranda, 2013), a sua ausência configura em cruzamento ao acaso.

Vale ressaltar, que com exceção da goiabeira, não existe programas de melhoramento genético com as espécies de *Psidium* ssp. nativas (Franzon et al., 2009). Sabendo que as metodologias aplicadas em melhoramento genético são

escolhidas com base no modo de reprodução das espécies, é de extrema importância trabalhos que visem este conhecimento, para a melhor condução dos programas de melhoramento (Allard, 1960; Franzon et al., 2009).

### 3.1.2.5 Metodologia da razão pólen:óvulo (P:O)

A razão pólen:ovulo, segundo Cruden (1977), é uma estimativa que indica o provável modo de reprodução das espécies, por ser rápido e de baixo custo, quando comparadas com técnicas de marcadores moleculares ou técnicas que necessitem realizar o cruzamento (Cruden, 2000).

Cruden (1977) propôs essa metodologia após estudar a razão P:O em 80 espécies diferentes, e concluir que quanto maior o grau de autogamia, menor razão P:O a espécie apresentava, e espécies com polinização cruzada apresentavam os maiores índices P:O (tabela 2).

**Tabela 2-** Razão entre o número de grãos de pólen e o número de óvulos (relação P:O), como um indicativo do modo preferencial de reprodução (Cruden, 1977)

Modo de Reprodução	P:O
Cleistogamia	2,7- 5,4
Autógama obrigatória	18,1-39
Autógama facultativa	31,9- 396
Xenógama facultativa	244,7-2588
Xenógama obrigatória	2108-195525

Com isso, ele determinou que essa proporção fosse um bom estimador do sistema de reprodução de uma espécie, visto que essa razão reflete a eficiência de um sistema de polinização. Sendo que, quanto mais eficiente a transferência dos grãos de pólen para o estigma, menor razão P:O, então, o conjunto máximo de sementes nas plantas de polinização cruzada exigiria mais pólen como resultado da dificuldade de transferência de pólen de uma planta para outra (hipótese de eficiência de polinização) (Cruden, 1977; Cruden, 2000).

Vários estudos afirmaram a validade da razão P:O como um indicador do sistema de reprodução das plantas (Lopez et al., 1999; Jurgens e Gottsberger, 2002; Wang et al., 2005; Michalski e Durka, 2009). Entretanto, esses estudos também mencionam que existem interações complexas que podem influenciar no resultado da relação P:O como *habitat*, eficiência dos polinizadores, mecanismo de polinização, interação polinizador-flor (por exemplo, recompensa de néctar e/ou pólen) e morfologia floral, mas que ainda não foram testados (Cruden, 2000; Jurgens e Gottsberger, 2002; Chouteau et al., 2006; Michalski e Durka, 2009).

O índice P:O, tradicionalmente utilizado como um estimador do sistema de reprodução das plantas, também tem sido utilizado para identificar a eficiência de diferentes polinizadores (Chouteau et al., 2006) e qual mecanismo de polinização é mais efetivo (Lopes et al., 1999; Etcheverry et al., 2011).

Em um desses estudos, Jurgens e Gottsberger (2002) conseguiram mostrar que os polinizadores noturnos e diurnos são igualmente eficientes, visto que não teve diferença significativa na razão P:O em flores com antese durante o dia e durante a noite. Nesse mesmo estudo, foi relatado também, que plantas perenes apresentam maior razão P:O do que plantas anuais, comumente sendo alógamas, provavelmente devido ao fato de que espécies anuais têm um curto período de tempo para se reproduzir, com isso, a autopolinização assegura uma reprodução eficiente.

Outro estudo demonstra, que plantas polinizadas por besouros têm a razão P:O maior do que as polinizadas por outras classes de polinizadores, creditando a hipótese que os besouros são polinizadores menos efetivos (Chouteau et al., 2006). Também estudando eficiência em tipos de polinização, Michalski e Durka (2009) compararam a razão P:O entre 85 espécies polinizadas por animal com 22 polinizadas pelo vento, e revelaram, que as maiores proporções de P:O foi com a anemofilia (corroborando com Cruden, 2000), e explica que a coevolução das plantas com seus polinizadores resultou em inúmeras soluções adaptativas para o problema de transporte de pólen.

É importante ressaltar que existem poucos trabalhos de razão P:O em flores de ecossistemas equatoriais (Chouteau et al., 2006). Entretanto, já existem trabalhos de razão P:O com fruteiras tropicais; em mamão, Damasceno Junior et al. (2009) observaram a razão P:O de 233,27, classificando o mamão como uma espécie autógama facultativa.

Garcia et al. (2014) estudaram a razão P:O em quatro espécies de *Passiflora*, duas autoincompatíveis (*P. caerulea* e *P. misera*) e duas autocompatíveis (*P. foetida* e *P. suberosa*) e observaram que a razão P:O diferiu significativamente entre as autocompatíveis e as autoincompatíveis. A relação P:O foi maior nas autoincompatíveis, estando de acordo com a teoria de Cruden (1977) de que espécies autoincompatíveis têm o valor da razão P:O superior, quando comparados com as espécies autocompatíveis. Entretanto, os valores encontrados da razão P:O em todas as espécies de *Passiflora* estudadas por Garcia et al. (2014) foram inferiores ao esperado. Nas espécies autoincompatíveis, os valores foram substancialmente mais baixos, indicando uma possível autopolinização, visto que foram classificadas pela razão P:O como autógama facultativa e xenógama facultativa.

Cruden e Miller-Ward (1981), justificaram que as espécies com mecanismos de transferência de pólen de uma flor para outra muito eficientes tinham razão P:O mais baixo que o esperado, em comparação a espécies com sistema de reprodução equivalentes, mas o fluxo de pólen menos eficiente.

A razão P:O ainda não foi estudada em *Psidium*, e ainda existe questionamentos quanto ao seu método de reprodução, sendo assim, por ser uma metodologia rápida, será relevante um estudo abordando essa relação, bem como estudar as características relacionadas à reprodução de espécies desse gênero.

### 3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.3.1 Material Vegetal

Os acessos utilizados nessa pesquisa pertencem à coleção de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Goiabeira da Universidade Estadual do Norte Fluminense- Darcy Ribeiro (UENF). A coleção está implantada no Colégio Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes. O clima da região Norte e Noroeste Fluminense é classificado como

do tipo Aw de Köppen (1948), tropical quente e úmido, com período seco no inverno, chuvoso no verão e precipitação anual em torno de 1152 mm.

Para essa pesquisa, foram coletados botões florais (BF) de quatro acessos de araçá: Araçá Amarelo (*P. cattleyanum*), Araçá Coroa (*P. cattleyanum*), Araçá Una (*P. cattleyanum*) e Araçá do Campo (*P. guineense*), e quatro variedades de goiabeira (*P. guajava*): Cortibel 1, Cortibel 4, Cortibel 6 e Paluma (tabela 3).

As goiabeiras foram propagadas por estaquia, enquanto os araçazeiros, por via seminal. O espaçamento foi de 5 m dentro da linha e 7 m entre linhas e os tratamentos culturais foram aplicados conforme necessários.

Durante a floração, quatro botões florais (BF) por acesso, na pré-antese, foram coletados ao acaso em solução de etanol 70%, mantidos a 4°C até o momento do preparo das lâminas.

**Tabela 3-** Acessos de *Psidium* spp. conservados no Colégio Agrícola Antônio Sarlo, Campos dos Goytacazes, RJ

<b>Espécie</b>	<b>Acesso</b>	<b>Nº de Plantas Utilizadas</b>	<b>Procedência</b>
<i>P. cattleyanum</i>	Araçá Coroa	2	Campos dos Goytacazes- RJ
<i>P. cattleyanum</i>	Araçá Amarelo	3	Campos dos Goytacazes- RJ
<i>P. cattleyanum</i>	Araçá Una	4	Campos dos Goytacazes- RJ
<i>P. guineense</i>	Araçá do Campo	1	Taboraí- RJ
<i>P. guajava</i>	Paluma	1	-
<i>P. guajava</i>	Cortibel1	1	-
<i>P. guajava</i>	Cortibel4	1	-
<i>P. guajava</i>	Cortibel6	1	-

### 3.1.3.2 Características avaliadas

**3.1.3.2.1 Número de grãos de pólen por antera (NGPA); Número de anteras por botão (NAB); Número de grãos de pólen por botão (NGPB); Número de óvulos por botão (NOB).**

Para a contagem do NGPA foi seguido o protocolo de Dafni (1992) e Damasceno Junior et al. (2009). Para tal, uma antera por BF foi macerada em uma solução contendo quatro gotas de detergente Triton-X, três gotas de azul de

metileno a 0,5% e 900 µl de etanol 70%. Após macerada, a antera foi colocada em um microtubo contendo a mesma solução, o qual foi agitado manualmente por um minuto. Uma amostra de 10 µl do total (1000 µl) da suspensão foi depositada sobre a lâmina e coberta com lamínula, para ser contado o número de grão de pólen presente nesta amostra em microscópio óptico Olympus BX60.

Prepararam-se quatro lâminas por antera (com uma amostra de 10 µl em cada lâmina) e foi contado o número total dos grãos de pólen por lâmina. Este procedimento foi feito com cinco anteras por BF, e foram utilizados quatro BF por acesso.

A partir da média de grãos de pólen contados nas quatro lâminas contendo 10 µl da suspensão cada, foram estimados quantos grãos de pólen estão presentes em uma antera (macerada em 1000 µl). Posteriormente, foi feita a média das cinco anteras do mesmo botão e estimou-se o número de grãos de pólen encontrados em uma antera de cada botão.

O NAB foi obtido pela contagem de anteras por flor. Posteriormente, foi estimada a variável NGPB, através da multiplicação do NGPA pelo NAB de cada botão.

Para NOB, foi realizada a contagem dos óvulos, em que os ovários foram cortados e os óvulos espalhados em uma lâmina com três gotas da solução lactofenol azul-algodão, em seguida foi colocada a lamínula e os óvulos foram contados em microscópio óptico Olympus BX60.

Para estimar as variáveis de cada acesso, foi calculada a média dos quatro BF analisados.

### **3.1.3.2 Razão Pólen: Óvulo**

A razão P:O foi estimada para cada acesso e para cada espécie. Foi estimada com a média de todos os botões do NGPB dividido pela média de todos os botões do NOB. A determinação do sistema reprodutivo foi baseada na divisão do número de pólen pelo número de óvulo (P:O) conforme Cruden (1977).

$$\frac{\text{NGPB}}{\text{NOB}} = \text{P:O}$$

### 3.1.3.2.3 Análise Estatística

As variáveis avaliadas NOB, NAB, NGPB e NGPA foram submetidas à análise de variância obedecendo ao seguinte modelo estatístico, com base no delineamento inteiramente ao acaso:

$$Y_{ijk} = \mu + G_j + \varepsilon_{ijk}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$G_i$  = efeito do  $i$ -ésimo Genótipo fixo ( $i = 1, 2, \dots, 8$ );

$\varepsilon_{ijk}$  = erro experimental, associado a cada observação, pressuposto NID ( $0, \sigma^2$ ).

Como forma de aferir a correta classificação dos acessos procedeu-se à análise de comparação de médias via teste Tukey a 5% de probabilidade. Para todas as análises foi utilizado o programa computacional S.A.S (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1996)

### 3.1.4. RESULTADOS

Os resultados da análise de variância, as estimativas de média e o coeficiente de variação experimental para as características: NGPB, NGPA, NAB, NOB e P:O estão apresentados na Tabela 4.

Como pode ser observado, todas as variáveis estudadas apresentaram diferenças significativas, pelo teste F a 1% de probabilidade ( $P < 0,01$ ). Ao analisar o coeficiente de variação experimental (CV), constata-se que os valores estimados foram considerados, segundo Gomes (1990), médios para NAB (12,96%) e NOB (17,53%), e altos para NGPB (29,71%), NGPA (21,73%) e P:O (30,16%), visto que para esse mesmo autor, os coeficientes de variação comumente obtidos em campo são tidos como baixos quando inferiores a 10%; médios, de 10 a 20%; altos, quando de 20 a 30%; e muito altos, se superiores a 30%.

**Tabela 4-** Resumo da análise de variância para número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos de pólen por antera (NGPA), número de anteras por botão floral (NAB), número de óvulos por botão floral (NOB) e razão pólen: óvulo (P:O) referente à avaliação de oito acessos de *Psidium* ssp.

FV	GL	Quadrados Médios				
		NGPB	NGPA	NAB	NOB	P:O
Genótipo	7	1,11E13**	49.894.907**	41.058,92**	218.076,57**	196.493.586**
Resíduo	24	462.788.558.786	1.593.072,10	2.273,66	4.610,76	5.844.671
Média		2.289.713	5.808,28	367,84	387,16	8.014.999
CV (%)		29,71	21,73	12,96	17,53	30,16

**FV**= fator de variação; **GL**= grau de liberdade;  
**\*\***= Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F;  
**CV(%)** = Coeficiente de variação

Entretanto, vale ressaltar, que embora os CV's tenham sido classificados entre médios e altos, esses valores envolvem a variação de três espécies dentro do gênero *Psidium*. Além disso, os CV's mais elevados 29,71% (NGPB) e 30,16% (P:O), podem ser explicados que para estimar esses caracteres, duas variáveis distintas são relacionadas: NAB e NGPA para NGPB e para P:O, NGPB e NOB, essas relações podem ter elevado o valor do CV.

Os valores médios e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade das variáveis NGPB, NGPA, NAB e NOB estão presentes na Tabela 5.

Os acessos de maiores médias para a característica NGPB foram também os acessos de maiores médias para a variável NGPA, em que todas as variedades de *P. guajava* demonstraram valores significativamente superiores a todos os acessos de araçá (tanto *P. guineense*, quanto *P. cattleyanum*). A variedade Cortibel 6 apresentou a maior média do NGPB (4.426.298) e do número de grãos de pólen por antera (10.197,50). Já a menor média de NGPB foi encontrada em Araçá Una (462.604), enquanto para NGPA, a menor média foi vista em Araçá Coroa (2.062,50).

**Tabela 5-** Média de número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos pólen por antera (NGPA), número de anteras por botão floral (NAB) e número de óvulos por botão floral (NOB) referente à avaliação de oito acessos de *Psidium* ssp.

<b>Acessos</b>	<b>Espécie</b>	<b>NGPB</b>	<b>NGPA</b>	<b>NAB</b>	<b>NOB</b>
Cortibel 6	<i>P. guajava</i>	4.426.298 a	10.197,50 a	431,75 a	542,75 a
Paluma	<i>P. guajava</i>	4.356.018 a	9.886,30 a	440,25 a	677,25 a
Cortibel 1	<i>P. guajava</i>	3.181.874 a	8.170 a	379,75 a	528,50 a
Cortibel 4	<i>P. guajava</i>	3.145.886 a	7.793,80 a	403,25 a	589,50 a
	<i>P. guajava</i>	3.777.519	9.011,90	413,75	584,50
Araçá Amarelo	<i>P. cattleyanum</i>	1.084.120 b	2.605 b	419,50 a	195 c
Araçá Coroa	<i>P. cattleyanum</i>	741.484 b	2.062,50 b	451,50 a	189,50 c
Araçá Una	<i>P. cattleyanum</i>	462.604 b	2.423,80 b	191 b	19,25 d
	<i>P. cattleyanum</i>	762.736	2.364	354	135
Araçá do Campo	<i>P. guineense</i>	741.484 b	3.327,50 b	225,75 b	355,50 b

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Assim como a variável NGPB, a menor média do NAB foi verificada no Araçá Una (191), enquanto a maior foi encontrada no araçá-coroa (451,50). Além do Araçá Coroa, o Araçá Amarelo e todas as variedades de goiabeira tiveram as maiores médias no NAB, conseqüentemente, apenas o Araçá do Campo e o Araçá Una apresentaram as menores médias.

Quanto ao NOB, novamente as goiabeiras se destacaram com as maiores médias, e a variedade Paluma teve a maior média, com 677,25 óvulos por BF. Os araçás se dividiram em três grupos, e o acesso com a menor média foi novamente o araçá-una, com apenas 19,25 óvulos.

A razão P:O estimada para *P. guajava* foi de 6.462,82, sendo assim, considerada xenógama. E como o esperado, ao calcular a razão P:O para cada cultivar de goiaba, todas se encontraram no mesmo intervalo (Tab. 6).

**Tabela 6-** Razão pólen:óvulo (P:O) e modo de reprodução de oito acessos de *Psidium* ssp., segundo a metodologia de Cruden (1977).

<b>Acessos</b>	<b>Espécie</b>	<b>P:O</b>	<b>Modo de Reprodução</b>
Cortibel 6	<i>P. guajava</i>	8.155,32	Xenógama
Paluma	<i>P. guajava</i>	6.431,92	Xenógama
Cortibel 1	<i>P. guajava</i>	6.020,58	Xenógama
Cortibel 4	<i>P. guajava</i>	5.336,53	Xenógama
	<i>P. guajava</i>	6.462,82	Xenógama
Araçá Amarelo	<i>P. cattleyanum</i>	5.559,59	Xenógama
Araçá Coroa	<i>P. cattleyanum</i>	3.912,84	Xenógama
Araçá Una	<i>P. cattleyanum</i>	24.031,37	Xenógama
	<i>P. cattleyanum</i>	5.649,89	Xenógama
Araçá do Campo	<i>P. guineense</i>	2.085,75	Xenógama Facultativa

A razão P:O de *P. cattleyanum*, a colocou no intervalo de xenógama, sendo de 5.649,89. Refletindo isso, todos os acessos dessa espécie também se apresentaram como xenógama (Tab. 6). A exceção foi a espécie *P. guineense*, que se apresentou no intervalo de xenógama facultativa, com a razão P:O de 2.085,75 (Tab. 6).

### 3.1.5. DISCUSSÃO

Raseira e Raseira (1996) estudaram em quatro tipos de *P. cattleyanum* (“roxo planalto”, “amarelo planalto”, “amarelo litoral” e “roxo sudeste”) o número de óvulos, número de grãos de pólen e número de anteras, e observaram que o número médio de óvulos variou entre 94 a 165, diferente dos nossos resultados, que teve variação entre 19,25 a 677,25. Entretanto, aqui foram avaliadas três espécies de *Psidium*, por isso a variação foi maior, ao analisar apenas dentre os *P. cattleyanum* a variação foi menor (19,25 a 195).

O número médio de anteras encontradas por Raseira e Raseira (1996) foi semelhante ao observado nas três espécies de *Psidium* avaliadas; em que tanto esses autores, quanto no presente trabalho, acharam o número máximo em um araçá amarelo (“amarelo planalto” -480; e Araçá Coroa – 451, respectivamente) e o mínimo em um araçá roxo (“roxo sudeste” -256; Araçá Una -191, sucessivamente). O caráter mais divergente entre os dois estudos foi NGPA, em que as três espécies de *Psidium* analisadas neste trabalho, tiveram valores mais elevados comparado com os quatro tipos de araçás observados por Raseira e Raseira (1996). Entretanto estes autores utilizaram uma metodologia diferente (Tuite, 1969) da utilizada no atual trabalho (Dafni, 1992).

De acordo com a classificação de Cruden (1977), todas as espécies aqui estudadas, *P. guineense*, *P. cattleyanum* e *P. guajava* foram consideradas xenógamas, ou seja, espécies que se reproduzem por polinização cruzada (alógamas). *P. guineense* foi tido como xenógamo facultativo, ou seja, pode possuir alguma taxa de autopolinização, enquanto *P. guajava* e *P. cattleyanum* pertenceram ao maior intervalo na tabela de Cruden (1977), identificando-os como xenógamos, ou seja, devem possuir alguma barreira, que dificulta a sua autopolinização, sendo assim, a sua polinização deve ser feita principalmente por polinizadores (Cruden, 1977; Lenzi e Orth, 2004).

*P. guajava*, tendo como provável estratégia de reprodução a xenogamia é concordante com o relato de outros autores que também consideraram a polinização cruzada como sendo a mais frequente em goiabeira (Dasarathy, 1951; Balasubrahmanyam, 1959). Esta afirmação é reforçada pelo fato da flor apresentar aroma agradável; liberar a maior parte do pólen, atraindo muitos visitantes florais (Alves, 2000), além da presença de uma pétala modificada em

forma de colher na variedade Paluma, que protege completamente o estigma, enquanto a flor está fechada, demonstrando mais uma característica que favorece a alogamia (Alves e Freitas, 2007).

Corroborando com isso, trabalhos relatam abelhas melífera (*Apis mellifera*), jandaíra (*Melipona subnitida*) e mamangava (*Xylocopa frontalis*) visitando as flores de goiabeira com comportamento de pastejo condizente com polinizadores (Alves e Freitas 2006; Alves e Freitas 2007). Isso explica o fato de alguns autores afirmarem que a polinização cruzada produz significativamente mais frutos e mais sementes, ao realizarem experimentos comparando diferentes tipos de polinização na goiabeira, incluindo a autopolinização (Alves 2000; Alves e Freitas 2007).

*P. cattleyanum* que também foi identificada como xenógama, foi sugerida por Raseira e Raseira (1996) como uma espécie com autoincompatibilidade. Isso porque, em um teste de polinização realizado por estes autores, foi observado que a penetração do tubo polínico no óvulo ocorreu em poucos pistilos, demonstrando que o tubo polínico cessa o crescimento antes de alcançar o ovário da flor.

Além disso, no mesmo trabalho, Raseira e Raseira (1996) calcularam que a porcentagem de frutificação obtida pela autopolinização foi menor do que a obtida por polinização livre. Entretanto, também foi observado frutificação quando as flores foram emasculadas, protegidas e não polinizadas, indicando a formação de frutos sem fertilização, provavelmente oriundos de parternocarpia ou apomixia.

*P. guineense* foi considerado, neste estudo, pela metodologia da razão P:O, como xenógama facultativa, corroborando com um estudo realizado por da Silva et al. (2016), em que foi observada uma ausência de endogamia e excesso de heterozigosidade em quatro populações naturais de *P. guineense*. Isso sugere que o principal modo de reprodução desta espécie é a alogamia (da Silva et al., 2016), visto que uma boa indicação da alogamia é a baixa frequência de locus em homozigose (Allard, 1960).

Outro fato confirmado por alguns autores (Cruden, 1977; Aarensen, 2000; Jurgens e Gottsberger, 2002; Galloni et al., 2007) relata que espécies perenes (como as três de *Psidium* estudadas) possuem uma razão P:O maior do que espécies anuais, sendo normalmente xenógamas. Isso ocorre porque espécies anuais têm um curto período disponível para deixar progênie, sendo assim, a

autopolinização traz uma vantagem, assegurando uma reprodução eficiente em um tempo limitado.

Em muitos estudos (Lopez et al., 1999; Jurgens e Gottsberger, 2002; Wang et al., 2005; Michalski e Durka, 2009), a razão P:O correspondem aos intervalos estimados por Cruden (1977), ou mantendo um padrão esperado, em que a razão P:O de espécies autógamas são inferiores a de espécies alógamas (Lehnebach e Riveiros, 2003; Medan, 2003), entretanto em alguns estudos ocorre uma discordância entre o resultado da razão P:O e o real modo de reprodução da espécie (Chouteau et al., 2006; Hokched e Ramírez, 2008).

Como no trabalho de García et al. (2014), que estudaram quatro espécies de *Passiflora*, duas autoincompatíveis (*P. caerulea* e *P. misera*) e duas autocompatíveis (*P. foetida* e *P. suberosa*), e observaram que embora a razão P:O tenha sido maior nas autoincompatíveis, essa estimativa classificou a *P. caerulea* no intervalo entre autógama facultativa e xeógama facultativa e a *P. misera* como xenógama facultativa. Isso demonstra que a razão P:O foi mais baixa do que deveria, visto que elas são autoincompatíveis e a autopolinização não é viável.

Devido a esses equívocos, essa estimativa para determinar o modo de reprodução sofreu algumas críticas. Entretanto, segundo Cruden (1977), a razão P:O é um dos fatores a ser analisado para predizer o modo de reprodução das espécies. Assim, mais estudos devem ser realizados para confirmar se a estimativa da razão P:O nas três espécies de *Psidium* está refletindo a realidade da reprodução dessas espécies no campo.

Cruden (2000) discute que este índice (P:O) pode ser confuso, principalmente para espécies alógamas com baixa razão P:O. Entretanto, alguns autores argumentam que as espécies com mecanismos de transferência de pólen precisos ou altamente especializados apresentam razão P:O mais baixa que o esperado, em comparação com espécies com sistema de reprodução equivalente, mas um fluxo de pólen menos eficiente (Cruden e Miller-Ward, 1981; Chouteau et al., 2006).

Vale ressaltar que são raros os estudos sobre biologia reprodutiva de espécies nativas da família Myrtaceae, principalmente as que pertencem ao gênero *Psidium*. E com exceção da goiabeira, até o momento, não existe programas de melhoramento genético de espécies de *Psidium* silvestres (Franzon

et al., 2009). Sendo assim, é de extrema importância trabalhos que visem o conhecimento básico sobre o modo de reprodução dessas espécies autóctones (Franzon et al., 2009), pois a forma que o melhoramento genético será conduzido depende principalmente do modo de reprodução da espécie.

### 3.1.6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse trabalho, conclui-se que as espécies aqui estudadas necessitam de muitos grãos de pólen para fertilizar um óvulo, indicando que a transferência de pólen para o estigma não é muito especializada, e por isso, corresponderam aos intervalos propostos por Cruden (1977), em que todas foram classificadas como xenógamas, sendo *P. guajava* e *P. Cattleyanum* xenógamas e *P. guineense* classificada como xenógama facultativa, com base na relação P:O.

Entretanto, como a razão P:O é apenas um fator indicativo do modo de reprodução, os estudos devem continuar a serem conduzidos para verificar a existência de autoincompatibilidade e identificar quais barreiras impossibilitam a autopolinização nas espécies estudadas.

### 3.2. AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO *IN VIVO* DOS GRÃOS DE PÓLEN EM TRÊS ESPÉCIES DE *Psidium* spp.

#### 3.2.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae, a qual possui pelo menos 133 gêneros e 3.800 espécies, sendo considerada uma das maiores famílias botânicas. (Costa e Forni-Martins, 2006; Éder-Silva et al., 2007).

Das espécies que o compõem, a goiabeira (*Psidium guajava* L.), é uma das mais importantes, devido ao grande valor econômico e nutricional (Oliveira, 2012; SEBRAE, 2015; IBGE, 2016). Outras espécies que se destacam nutricionalmente são *Psidium guineense* Swartz. (araçazeiro), e *Psidium cattleyanum* Sabine (araçazeiro), que embora não tenham representatividade na economia (Bezerra et al., 2006), são utilizados principalmente como fonte de genes em programas de melhoramento genético da goiabeira (Carneiro et al., 2007; Miranda et al., 2011; Patel et al., 2012; Freitas et al., 2014; Gomes et al., 2017).

Todavia, apesar de saber que para realizar o melhoramento genético de qualquer espécie vegetal, é de suma importância conhecer o seu modo de reprodução (Allard, 1960), este ainda não está bem definido nessas espécies.

Em goiabeira, essa informação ainda é controversa, visto que alguns autores afirmam que a espécie é preferencialmente autógama (Soubiê Sobrinho,

1951; Singh e Sehgal, 1968; São José e Pereira, 1987), enquanto outros concluíram que ela tem preferência pela alogamia (Dasarathy, 1951; Balasubrahmanyam, 1959).

Nas espécies de araquá, existem poucos estudos sobre o modo de reprodução, e a maioria das pesquisas não foca realmente nessa questão, obtendo resultados inconclusivos, como Raseira e Raseira (1996), que observando o crescimento do tubo polínico no pistilo de flores de *P. cattleyanum* afirmaram apenas que a autoincompatibilidade não parece ser incomum. E para *P. guinneense*, da Silva et al. (2016) sugerem que a alogamia é o principal modo de reprodução, mas isso ao analisarem ausência de endogamia em quatro populações naturais dessa espécie. Necessitando então, estudos que tenham a definição do modo de reprodução como principal objetivo.

As flores das goiabeiras e dos araçazeiros são hermafroditas, sendo fator potencial para autogamia (Danner et al., 2010), entretanto, é necessário verificar a ocorrência de sistemas de autoincompatibilidade (AI), visto que a AI promove a alogamia impedindo a autofecundação (Schifino-Wittmann e Dall'Agnol, 2002).

Sabendo disso, estudos sobre a biologia reprodutiva dessas espécies são prioridade para o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos programas de melhoramento genético, visto que com esse conhecimento é possível definir métodos de seleção com base em cruzamentos intra e interpopulacionais (Danner et al., 2010; Santos et al., 2007).

Em trabalho prévio, observou-se que tanto a goiabeira quanto o *P. cattleyanum* tem preferência pela alogamia (Capítulo 1); entretanto, por possuírem flores hermafroditas e haver a suposição de que há um sistema de autoincompatibilidade nas goiabeiras é necessário que haja uma investigação. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar teste de germinação *in vivo* dos grãos de pólen nas três espécies em estudo e gerar informações a respeito da biologia reprodutiva dessas espécies.

## 3.2.2. REVISÃO

### 3.2.2.1. Viabilidade polínica

A viabilidade polínica é um dos fatores responsáveis pela seleção de genótipos em programas de melhoramento, visto que, polens viáveis influenciam diretamente na fertilização e asseguram sucesso nas hibridações controladas (Costa et al., 2009; Cabral et al., 2013). Além disso, com o aumento do número de grãos de pólen viáveis depositados no estigma, é possível aumentar o tamanho do fruto, o número de sementes e a percentagem de frutos produzidos (Dafni, 1992).

A análise da viabilidade do pólen é importante no melhoramento clássico, pois reflete o potencial do gameta masculino na eficiência da fertilização (Alexander, 1980; Franklin et al., 1995). O estudo da viabilidade do pólen também é empregado no monitoramento dos grãos de pólen armazenados, para garantir a fecundação no cruzamento entre genótipos com floração em diferentes épocas ou entre locais distantes (Alexander, 1980; Einhardt et al., 2006; Danner et al., 2011).

Com isso, para o melhoramento genético, são importantes trabalhos que estudem a viabilidade polínica, para que possam indicar o melhor momento da coleta do pólen em adequado estágio de maturação, para que o mesmo se mantenha viável e com capacidade de germinação quando a hibridação for realizada (Franzon e Raseira, 2006; Costa et al., 2009). Visto que as polinizações controladas continuam sendo um pilar do melhoramento e muitas vezes ocorre a comparação do desempenho dos doadores de pólen (Stone et al., 1995).

Vale ressaltar, que o termo viabilidade polínica é definido na literatura como “ter a capacidade de viver, crescer, germinar ou desenvolver” (Lincoln et al., 1982), entretanto, ter a capacidade não significa que necessariamente os polens viáveis irão germinar ou fecundar ( *in vitro* ou *in vivo*), visto que muitos fatores podem influenciar na sua germinação e fertilização (Dafni e Firmage, 2000).

Isso é evidenciado em alguns estudos, que mostram que idade do pólen e fatores climáticos, como temperatura e umidade relativa do ar durante o florescimento, podem aumentar a inviabilidade polínica (Dafni, 1992; Souza et al., 2002; Franzon e Razeira, 2006; Danner et al., 2011). Além de fatores abióticos,

anomalias citogenéticas, como alterações pós-meióticas, também podem refletir em baixa viabilidade do pólen (Techio et al., 2006).

Sendo assim, pode-se relacionar a predominância de grãos de polens viáveis com uma divisão nuclear satisfatória, ou seja, a divisão celular regular, com elevado número de tétrades normais, resulta em grãos de polens viáveis (Moreira et al., 2017). Barbosa (2016) também observou que genótipos com baixa viabilidade polínica possuíam elevado número de produtos pós-meióticos anormais, como díades e tríades. Isso constata a importância de avaliar a viabilidade polínica das plantas que serão utilizadas nos programas de melhoramento, que além de mostrar a porcentagem de polens viáveis, ainda é uma forma de inferir se a divisão celular está ocorrendo de forma normal (Barbosa, 2016; Moreira et al., 2017).

Considerando isso, várias técnicas foram definidas visando à eficiência em definir com rapidez e precisão a viabilidade polínica (Dafni, 1992). Esses métodos podem ser divididos em quatro categorias: teste de germinação *in vivo*, teste de germinação *in vitro*, utilização de corantes e porcentagem de frutificação efetiva (Galleta, 1983; Stone et al., 1995; Einhardt, et al., 2006).

Entretanto, não há na literatura um teste de viabilidade universal para ser utilizado em todas as espécies (Hister e Tedesco, 2016), e todos os métodos têm prós e contras. O teste de germinação *in vivo* é exigente e por demandar tempo, limita o tamanho da amostra (Stone et al., 1995); o teste de germinação *in vitro* subestima ou superestima a porcentagem de polens viáveis (Galleta, 1983); o método que utiliza a porcentagem de frutificação efetiva é o que demanda mais tempo, pois além de aguardar a frutificação, polinizações manuais ainda devem ser feitas; já os métodos que utilizam corantes, embora superestime a porcentagem de polens viáveis, é um método simples e barato que fornecem resultados rápidos, de baixo custo e são amplamente utilizados (Galleta, 1983; Báez et al., 2002; Kelly et al., 2002; Techio et al., 2006; Einhardt et al., 2006).

Dentre os corantes mais utilizados, a coloração tripla de Alexander é a que sugere os dados mais acurados sobre a viabilidade dos grãos de pólen, pois colore de forma diferente os polens viáveis e os inviáveis, devido à utilização de duas substâncias que apresentam dupla coloração: o verde malaquita e a fucsina ácida. Em que o primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, quanto ao segundo, cora o protoplasto. Com isso, torna

possível identificar grãos de pólen abortados dos não abortados, pois os últimos não possuem protoplasto, e apenas a celulose contida na parede apresentará coloração (Alexander, 1980; Techio et al., 2006; Hister e Tedesco, 2016; Silva et al., 2017).

Entretanto, para Báez et al. (2002), esses testes com corantes são ineficientes, visto que apenas determinam componentes celulares e a integridade do grão de pólen (núcleo e membrana plasmática), sendo necessário cautela na interpretação dos dados.

A fim de garantir o sucesso dos programas de melhoramento com *Psidium* spp. por meio de polinização controlada, alguns trabalhos com viabilidade polínica já foram realizados (Boti, 2001; Einhardt et al., 2006; Silva et al., 2017). Boti (2001) analisou a viabilidade dos grãos de pólen de cinco indivíduos de *Psidium guajava* na antese e na pré-antese, utilizando o corante carmim acético e identificou 59,8% de polens viáveis na pré-antese, subindo para 98% na antese. Além disso, ele ainda identificou que os polens permaneciam viáveis por até 10 horas após a abertura floral.

Silva et al. (2017) analisaram a viabilidade polínica de 22 genótipos de *P. guajava* por três anos e com três corantes diferentes: Solução tripla de Alexander, Orceína Acética e Lugol. Eles observaram que todos os genótipos apresentaram elevada quantidade de pólen viável, com uma média geral de 93,46% nas três coletas. Além disso, no último ano, eles utilizaram apenas a Solução tripla de Alexander como corante, pois possibilitou uma diferenciação mais fácil entre os grãos de pólen de *Psidium guajava*.

Em relação ao corante, Hister e Tedesco (2016), também concluíram que o reativo de Alexander é o mais eficiente e fidedigno no que diz respeito à estimativa da viabilidade dos grãos de pólen de *Psidium* por meio da capacidade de coloração. Esses autores chegaram a esse resultado ao compararem a viabilidade polínica de 20 acessos de *P. cattleyanum*, quando corados com orceína acética e o reativo de Alexander. Eles verificaram, também, que com o segundo corante, a viabilidade polínica na maioria dos acessos é acima de 80%, sendo considerada elevada.

Embora existam estudos da viabilidade polínica em *Psidium guajava*, em espécies de *Psidium* silvestres, esse tipo de estudo é raro. Stone et al. (1995) fizeram um levantamento bibliográfico com artigos de sete revistas por 14 anos

que utilizaram polinização manual e verificaram que menos de um terço relatam qualquer consideração com a viabilidade polínica. Sendo assim, é importante que estudos, buscando identificar acessos com a maior viabilidade do pólen, continuem sendo realizados, objetivando auxiliar o melhorista no momento da hibridação.

### **3.2.2.2. Receptividade do estigma**

O estigma é a porção receptiva do tecido feminino, no qual o pólen se liga e medeia a migração do tubo polínico para o estilo. Os estigmas geralmente são classificados em dois grupos: estigmas úmidos, que são cobertos com células superficiais, que muitas vezes se lisam para liberar uma secreção superficial viscosa contendo proteínas, lipídios, polissacarídeos e pigmentos; e estigmas secos, em que as células superficiais são intactas e são cobertas por uma parede celular primária, uma cutícula cerosa e uma película proteica (Edlund et al., 2004).

Para o sucesso da fertilização, é necessário que o pólen seja transferido para o estigma (Ramos et al., 2008), e que este seja receptivo ao pólen, ou seja, que o estigma permita a germinação do gametófito masculino ou grão de pólen viável e compatível (Sanzol e Herrero, 2001; Yi et al., 2006). Sendo assim, a receptividade do estigma é um estágio crucial na maturação da flor, que pode influenciar a taxa de autopolinização, o sucesso da polinização nos diferentes estágios do ciclo de vida das flores e a importância de vários polinizadores (Gallen et al., 1987).

O início da receptividade estigmática é acompanhado de uma série de mudanças que ocorrem após a maturação do estigma (Sanzol e Herrero, 2001). A receptividade ótima é variável e pode ocorrer antes e/ou após a abertura floral (Boti, 2001; Yi et al., 2006). Alguns fatores podem influenciar na receptividade do estigma, como a idade da flor, o horário do dia e a presença ou ausência de exsudato no estigma (Dafni, 1992).

A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, como por exemplo, a presença de exsudatos e mudança na coloração; pela quantidade de pólenes germinados no estigma; e por testes para verificação das enzimas ativas, como peroxidase e a esterase (Dafni, 1992; Boti, 2001; Zanandrea et al., 2011).

Em *Psidium* spp. os trabalhos relacionados à receptividade do estigma são muito divergentes. Para Singh e Sehgal (1968), a receptividade do estigma se inicia dois dias antes da antese e atinge o pico na antese, enquanto para Soubihe Sobrinho (1951), a receptividade ocorre apenas no momento da antese. Já para Dasarathy (1951) e Balasubrahmanyam (1959), o estigma só está viável após duas ou três horas da abertura da flor, e prossegue funcional por, aproximadamente, 48 horas.

Boti (2001), utilizando o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Dafni, 1992) para verificar receptividade do estigma em 40 flores de goiabeira, relatou que o estigma se encontrava funcional desde a pré-antese até 30 horas após a abertura da flor. Entretanto, o pico de receptibilidade foi na antese.

Vale ressaltar, que segundo Stone et al. (1995), em um levantamento bibliográfico de artigos de polinização manual de 14 anos, concluiu que artigos que relatam receptividade do estigma são raros. E na maioria das culturas, os autores fazem apenas uma avaliação subjetiva da receptividade, dizendo que o estigma está receptivo sem indicar como a receptividade foi avaliada ou apenas descrevendo uma mudança morfológica associada à receptividade. E menos frequente ainda, foi especificado algum período de tempo em que os estigmas ficaram receptivos.

### **3.2.2.3. Análise de autoincompatibilidade pela germinação do grão de pólen *in vivo***

O conhecimento do modo de reprodução de uma espécie é importante para a conservação do germoplasma, o manejo em cultivo e para o melhoramento genético, uma vez que permite definir estratégias de seleção com base em cruzamentos (Danner et al., 2011).

Para que ocorra a fertilização, na maioria das angiospermas, ocorre a dispersão dos grãos de pólen maduros, os quais estão desidratados. Se o pólen encontra um estigma receptivo e compatível, ele se adere nessa superfície, onde é reconhecido pelos tecidos do pistilo, reidratam-se pela aquisição de água do exsudato estilar ou das células papilares do estigma. Após a germinação do pólen, os tubos polínicos só podem entrar no estilo depois de ultrapassar a barreira do estigma (Gaude e McCormick, 1999; Edlund et al., 2004).

Os detalhes dessa etapa variam de espécie para espécie. Em plantas com estilo aberto, o estigma é coberto com uma epiderme que é contínua com o estilo, entretanto, em espécies com estigma fechado, os tubos polínicos crescem através da cutícula externa e parede celular das papilas do estigma para entrar no estilo. Vale ressaltar que a penetração enzimática da superfície do estigma é controlada, para não expor o pistilo a patógenos danosos (Edlund et al., 2004). Quando o tubo polínico finalmente atinge o ovário, ele descarrega dois gametas masculinos no saco embrionário, onde ocorre a dupla fecundação (Gaude e McCormick, 1999).

A observação direta *in vivo* é o método mais utilizado para o estudo da interação pólen/pistilo e baseia-se na coloração da calose por fluorocromo, que emite luz fluorescente quando é iluminada por radiações no espectro da luz azul ou do ultravioleta (Cordeiro et al., 2004). Desta forma, essa técnica permite analisar características associadas à germinação dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento, podendo acompanhar o sucesso ou não da fertilização nas hibridações e elucidar questões referentes à incompatibilidade ou autoincompatibilidade reprodutiva das espécies (Bandeira et al., 2011).

A autoincompatibilidade (AI) é a incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando fertilizadas por seu próprio pólen, e é um assunto de grande interesse para geneticistas e melhoristas (Schifino-Wittmann e Dall'Agnol, 2002).

Esse mecanismo fisiológico, com base genética, promove a alogamia impedindo a autofecundação (Schifino-Wittmann e Dall'Agnol, 2002). A autoincompatibilidade pode ser heteromórfica ou homomórfica. A primeira ocorre quando há diferença nas estruturas florais (Cunha, 2013). Já o sistema homomórfico pode ser gametofítico ou esporofítico, sendo que no gametofítico a reação de AI ocorre no estilete da flor e, para tal, é necessário que o alelo presente no grão de pólen não esteja presente no tecido diploide do estilete. (Nettancourt, 1977; Schifino-Wittmann e Dall'Agnol, 2002).

Já a AI esporofítica, a especificidade do pólen é determinada pelo genótipo diploide do esporófito (planta mãe); portanto o que determina a ocorrência ou não de AI são os alelos presentes no tecido diploide da planta, e em caso de incompatibilidade o grão de pólen ou não germina ou cessa o crescimento do tubo polínico na superfície estigmática (Nettancourt, 1977; Schifino-Wittmann e Dall'Agnol, 2002).

O entendimento do sistema de autoincompatibilidade pode gerar informações úteis no planejamento de estratégias de melhoramento e hibridações controladas, para garantir a adequada polinização com o uso de genótipos compatíveis (Santos et al., 2007). Para isso, muitos autores têm utilizado a metodologia de acompanhar o crescimento do tubo polínico, após polinização, para verificar o sucesso ou não do cruzamento entre genótipos (Dantas et al., 2005; Martins et al., 2014) ou verificar se existe autoincompatibilidade na espécie de estudo (Santos et al., 2007).

Santos et al. (2007) realizaram um trabalho a fim de detectar se existe a presença de mecanismos de autoincompatibilidade em *Acca sellowiana*, uma espécie que pertence à família das Myrtaceae. Para isso, realizaram tanto a autopolinização manual de dois genótipos, quanto a polinização cruzada entre eles, e acompanharam o crescimento do tubo polínico. Eles verificaram que esse crescimento levou 96 horas para atingir o ovário, tanto em pistilos autopolinizados como naqueles de polinização cruzada. Devido a isso, eles concluíram que não existe um sistema de autoincompatibilidade nessa espécie de Myrtaceae.

Em *Psidium* spp. ainda existe grande discussão sobre a existência da autoincompatibilidade, visto que enquanto alguns autores afirmam que *P. guajava* é autoincompatível (Seth, 1960; Hirano e Nakasone, 1969), outros relatam que o pólen da goiabeira pode se autopolinizar (Soubihe Sobrinho, 1951; Singh e Seghal, 1968; Boti, 2001)

Vale ressaltar que esses estudos são antigos, e essa questão ainda não está elucidada, sendo importante dar continuidade a esses estudos, acompanhando o crescimento do tubo polínico nas espécies de *Psidium* spp. para assim conseguir afirmar se a autoincompatibilidade existe nessas espécies.

### **3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.3.1. Material Vegetal**

Neste estudo foram utilizados oito acessos de *Psidium* spp., sendo quatro de *P. guajava* (Cortibel 1, Cortibel 4, Cortibel 6 e Cortibel 12), três de *P. cattleianum* (Araçá Amarelo, Araçá Madureira e Araçá Una) e um de *P.*

*guineense* (Araçá do Campo) (Tabela 1). Todos pertencem à coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e estão conservados na área experimental da Escola Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes.

As plantas estão distribuídas em seis linhas de plantio, com espaçamento de cinco metros dentro da linha e sete metros entre linhas. Os araçazeiros foram propagados via seminal, enquanto as goiabeiras, por estaquia.

**Tabela 1.** Acessos de *Psidium* spp utilizados na pesquisa e conservados na coleção de germoplasma na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF, na Escola Agrícola Antônio Sarlo, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro(RJ).

Acesso	Espécie	Nº de Plantas utilizadas	Procedência
Cortibel 1	<i>P. guajava</i>	1	-
Cortibel 4	<i>P. guajava</i>	1	-
Cortibel 6	<i>P. guajava</i>	1	-
Cortibel 12	<i>P. guajava</i>	1	-
Araçá Madureira	<i>P. cattleyanum</i>	4	-
Araçá Amarelo	<i>P. cattleyanum</i>	3	Campos dos Goytacazes- RJ
Araçá Una	<i>P. cattleyanum</i>	5	Campos dos Goytacazes- RJ
Araçá do Campo	<i>P. guineense</i>	1	Itaboraí- RJ

### 3.2.3.2. Viabilidade polínica e receptividade do estigma

Tanto para estimar a viabilidade polínica, quanto para verificar a receptividade dos estigmas, seis botões florais por acessos foram coletados, três na pré-antese (PA) e três na antese (AT), fixados em etanol 70% e conservados a 4°C.

Para estimar a viabilidade polínica de cada acesso, 15 anteras foram maceradas com uma gota do corante solução tripla de Alexander (Alexander, 1969). Foram feitas duas lâminas por botão floral, nos três botões florais PA e na AT, totalizando seis lâminas por período de coleta. De cada lâmina foram contados 200 grãos de pólen, totalizando 1.200 grãos de polens contados na PA e 1.200 na AT. As lâminas foram lidas com o auxílio do microscópio óptico (Olympus BX60). Os polens considerados viáveis foram aqueles que apresentavam os grãos com formato e tamanho regular e de coloração púrpura. Já os inviáveis foram os que não coraram, com protoplasto contraído ou de formato e tamanho irregular. Foi estimado, então, a porcentagem de polens viáveis na PA (%VPPA), na AT (%VPAT) e a média das duas (%VPM).

A porcentagem da viabilidade polínica foi estimada empregando a seguinte expressão:

$$GPV (\%) = \frac{(NGPV)}{1200} \times 100$$

Onde:

GPV – Porcentagem de grãos de polens viáveis

NGPV- Número de grãos de polens viáveis

Para verificar a receptividade do estigma foram utilizados os mesmos botões florais da estimativa da viabilidade polínica. Essa estratégia foi adotada para verificar se existia a possibilidade de autofecundação pelo fato de ambas estruturas reprodutivas estarem maduras.

Desta forma, a receptividade foi testada, imergindo os estigmas na solução de alfa-naftil acetato (Pearse, 1953) por cinco minutos, sendo classificados como receptivos aqueles que apresentaram coloração escura (Dafni, 1992).

### **3.2.3.3. Teste de germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico *in vivo***

Para determinar se existe autoincompatibilidade (AI) nas espécies estudadas, foram coletados quatro botões florais por acesso em cinco tratamentos diferentes:

Tratamento 1: Botões florais ensacados na pré-antese e coletados na antese (BFA);

Tratamento 2: Botões florais ensacados na pré-antese e que permaneceram ensacados até 24 horas após a antese (hora da coleta) (BFE24);

Tratamento 3: Botões florais ensacados na pré-antese e mantidos ensacados até 48 horas após a antese (hora da coleta) (BFE48);

Tratamento 4: Botões florais identificados na pré-antese, sujeitos à polinização aberta e coletados 24 horas após a antese (BF24AA); e

Tratamento 5: Botões florais marcados na pré-antese, mantidos em polinização aberta e coletados 48 horas após a antese (BF48AA).

Em todos os tratamentos, quatro botões florais foram coletados e fixados em FAA (formaldeído, álcool e ácido acético) por 24 horas. Posteriormente, os botões foram transferidos para solução de álcool 70% por pelo menos quatro horas. No preparo do tecido para a visualização no microscópio óptico, os pistilos foram colocados em NaOH 8M por oito horas, para que ocorresse o amaciamento do tecido. Em seguida, os pistilos foram lavados cinco vezes em água destilada e colocados em frascos âmbar recoberto com papel alumínio contendo o corante anilina azul 1% e deixados em temperatura ambiente por quatro horas.

Apenas o estigma e o estilete foram observados no microscópio óptico de fluorescência. Foi utilizado o filtro de emissão de ultravioleta de 509nm e 370nm de excitação (Olympus BX60), e as imagens foram capturadas com o Image-Pro Plus Software (versão 5.1, Media Cybernetics). A avaliação constou na observação dos grãos de pólen germinados e no crescimento do tubo polínico até atingir o final do estilete.

#### **3.2.3.4. Análise estatística**

As variáveis avaliadas %VPPA e %VPAT foram submetidas à análise de variância obedecendo ao seguinte modelo estatístico, com base no delineamento inteiramente ao acaso:

$$Y_{ijk} = \mu + G_j + \varepsilon_{ijk}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$G_i$  = efeito do  $i$ -ésimo Genótipo fixo ( $i = 1, 2, \dots, 8$ );

$\varepsilon_{ijk}$  = erro experimental, associado a cada observação, pressuposto NID (0,  $\sigma^2$ ).

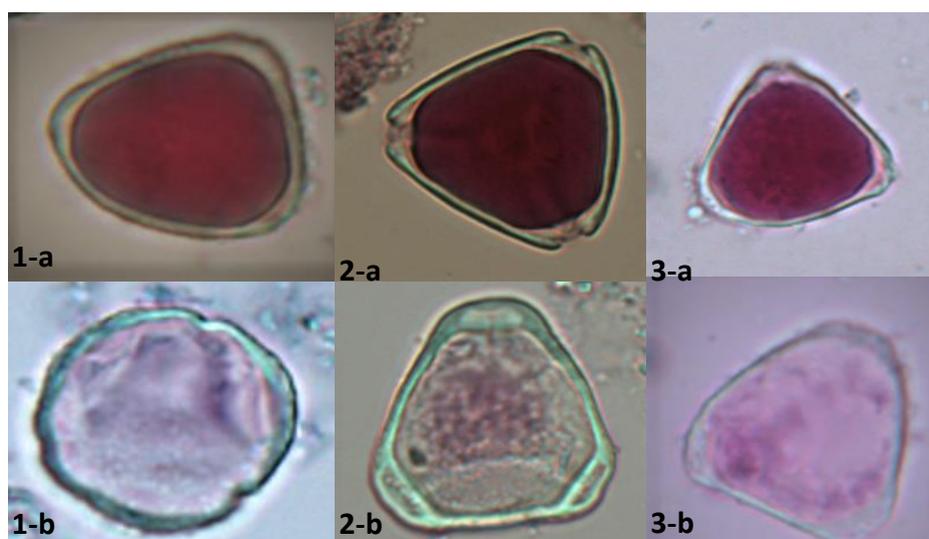
Como forma de distinguir os acessos, procedeu-se à análise de comparação de médias via teste Tukey a 5% de probabilidade. Para todas as análises foi utilizado o programa computacional Genes (Cruz, 2013).

### 3.2.4. RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.2.4.1. Análise da viabilidade polínica e receptividade do estigma

A viabilidade polínica é um dos fatores que tem influência direta sobre o sucesso da fertilização (Dafni, 1992), uma vez que reflete o potencial do gameta masculino na eficiência da fecundação (Alexander, 1980). Sendo assim, para assegurar o sucesso nas hibridações controladas, as quais são muito utilizadas nos programas de melhoramento, é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade (Einhardt et al., 2006) (Figura 1).

Ao observar a análise de variância (tabela 2), pode-se notar que, tanto na pré-antese quanto na antese, é possível observar acessos com a viabilidade polínica mais elevada que os demais, visto que para ambas as variáveis o teste F foi significativo a 1%.



**Figura 1:** Grão de pólen viáveis (a) e inviáveis (b) de: 1- *P. guajava*; 2- *P. cattleyanum*; 3- *P. guineense*.

O coeficiente de variação (CV%) das características foi considerado baixo para %VPAT (6,44%) e %VPM (8,90%) e médio para %VPPA (16,48%) (tabela 2), isso de acordo com Gomes (1990), que determinou que CV% muito alto são superiores a 30%, altos de 20 a 30%, de 10 a 20% são médios e inferiores a 10% são baixos. Vale ressaltar que até mesmo o CV% de %VPPA pode ser considerado baixo, se analisarmos que a variação refletida nessa análise é de três espécies diferentes.

Outra característica que chama a atenção na tabela 2, é que a média da viabilidade pré-antese (%VPPA) e antese (%VPAT) a abertura floral foram semelhantes (79,18% e 79,5%, respectivamente), demonstrando que a viabilidade polínica não se eleva no dia da antese, e que os grãos de polens já estão maduros, mesmo 24 horas antes da abertura floral. Resultado semelhante foi observado por Costa et al. (2009), que ao estudarem qual o melhor momento de coleta de polens viáveis em *Passiflora alata*, verificaram que a viabilidade é relativamente constante durante todo o período da antese floral, desde um dia antes até um dia depois.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para viabilidade polínica na pré-antese (%VPPA), viabilidade polínica na antese (%VPAT) e viabilidade média (%VPM) referente à avaliação de oito acessos de *Psidium* spp.

FV	GL	Quadrado Médio		
		%VPPA	%VPAT	%VPM
Genótipo	7	2336**	2101.46**	2119.57**
Resíduo	16	169.59	26.25	49.54
Média		79.18	79.5	79.33
CV%		16.48	6.44	8.90

**FV**= fator de variação;

**GL**= grau de liberdade;

**\*\***= Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

**CV (%)** = Coeficiente de variação

Os valores médios da viabilidade polínica na pré-antese e da viabilidade polínica na antese de cada acesso e a média das espécies estão na tabela 3, juntamente com a análise de comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 3** - Valores médios da porcentagem da viabilidade polínica na pré-antese (%VPPA), da viabilidade polínica na antese (%VPAT) e viabilidade média (%VPM) referente à avaliação dos oito acessos de *Psidium* spp.

<b>Acessos</b>	<b>Espécie</b>	<b>%VPPA</b>	<b>%VPAT</b>	<b>%VPM</b>
Cortibel 1	<i>P. guajava</i>	98,33 a	98,42 a	98,37 a
Cortibel 4	<i>P. guajava</i>	98,17 a	98,2 a	98,18 a
Cortibel 6	<i>P. guajava</i>	99,42 a	89,83 ab	94,62 a
Cortibel 12	<i>P. guajava</i>	98,83 a	99,08 a	98,96 a
Média	<i>P. guajava</i>	98,9	96,38	97,56
Araçá Una	<i>P. cattleyanum</i>	97,91 a	91,5 a	94,71 a
Araçá Amarelo	<i>P. cattleyanum</i>	64,08 ab	76,17 bc	70,12 b
Araçá Madureira	<i>P. cattleyanum</i>	40,75 b	20,41 d	30,58 c
Média	<i>P. cattleyanum</i>	67,58	62,69	65,14
Araçá do Campo	<i>P. guineense</i>	35,92 b	60,38 c	49,15 c

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A %VPPA variou de 99,42% (Cortibel 6) a 35,92% (Araçá do Campo), enquanto a %VPAT teve seu maior valor, 99,08% no acesso Cortibel 12, e o menor no Araçá Madureira (20,41%). Esses dois acessos também apresentaram os maiores e menores valores para %VPM, de 98,96% e 30,58%, respectivamente.

O Araçá Madureira foi o único acesso que apresentou a %VPAT menor que %VPPA, ou seja, teve mais polens viáveis antes da antese do que na antese propriamente dita, isso pode ter ocorrido devido à influência ambiental no dia da coleta, visto que o dia estava com temperaturas mais baixas, e alguns estudos relatam que a temperatura pode influenciar na viabilidade polínica (Souza et al., 2002; Kelly et al., 2002; Danner et al., 2011).

Todas as goiabeiras e dois *P. cattleyanum* (Araçá Una e Araçá Amarelo) não diferiram significativamente para %VPPA e apresentaram as maiores médias, o mesmo ocorreu com %VPAT e %VPM, exceto para o Araçá Amarelo, que demonstrou a viabilidade polínica significativamente inferior para essas duas últimas variáveis.

Vale ressaltar, que ocorreu diferença significativa entre os *P. cattleyanum* para todas as características analisadas, e na %VPM foi a que demonstrou a maior variabilidade entre os acessos, tendo o maior valor 94,71% (Araçá Una) e o menor 30,58% (Araçá Madureira). Hister e Tedesco (2016), estudando genótipos

dessa mesma espécie, também observaram grande variação na viabilidade polínica (43% a 97%), demonstrando grande variabilidade genética da espécie.

O mesmo não ocorreu com as goiabeiras, que foram significativamente iguais em todas as variáveis estudadas, com a viabilidade polínica sempre acima de 89%. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2017), que ao avaliarem a viabilidade polínica de 22 acessos de goiabeiras, observaram que apenas 4 genótipos ficaram com a viabilidade abaixo de 80%.

Ao analisar a viabilidade polínica durante o período da antese, desde um dia antes, até a antese (%VPM), observa-se que todos os acessos de goiabeira e o Araçá Una não se diferem estatisticamente e possuem a viabilidade polínica elevada, considerando que, para Ruggiero (1973), a viabilidade polínica é alta acima de 70%. Sendo assim, além desses acessos, o Araçá Amarelo também possui a viabilidade polínica elevada, mesmo que seja significativamente inferior ao *P. guajava* e o Araçá Una.

Ainda, analisando a viabilidade polínica de todo o período da antese (%VPM), o Araçá Madureira e o Araçá do Campo, possuem a viabilidade polínica considerada mais baixa, de 30,58% e 49,15%, respectivamente. Vale ressaltar, que valores inferiores a 70% podem trazer problemas para a espécie, como infertilidade (Hister e Tedesco, 2016).

Relacionando os dois períodos avaliados, antes da antese (%VPPA) e na antese (%VPAT), observa-se que na média das espécies *P. guajava* e *P. cattleyanum* não houve variação quanto à quantidade de polens viáveis, indicando, que mesmo antes da antese, os polens já estavam maduros.

Nas goiabeiras, a viabilidade foi de 98,90% na pré-antese e 96,38% na antese, esses resultados corroboram com Siqueira (2010), que observou em *P. guajava* cv Paluma a viabilidade polínica de 95,6%, e ela se manteve elevada desde a pré-antese até 16 horas após a antese (que foi o último horário de observação do autor).

Já a média dos acessos de *P. cattleyanum* variou entre 67,58% na pré-antese e 62,69% na antese. Franzon e Raseira (2006), estudando outra espécie de Myrtaceae silvestre, *Eugenia involucrata*, observaram que a porcentagem da viabilidade polínica variou significativamente entre a flor em estágio de balão e a flor na antese (48% a 70,90%).

No acesso Araçá do Campo (*P. guineense*), o número de polens viáveis quase dobrou ao ser comparado antes e após a antese (35,92%- %VPPA para 60,38%- %VPAT). Esse aumento pode ter ocorrido para favorecer a polinização cruzada. Danner et al. (2011) também observaram que em jabuticabeira, outra espécie de Myrtaceae, a viabilidade polínica aumenta, a partir da antese, e atinge a máxima em 6 horas após a antese, coincidindo com o período de maior visitação dos polinizadores.

Analisando a média da viabilidade polínica (%VPM) das espécies de *P. guajava*, *P. cattleyanum* e do acesso de *P. guineense*, observa-se que a da goiabeira é maior que o dos dois araçazeiros. Isso também foi relatado por Barbosa (2016), em que a viabilidade polínica dos araçazeiros variou de 47% a 79,6%, enquanto a das goiabeiras teve variação de 95 a 99,6%.

Barbosa (2016) ainda relata, que com viabilidade de 47% um acesso pode ser considerado um acesso semi-estéril e pouco útil para o melhoramento, se for utilizado como genitor masculino. Brink (1927) considerou genótipos de milho semi-estéril quando 50% dos polens avaliados eram abortados. Essa baixa viabilidade também ocorreu no Araçá do Campo (49,15%) e no Araçá Madureira (30,58%), sendo assim, caso esses acessos sejam utilizados em hibridações em programas de melhoramento, aconselha-se utilizá-los apenas como genitor feminino.

A diferença da média da viabilidade polínica entre as espécies de *P. guajava* e *P. cattleyanum* e o acesso de *P. guineense* pode ser explicado pelo comportamento meiótico dessas espécies, visto que isso está diretamente ligado ao seu grau de fertilidade, e que alterações observadas durante o processo de divisão celular pode refletir na viabilidade polínica (Defani-Scoarize et al., 1995).

Barbosa (2016), analisando a meiose desses mesmos acessos de *Psidium* verificou que a maior porcentagem de gametas não reduzidos (2n), que são causados por irregularidades meióticas, foi nos acessos de *P. cattleyanum* e no acesso de *P. guineense* e menor nos de *P. guajava*. Além disso, esse autor observou que os acessos com maiores irregularidades meióticas foram o Araçá Madureira (31,3%) e o Araçá do Campo (12,5%), corroborando com o atual trabalho, visto que esses dois acessos foram os que tiveram a menor viabilidade polínica.

Souza et al (2002), trabalhando com *Passiflora* também relaciona a viabilidade polínica mais baixa como consequência de anormalidades meióticas, as quais foram consideradas causadoras de grãos de pólen imperfeitos e conseqüentemente, inviáveis

Guerra (1988) explica que os elevados valores de viabilidade polínica, como o observado para as goiabeiras, o Araça Una e o Araçá Amarelo, são conseqüências de regularidade na meiose, como ao pareamento e a separação regular dos cromossomos durante esse processo.

Estimar a viabilidade polínica é muito importante, pois é um dos fatores responsáveis pela seleção de genótipos para programas de melhoramentos (Cabral et al., 2013), visto que, de acordo Alves e Freitas (2007), parece haver uma necessidade do desenvolvimento de um número mínimo de sementes para assegurar a produção de hormônios responsáveis para o vingamento dos frutos da goiabeira. Além disso, esses autores sugerem que o maior número de grãos de polens viáveis no estigma induz a produção de goiabas com maior massa.

Para que ocorra a fertilização, além do pólen estar viável, o estigma deve estar receptivo. A receptividade do estigma avalia a capacidade do estigma de permitir a germinação do pólen. No processo de maturação do estigma, ocorre uma série de mudanças, como a produção da enzima peroxidase (Sanzol e Herrero, 2001; Ramos et al., 2008).

A receptividade do estigma limita o período de polinização efetivo da planta (Sanzol e Herrero, 2001), por isso é importante identificar em qual período o estigma está maduro para que a polinização possa ser feita com maior eficiência. Além disso, estimar em conjunto a receptividade do estigma e a maturação do pólen, pode indicar se a espécie possui dicogamia, ou seja, se a maturação das partes femininas e masculinas de flores hermafroditas ocorre em diferentes momentos, sendo este um mecanismo que promove a alogamia (Bespalhok et al., 2014).

Sendo assim, pode-se afirmar que nenhum dos acessos estudados possuem protandria (grãos de pólen maduro antes dos estigmas) ou protogenia (estigmas receptivos antes da maturidade polínica), visto que o estigma de todos os acessos estava receptivo desde a pré-antese até a antese. Nos mesmos momentos em que os polens se mostraram maduros (%VPPA e %VPAT). Esse resultado ainda demonstra que existe a possibilidade das flores de *P. guajava*, *P.*

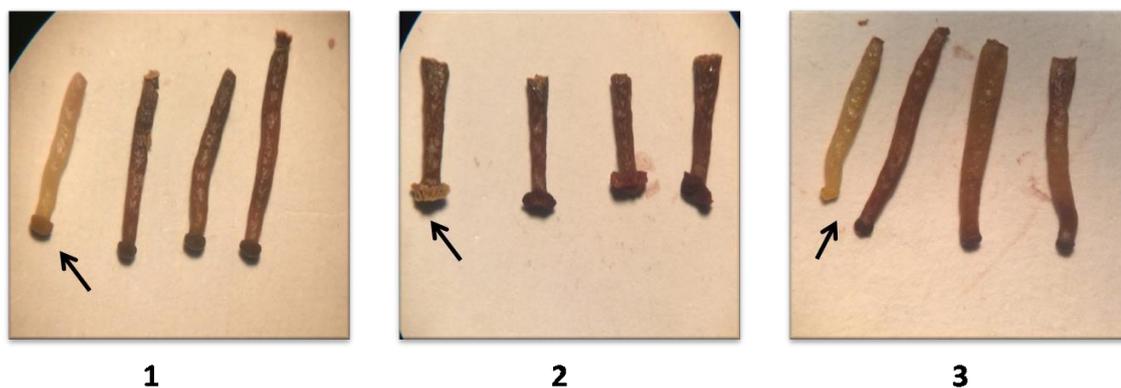
*cattleyanum* e *P. guineense* se autofecundarem mesmo antes de abrir, visto que tanto o pólen quanto o estigma estavam maduros na pré-antese.

Este resultado corrobora com outros trabalhos que afirmam que o estigma está receptivo dois dias antes da antese em *P. guajava* (Singh e Segal, 1968). Boti (2001) também afirma que o estigma se encontra maduro na pré-antese, entretanto, atinge o pico de receptividade na antese e permanece receptivo até 30 horas após a antese. Este autor ainda sugere que, com o estigma receptivo na pré-antese e polens viáveis no mesmo período, favorece a autopolinização espontânea.

Todavia, outros autores afirmam que o estigma em *P. guajava* só se torna receptivo após a antese. Siqueira et al. (2012) observaram que o estigma está receptivo logo após a antese, e permanece por no mínimo 16 horas. Soubihe Sobrinho (1951) também relatou que a receptividade do estigma inicia-se na abertura floral.

Maués e Couturier (2002), estudando uma espécie de Myrtaceae silvestre, *Myrciaria dúbia* (camu-camu), também observaram sincronismo entre a viabilidade do pólen e a receptividade do estigma, bem como foi relatado neste estudo com *Psidium*. Entretanto, em camu-camu a receptividade do estigma se manifestou imediatamente após a antese e estendeu-se por cerca de cinco horas, diferente do observado nos araçazeiros e na goiabeira, em que o estigma já estava maduro antes mesmo da antese.

Vale ressaltar ainda, que a metodologia empregada neste trabalho para determinar a receptividade do estigma foi eficiente para as três espécies analisadas, visto que os estigmas viáveis foram devidamente corados como pode ser observado na figura 2.



**Figura 2:** Estigmas receptivos corados de *P. guineense* (1), *Psidium cattleyanum* (2) e *P. guajava* (3). A seta indica estigmas que não foram submetidos à solução de alfa-naftil (controle).

### 3.2.4.2. Germinação e crescimento do tubo polínico *in vivo*

As observações da germinação *in vivo* dos grãos de pólen no estigma é o método mais utilizado para o estudo da interação pólen/pistilo e baseia-se na coloração da calose por certos corantes, emitindo luz fluorescente quando é iluminada por radiações no espectro de luz desejável (Cordeiro et al., 2004).

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu observar a germinação dos grãos de pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico *in vivo* ao longo do estilete. Outros autores também relatam que a fluorescência foi a técnica mais eficiente para tal análise (Cordeiro et al., 2004; Dantas et al., 2005).

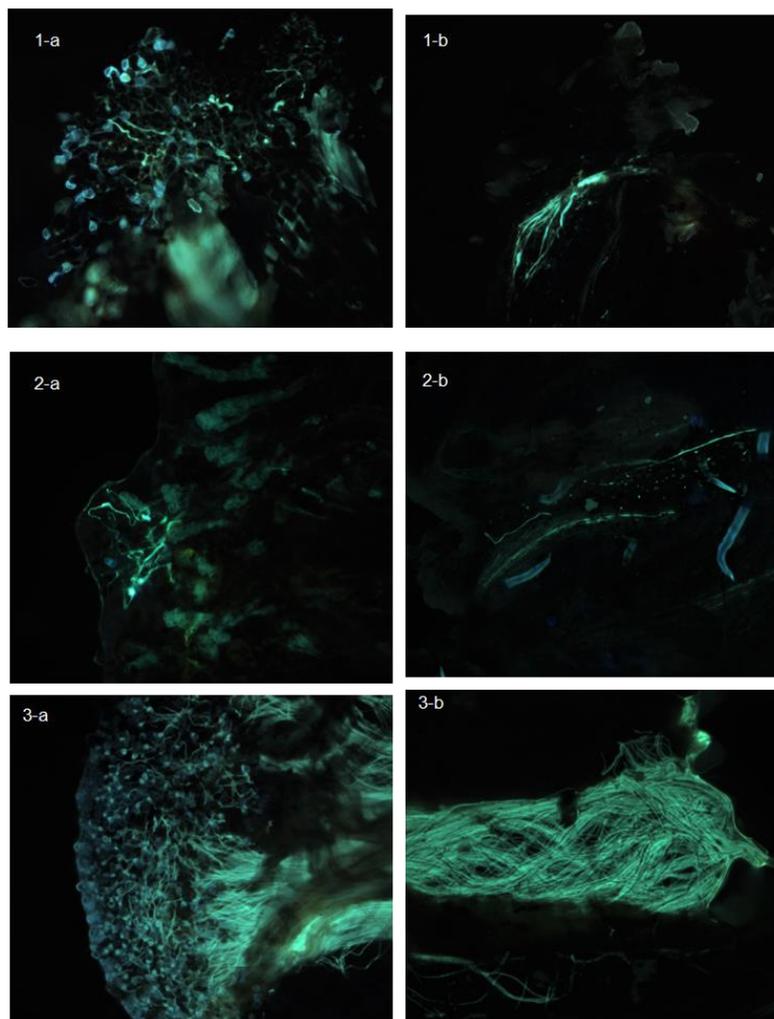
A germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico *in vivo* foram diferentes nas espécies estudadas. Em todos os acessos, no tratamento 1, foram observados grãos de polens depositados no estigma sem germinar. Entretanto, levando em conta o total de grãos de polens em um botão (variando de 462.604- 4426.298 - dados do capítulo 1), o baixo número observado nos estigmas foi considerado não representativo. Isso só não foi observado em dois acessos, Araçá Amarelo e Araçá do Campo, visto que nenhum pólen foi visualizado no estigma. Sendo assim, não houve germinação de grãos de polens em nenhum acesso analisado, tanto de goiabeiras quanto de araçazeiros, para esse tratamento.

No tratamento BFE24, em todos os acessos de *P. cattleyanum* houve germinação do pólen e crescimento do tubo polínico no estilete. Entretanto, apenas no Araçá Una, mesmo que muito poucos, o tubo polínico atinge o final do

estilete, nos demais acessos, ele foi visualizado ainda sem atingir o local em que estaria o ovário. Vale ressaltar ainda, que a germinação polínica *in vivo* do Araçá Amarelo e do Araçá Madureira foi mais baixa, se comparada com o Araçá Una. Um dos fatores que pode explicar essa diferença é que a viabilidade polínica deste foi maior que dos demais acessos, e embora nem todos os polens viáveis germinem, é uma estimativa que indica que o Araçá Una tem mais grãos de polens com as integridades estruturais que possibilitam a germinação (Baez et al., 2002).

É interessante observar que houve uma variação nos acessos da espécie *P. cattleyanum* na germinação do grão de pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico no tratamento BFE24. Isso não foi observado em *P. guajava*, visto que em todos os acessos houve a germinação de grãos de polens no estigma e o tubo polínico interrompe o seu crescimento no meio do estilete em todos os acessos observados. Já no Araçá do Campo não ocorreu germinação de grão de pólen em nenhum botão observado.

No tratamento BFE48, foi possível observar, em *P. guajava*, muitos polens germinados no estigma e o tubo polínico completando o crescimento no estilete, chegando ao final, constatando-se que para essa espécie, 48 horas é tempo suficiente para que o tubo polínico chegue ao ovário para que ocorra a fertilização. Em *P. cattleyanum*, com exceção do Araçá Una, foi observado que os tubos polínicos não completaram o crescimento no estilete, assim como no tratamento BFE24, eles cessaram o crescimento no meio, e mesmo o Araçá Una, com elevada viabilidade polínica, poucos tubos polínicos atingem o final do estigma. Já no acesso Araçá do Campo, houve a germinação de poucos polens, e desses, pouquíssimos tubos polínicos atingiram o final do estilete (Figura 3).



**Figura 3:** Tratamento BFE48- Grão de polens germinando no estigma (a) e tubos polínicos atingindo o final do estilete (b) de: 1- *P. cattleyanum*; 2- *P. guineense* 3- *P. guajava*.

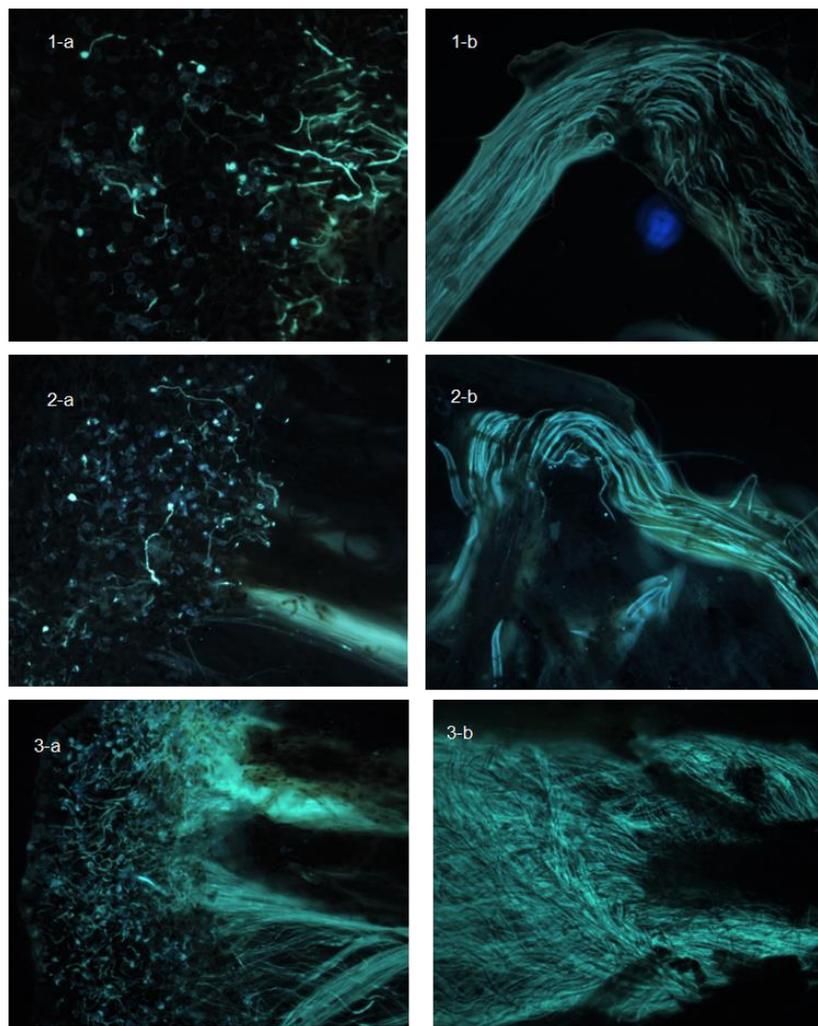
No tratamento em polinização aberta, BF24AA para o Araçá Amarelo e o Araçá Una demonstram grande quantidade de pólen germinado no estigma, e muitos tubos polínicos atingindo o final do estilete. Indicando que para esses acessos, 24 horas é o tempo em que o tubo polínico precisa para crescer por todo o estilete e atingir o ovário. Entretanto, em Araçá Madureira, embora alguns polens tenham germinado no estigma, os tubos polínicos param o crescimento no meio do estilete. O mesmo resultado foi observado em todos os acessos de *P. guajava*, o crescimento do tubo polínico para no meio do estilete, embora tenha muitos polens germinando no estigma. Já no acesso Araçá do Campo, os polens germinam no estigma, entretanto, embora alguns cheguem ao final do estilete, a maioria para o crescimento no meio.

Já no tratamento BF48AA (Figura 4) é possível observar, que mesmo nos acessos que o tubo polínico para o crescimento no meio, o final do estilete é atingido. Sendo assim, nesse tratamento, todos os acessos analisados tiveram o tubo polínico crescendo por todo o estilete até atingir o ovário. Nesse tratamento também é possível observar que mais grãos de polens germinaram nos estigmas de todos os acessos de araçazeiros, tanto em *P. cattleyanum* quanto no Araçá do Campo, se comparados com o tratamento BFE48.

Ao comparar tratamentos de botões ensacados na antese (BFE24 e BFE48) com os tratamentos em que os botões foram mantidos em polinização aberta (BF24AA e BF48AA), pode-se observar no *P. cattleyanum* que nas polinizações abertas mais polens germinaram no estigma e mais tubos polínicos atingiram o fim do estilete. Visto que nesses acessos, nos tratamentos em que os botões foram mantidos protegidos, a maioria do tubo polínico para o crescimento no meio do estilete e poucos polens germinam no estigmam, pode-se sugerir, que essas espécies possuem alguma autoincompatibilidade.

No acesso referente ao *P. guineense* isso também ocorre, mas levando em conta que a viabilidade polínica desse acesso é uma das mais baixas observadas, talvez essa baixa germinação *in vivo* e poucos tubos polínicos atingindo o final do estilete seja resultado de polens inviáveis e não de autoincompatibilidade.

Raseira e Raseira (1996) realizaram um experimento similar, protegendo botões florais de *P. cattleyanum* e deixando alguns botões em polinização aberta para observar a germinação e o crescimento do tubo polínico em flores autopolinizadas e em flores com polinização livre e obtiveram resultados parecidos. Eles observaram na maioria das flores oriundas de polinização aberta que os polens germinavam e ocorria o crescimento do tubo polínico, entretanto, poucos penetraram o óvulo. Já em flores protegidas, ocorreu baixa germinação de polens e a maioria dos tubos polínicos cresciam até próximo do óvulo, entretanto, não foi observado a penetração.



**Figura 4:** Tratamento BF48AA- Grão de polens germinando no estigma (a) e tubos polínicos atingindo o final do estilete (b) de: 1- *P. cattleyanum*; 2- *P. guineense* 3- *P. guajava*.

Já em *P. guajava* diferente dos araçazeiros, foi observado crescimento do tubo polínico até o final do estilete, tanto em botões protegidos quanto em botões sujeitos a polinização aberta. Com isso, pode-se supor que não exista autoincompatibilidade nesta espécie. Outros autores também acreditam que essa espécie é autocompatível, embora tenham uma preferência pela alogamia, produzindo mais frutos, frutos maiores e com mais sementes, indicando maior taxa de fertilização quando é permitida a presença de polinizadores (Boti, 2001; Alves e Freitas, 2007; Siqueira et al., 2012).

Santos et al. (2007) objetivando caracterizar a presença de mecanismos de autoincompatibilidade atuante em *Acca sellowiana*, uma espécie pertencente a família Myrtaceae, observaram resultados semelhantes ao da espécie *P. guajava*, em que o crescimento do tubo polínico ocorreu de forma igual nos pistilos

autopolinizados e nos com polinização cruzada. Isso ocorreu até no acesso dito previamente autoincompatível. Os autores justificaram esse fato relatando a autoincompatibilidade, como o aborto dos frutos de forma uniforme, em um curto prazo após a polinização. Entretanto, como foi observado, a presença de tubo polínico no ovário de acessos autopolinizados pode-se sugerir que não ocorra um sistema clássico de autoincompatibilidade (esporofítica ou gametofítica).

Vale ressaltar, que no atual estudo, embora o crescimento do tubo polínico tenha sido observado até atingir o ponto em que estaria o ovário, não foi possível visualizar o tubo polínico penetrando o óvulo para que ocorra a fertilização, sendo assim, não é possível concluir que ocorreu de fato a fertilização nas espécies em questão, apenas sugerir que não ocorre incompatibilidade em *P. guajava*. A possibilidade dessa espécie ser autocompatível corrobora com Krause et al. (2017), que relatam que é possível desenvolver populações endogâmicas de goiabeira, seja por autofecundação ou cruzamento entre indivíduos aparentados, sem que ocorra depressão por endogamia.

A determinação da velocidade do crescimento do tubo polínico também pode evidenciar incompatibilidade atuante entre cruzamentos (Bandeira et al., 2011). Visto que, quanto mais rápido for, menores serão os efeitos dos fatores externos que podem provocar a abscisão do estilete antes da fecundação (Carvalho, 1989), além disso, cruzamentos incompatíveis podem apresentar crescimento do tubo polínico mais lento que os compatíveis (Silveira, 2008).

A velocidade de crescimento dos tubos polínicos não diferiu entre tratamentos ensacados e de polinização livre em nenhum acesso avaliado. O que foi observado é que o tubo polínico leva cerca de 24 horas para percorrer todo o estilete em Araçá Amarelo, Araçá Una e Araçá do Campo, nos devidos tratamentos em que eles atingiram o final do estilete, seja no botão protegido ou polinizado livremente. Já o Araçá Madureira e todos os acessos de *P. guajava* levam cerca de 48 horas, desde a germinação dos grãos de polens até o tubo polínico atingir o final do estilete.

Essa velocidade de crescimento é variável entre as espécies. Bandeira et al. (2011) relataram que em polinização cruzada entre variedades de ameixa japonesa (cultivar América como genitor feminino) os tubos polínicos levaram 120 horas para atingirem os óvulos. Já Santos et al. (2007) discutiram que não houve diferença em relação à velocidade de crescimento em acessos autopolinizados e

aqueles com polinização cruzada em *A. sellowiana*, esse resultado foi semelhante ao observado em *Psidium*. A diferença, é que a espécie estudada por Santos et al (2007) leva 96 horas para o completo crescimento do tubo polínico até o ovário.

De forma geral, o entendimento do sistema de autoincompatibilidade e a identificação da existência ou não da incompatibilidade, pode gerar informações úteis no planejamento de estratégias de melhoramento, como hibridações controladas e garantir o adequado uso dos acessos disponíveis (Santos et al., 2007). Sendo assim, é de extrema importância estudos que informam características relacionadas à reprodução das plantas.

### 3.2.5. CONCLUSÃO

Todas as variedades de goiabeira e o Araçá Una foram os acessos que tiveram a maior viabilidade polínica, embora apenas o Araçá Madureira e o Araçá do Campo tiveram a viabilidade polínica considerada baixa. Tanto os polens quanto os estigmas estavam maduros 24 horas antes da antese, e permaneceram 24 horas após a antese, possibilitando autofecundação dos acessos.

Embora os grãos de polens e os estigmas estejam receptivos antes da abertura floral, possibilitando cleistogamia, isso não ocorreu em nenhuma espécie observada, visto que ao analisar a germinação *in vivo*, no tratamento BFA não foram visualizados grãos de polens germinados e nem crescimento de tubo polínico, indicando que a polinização ocorre após a abertura floral.

É possível sugerir que não existe autoincompatibilidade em *P. guajava*, visto que os tubos polínicos atingiram o fim do estilete em botões protegidos 48 horas após a abertura floral. Entretanto, estudos devem continuar sendo realizados para a comprovação, visto que não foi possível visualizar o tubo polínico penetrando a micrópila e fertilizando o óvulo.

### **3.3. ESTUDO DA DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE TRÊS ESPÉCIES DE *Psidium* spp. (*P. guajava*, *P. guineense* e *P. cattleyanum*) BASEADO EM CARACTERES REPRODUTIVOS E ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS**

#### **3.3.1. INTRODUÇÃO**

A goiabeira e os araçazeiros pertencem à família Myrtaceae, a qual compreende aproximadamente 133 gêneros e 3.800 espécies (Landrum e Kawasaki, 1997), sendo a goiabeira uma das fruteiras de maior distribuição geográfica no Brasil, onde a região sudeste possui a segunda maior área de cultivo (IBGE, 2016).

O norte do estado do Rio de Janeiro carece de culturas alternativas para incrementar a economia local, e a fruticultura é uma possível opção, seja pelas condições edafoclimáticas ou como alternativa à monocultura canavieira (Gomes Filho et al., 2010). Para isso, tanto a goiabeira (*Psidium guajava*) quanto os araçazeiros (*Psidium guineense* e *Psidium cattleyanum*) seriam viáveis, pois são apreciados pelo seu alto valor nutritivo e elevados teores de vitamina C (Oliveira et al., 2012; Patel et al., 2012).

Apesar de apenas a goiabeira ter expressão na economia nacional (Bezerra et al., 2006), o araçazeiro tem sido estudado como alternativa de plantio comercial em algumas regiões, além de ser utilizado em programas de melhoramento de goiabeiras, visto que, algumas espécies apresentam genes de

resistência que podem ser utilizados no melhoramento da goiabeira (Carneiro et al., 2007; Miranda et al., 2011; Freitas et al., 2014; Souza et al., 2014; Biazatti et al., 2016).

Um exemplo disso é a resistência que o *P. cattleyanum* e o *P. guineense* possuem à doença “o declínio da goiabeira” (Carneiro et al., 2007; Miranda et al., 2011; Freitas et al., 2014; Biazatti et al., 2016; Costa et al., 2016), a qual é causada por uma associação entre um nematoide, *Meloydogine enterolobii* e um fungo, *Fusarium solani* (Gomes, 2007; Gomes et al., 2011). Entretanto, o uso dessas espécies em programas de melhoramento vem demonstrando problemas, quanto à compatibilidade para enxertia, devido a uma diferença de ploidia entre essas espécies (Freitas et al., 2014; Robaina et al., 2015).

Sendo assim, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos resistentes e/ou que aceite enxertia é o ideal para conter a doença, visto que ainda não foram identificados acessos de *P. guajava* resistentes (Miranda et al., 2011; Freitas et al., 2014). Entretanto, poucos trabalhos relatam êxito em cruzamentos entre goiabeiras e araçazeiros (Costa et al., 2016; Gomes et al., 2017).

Por isso, pesquisas sobre a distância genética entre essas espécies são importantes (da Silva et al., 2016), pois geram informações que podem orientar os pesquisadores na condução de programas de melhoramento (Coser et al., 2014), direcionando cruzamentos (Cruz et al., 1994; Coser et al., 2014) e indicando acessos mais próximos geneticamente para que a hibridação interespecífica tenha sucesso.

Vale ressaltar, ainda, que antes mesmo do conhecimento sobre a diversidade de araçazeiros, tanto o *P. cattleyanum* quanto o *P. guineense* estão sofrendo erosão genética devido à devastação do ecossistema provocado pelo desmatamento de áreas com vegetação nativa onde elas ocorrem (Santos et al., 2014; da Silva et al., 2016), agregando ainda mais valor a trabalhos que geram informações sobre a diversidade genética dessas espécie.

Com isso, o objetivo desse trabalho foi estudar a variabilidade genética de acessos de *Psidium* spp. (*P. guajava*, *P. guineense* e *P. cattleyanum*), com base na caracterização dos aspectos reprodutivos a fim de fornecer subsídios para programas de melhoramento.

### 3.3.2. REVISÃO

#### 3.3.2.1. Melhoramento de *Psidium* spp.

O começo do melhoramento genético da goiabeira confunde-se com a origem da cultura, porque, possivelmente, durante a introdução da goiabeira em diversas partes do mundo pelos navegadores espanhóis, mesmo sem o conhecimento prévio, estava sendo feito o melhoramento genético da espécie, pela seleção de plantas que produziam frutos com características mais atrativas (Pereira e Nachtigal, 2002).

Os primeiros relatos de melhoramento genético, propriamente ditos, de goiabeiras datam um pouco antes da metade do século passado, nos Estados Unidos (Califórnia e Flórida), em Porto Rico, na Índia e no Egito. No Brasil, destacam-se os trabalhos de doutorado desenvolvidos por Soubihe Sobrinho, na escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, publicados em 1951 (Soubihe Sobrinho, 1951; Pereira e Nachtigal, 2002). Neste mesmo trabalho, foi estabelecida a base para todos os trabalhos de melhoramento subsequentes, envolvendo biologia floral, taxa de cruzamento natural e outros fundamentos desta espécie no Brasil (Soubihe Sobrinho, 1951; Soubihe Sobrinho e Gurgel, 1962).

Posteriormente, em 1976, na Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual Paulista (*campus* Jaboticabal), foi iniciado um programa de seleção de novos cultivares, pela introdução e seleção de plantas originárias de sementes de variedades americanas, indianas e brasileiras de diferentes regiões, que permitiu a obtenção dos cultivares Rica e Paluma (Pereira e Nachtigal, 2002).

Nessa mesma universidade, desde 1985, estava sendo desenvolvido outro programa de melhoramento genético da goiabeira, visando plantas com boas características agrônômicas de frutos que pudessem ser destinados a industrialização e ao consumo *in natura*, e em 2003, lançaram a cultivar Século XXI (Pereira e Nachtigal, 2002; Pereira et al., 2003).

Assim como para desenvolver a cultivar século XXI, como na maioria dos programas de melhoramento genético, utilizou-se a polinização artificial controlada, fazendo o cruzamento entre plantas que apresentassem características de interesse agrônômico. Os trabalhos se iniciam com a seleção

de genitores, que combinados, obtenha-se um híbrido com características favoráveis (Pereira e Nachtigal, 2002; Pommer e Murakami, 2009).

As tendências do mercado para a cultura exigem que as plantas sejam vigorosas, produtivas, com boa adaptação, resistentes ou com algum grau de tolerância a doenças e pragas, com porte baixo e esgalhadas, e com frutos que apresentem grande valor nutritivo, especialmente ricos em açúcar, sais minerais e vitaminas A e C (Pereira, 1995; Pereira e Nachtigal, 2002).

Além disso, os frutos devem ter boa aparência (polpa vermelha ou rosada), de formato ovoide, com rendimento de polpa superior a 70%, ausência de manchas e de células petrificadas, cor de casca verde-amarelada ou amarelada quando maduros (Pereira e Nachtigal, 2002).

Os melhoristas dessa cultura, além de tentar incorporar todas essas características em uma cultivar, depararam-se com um novo desafio, desenvolver uma planta resistente à doença chamada “o declínio da goiabeira”. Essa doença ocorre devido à interação sinérgica que acontece entre nematoide das galhas (*Meloidogyne enterolobii*), que predispõe a goiabeira à podridão radicular, tornando a raiz vulnerável à destruição pelo fungo *Fusarium solani* (Gomes, 2007; Gomes et al., 2011).

Essa doença apresenta como sintomas apodrecimento progressivo do sistema radicular, amarelecimento, queima e queda das folhas, e conseqüentemente, a morte da planta (Gomes et al., 2011). Tal doença já foi relatada em muitos estados brasileiros (Maranhão et al., 2001; Silva et al., 2008; Biazatti et al., 2016).

A melhor alternativa para contê-la é com o uso de cultivares resistentes, entretanto, até o presente momento, não há variedades de goiabeira resistentes ao nematoide, sendo esta resistência encontrada em plantas de espécies de araçazeiros (Carneiro et al., 2007; Miranda et al., 2011; Freitas et al., 2014). A utilização do araçá em programas de melhoramento de goiabeiras pode ocorrer, tanto para introgressão do gene de resistência quanto para utilizá-lo como porta-enxerto (Miranda et al., 2011).

Entretanto, devido à diferença de ploidia entre os araçazeiros e as goiabeiras, a tentativa de enxertia em *P. cattleyanum* tem ocorrido sem sucesso efetivo, visto que ocorre a morte de mais de 50% das plantas enxertadas (Freitas et al., 2014; Robaina et al., 2015). Há relatos em poucos estudos que

conseguiram desenvolver híbridos interespecíficos entre goiabeiras e araçazeiros (Costa et al., 2016; Gomes et al., 2017).

Com exceção da goiabeira, não existe programa de melhoramento genético no Brasil com espécies de *Psidium* nativas (Franzon et al., 2009), geralmente essas espécies apenas constituem bancos de germoplasma, e são utilizadas apenas em programas de melhoramento de goiabeiras (Eder-Silva et al., 2007; Junqueira et al., 2008; Costa et al., 2010).

Para o desenvolvimento e expansão nacional das espécies *P. cattleyanum* e *P. guineense*, é necessário o aproveitamento das suas características positivas, como a facilidade de propagação por sementes, a ampla faixa de distribuição geográfica, boa adaptação em diferentes *habitats* e grande potencial de exploração econômica (Bezerra et al., 2006).

Existem apenas duas cultivares de araçazeiros nativos descritos, e ambas são da espécie *P. cattleyanum*, “YA-cy” e “Iarapuã”. Elas foram lançadas pela Embrapa Clima Temperado a partir de um programa criado em 1985 no Rio Grande do Sul (Raseira e Raseira, 1996; Franzon et al., 2009).

Contudo, falta conhecimento sobre o manejo de espécies nativas de *Psidium*, e os bancos de germoplasma que contêm exemplares de *P. guineense* e *P. cattleyanum* no país são poucos, necessitando de conservação e coletas dessas espécies, para assim, aprimorar o conhecimento sobre elas (Bezerra et al., 2006).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), possui uma coleção com acessos de *Psidium* (*P. guajava*, *P. guineense*, *P. cattleyanum*), e tem desenvolvido pesquisas a fim de gerar conhecimento básicos sobre essas espécies, visando obter informações que poderão subsidiar o melhoramento da goiabeira, a conservação das espécies de araçazeiros e o desenvolvimento de cultivares.

### **3.3.2.2. Melhoramento de goiabeira na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF**

Considerando que a região Norte e Noroeste Fluminense é produtora de goiaba, a UENF iniciou em 2008 um programa de melhoramento desta fruteira, com o objetivo de desenvolver cultivares com características agrônomicas

superiores, tanto para o consumo *in natura* quanto para o processamento (Almeida, 2017). Para isso, uma equipe de pesquisadores (melhoristas e fitopatologistas) tem trabalhado, a fim de gerar conhecimentos básicos e úteis para serem aplicados no desenvolvimento de novas cultivares.

Desde então, muitos trabalhos foram publicados, e como o objetivo é lançar novas cultivares, o trabalho inicial feito foi de diversidade genética dos acessos, para identificar genitores distantes ideais para cruzamentos, alcançando maior efeito da heterose na progênie (Pessanha et al., 2011).

No trabalho de Campos et al. (2013) foi quantificado a diversidade genética entre 138 acessos de goiabeira, obtidos a partir de sementes oriundas dos cruzamentos sugeridos por Pessanha et al. (2011). Para isso, Campos et al. (2013) utilizaram descritores morfológicos, agrônômicos e físico-químicos, e verificaram ampla divergência genética entre os indivíduos, formando oito grupos de similaridade, com possibilidade de realizar cruzamentos para gerar famílias de irmãos completos e unir características de interesse apresentadas por grupos distintos.

Ainda com o intuito de identificar progênies superiores para características de produtividade e qualidade de interesse no melhoramento da cultura, Quintal et al. (2017) selecionaram 10 melhores progênies em três épocas distintas, classificando-as em relação à maior produção de frutos por planta, peso do fruto e produtividade.

Já Paiva et al. (2016) objetivaram comparar os ganhos genéticos preditos em diferentes índices de seleção entre e dentro de progênies de irmãos completos, para poder selecionar as plantas mais promissoras com base nas características dos frutos. Foi identificado que o índice de seleção clássico é o mais indicado para o melhoramento genético da goiabeira, visto que foi o índice com o critério de seleção que demonstrou melhores resultados em termos de ganhos genéticos no número e peso do fruto.

Além desses trabalhos, também foram realizadas pesquisas visando identificar plantas resistentes a doença “o declínio da goiabeira”. Miranda et al. (2011) avaliaram 47 acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência ao *M. enterolobii*, a fim de selecionar genótipos que poderiam servir de porta-enxerto. Eles identificaram que acessos de *P. cattleianum* eram resistentes ao nematoide.

Posteriormente, Biazatti et al. (2016) avaliaram a resistência da progênie dos acessos de *P. cattleyanum* identificados por Miranda et al. (2011) como resistentes. E constataram que, assim como os pais, a progênie também apresentava resistência ao *M. enterolobii*.

Ainda com os araçazeiros resistentes do trabalho de Miranda et al. (2011), Robaina et al. (2015) avaliaram a compatibilidade para enxertia entre os acessos de *P. cattleyanum* e *P. guajava* cv Paluma, utilizando o primeiro como porta-enxerto do segundo. Os resultados encontrados não foram satisfatórios, pois embora tenha ocorrido pegamento do enxerto, no campo, após um ano de plantio, todas as plantas morreram, confirmando incompatibilidade histológica entre os acessos.

Robaina et al. (2012) também tentaram realizar o subenxerto dos acessos de *P. cattleyanum* resistentes nos acessos de *P. guajava* cv Paluma, na tentativa de obter goiabeiras resistentes ao nematoide. Entretanto, após o pegamento, a conexão vascular não foi estabelecida com sucesso, o que resultou em uma baixa sobrevivência da copa.

Essa incompatibilidade é associada a fatores genéticos, visto que a goiaba é diploide e o araçá poliploide, e isso pode dificultar a fusão dos tecidos e a troca celular, uma vez que cada tecido continua a se multiplicar por mitose, mantendo o número de cromossomos. Devido a isso, aconselha-se realizar enxertos entre plantas com semelhante ploidia (Souza et al., 2014).

Barbosa (2016) caracterizou citologicamente acessos de *P. cattleyanum* da UENF, quanto ao número cromossômico e constatou que todos os acessos analisados eram poliploides, sendo que três foram considerados triploides e um tetraploide.

Novos trabalhos estão sendo realizados na universidade a fim de levantar respostas, solucionar os problemas e lançar cultivares de goiabeira com elevado interesse agrônômico e resistente ao nematoide no mercado.

### **3.3.2.3. Diversidade Genética**

A diversidade genética é de especial interesse para o melhorista, visto que em sua ausência, o melhoramento de plantas não seria possível. Isso porque, os métodos empregados no melhoramento necessitam de variabilidade genética

nas espécies, para que seja possível fazer a seleção de acessos de maior interesse (Borém e Miranda, 2013).

A caracterização do material genético é o que permite que a diversidade genética seja estudada, e a utilização de técnicas biométricas para esse fim permite quantificar a diversidade e entender sua magnitude, natureza e distribuição entre e dentro de populações (Cruz et al., 2006). O objetivo da caracterização da diversidade é agrupar genótipos similares, de maneira que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados (Cruz et al., 2006).

Para isso, a caracterização pode ser de forma morfológica, nutricional, funcional, genética, fisiológica, fitopatológica, bioquímica e molecular (Cruz et al., 2006; Correa et al., 2011). Esses métodos de análise podem ser aplicados isoladamente ou por uma combinação de métodos (Moura et al., 2010).

Sabendo disso, a avaliação da variabilidade genética nas espécies de *Psidium* spp. é o primeiro passo para a conservação e uso eficiente dos recursos genéticos em programas de melhoramento (Sitther et al., 2014). Além disso, espécies silvestres de *Psidium*, como o *P. guineense* e o *P. cattleyanum*, vêm sofrendo erosão genética severa (Bezerra et al., 2006; Santos et al., 2014), e estudos de diversidade dessas espécies são de extrema importância, visto que fornecem parâmetros fundamentais para o pré-melhoramento e definição de estratégias para conservação dessas espécies (Pessanha et al., 2011; da Silva et al., 2016).

Por esse motivo, Santos et al. (2014) realizaram um estudo objetivando caracterizar e avaliar a diversidade genética de acessos de araçá de cinco municípios no semi-árido baiano utilizando descritores morfológicos e parâmetros físico-químicos. Eles observaram que existe diversidade genética entre os araçazeiros da mesma espécie e entre espécies diferentes, assim como entre municípios e dentro de um mesmo município. Além disso, foram identificados acessos com boas características de frutos para uso direto em programas de melhoramento.

Em um outro estudo, utilizando também descritores morfológicos e parâmetros físico-químicos, Coser et al. (2014) estudaram a diversidade genética entre 16 acessos de *P. guajava* (Paluma, Pedro Sato, Roxa e da Cortibel I à Cortibel XIII) a fim de orientar programas de melhoramento. Como resultado, eles relataram grande divergência genética entre os genótipos, e destacam alguns

genótipos com potencial para serem utilizados como novas cultivares ou para hibridação em programa de melhoramento.

Além de descritores morfológicos e de parâmetros físico-químicos, também já foram utilizados marcadores moleculares em *Psidium* para estudar a diversidade genética (Gomes Filho et al., 2010; Correa et al., 2011; Pessanha et al., 2011). Entretanto, estudos sobre caracterização de *Psidium* silvestres ainda são poucos, visto que existe uma elevada variabilidade entre esses materiais, e um apelo cada vez maior do mercado, exigindo o lançamento de novas cultivares, com boas características agrônômicas, resistentes e de boa adaptabilidade às diferentes regiões do Brasil (Santos et al., 2014).

### 3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.3.1. Material Vegetal

Todos os sete acessos utilizados neste trabalho fazem parte da coleção de germoplasma de *Psidium* da Universidade Estadual do Norte Fluminense e estão localizados no Colégio Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes- RJ.

O material vegetal utilizado nessa pesquisa foram botões florais, coletados de sete acessos de *Psidium* spp., em que três são da espécie *P. guajava* (variedades Cortibel 1, Cortibel 4 e Cortibel 6), três da espécie *P. cattleianum* (conhecidos como Araçá Amarelo, Araçá Madureira e Araçá Una) e um da espécie *P. guineense* (Araçá do Campo) (Tabela 1). Cada acesso de araçazeiro foi representado por no mínimo duas plantas, exceto o Araçá do Campo, visto que havia apenas um exemplar na coleção de germoplasma. Essas plantas foram propagadas via seminal, enquanto as goiabeiras foram propagadas por estaquia.

**Tabela 1.** Acesso de *Psidium* spp utilizados na presente pesquisa e conservados na coleção de germoplasma na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF, na Escola Agrícola Antônio Sarlo, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro(RJ).

<b>Acesso</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nº de Plantas Utilizadas</b>	<b>Procedência</b>
Cortibel 1	<i>P. guajava</i>	1	-
Cortibel 4	<i>P. guajava</i>	1	-
Cortibel 6	<i>P. guajava</i>	1	-
Araçá Coroa	<i>P. cattleyanum</i>	2	São João da Barra- RJ
Araçá Amarelo	<i>P. cattleyanum</i>	3	Campos dos Goytacazes- RJ
Araçá Una	<i>P. cattleyanum</i>	5	Campos dos Goytacazes- RJ
Araçá do Campo	<i>P. guineense</i>	1	Itaboraí- RJ

Para todas as características avaliadas, os botões florais foram coletados ao acaso, durante a floração das plantas, na pré-antese ou na antese, dependendo da característica avaliada. Após a coleta foram colocados em solução de etanol 70% e mantidos a 4°C até o momento da análise.

### 3.3.3.2. Características avaliadas

#### 3.3.3.2.1. Número de grãos de pólen por antera (NGPA);

Para estimar o NGPA, uma antera por vez foi macerada em uma gota de solução contendo quatro gotas de detergente Triton-x, três gotas de azul de metileno a 0,5% e 900 µl de etanol 70% (Dafni, 1992; Damasceno Junior et al., 2009). Após macerada, foi colocada em um microtubo contendo a mesma solução, o qual foi agitado manualmente por um minuto. Desta suspensão (contendo 1000 µl), uma amostra de 10 µl foi retirada e depositada em uma lâmina, coberta com uma lamínula, para ser contado no microscópio óptico Olympus BX60, o número de grãos de pólen presentes nesta amostra.

Foram preparadas quatro lâminas por antera (cada lâmina com uma amostra de 10 µl da suspensão) e contado o número total de grãos de pólen encontrados nas lâminas. Esse procedimento foi realizado em cinco anteras de cada botão floral analisado, e foram analisados quatro botões florais por acesso.

Posteriormente, foram estimados quantos grãos de pólen estavam presentes em uma antera (a qual estava macerada em 1000 µl). A partir da média

de grãos de pólen contados nas quatro lâminas (cada uma contendo uma amostra de 10 µl da suspensão de 1000 µl), foi feita, então, a média das cinco anteras de um mesmo botão para estimar o número de grãos de pólen encontrados em uma antera daquele botão.

#### **3.3.3.2.2. Número de anteras por botão (NAB);**

Para determinar o NAB, foi feita a contagem de anteras por botão, em quatro botões florais por acesso, com o auxílio do microscópio estereoscópio motic 102M.

#### **3.3.3.2.3. Número de grãos de pólen por botão (NGPB);**

A variável NGPB foi estimada pela multiplicação do NGPA pelo NAB do mesmo botão. Nesta variável, também foi utilizado quatro botões florais por acesso.

#### **3.3.3.2.4. Número de óvulos por botão (NOB);**

Para esta variável, os ovários dos botões florais foram abertos longitudinalmente, e os óvulos foram espalhados em uma lâmina contendo três gotas de lactofenol azul-algodão. Foi depositada uma lamínula por cima e foi contado o número total de óvulos, em Microscópio óptico Olympus BX60, por botão floral. Foram utilizados quatro botões florais por acesso.

#### **3.3.3.2.5. Razão Pólen: Óvulo (P:O)**

A P:O é um parâmetro que visa indicar o modo de reprodução de uma espécie através da divisão da média número NGPB de todos os botões analisados, pela média NOB dos mesmos botões (Cruden, 1977).

#### **3.3.3.2.6. Viabilidade polínica na pré- antese (%VPPA) e viabilidade polínica na antese (%VPAT)**

A metodologia para determinar %VPPA e %VPAT é a mesma, o que as difere, é que na primeira, os botões florais foram coletados na pré-antese (24 horas antes dos botões florais abrirem) enquanto na segunda, os botões florais

foram coletados imediatamente após a abertura. Em ambas variáveis, foram coletados três botões florais por acesso e a viabilidade polínica foi estimada via solução tripla de Alexander (Alexander, 1969).

Na preparação das lâminas, 15 anteras foram maceradas em uma gota do corante. Para cada botão foram feitas duas lâminas e de cada lâmina foram contados 200 grãos de pólen, totalizando 1200 grãos de pólen por acesso. Foram considerados grãos de polens viáveis, aqueles com formato e tamanho regular e que apresentaram coloração púrpura; e inviáveis os grãos que não coraram, com protoplasto contraído ou de formato e tamanho irregular.

A porcentagem da viabilidade polínica foi estimada empregando a seguinte expressão:

$$\text{GPV (\%)} = \frac{(\text{NGPV})}{1200} \times 100$$

Onde:

GPV – Porcentagem de grãos de polens viáveis

NGPV- Número de grãos de polens viáveis

### **3.3.3.2.7. Tamanho de grão de pólen (TGP- $\mu\text{m}$ ) e tamanho de óvulo (TO- $\mu\text{m}$ ).**

Dos grãos de pólen contados para estimar NGPB, 100 deles (por acesso) foram fotografados em microscópio óptico, e o diâmetro do maior lado foi medido no programa *CellSens Standard 1.8* (Olympus)

Para o TO-  $\mu\text{m}$ , também foram fotografados 100 óvulos (por acesso) dos que foram contados para estimar NOB e, também, medido o diâmetro do maior lado com o auxílio do programa *CellSens Standard 1.8* (Olympus).

### **3.3.3.3. Análise dos dados**

#### **3.3.3.3.1. Análise de variância**

Todas as características avaliadas neste trabalho foram submetidas à análise de variância, com base no delineamento de blocos casualizados, obedecendo ao seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + \varepsilon_{ijk}$$

onde:

$\mu$  = constante geral;

$G_i$  = efeito do  $i$ -ésimo Genótipo fixo ( $i = 1, 2, \dots, 8$ );

$\varepsilon_{ijk}$  = erro experimental, associado a cada observação, pressuposto NID ( $0, \sigma^2$ ).

Os esquemas das análises de variâncias e as esperanças dos quadrados médios estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2** - Esquema das análises de variância, envolvendo o quadrado médio (QM), as esperanças dos quadrados médios (E(QM)), graus de liberdade (GL) e o teste F.

F.V	G.L	QM	E(QM)	F
Genótipos(G)	$g-1$	QMg	$\sigma^2 + \sigma_g^2$	QMG/QMR
Resíduo(R)	$g(r-1)$	QMr	$\sigma^2$	

Essa análise estatística foi feita utilizando o programa computacional S.A.S (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1996).

### 3.3.3.3.2. Estimativas dos componentes de variância e dos parâmetros

Assim como na análise de variância, também foram estimados alguns parâmetros, como o Coeficiente de Variação Genotípica ( $\sigma_g$ ), Variância Fenotípica ( $\sigma^2_f$ ), Coeficiente de Variação Experimental (%CVe), Coeficiente de Variação Genotípico (%CVg), herdabilidade com base na média ( $h^2$ ) e o índice de variação- ( $I_v$ ), conforme os estimadores abaixo:

- $\sigma_g = \frac{QMg - QMr}{r}$

- $\sigma^2_f = \frac{QMg}{r}$

- $\%CV_e = \left( \frac{\sqrt{QM_r}}{m} \right) 100$
- $\%CV_g = \left( \frac{\sqrt{\sigma_g}}{m} \right) 100$
- $h^2 = \frac{\sigma_g}{\sigma^2_f}$
- $lv = \frac{\%CV_e}{\%CV_g}$

Em que:

QM<sub>g</sub>= Quadrado Médio do Genótipo;

QM<sub>r</sub>= Quadrado Médio do Resíduo;

m= Média

r= Repetição

### 3.3.3.3.3. Distâncias Genéticas e Análise de Agrupamento

Posterior à análise de variância, obteve-se a matriz de dissimilaridade entre os acessos pela distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) e a quantificação da contribuição relativa dos caracteres (S.j), obtida de acordo com Singh (1981). A partir dessas análises, foi construído um dendrograma por meio da análise de agrupamento, utilizando o método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average), através do programa R- "Project for Statistical Computing". (<http://www.rproject.org>).

Para determinar se o dendrograma está coerente com a matriz de dissimilaridade foi realizado o coeficiente de correlação cofenética (CCC).

### 3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.4.1. Análise de variância e parâmetros genéticos

Pela análise de variância é possível identificar a magnitude dos efeitos gênicos que regem uma característica e estimar a variabilidade gênica que compõem a média dos acessos estudados (Cruz e Regazzi, 2001). Sendo assim, os valores dos quadrados médios obtidos na análise de variância das características NGPB, NGPA, NAB, NOB, P:O, TGP-  $\mu\text{m}$ , TO-  $\mu\text{m}$ , %VPAT e %VPPA estão apresentados na Tabela 3.

Pelo teste F foi possível identificar que teve diferença significativa a nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) para todas as variáveis analisadas (Tabela 3). Esse resultado demonstrando ter variabilidade genética entre os acessos estudados já era esperado, visto que três espécies foram analisadas em conjunto.

Conhecer as estimativas dos parâmetros genéticos permite ao melhorista gerar informações de grande utilidade a respeito da estrutura genética da população, identificar a variabilidade genética e predizer os ganhos genéticos para o possível sucesso nos programas de melhoramento. Além disso, também possibilita a definição com eficiência de diferentes estratégias de melhoramento mantendo a base genética adequada na população (Cruz et al., 2004; Cruz e Carneiro, 2006).

Analisando a tabela 4, observa-se, de forma geral, elevados valores do coeficiente de determinação genotípico ( $\sigma_g$ ), o qual é causado pelas diferenças genéticas entre os indivíduos (Borém e Miranda, 2013), sendo assim, quanto maior suas magnitudes, mais heterogêneos são os genótipos avaliados e maior possibilidade de selecionar materiais superiores para serem utilizados como genitores (Ferrão et al., 2008).

Já a variância fenotípica, resulta da ação conjunta dos efeitos genéticos e ambientais. E estimá-la é de grande importância para os melhoristas na escolha dos métodos de melhoramento, dos locais para a condução dos testes de rendimento, do número de repetições e na predição dos ganhos de seleção (Borém e Miranda, 2013).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância para número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos de pólen por antera (NGPA), número de anteras por botão floral (NAB), número de óvulos por botão floral (NOB), razão pólen: óvulo (P:O), tamanho de grão de pólen- (TGP-  $\mu\text{m}$ ), tamanho de óvulo (TO-  $\mu\text{m}$ ), viabilidade polínica na antese (%VPAT) e viabilidade polínica na pré-antese (%VPPA), referente à avaliação de sete acessos de *Psidium* spp.

FV	GL	Quadrado Médio								
		NGPB	NGPA	NAB	NOB	P:O	TGP- $\mu\text{m}$	TO- $\mu\text{m}$	%VPAT	%VPPA
<b>Repetição</b>	2	6,84E+11	1425836,9	6377.33	2368,05	294171	1,23	523,92	0,79	53,45
<b>Genótipo</b>	6	6,967**	34465921,8**	34559.27**	159582,63**	204891208**	41,02**	11352,48**	562,04**	1768,25**
<b>Resíduo</b>	12	2,87E+11	1237060,5	1742.56	4152,16	3143528	1,52	90,43	33.34	83,31
<b>Total</b>	20									
<b>Média</b>		2022426	5364,09	357,62	347,9	8576,5	18,97	364,51	84,38	81,88

FV= fator de variação; GL= grau de liberdade;

\*\*= Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

Sabendo disso, ao analisar a tabela 4 pode-se notar que a variância fenotípica ( $\sigma^2_f$ ) dos caracteres deveu-se predominantemente a causas genéticas, podendo ser utilizada como critério de seleção. Concordando com isso, Gurgel et al. (2012), ao analisarem os parâmetros genéticos das características dos frutos em 46 acessos de camu-camuzeiro, uma espécie que pertence à família Myrtaceae, também observaram que a variância fenotípica é mais influenciada pela variância genética do que ambiental.

Ainda na tabela 4, por meio da variância fenotípica ( $\sigma^2_f$ ) e do coeficiente de determinação genotípico ( $\emptyset_g$ ), foi possível estimar a herdabilidade, que é a proporção genética da variabilidade total (Borém e Miranda, 2013). Todos os caracteres apresentaram alta herdabilidade, com destaque para TO-  $\mu$ m (0,9920) e P:O (0,9850), até mesmo o %VPAT, que apresentou a menor herdabilidade (0,9407), ainda foi considerada elevada.

Entretanto, Silva et al. (2017), estudando a viabilidade polínica de 22 genótipos de goiabeira no período de três anos observaram que a herdabilidade variou entre 0,126 a 0,583, (valor inferior ao relatado neste estudo - 0,9407 e 0,9528), indicando que a viabilidade polínica em goiabeira é mais influenciada por fatores ambientais do que genéticos.

Vale ressaltar que o comportamento meiótico de uma planta está diretamente relacionado ao seu grau de fertilidade (Defani-Scoarize et al., 1996), e como a goiabeira é uma espécie diploide (Pereira, 1995; Souza et al., 2014; Souza et al., 2015; Barbosa, 2016), apresenta a meiose regular, resultando que a inviabilidade polínica seja causada mais por fatores ambientais do que genéticos.

Diferente do que ocorre com os araçazeiros, que por serem poliploides (Pereira, 1995; Souza et al. 2014; Souza et al., 2015; Barbosa, 2016) apresentam mais produtos pós-meióticos anormais do que os diploides (Barbosa, 2016), e por isso, a probabilidade de polens inviáveis serem resultados de uma meiose irregular é maior do que serem causados por efeitos ambientais. E isso pode ter influenciado no aumento da variância genotípica da viabilidade polínica e, conseqüentemente, da herdabilidade no estudo atual, visto que a maioria dos acessos analisados são araçazeiros.

**Tabela 4.** Estimativas de parâmetros genéticos referentes às variáveis: número de grãos de pólen por antera (NGPA), número de anteras por botão floral (NAB), número de óvulos por botão floral (NOB), razão pólen: óvulo (P:O), tamanho de grão de pólen (TGP-  $\mu\text{m}$ ), tamanho de óvulo (TO-  $\mu\text{m}$ ), viabilidade polínica na antese (%VPAT) e viabilidade polínica na pré-antese (%VPPA), referente à avaliação de sete acessos de *Psidium* spp.

	<b>NGPA</b>	<b>NAB</b>	<b>NOB</b>	<b>P:O</b>	<b>TGP- <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>TO- <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>%VPAT</b>	<b>%VPPA</b>
<b><math>\sigma^2_g</math></b>	11076287,1	10938,90	51810,16	67249226,67	13,17	3754,02	176,23	561,65
<b><math>\sigma^2_f</math></b>	11488640,6	11519,76	53194,21	68297069,33	13,67	3784,16	187,35	589,42
<b><math>h^2</math></b>	0,964	0,949	0,974	0,985	0,9629	0,9920	0,9407	0,9528
<b>%Cve</b>	20,73	11,67	18,52	20,67	6,50	2,61	6,84	11,15
<b>%Cvg</b>	62,04	29,22	65,42	95,62	19,13	16,81	15,73	28,94
<b>Iv</b>	2,99	2,50	3,53	4,63	2,94	6,44	2,30	2,60

$\sigma^2_g$ : variância genotípica;  $\sigma^2_f$ : variância fenotípica;  $h^2$ : Herdabilidade com base na média; %Cve coeficiente de variância experimental; %Cvg: coeficiente de variância genético; Iv: índice de variação.

De forma geral, herdabilidade elevada encontrada pode ser explicada porque ela está diretamente relacionada ao tempo de exposição da variável ao ambiente, ou seja, características que levam muito tempo para se desenvolverem ficam mais sujeitas à variação ambiental, e por isso apresentam a herdabilidade baixa (Borém e Miranda, 2013). E segundo Subramanyam e Iyer (1993), as flores de *Psidium* ficam pouco tempo expostas ao ambiente, visto que levam 31 dias para que ocorra a diferenciação do botão floral à abertura da flor, explicando a alta herdabilidade estimada.

Mensurar esse parâmetro é importante para o auxílio em programas de melhoramento, porque o ganho genético está relacionado a ele (Miranda et al., 1988; Ferrão et al., 2008). Sendo assim, quanto maior a herdabilidade, maior será a possibilidade de ganhos expressivos no processo de seleção quanto aos descritores (Miranda et al., 1988; Dias et al., 2011). Além disso, a alta herdabilidade demonstra que a contribuição genética para a variabilidade total é elevada, e essa característica é desejável em um programa de melhoramento (Gurgel et al., 2012), visto que facilita a identificação de genótipos superiores.

Outro parâmetro que merece atenção na tabela 4 é a estimativa do coeficiente de variação experimental (%CVe), visto que ele indica a precisão do experimento, (Fonseca e Martins, 1996). Neste trabalho, a precisão experimental foi boa, pois os valores mais elevados do %CVe foi de 20,73% (NGPA) seguidos de 20,67% (P:O), valores considerados medianos por Gomes (1990). Enquanto o menor valor foi 2,61% (TO-  $\mu$ m), sendo considerado baixo (Gomes, 1990), demonstrando a elevada qualidade experimental.

Embora os %CVe da maioria dos caracteres estudados (NGPA, NAB, NOB, P:O e %VPPA) tenham sido considerados médios de acordo com Gomes (1990) (entre 10 e 20%), é importante ressaltar que foram analisados acessos de três espécies distintas, aumentando a variação na média geral do experimento.

Já o coeficiente de variação genético (%CVg) foi elevado para todos os caracteres, variando entre 15,73% (%VPAT) e 95,62% (P:O) (tabela 4). Essa estimativa indica a amplitude de variação genética de uma característica, ou seja, expressa a quantidade de variação genética existente, possibilitando ao melhorista ter uma noção da grandeza relativa das mudanças que podem ser obtidas em cada descritor por meio da seleção (Shimoya et al., 2002; Dias et al.,

2011). Sendo assim, é possível dizer que há possibilidade de ganho expressivo no processo de seleção para as características avaliadas.

Vale ressaltar ainda, que para todas as características analisadas, o valor de %CVg foi superior ao de %CVe. O mesmo aconteceu com Almeida (2017) ao avaliar características do fruto de 10 progênies de goiabeira e Cardoso et al. (2009) analisando caracteres relacionados a sementes de 30 acessos de mamão.

Pela relação %CVg/%CVe, é possível identificar os caracteres cuja variação se deve mais a causas genéticas do que ambientais (Gurgel et al., 2012). Quando o índice (%CVg/%CVe) tende a um ou mais, indica que a população pode vir a obter ganhos na seleção, visto que a variação do caractere se deve mais à variação genética (Vencovsky, 1987). E isso aconteceu em todos os caracteres analisados neste trabalho (tabela 4), com o valor máximo de 6,44 em TO e valor mínimo de 2,30 em %VPAT, demonstrando claro efeito da variabilidade genotípica. Esses valores elevados corroboram com Almeida (2017) estudando caracteres relativos à fruta da goiabeira.

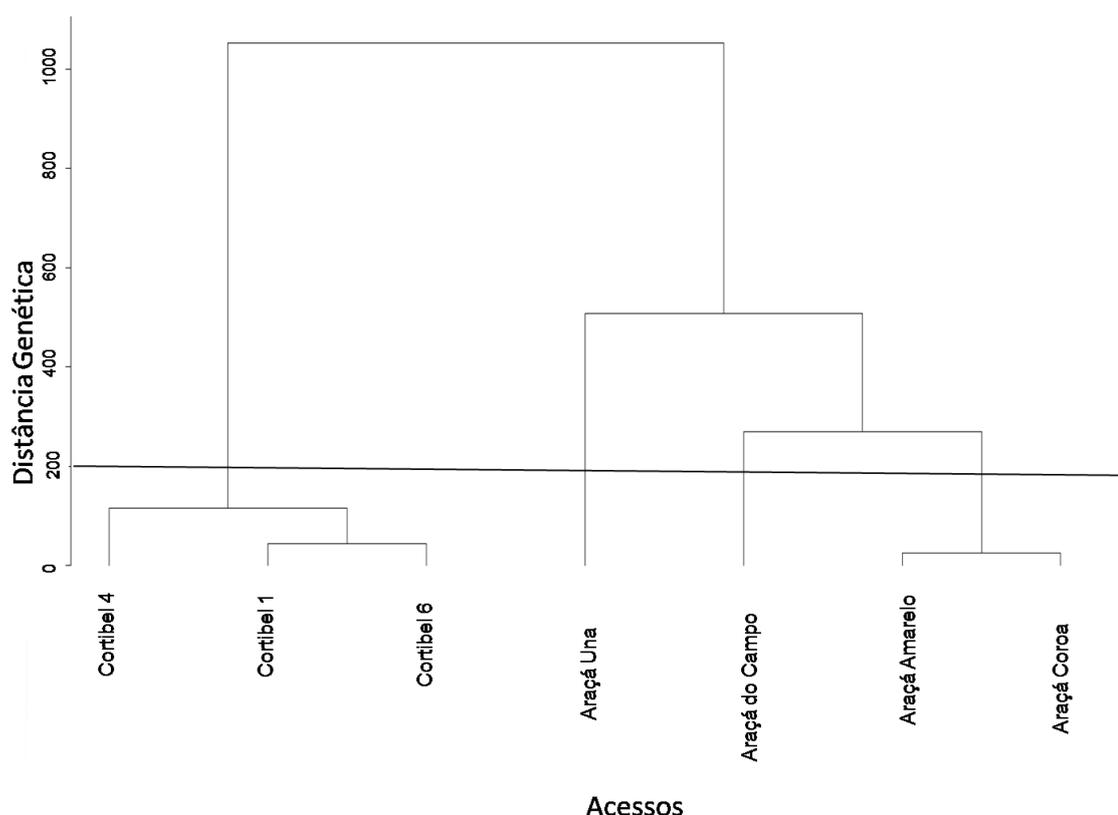
#### **3.3.4.2. Análise de agrupamento pelo método UPGMA**

O método UPGMA, baseado na matriz de dissimilaridade gerada pela distância generalizada de Mahalanobis, foi utilizado como critério para formação dos grupos no dendrograma (Figura 1), o qual mostra que existe divergência genética entre os sete acessos estudados, devido à formação de quatro grupos distintos, considerando-se o corte no eixo y na distância genética de 200.

Segundo Cruz et al. (2003), o ponto de corte que demarca o número de grupos formados no dendrograma deve ocorrer em um ponto de mudança brusca de nível, o que torna o ponto de corte subjetivo, com isso, cada análise pode demonstrar um ponto de corte diferente (Moura et al., 2010; Oliveira et al., 2017).

Mesmo que esta divergência genética fosse esperada, visto que três espécies foram analisadas, a formação de quatro grupos não era esperada, já que teoricamente, os acessos da mesma espécie iriam se agrupar. Isso, de fato, ocorreu com as goiabeiras analisadas (Cortibel 1, Cortibel 4 e Cortibel 6), as quais foram agrupadas no Grupo I, da esquerda para direita, (Figura 1), indicando baixa variabilidade genética entre os acessos de *P. guajava*, em que a distância entre eles variou de 44,29 a 138,33.

Entretanto, Coser et al. (2014) obtiveram resultados diferentes ao estudarem a diversidade genética da Cortibel I a XIII e verificarem que existe grande variabilidade entre os acessos, e a Cortibel I foi a mais divergente das demais, ficando em um grupo sozinha. Essa divergência de resultados pode ter ocorrido porque Coser et al. (2014) analisaram características do fruto, enquanto no atual trabalho, características relacionadas a aspectos reprodutivos foram avaliadas.



**Figura 1** – Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseado na matriz de dissimilaridade gerada pela distância generalizada de Mahalanobis de sete acessos de *Psidium* spp. analisados com base em características relacionadas à reprodução.

Além disso, a formação do dendrograma pelo UPGMA procede-se pela identificação dos genótipos mais próximos a partir do par mais semelhante (Pessanha et al., 2011). Então, ao avaliar três espécies diferentes, a distância genética é grande, podendo acarretar em uma maior distância entre o par mais semelhante do que em análises feitas com a mesma espécie. Igualmente ocorreu

com Coser et al. (2014), e isso resulta em agrupar acessos que não estariam juntos se estivesse sendo analisado apenas a mesma espécie.

Diferente das goiabeiras, os araçazeiros não se reuniram em um mesmo grupo, sendo dispersados em três grupos distintos. Analisando a figura 1, pode-se observar que o grupo IV foi composto por dois genótipos de araçá da mesma espécie (*P. cattleyanum*), Araçá Amarelo e Araçá Coroa, sendo esses os genótipos com a menor distância genética encontrada em todo o trabalho (25,41) (tabela 5).

Os grupos II e III apresentaram apenas um acesso em sua formação, Araçá Una (*P. cattleyanum*) e Araçá do Campo (*P. guineense*), respectivamente (Figura 1). Grupos, formados por apenas um indivíduo, indicam que tais indivíduos sejam mais divergentes comparados com os outros (Barros et al., 2005; Gomes Filho et al., 2010; Santos et al., 2014).

Vale ressaltar que, embora o Araçá Una seja da mesma espécie do Araçá Coroa e Amarelo (*P. cattleyanum*), ele ficou em um grupo separado, evidenciando que existe diversidade genética entre araçás de uma mesma espécie. A formação de mais de um grupo com acessos da mesma espécie também ocorreu com Santos et al. (2014), que ao agruparem 37 acessos de araçazeiro de três espécies diferentes pelo método de otimização de Tocher, observaram que a espécie *P. schenckianum* se distribuiu em dois grupos distintos.

Outro ponto importante deste estudo é a observação de uma proximidade genética maior entre o Araçá do Campo (*P. guineense*) com dois *P. cattleyanum* (Araçá Amarelo e Araçá Coroa) do que esses *P. cattleyanum* com o Araçá Una, o qual é da mesma espécie.

Isso indica que é viável obter híbridos interespecíficos resistentes à doença “o declínio da goiabeira” e compatíveis para enxertia, cruzando o Araçá Amarelo ou o Araçá Coroa com o Araçá do Campo, visto que os dois primeiros possuem o gene de resistência (Miranda et al., 2011; Freitas et al., 2014) enquanto, o último, comparando com todos os acessos de araçazeiros, é o mais próximo das goiabeiras. Sendo assim, o híbrido entre essas duas espécies de araçazeiros pode aceitar a enxertia e ser útil em programas de melhoramento.

**Tabela 5-** Estimativas da distância generalizada de Mahalanobis entre os sete acessos de *Psidium* ssp.

<b>Acessos</b>							
	<b>Araçá do Campo</b>	<b>Araçá Amarelo</b>	<b>Araçá Una</b>	<b>Araçá Coroa</b>	<b>Cortibel 1</b>	<b>Cortibel 4</b>	<b>Cortibel 6</b>
<b>Araçá do Campo</b>		288,98	662,69	249,51	803,10	663,31	744,74
<b>Araçá Amarelo</b>	288,98		417,78	25,41	1378,53	910,59	1228,96
<b>Araçá Una</b>	662,69	417,78		442,16	1554,98	1145,69	1476,82
<b>Araçá Coroa</b>	249,51	25,41	442,16		1102,15	674,54	948,95
<b>Cortibel 1</b>	803,10	1378,53	1554,98	1102,15		138,32	44,28
<b>Cortibel 4</b>	803,11	910,59	1145,69	674,54	138,32		91,55
<b>Cortibel 6</b>	803,12	1228,96	1476,82	948,95	44,28	91,55	

Confirmando a possibilidade da obtenção do híbrido interespecíficos entre essas espécies, Gomes et al. (2017) realizaram cruzamentos entre as mesmas espécies estudadas no atual trabalho e embora tenham conseguido obter híbridos tanto entre *P. guajava* x *P. guineense*, *P. cattleyanum* x *P. guineense* e *P. guajava* x *P. cattleyanum*, o cruzamento que mais obteve frutos, foi justamente o indicado aqui como sendo as espécies mais próximas (*P. cattleyanum* x *P. guineense*- 249,519) (tabela 5). Enquanto o que menos obteve frutos foram os cruzamentos entre as espécies mais distantes *P. guajava* x *P. cattleyanum*.

Estudos de diversidade genética, avaliando a variabilidade de araçazeiros e goiabeiras em conjunto já foram realizados por outros pesquisadores, e obtiveram o resultado do agrupamento semelhante ao atual estudo, com grupos sendo formados apenas com goiabeiras, e outros apenas com araçazeiros.

Santos et al. (2011), que ao avaliarem 69 acessos de *Psidium* spp. (10 araçazeiros e 59 goiabeiras) quanto a descritores bioquímicos e agrônômicos, verificaram que o agrupamento pelo método de Tocher baseado na distância de Mahalanobis formou oito grupos apenas com goiabeiras e dois grupos apenas com araçazeiros.

Correa et al. (2011), analisando 64 goiabeiras e 24 araçazeiros via marcador molecular (AFLP- amplified fragment length polymorphism), observaram a formação de dois grupos, um apenas com goiabeiras e outro, em que a maioria era de araçazeiro.

Dos quatro grupos formados no dendrograma (Figura 1), no Grupo I foram alocadas as variedades com maior NGPB, NGPA e NOB, enquanto o Grupo II foi composto pelo acesso com a maior relação P:O e o Grupo III, que também teve apenas um membro, foi o de menor %VPPA. Embora os acessos do grupo IV não tenham sua dissimilaridade dos demais destacada por alguma característica, foram os acessos mais similares dentre todos os analisados, justificando seu agrupamento.

Em relação à distância genética, é interessante observar que o acesso de goiabeira Cortibel 1 foi o mais distante geneticamente de todos os araçazeiros, enquanto que para todas as goiabeiras, o acesso Araçá Una é o que demonstrou maior distância.

Entretanto, ao comparar a distância genética entre os acessos de goiabeira com os *P. cattleyanum*, observa-se que a menor distância é entre o

Araçá Coroa e Cortibel 4 (674,54) (tabela 5), podendo sugerir cruzamentos interespecíficos entre esses acessos a fim de gerar um híbrido resistente. Porém, além da distância genética, é necessário avaliar se os acessos escolhidos formarão sementes híbridas viáveis (Pessanha et al., 2011).

Desta forma, a análise de diversidade se torna muito importante em estudos de melhoramento genético, permitindo identificar genótipos tanto com máxima divergência genética, para aumentar a variabilidade da população ao cruzá-los, quanto com menor divergência entre espécies diferentes, para tentar obter híbridos interespecíficos (Franco et al., 2001; Leão et al., 2011; Pessanha et al., 2011).

Vale ressaltar, que o coeficiente de correlação cofenético foi de 0,87, mostrando que o agrupamento dos acessos no dendrograma podem ser considerados seguros, visto que o elevado CCC indica bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e a representação gráfica obtida (Gomes Filho et al., 2010).

#### **3.3.4.3. Contribuição relativa dos caracteres para divergência- Singh**

Estudos sobre a importância relativa das variáveis são de grande interesse dos pesquisadores, possibilitando assegurar a viabilidade de utilizar os descritores utilizados nos estudos de divergência genética. Desta forma, é possível distinguir qual característica contribui pouco para a discriminação da variabilidade, podendo-se excluí-la nos futuros estudos sabendo que não ocorrerá perda de informação (Quintal, 2013).

Essa diminuição no número de variáveis que contribuem pouco para a discriminação dos materiais avaliados possibilita economia de tempo e de mão-de-obra, tanto na coleta de dados quanto na experimentação, além de baratear um pouco análises futuras (Quintal, 2013)

Cruz et al. (2003) discutem que as características dispensáveis em estudo de divergência genética são aquelas em que não ocorre muita variabilidade entre os indivíduos estudados.

Sabendo disso, a metodologia de Singh (1981) foi aplicada para avaliar a importância relativa das nove variáveis utilizadas, e apontou que a característica que mais contribuiu para agrupar os acessos foi TO-  $\mu$ m (20,53%) seguida pelo

NGPB (18,66%). Por outro lado, %VPAT e %VPPA foram as características que menos contribuíram, com 4,21% e 4,02%, respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6-** Contribuição relativa dos caracteres número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos de pólen por antera (NGPA), número de anteras por botão floral (NAB), número de óvulos por botão floral (NOB), razão pólen: óvulo (P:O), tamanho de grão de pólen (TGP-  $\mu\text{m}$ ), tamanho de óvulo (TO-  $\mu\text{m}$ ), viabilidade polínica na antese (%VPAT) e viabilidade polínica na pré-antese (%VPPA) para divergência genética de sete acessos de *Psidium* spp., baseado em Singh (1981)

Variável	Contribuição Relativa (%)
NGPB	18,66
NGPA	11,71
NAB	6,55
NOB	17,51
P:O	5,64
TGP- $\mu\text{m}$	11,16
TO- $\mu\text{m}$	20,53
%VPAT	4,21
%VPPA	4,02

Ainda observando a tabela 6, vale ressaltar que a contribuição relativa dos caracteres foi bem distribuída em todas as variáveis observadas, não havendo a concentração da contribuição em poucas características, mostrando que todas foram importantes nesse estudo.

### 3.3.5. CONCLUSÃO

Existe dissimilaridade genética entre os acessos de *Psidium* spp. estudados, tanto entre espécies diferentes, como era esperado, como dentro da mesma espécie (*P. cattleyanum*).

A análise dos parâmetros genéticos mostrou que as características avaliadas têm grande credibilidade na divisão dos acessos, visto que a variância fenotípica é mais influenciada pela variância genética do que pela ambiental, ilustrando que o fenótipo reflete mais o genótipo do que o ambiente. Isso torna

essas variáveis boas para serem utilizadas em estudo de diversidade genética, e facilitam a seleção dos melhoristas

Os resultados elevados da herdabilidade e do  $I_v$  indicam condições favoráveis e possibilidade de êxito em um programa de melhoramento, visto que indicam que esses acessos têm a possibilidade de obter ganhos na seleção para as características de interesse estudadas.

Pela análise da distância de Mahalanobis e do dendrograma formado pelo UPGMA, pode-se sugerir o cruzamento entre Cortibel 4 (*P. guajava*) e Araçá Coroa, por possuírem a menor distância interespecífica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarensen, L.W. (2000) Why are most selfers annuals? A new hypothesis for the fitness benefit of selfing. *Oikos*, 89: 606–612.
- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted non aborted pollen. *Stain Technology*, 44:117-122.
- Alexander, M.P. (1980) A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol. Baltimore*, 55 (1): 13-18.
- Allard, R.W. (1960) *Princípios do melhoramento genético de plantas*. Edgard Blucher. ed. São Paulo, 381p.
- Almeida, C.L.P. (2017) *Índices multivariados e BLUP multisafras na seleção de genótipos de goiabeira*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 99p.
- Almeida, E.J., Martins, A.B.G., Santos, J.M. (2009). Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis* e estudo da compatibilidade na enxertia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 421-423.
- Almeida, E.J., Wickert, E., Santos, J. M.; Martins, A.B.G. (2012) Análise da variabilidade genética de *Psidium* spp. (Myrtaceae) avaliados quanto à reação a *Meloidogyne enterolobii*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34: 532-539.

- Alves, J.E. (2000). *Eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas na polinização da goiabeira (Psidium guajava L.)*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Fortaleza-. Universidade Federal do Ceará- UFC, 140p.
- Alves, J.E., Freitas, B.M. (2006) Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira. (*Psidium guajava L.*). *Ciência Agrônômica*, 37: 216-220.
- Alves, J.E., Freitas, B.M. (2007) Requerimentos de polinização de goiabeiras. *Ciência Rural*, 37: 1281-1286.
- Báez, P., Riveros, M., Lehnebach, C. (2002) Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in South Chile. *New Zealand Journal of Botany*, 40: 671-678.
- Balasubrahmanyam, V.R. (1959) Studies on blossom biology of guava. *Indian Journal of Horticulture*, 16: 69-75.
- Bandeira, J. M., Thurow, L.B., Peters, J.A., Raseira, M.C.B., Bianchi, V.J. (2011) Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira japonesa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 860-867.
- Barbosa, R.M. (2016) *Avaliação citológica de espécies de Psidium*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes-. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF, 44p.
- Barros, A.M.; Faleiro, F.G.; Karia, C.T.; Shiratsuchi, L.S.; Andrade, R.P.; Lopes, G.K.B. (2005) Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40:899-909.
- Bespalhok, J.C., Guerra, E.P., OLIVEIRA, R. (2014) Sistema reprodutivo de plantas cultivadas. *In: Bespilhok, J.C., Guerra, E.P., OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas*, 1-8.
- Bezerra, J.E.F, Lederman, I.E., Silva Junior, J.F., Proença, C.E.B. (2006). *Araçá. Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil*. 1.ed. Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 42-62.

- Biazatti, M.A.; de Souza, R.M.; Marinho, C.S.; Guilherme, D.O.; Campos, G.S.; Gomes, V.M.; Bremenkamp, C.A. (2016). Resistência de genótipos de araçazeiros a *Meloidogyne enterolobii*. *Ciência Rural*, 46: 418-120.
- Borém, A., Miranda, G.V. (2013). *Melhoramento de plantas*. 6. ed. Viçosa. 523p. p.
- Boti JB (2001). *Polinização entomófila da goiabeira (Psidium guajava L., Myrtaceae): influência da distância de fragmentos florestais em Santa Teresa, Espírito Santo*. Dissertação (Mestrado em Entomologia). - Viçosa- Universidade Federal de Viçosa- UFV, 70p.
- Boti, B.J., Campos, L.A.O., Marco Junior, P., Vieira, M.F. (2005). Influência da distância de fragmentos florestais na polinização da goiabeira. *Revista Ceres*, 52: 863-874.
- Brandão, M., Laca-Buendía, J.P., Macedo, J.F. (2002). *Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte. Epamig. 528 p.
- Brink, R.A. (1927) The occurrence of semi-sterility in maize. *Journal of Heredity*, 18: 266-270.
- Cabral, J.C., Rossi, A.A.B., Klein, M.E., Vieira, F.S., Giustina, L.D. (2013). Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes calorimétricos. *Enciclopédia Biosfera*, 17: 2780- 1788.
- Campos, B.M., Viana, A.P., Quintal, S.S.R., Gonçalves, L. S. A., Pessanha, P.G.D.O. (2013) Quantification of the genetic divergence among guava accessions using Ward-MLM strategy. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 571-578.
- Cardoso, D.L., Silva, R.F., Pereira, M.G., Viana, A.P., Araújo, E.F. (2009) Diversidade genética e parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de sementes em germoplasma de mamoeiro. *Revista Ceres*, 56: 572-579.
- Carneiro, R. M. D. G., Cirotto, P.A., Quintanilha, A.P., Silva, D.B., Carneiro, R.G. (2007) Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 281-284.

- Carvalho, T.C.P. (1989) Comportamento de algumas cultivares de ameixeira (*Prunus salicina*) quanto à polinização no Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Pelotas, Universidade Federal de Pelotas- 73p.
- Chouteau, M., Barabé, D., Gibernau, M. (2006) Pollen-ovule ratios in some Neotropical Araceae and their putative significance. *Plant Systematics and Evolution*, 257: 147-157.
- Cordeiro, A.M., Martins, P.C.S., Rosa, M.M., Mouro, F., Botelho, R., Ramos, A. (2004). Incompatibilidade pólen/pistilo em variedades de Oliveira (*Olea europaea* L.). *Melhoramento*, 39: 114-121.
- Correa, L.C., Santos, C.A.F., Lima, G.P.P., Rodrigues, M.A., Costa, T.P.P. (2011) Similaridade genética entre acessos de goiabeiras e araçazeiros baseada em marcadores moleculares AFLP<sup>1</sup>. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33: 859-867.
- Coser, S.M., Ferreira, M.F.S., Ferreira, A., Saraiva, S.H. (2014). Diversidade genética de seleções de goiabeiras Cortibel<sub>1</sub>. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 391-399.
- Costa, I.R., Forni-Martins, E.R. (2006). Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pávon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia*. 59: 7-13.
- Costa, I.R., Forni-Martins, E.R. (2007). Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155: 571-580.
- Costa, R.S., Môro, F.V., Oliveira, J.C. (2009). Influência do momento de coleta sobre a viabilidade do grão de pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31: 956-961.
- Costa, S.R., Santos, C.A.F., Castro, J.M.C (2016) Inheritance of resistance to *Meloidogyne enterolobii* in *Psidium guajava* x *P. guineense* hybrid. *European Journal of Plant Pathology*, 146: 1-7.
- Costa, S.R., Santos, C.A.F., Castro, J.M.C. (2012). Assessing *Psidium guajava* x *P. guineense* hybrids tolerance to *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Horticulture*, 959: 59-65.

- Costa, S.R., Santos, C.A.F., Medeiros, A.G., Nunes, E.D., Diniz, L.S. (2010) Cruzamentos interespecíficos entre goiabeira e araçazeiro visando a obtenção de híbridos resistentes ao nematoide *Meloidogyne mayaguensis*. *Anais do XVIII Encontro de Genética do Nordeste- Bahia*. 5 p.
- Cruden, R.W. (1977) Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32–46.
- Cruden, R.W. (2000). Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution*. 222: 143-165.
- Cruden, R.W., Miller-Ward, S. (1981). Pollen-ovule ration, pollen-size, and the ratio of stigmatic area to the pollen-bearing area of the pollinator: an hypothesis. *Evolution*, 5: 964-974.
- Cruz, C. D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(3):271-276.
- Cruz, C. D., Carneiro, P. C. S, (2006), *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2 ed, Viçosa- UFV, 585 p.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J. (2001) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*., 2. Ed. Viçosa: UFV. 390 p.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S., Regazzi, A.J. (2003) *Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético*. 2. Ed. Viçosa- UFV, 585p.
- Cruz, C.D., Carvalho, S.P., Vencovsky, R. (1994) Estudos sobre divergência genética. II. Eficiência da predição do comportamento de híbridos com base na divergência de progenitores. *Revista Ceres*, 41: 183-190.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3. Ed. Viçosa. Editora UFV, 1480p.
- Cunha, M. (2013) *Produtividade e características de frutos de pomares de maracujá implantados com sementes originais e reaproveitadas do híbrido BRS Gigante Amarelo*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Brasília- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 46p.

- da Silva, E.F., Araujo, R.L., Martins, C.S.R., Martins, L.S.S., Veasey, E.A. (2016) Diversity and genetic structure of natural populations of Araçá (*Psidium guineense* Sw.)<sup>1</sup>. *Revista Caatinga*, 29: 37-44.
- Dafni, A. (1992) *Pollination Ecology: A practical approach*. The practical approach series. Oxford University Press, 250p.
- Dafni, A., Firmage, D., (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 113-132.
- Damasceno Junior, P.C, Pereira, T.N.S, Pereira, M.G., da Silva, F.F., Souza, M.M., Nicoli, R.G. (2009) Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L; *Caricaceae*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31: 182-189.
- Danner, M. A., Citadin, I., Sasso, S.A.Z., Sachet, M.R., Malagi, G. (2011) Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jabuticabeira<sup>1</sup>. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33: 345-342.
- Danner, M.A., Raseira, M.C.B., Sasso, S.A.Z., Citadin, I., Scariot, S. (2010) Repetibilidade de caracteres de fruto em araçazeiro e pitangueira. *Ciência Rural*, 40: 2086-2091.
- Dantas, A.C.M., Peixoto, M.L., Nodari, R.O., Guerra, M.P. (2005) Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp) <sup>1</sup>. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27: 356-359.
- Dasarathy, T. B. (1951) The guava. *Madras Agriculture Journal*, 38: 521-527.
- Defani-Scoarize, M. A., Pagliarini, M.S., Aguiar, C., G. (1995) Evolution of meiotic behavior in double-cross maize hybrids and their parents. *Maydica* 40: 319-324.
- Dias, N.L.P., Oliveira, E.J., Dantas, J.L.L. (2011) Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agrônômicos e estimação de parâmetros genéticos. *Revista Agropecuária Brasileira*, 46: 1471-1479.
- Éder-Silva, E., Felix, L.P., Bruno, R.L.A. (2007) Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 110-114.

- Edlund, A.F., Sawanson, R., Preuss, D. (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16: 84-97.
- Einhardt, P.M., Correa, E.R., Raseira, M.C.B. (2006). Comparação entre métodos para testa a viabilidade de pólen de Pessegueiro <sup>1</sup>. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 5-7.
- Etcheverry, A.V., Alemán, M.M., Figueroa-Fleming, T., López-Spahr, D., Gómez, C.A., Yáñez, C., Figueroa-Castro, D.M., Ortega-Baes, P (2011). Pollen:Ovule ratio and its relationship with other floral traits in Papilionoideae (Leguminosae): an evaluation with argentine species. *Plant Biology*, 14- 171-178.
- Faostat, F., 2013 Agriculture organization of the United Nations (2011). *FAO*, Retrieved from. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/download/Q/QC/S>. Acesso, 2017
- Ferrão, R.G., Cruz, C.D., Ferreira, A., Cecon, P.R., Ferrão, M.A.G., Fonseca, A.F.A., Carneiro, P.C.S., Silva, M.F. (2008) Parâmetros genéticos em café Conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 61-69.
- Fonseca, J. S., de Martins, G. A. (1996) *Curso de Estatística*, 6 ed, São Paulo: Atlas, 320 p.
- Franco, M. C., Cassini, S. T. A., Oliveira, V. R., Tsai, S. M. (2001) Characterization of the genetic diversity of common beans by RAPD markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(2): 381-385.
- Franklin, F.C.H., Lawrence, M.J., Franklin-Tong, V.E. (1995). Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *In: Kawang, W.J., Jarvik, J. International Review of Cytology*, 158: 1-64.
- Franzon, R.C., Campos, L.Z.O., Proença, C.E.B., Sousa-Silva, J.C. (2009) Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados, *Planaltina*. 47p.
- Franzon, R.C., Raseira, M.C.B. (2006). Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* Dc. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 18-20.

- Freitas, B.M., Alves, J.E (2008) Efeito do número de visitas florais da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) na polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma. *Rev. Ciên. Agron.*, 39: 148-154.
- Freitas, V.M., Correa, V.R., Motta, F.C., Sousa, M.G., Gomes, A.C.M.M., Carneiro, M.D.G., Silva, D.B., Mattos, J.K., Nicole, M., Carneiro, R.M.D.G. (2014) Resistant accessions of wild *Psidium* spp. to *Meloidogyne enterolobii* and histological characterization of resistance. *Plant Pathology*, 63: 738-746.
- Gallen, C., Zimmer, K.A., Newport, M.E. (1987) Pollination and floral scent morphs of *Polemonium viscosum*: a mechanism for disruptive selection on flower size. *Evolution*: 41:599–606
- Galleta, G.J. (1983). Pollen and seed management. *In*: Moore, J.N., Janck, J. *Methods in fruits breeding*. West Lafayette: Purdue University Press, 23-47.
- Galloni, M., Podda, L., Vivarelli, D., Cristofolini, G. (2007) Pollen representation, polle:ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterranean Legumes (Fam. Fabaceae – Subfam. Faboideae). *Plant Systematics and Evolution*, 266: 147-164.
- Garcia, M.T.A., Miguez, M.B., Gottsberguer, G. (2014) Pollen: ovule ratio and its relationship with other reproductive traits in some *Passiflora* species (Passifloraceae). *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 71:1-8.
- Gaude, T., McCormick, S. (1999) Signaling in pollen-pistil interactions. *Semin Cell Dev Biol.*, 10(2):139-47.
- Gomes Filho, A.; Oliveira, J.G.; Viana, A.P.; Siqueira, A.P.O.; Oliveira, 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*, 32: 627-633.
- Gomes, F. P. (1990) *Estatística experimental*. Universidade de São Paulo: Piracicaba-SP. 240p.
- 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.

Gomes, V. M., Souza, R.M., Mussi-Dias, V., Silveira, S.F., Dolinski, C. (2011) Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne enterolobii* and *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology*, 159: 45-50.

Gomes, V.M., Ribeiro, R.M., Viana, A.P., Souza, R.M., Santos, E.A., Rodrigues, D.L., Almeida, O.F. (2017) Inheritance of resistance to *Meloidogyne enterolobii* and individual selection in segregating populations of *Psidium* spp. *Journal of Plant Pathology*, 148: 699-708.

Guerra, M. (1988) *Introdução à citogenética geral*. São Paulo: Guanabara, 132p.

Gurgel, F.L., Nascimento, W.M.O., Ribeiro, O.D., Bhering, L.L. (2012) Parâmetros Genéticos em acessos de Camucamuzeiro para caracteres de fruto. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura- Resumo Expandido*. Bento Gonçalves. 4788-4791.

Hirano, R.T., Nakasone, H.Y. (1969) Pollen germination and compatibility studies of some *Psidium* species. *Proceedings of the American Society*, 94: 287–289.

Hister, C.A.L., Tedesco, S.B. (2016) Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 18: 135-141.

Hokched, O., Ramírez, N. (2008) Breeding systems in species of Melastomataceae in Gran Sabana (Bolívar State, Venezuela). *Acta Botánica Venezolánica*, 31: 387-408.

IBGE (2016). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola Municipal 2016*.

Junqueira, K.P., Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Bellon, G., Ramos, J.D., Braga, M.F., Souza, L.S. (2008) Confirmação de híbrido interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. *Revista brasileira de fruticultura*, 30 (1): 191-196.

- Jurgens, A., Witt, T., Gottsberger, G. (2002) Pollen grain numbers, ovule numbers and pollen-ovule ratios in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number and sexual system. *Sex Plant Reprod*, 14: 279-289.
- Kelly, J.K., Rasch, A., Kalisz, S. (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany*, 89 (6):1021-1023.
- Krause, W.; Viana, A.P.; Cavalcante, N.R.; Ambrósio, M.; Santos, E.A.; Vieira, H.D. (2017) Digital phenotyping for quantification of genetic diversity in inbred guava (*Psidium guajava*) families. *Genetics and Molecular Research*, 16: 1-11.
- Landrum, L.R., Clark, W.D., Sharp, W.P., Brendecke, J. (1995) Hybridization between *Psidium guajava* and *Psidium guineense* (Myrtaceae). *Economic Botany*, 49:153-161.
- Landrum, L.R., Kawasaki, M.L. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification Keys. *Brittonia*, 49: 509-536.
- Leão, P.C.S., Cruz, C.D., Motoike, S.Y. (2011) Genetic diversity of table grape based on morphoagronomic traits. *Scientia Agricola*, 68(1): 42-49.
- Lehnebach, C., Riveiros, M. (2003) Pollination biology of the Chilean endemic orchid *Chloraea lamellata*. *Biodiversity and Conservation*, 12: 1741–1751.
- Lenzi, M., Oth, A.I. (2004) Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26: 198-201.
- Lincoln, R.J., Boxshall, G.A., Clark, P.F. (1982) A dictionary of ecology, evolution and systematics. *Cambridge University Press*, New York.
- López, J., Rodríguez-Riaño, T., Ortega-Olivencia, A., Devesa, J.A., Ruiz, T. (1999) Pollination mechanisms and pollen-ovule ratios in some *Genisteae* (*Fabaceae*) from Southwestern Europe. *Plant Systematics and Evolution*, 216: 23-47.
- Mani, A., Mishra, R., Thomas, G. (2011) Elucidation of diversity among *Psidium* Species using morphological and SPAR methods. *Journal of Phytology*, 3: 53-61.

- Maranhão, S.R.V.L., de Moura, R.M., Pedrosa, E.M.R. (2001) Reação de indivíduos segregantes de goiabeira a *Meloidogyne incógnita* raça 1 e *M. mayaguensis*\*. *Nematologia Brasileira*, 25: 191-195.
- Martins, K.C., Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Rodrigues, R., Amaral Junior, A. T. (2014) Crossability and evaluation of incompatibility barriers in crosses between *Capsicum* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 15: 139-145.
- Maués, M.M., Couturier, G. (2002) Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 25: 441-448.
- Medan, D. (2003) Reproductive biology of the andean shrub *Discaria nana* (Rhamnaceae). *Plant Biology*, 5:94-102.
- Medina JC (1988). *Goiaba I- Cultura*. Goiaba: cultura matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2.ed. Campinas. 120p.
- Michalski, S.G., Durka, W. (2009). Pollination mode and life form strongly affect the relation between mating system and pollen to ovule ratios. *New Phytologist*, 183: 470–479.
- Miranda, G.B., de Souza, R.M., Gomes, V.M., Ferreira, T.F, Almeida, A.M. (2012) Avaliação de acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterolobii*. *Bragantia*, 71: 52-58.
- Miranda, G.B., Souza, R.M., Viana, A.P. (2011). Assessment of methods and criteria for screening *Psidium* spp. for resistance *Meloidogyne enterolobii*. *Nematologia Brasileira*, 34: 211-219.
- Miranda, J.E.C., Costa, C.P., Cruz, C.D. (1988) Correlações genotípica, fenotípica e de ambiente entre caracteres de fruto e planta de pimentão (*Capsicum annunn* L.). *Revista Brasileira de Genética*, 11: 457-468.
- Moreira, N.F., Pereira, T.N.S., Martins, K.C. (2017) Meiotic analysis of interspecific hybrids between *Capsicum frutescens* and *Capsicum chinense*.

- Moura, M.C.C.L., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Rodrigues, R., Amaral Junior, T.A., Pereira, T.N.S. (2010) Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. *Horticultura Brasileira*, 28(2): 155-161.
- Nettancourt, D. (1977) Incompatibility in Angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, 10: 185-199.
- Oliveira, I.P., Oliveira, L.C., Moura, C.S.F.T., Lima Júnior, A.F., Rosa, S.R.A (2012) Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. *Revista Faculdade Montes Belos*, 5: 137-156.
- Oliveira, M.L.F., Daher, F.R., Menezes, B.R.S., Vivas, M., Rocha, A.S., Ponciano, N.J., Amaral Junior, A.T., Araujo, M.S.B., Pereira, T.N.S., Silva, V.B. (2017). Genetic diversity of elephant grass (*Cenchrus purpureus* [Schumach.] Morrone) for energetic production based on quantitative and multi-category traits. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77: 48-57.
- Paiva, C.L.; Viana, A.P.; Santos, E.A.; Freitas, J.C.O.; Amaral Júnior, A.T. (2016) Genetic gain estimated by different selection criteria in guava progênies. *Bragantia*, 75: 418-427.
- Patel, S. (2012). Exotic tropical plant *Psidium cattleiaum*: a review on prospects and threats. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*, 11: 243-248.
- Pearse, A. G. E. (1953) *Histochemistry, theoretical and applied*. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 594p.
- Pereira, F.M. (1995). *Cultura da goiabeira*. Jaboticabal: Funep. 47p.
- Pereira, F.M., Carvalho, C.A., Nachtigal, J.C. (2003) Século XXI: nova cultivar de goiabeira de dupla finalidade<sup>1</sup>. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 498-500.
- Pereira, F.M., Nachtigal, J.C. (2002). Melhoramento da goiabeira. *In: Claudio Horst Bruckner. Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa: UFV, 267-289.
- Pereira, F.O.M., de Souza, R.M., Souza, P.M., Dolinski, C., Santos, G.K. (2009) Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 33: 176-181.

- Pessanha, P.G.D.O., Viana, A.P., Amaral Júnior, A.T.D., Souza, R.M.D., Teixeira, M.C., Pereira, M.G. (2011) Assessment of genetic diversity in access to *Psidium* spp. via RAPD markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(1), 129-136.
- Pommer, C.V., Murakami, K.R.N. (2009) Breeding guava (*Psidium guajava* L.). In: Jain, S.M., Priyadarshan, P.M., *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. New York: Springer, 82-120.
- Pommer, C.V., Oliveira, O.F., Santos, C.A.F. (2013) *Goiaba: recursos genéticos e melhoramento*. Ed.1. Edufersa, 126p.
- Quintal, S.S.R. (2013) Melhoramento da goiabeira *P. guajava* via metodologia de modelos mistos. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF-193p.
- R Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramos, J.D., Pasqual, M., Salles, L.A., Chagas, E.A., Pio, R. (2008) Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. *Interciencia*, vol. 33, 51-53.
- Raseira, M.C.B., Raseira, A. (1996). *Contribuição ao estudo do araçazeiro, Psidium cattleyanum*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 95p.
- Robaina, R.R., Campos, G.S., Marinho, C.S., Souza, R.M., Bremenkanp, C.A. (2015) Grafting guava on cattley guava resistant to *Meloidogyne enterolobii*. *Ciência Rural*, 45: 1579-1584.
- Robaina, R.R., Marinho, C.S., Souza, R.M., Campos, G.S. (2012) Subenxertia da goiabeira 'Paluma' com araçazeiros resistentes a *Meloidogyne enterolobii* (*sin. M. mayaguensis*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34: 951-955.
- Ruggiero, C. (1973) Estudos sobre floração e polinização do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Tese (Doutorado em Ciências). Tese

(Doutorado em Ciências) – Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 92p.

- Santos, C.A.F., Corrêa, L.C., Costa, S.R. (2011) Genetic divergence among *Psidium* accessions based on biochemical and agronomic variables. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 149-156.
- Santos, K.L., Lenzi, M., Caprestano, C.A., Dantas, A.C.M., Ducrochet, G.P.H.J., Nodari, R.O., Orth, A.I., Guerra, M.P. (2007). Evidência da atuação do sistema de auto-incompatibilidade tardia em *Acca selowiana* (Berg) Burret. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 120-123.
- Santos, M.A.C., Queiroz, M.A., Santos, A.S., Santos, L.C., Carneiro, P.C.S. (2014) Diversidade genética entre acessos de araçá de diferentes municípios do semiárido baiano<sup>1</sup>. *Revista Caatinga*, 27: 48-57.
- Sanzol, J., Herrero, M. (2001) The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, 90: 1-17.
- São José, A.R., Pereira, F.M. (1987) Estudo de diferentes processos para coleta de pólen e polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Científica*, 15: 85-92.
- Schifino-Wittmann, M.T., Dall’Agnol, M. (2002). Auto-incompatibilidade em plantas. *Ciência Rural*, 32: 1083-1090.
- SEBRAE (2015). *Agronegócio fruticultura. Boletim de inteligência*. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)>. Acesso em 10/11/2016.
- Seth, J.N. (1960) Varietal cross-incompatibility in guava (*Psidium guajava* L.). *Horticulture Adversity*, 4: 161-164.
- Shimoya, A., Cruz, C.D., Ferreira, R.P. de., Pereira, V.A., Carneiro, P.C.S. (2002) Divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma de capim-elefante. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (7): 971-980.

- Silva, G.S., Pereira, A.L., Araújo, J.R.G., Carneiro, R.M.D.G. (2008) Ocorrência de *Meloidogyne mayagensis* em *Psidium guajava* no estado do Maranhão. *Nematologia Brasileira*, 32: 242-243.
- Silva, S.N., Silva, M.A., Marçal, T.S., Ferreira, A., Fontes, M.M.P., Ferreira, M.F.S. (2017) Genetic parameters of pollen viability in guava (*Psidium guajava* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 11(1):1-8.
- Silveira, T.M.T. (2008) Polinização em amoreira-preta (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium ashei*) e ameixeira-japonesa (*Prunus salicina*). Dissertação (Mestrado em Agronomia). Pelotas, Universidade Federal de Pelotas- 90p.
- Singh, D. (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian Journal Genetics & Plant Breeding*, 41: 237-245.
- Singh, R., Sehgal, O.P. (1968). Studies on the blossom biology of *Psidium guajava* L. (guava); Pollen studies stigmatal receptivity pollination and fruit. *Indian Journal of Horticulture*, 25: 52-59.
- Siqueira K.M.M. (2010) Polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.). In: Ribeiro, M.F., Kiil, L.H.P., Silva, E.M.S., Siqueira, K.M.M. *III Semana dos Polinizadores: Palestras e Resumos*. Juazeiro: Embrapa Semi-Árido, 144-161.
- Siqueira, K.M.M., Kiill, L.H.P., Martins, C.F., Silva, L.T. (2012) Ecologia da polinização de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae): riqueza, frequência e horário de atividades de visitantes florais em um sistema agrícola. *Magistra*, 24: 150-157.
- Sitther, V., Zhang, D., Harris, D.L., Yadav, A.K., Zee, F.T., Meinhardt, L.W., Dhekney, S.A. (2014) Genetic characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in the United States using microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 61:829–839.
- Soubihe Sobrinho, J (1951). *Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (Psidium guajava L.)*. Tese (Doutorado em Fitotecnia). São Paulo- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-ESALQ. 166p.
- Soubihe Sobrinho, J., Gurgel, J.T.A. (1962). Taxa de panmixia na goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Bragantia*, 21: 15-20.

- Souza, A.G., Resende, L.G., Lima, I.P., Santos, R.M., Chalfun, N.N.J. (2014) Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*. *Ciência Rural*, 44: 822-829.
- Souza, A.G., Resende, L.V., Lima, I.P., Martins, L.S.S., Techio, V.H. (2015) Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. *Plant Syst. Evol.*, 301: 231-237.
- Souza, M.M., 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. *flaviacarpa* Degener) <sup>1</sup>. *Ciênc. agrotec.*, 26: 1209-1217.
- Staggemeier, V.G., Morellato, L.P.C., Gelatti, M. (2007) Fenologia reprodutiva de Myrtaceae em uma ilha continental de Floresta Atlântica. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 423-425.
- Statistical Analysis System – SAS User's guide. 1996. Version 6, ed. 4, Cary. 1686p.
- Stone, J.L., Thomson, J.D., Dent-Acosta, S.J. (1995). Assessment of pollen viability in hand pollination experiments: a review<sup>1</sup>. *American Journal of Botany*, 82(9): 1186-1197.
- Subramanyam, M.D., Iyer, C.P.A. (1993) Improvement of guava. In: Chadha, K.L., Pareek, O.P.E. *Advances in Horticulture: Fruit Crops* – New Delhi: Malhotra Publishing House, 337–347.
- Techio, C.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: 353-362.
- Tuite, J. (1969) Use the spencer hemacytometer. *Plant pathological methods fungi and bacteria*, 182-185.
- Vencovsky, R. (1987) Herança quantitativa. In: Paterniani, E., Viegas, G.P. *Melhoramento e produção do milho*. Campinas: Fundação Cargill, 135-214.

- Wang, Y., Zhang, D., Renner, S.S., Chen, Z. (2005). Self-pollination by sliding pollen in *Caulokaempferia coenobialis* (Zingiberaceae). *Int. J. Plant Sci.*, 166: 753–759.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Gadek, P.A., Quinn, C.J. (2001) Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* 88: 2013-2025.
- Yi, W., Law, E., McCoy, D., Wetzstein, H.Y. (2006) Stigma development and receptivity in Almond (*Prunus dulcis*). *Annals of Botany*, 97: 57–63.
- Zanandrea, I., Raseira, M.C.B., Santos, J., Silva, J.B. (2011) Receptividade do estigma e desenvolvimento do tubo polínico em flores de pessegueiro submetidas à temperatura elevada. *Ciência Rural*, 41: 2066-2072.