

CARACTERIZAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE
POPULAÇÕES SEGREGANTES DE *Psidium* spp. RESISTENTES
AO *Meloidogyne enterolobii* VIA MARCADORES MICROSSATÉLITES

RAIANE MARIANI SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO-2018

CARACTERIZAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE
POPULAÇÕES SEGREGANTES DE *Psidium* spp. RESISTENTES
AO *Meloidogyne enterolobii* VIA MARCADORES MICROSSATÉLITES

RAIANE MARIANI SANTOS

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO-2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

058/2018

S237 Santos, Raiane Mariani.

Caracterização e estruturação genética de

Populações segregantes de *Psidium* spp. resistentes ao *Meloidogyne enterolobii* via marcadores microssatélites / Raiane Mariani Santos. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

50 f. : il.

Bibliografia: 28 – 35.

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

Orientador: Alexandre Pio Viana.

1. Cruzamento Interespecífico. 2. Declínio da Goiabeira. 3. Marcadores de DNA. 4. Diversidade Genética. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.421

CARACTERIZAÇÃO E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE
POPULAÇÕES SEGREGANTES DE *Psidium* spp. RESISTENTES
AO *Meloidogyne enterolobii* VIA MARCADORES MICROSSATÉLITES

RAIANE MARIANI SANTOS

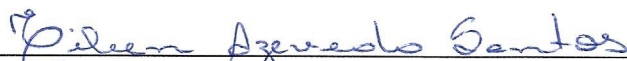
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 23 de fevereiro de 2018.

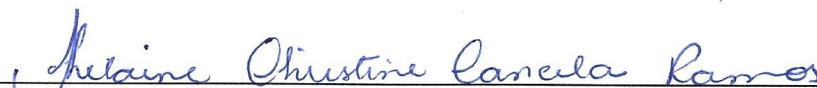
Comissão Examinadora:



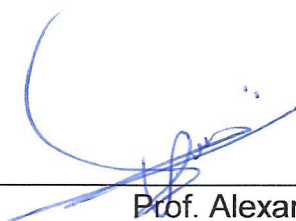
Prof.^a Marcia Flores da Silva Ferreira (D.Sc Melhoramento de Plantas) - UFES



Dr.^a Eileen Azevedo Santos (D.Sc Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF



Prof.^a Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF



Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc Produção Vegetal) - UENF
(Orientador)

À minha filha Melina, meu esposo Gerson e meu filho irmão, Igor e aos amigos
que conquistei durante minha caminhada.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o pensamento positivo de que sempre vai dar certo quando tem que ser;

Ao meu esposo, Gerson, pelo apoio e incentivo dado durante toda a minha formação acadêmica, você é essencial em minha vida;

Ao meu irmão, Igor e minha filha, Melina, pelo incentivo de buscar sempre o meu melhor;

À Adriana, minha irmã, que me acolheu e me deu todo apoio para a conclusão desse mestrado;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, pela estrutura oferecida para a realização deste trabalho;

À Capes, pela concessão da bolsa;

À Faperj, pelo fomento à pesquisa;

Ao meu orientador, Alexandre Pio Viana, pelo incentivo, aprendizado e parceria durante minha formação;

Às Pós-Doutorandas Dr^a Daniele e, principalmente, Dr^a Eileen e à Dr^a Marcela, que deram suporte ao desenvolvimento do trabalho;

Aos meus amigos de equipe: Odimar, Paulo, Flávia, Moisés, Sandra, Misael, Natan, Flavia, Géssica, Beatriz, Valquíria, que sempre estiveram presentes tornando meus dias mais felizes;

Às minhas amigas de república, Laís e Mariane, por todo carinho e ajuda durante o mestrado;

Ao secretário do programa, Daniel, pela sua eficiência e comprometimento, que resultam no funcionamento do Programa.

FIGURAS

- Figura 1.** A: Populações segregantes de *Psidium* spp. resistentes ao nematoide *M. enterolobii* , B: Genótipo oriundo do cruzamento: 1 *P. cattleianum* (Ara CV1) x *P. guineensi* (Ara CV11) , 2 *P. guineensi* (P36) x *P. cattleianum* (Ara P11) , 3 *P. cattleianum* (Ara CV8) x *P. guineensi* (Ara CV11) , 4 *P. guajava* (Guava 13.4 II) x *P. cattleianum* (Ara P33) , 5 *P. guajava* (Guava 13.4 II) x *P. cattleianum* (Ara P53).
..... 10
- Figura 2.** Número ótimo de marcadores microssatélites analisados em 94 indivíduos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp..... 18
- Figura 3.** a) Valores de delta K (ΔK) para os respectivos números de grupos (K) em cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp , b) Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base na distância genética de Nei para as cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp., c) Agrupamento pela inferência bayesiana em cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp. com k=3 grupos..... 23
- Figura 4.** Dispersão gráfica pela análise de Coordenadas Principais com base na distância genética de Nei para as cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp..... 25

Figura 5. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base na distância estabelecida pelo Índice Ponderado para 94 indivíduos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.* Grupo azul: formado pelo genitor Ara P36 e pelos híbridos de *P. guineensi* (P36) x *P. cattleianum* (P11), grupo vermelho: constituído pelos genitores Guava 13 4 (2), Guava 13 4 (5) e os híbridos de *P. guajava* (13.4 2) x *P. cattleianum* (P33) e *P. guajava* (13.4 5) x *P. cattleianum* (P51) e grupo verde: genitores Ara P11, Ara CV8, Ara CV1, Ara CV11 (3), CV11 (4), Ara P33 e Ara P53 e híbridos de *P. cattleianum* (CV8) x *P. guineensi* (CV11) e *P. cattleianum* (CV1) x *P. guineensi* (CV11).
Correlação cofenética= 0.9626

TABELAS

Tabela 1. Genótipos de <i>P. guineense</i> , <i>P. cattleianum</i> e <i>P. guajava</i> utilizados nos cruzamentos interespecíficos para a obtenção das populações segregantes de <i>Psidium</i> spp e número de plantas híbridas resistentes avaliadas em cada população com os parentais.....	11
Tabela 2. Sequência dos 33 pares de iniciadores microsatélites utilizados na análise dos 94 genótipos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de <i>Psidium</i> spp.....	16
Tabela 3. Probabilidade de identidade (PI), estimada para 33 <i>locus</i> analisados em 94 indivíduos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de <i>Psidium</i> spp.....	19
Tabela 4. Número de indivíduos (N), número médio de alelos (Na), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de fixação (f), e conteúdo de informação polimórfica (PIC), estimados para as cinco populações obtidas de cruzamentos.....	21
Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) em populações segregantes de <i>Psidium</i> spp. por meio de marcadores microsatélites (SSR).....	24

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRAT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 O gênero <i>Psidium</i> spp.	4
3.2 Importância nutricional e econômica de <i>Psidium guajava</i>	5
3.3 Declínio da goiabeira	6
3.4 Melhoramento genético visando à resistência ao <i>M. enterolobii</i>	7
3.5 Aplicação de marcadores microssatélites na goiabeira	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Material genético.....	10
4.2 Extração e quantificação do DNA genômico.....	11
4.3 Triagem dos <i>Primers</i>	11
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	12

4.5	Análise estatística	12
4.5.1	Estimação da diversidade genética dos marcadores SSR	12
4.5.2	Análise da estrutura e agrupamento entre as populações de Psidium spp	14
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6.	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

SANTOS, Raiane Mariani, Ms., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Fevereiro 2018, Caracterização e estruturação genética de populações segregantes de *Psidium* spp. resistentes ao *Meloidogyne enterolobii* via marcadores microssatélites. Orientador: Alexandre Pio Viana, Conselheiros: Eileen Azevedo Santos e Helaine Christine Cancela Ramos.

O declínio da goiabeira (*Psidium guajava*), responsável pela erradicação de inúmeros pomares de goiaba, há alguns anos se instalou no país, constituindo-se um grave problema fitossanitário. Os sintomas do declínio são atribuídos à ação sinérgica entre *Meloidogyne enterolobii* e *Fusarium solani*, que contribui para o apodrecimento das raízes, tornando assim o manejo da doença complexo. O objetivo desse trabalho foi selecionar genótipos geneticamente mais próximos de *Psidium guajava* para avanço de geração no programa de melhoramento da goiabeira, visando resistência ao *M. enterolobii*. Foram avaliados 94 indivíduos oriundos de cinco populações segregantes de *Psidium* resistentes ao nematoide *M. enterolobii*, e seus respectivos genitores. As populações foram obtidas por meio de hibridação interespecífica de *P. cattleianum* (genótipo resistente), *P. guajava* e *P. guineensi* (genótipos suscetíveis) e avaliadas para resistência ao *M. enterolobii*. A extração do DNA genômico total foi efetuada a partir de folhas jovens coletadas individualmente de cada planta híbrida e os parentais, utilizando o método CTAB padrão com modificações. Os produtos da PCR foram submetidos a um sistema de eletroforese capilar para visualização dos resultados. A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os genótipos, utilizando o Índice

Ponderado e entre as populações com base na distância genética de Nei. A análise de agrupamento via dendrograma foi feita por meio do método UPGMA, e a dispersão gráfica entre as populações foi realizada com base na análise das coordenadas principais (PCA). A partir das variáveis moleculares estimou-se a diversidade genética entre as populações de *Psidium* spp. Foram estimados os seguintes parâmetros: o número de alelos por loco (NA), conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de identidade (PI), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), índice de fixação (f). Com base nas informações obtidas dos iniciadores polimórficos, foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA), para avaliar as diferenças entre e dentro das populações. As populações também foram avaliadas quanto à estruturação genética, através do método baseado em algoritmos de agrupamentos bayesianos. O Na por loco variou de 2-4 alelos, com uma média de 2,70 alelos por loco. O número médio de alelos nas populações variou de 1.606 a 2.091, com média de 1,867. Os valores da H_o variaram de 0.213 a 0.422 com média de 0,289 e a H_e variou com valores de 0,143 a 0,269 com média de 0,217. O PIC variou de 0,112 a 0,227 com média de 0,174. O f variou de -0,030 a 0,272 com média de 0,018. A AMOVA indicou que aproximadamente 80% da variação surgiram da diferenciação entre essas populações e apenas 20% da variação total foi observada dentro das populações. A análise bayesiana mostrou que as populações foram subdivididas em três grupos, concordando com o número de grupos observados pela distância genética de Nei e pela análise de coordenadas principais. As populações (*P. guineensi* x *P. cattleianum*) e (*P. guajava* x *P. cattleianum*) foram as que obtiveram maior diversidade genética, que pode ser confirmada pelos maiores valores de heterozigosidade observada (0.422 e 0.312 respectivamente). A população obtida do cruzamento entre *P. guineensi* x *P. cattleianum* se diferenciou das demais com uma nítida estruturação, enquanto que as populações de *P. guajava* x *P. cattleianum* e *P. cattleianum* x *P. guineense* foram as mais similares entre si. Por meio da análise de agrupamento individual, foi possível selecionar três híbridos resistentes, ambos provenientes dos cruzamentos entre *P. guajava* x *P. cattleianum*, sendo eles os genótipos 80,82 e 84, que estão mais próximos geneticamente de *P. guajava*, podendo, assim, serem utilizados em futuros cruzamentos com a goiabeira a fim de dar continuidade ao programa de melhoramento da goiaba visando resistência ao *M. enterolobii* na UENF.

Palavras chave: Cruzamento interespecífico; Declínio da goiabeira; Nematóide de galha; Marcadores de DNA; Diversidade Genética.

ABSTRAT

SANTOS, Raiane Mariani, Ms., State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, February, 2018, Genetic description and structuring of segregant *Psidium* spp. population resistant to *Meloidogyne enterolobii* by microsatellites markers. Advisor: Alexandre Pio Viana, Counselors: Eileen Azevedo Santos e Helaine Christine Cancela Ramos.

The guava (*Psidium guajava*) decline, responsible by the eradication of uncountable guava orchards, have been installed in the country some years ago, becoming a serious phytosanitary problem. The symptoms of decline are attributable to synergic action between *Meloidogyne enterolobii* e *Fusarium solani*, that contributed to root rotting, becoming complex the disease management. The aiming of this work was select genotypes genetically closers of *Psidium guajava* to advance generations in guava breeding program aiming *M. enterolobii* resistance. 94 individuals originated from five segregant populations of *Psidium* resistant to nematode *M. enterolobii* and their respective parents. The population were obtained through interspecific hybridization of *P. cattleianum* (resistant genotype), *P. guajava* e *P. guineensi* (both susceptible genotypes) and evaluated for resistance to *M. enterolobii*. The total genomic DNA extraction was carried out from young leaves individually collected from each hybrid plant and parents, using the CTAB standard method with modifications. The results of PCR were submitted to capillary electrophoresis system for output visualization. From this numerical matrix, was estimated the genetic distance between the genotypes using the Weighted Index and between the populations based on genetic distance of Nei. The clustering analyses via

dendrogram was carried out by UPGMA method, and the graphic dispersion between populations was carried out based on principal coordinates analyses (PCA). From molecular variables the genetic divergence was estimated between populations of *Psidium* spp. Were estimated the following parameters: number of alleles *per locus* (NA), polymorphic information content (PIC), probability of identity (PI), heterozygosity observed (Ho), heterozygosity expected (He), fixation index (*f*). Based on information obtained from polymorphic primers, was carried out an analysis of molecular variance (AMOVA), to evaluate the differences among and within the populations. The populations were also evaluated in terms of genetic structuring, through the method based in algorithms of Bayesian clustering. The NA *per locus* varied from 2-4 alleles, with a mean of 2,70 alleles *per locus*. The average number of alleles in the populations, varied from 1,606 to 2,091, with mean of 1,867. The values of Ho varied from 0.213 to 0.422 with mean of 0.289 and the He varied with values of 0.143 to 0.269 with mean of 0.217. The PIC varied from 0.112 to 1.227 with mean of 0.174. The *f* varied from -0.030 to 0.272 with mean of 0.018. The AMOVA indicated that approximately 80% of variation originated from the differentiation among these populations. The Bayesian analysis presented that the populations were subdivided in three groups agreeing with the number of clusters observed by genetic distance of Nei and by principal coordinated analysis. The populations (*P. guineensi* x *P. cattleianum*) and (*P. guajava* x *P. cattleianum*) were the two with the most genetic diversity, that could be confirmed by the highest values of heterozygosity observed (0.422 and 0.312, respectively). The population obtained from cross between *P. guineensi* x *P. cattleianum* differentiated from others with a sharp structuring, while the populations from *P. guajava* x *P. cattleianum* and *P. cattleianum* x *P. guineensi* were the most similar among them. Through of the individual clustering analysis was possible select three resistant hybrids, both originated from crosses between *P. guajava* x *P. cattleianum* being them the genotypes 80, 82 and 84, that was the genetically closest to *P. guajava*, and can thus be used in next crosses with guava to continue the guava breeding program aiming resistance to *M. enterolobii* at UENF.

Keywords: Interspecific cross; Guava decline; Knot nematode; DNA markers; Genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava*, L.), uma das fruteiras de maior importância da família Myrtaceae é originária da região tropical do continente americano, com centro de origem provável, na região compreendida entre o sul do México e o norte da América do Sul (Pereira, Kavati, 2011).

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de goiaba, sendo a Índia o maior produtor, seguido pela China, Tailândia, Paquistão, México e Indonésia (Pariona, 2017). No ano de 2016, o país destinou à colheita de goiabas uma área de 17.179 ha, obteve uma produção de 508.573 toneladas, destacando-se os estados de Pernambuco e São Paulo como os maiores produtores (IBGE, 2016).

No entanto, nos últimos anos, a meloidoginose causada pelo nematoide-degalhas da goiabeira (*Meloidogyne enterolobii*) tornou-se o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil. Estima-se que mais de cinco mil hectares (ha) desta cultura estejam infestados pelo nematoide, em vários estados brasileiros (Pereira et al., 2009).

A associação sinérgica do *M. enterolobii* com fungo *Fusarium solani* torna o quadro ainda mais preocupante, levando, a médio prazo, o declínio dos pomares com acentuada queda de produtividade, seguida de morte das goiabeiras (Gomes et al., 2011).

Devido à inexistência de métodos de controle eficientes, as melhores expectativas para o manejo de *M. enterolobii* em pomares de goiabeira está no desenvolvimento de novas cultivares, por meio de cruzamentos interespecíficos

entre espécies de *Psidium* silvestres resistentes ao nematoide e goiabeiras (Costa et al., 2016).

Alguns fatores dificultam os programas de melhoramento na obtenção desses híbridos resistentes, como barreiras pré e pós fertilização, comumente presentes em cruzamentos interespecíficos, incompatibilidade genética em virtude da ploidia diferente entre as espécies (Souza et al., 2014, Costa et al., 2016).

Eliminando tais dificuldades, o programa de melhoramento genético da goiabeira da Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF realizou hibridações interespecíficas com genótipos de *Psidium*, utilizando como parentais: *P. guajava* e *P. guineense*, acessos receptores de genes de resistência e *P. cattleianum*, acessos utilizados como fonte doadora de genes de resistência (Miranda et al., 2012, Gomes et al., 2016).

Gomes et al. (2016) realizaram 696 cruzamentos, que resultaram em cinco populações, totalizando 885 plantas híbridas. As populações foram caracterizadas por meio de descritores morfológicos e avaliadas em relação à resistência ao *M. enterolobii*. (Almeida, 2017).

Os híbridos resistentes, imunes e suscetíveis foram submetidos, também, a um estudo de herança da resistência ao *M. enterolobii*, os parâmetros genéticos foram obtidos pelo procedimento REML/BLUP e ranqueados os genótipos mais resistentes. Pelo teste do qui-quadrado, os autores descartaram a hipótese de herança monogênica com dominância incompleta, sugerindo que tal característica tem ação poligênica (Gomes et al., 2016).

Quanto ao aspecto da herança, há relatos contraditórios na literatura. Costa et al. (2016) avaliaram 276 híbridos do cruzamento *P. guajava* x *P. guineense* e verificaram que 242 plantas foram imunes e 28 plantas foram suscetíveis, sugerindo herança simples e com dominância completa.

Visando melhor compreensão da diversidade e estruturação genética das populações híbridas resistentes, estudos comparativos utilizando dados morfológicos (Almeida, 2017) e moleculares oriundos de marcadores SSR no trabalho em questão torna-se pioneiro, acelerando as novas etapas do programa de melhoramento genético da goiaba.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar caracterização genético-molecular de populações oriundas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium* spp, propondo subsidiar o programa de melhoramento da goiabeira, visando resistência ao *M. enterolobii*.

2.2 Específicos

- Acessar o potencial dos marcadores microssatélites em detectar polimorfismo em genótipos de *Psidium*;
- Estimar a distância genética entre populações segregantes de *Psidium*, utilizando marcadores microssatélites;
- Realizar a caracterização genética, buscando estimar índices genotípicos para a quantificação e estruturação da variabilidade genética das populações avaliadas;
- Selecionar genótipos geneticamente mais próximos a *P. guajava* para o avanço de geração no programa de melhoramento da goiabeira, visando resistência ao *M. enterolobii*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O gênero *Psidium* spp.

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae, e compreende aproximadamente cerca de 92 espécies dentre as quais se destacam a goiaba (*P. guajava* L.) e os araçás (*P. cattleianum* e *P. guineense*) com origens nas regiões tropicais da América (Govaerts et al., 2011).

Com ampla variabilidade, uma característica marcante do gênero é a diferença de ploidia dentro das espécies de *Psidium*, o número de cromossomos básico é $x=11$ sendo, *P. guajava* $2n= 22$, *P. guineensi* é de $2n = 44$, enquanto que *P. cattleianum* apresentam variação de $2n = 44, 46, 48, 55, 58, 82$ (Souza 2011).

A goiabeira originária da América está distribuída em todo território brasileiro, e consiste em uma planta arbórea, que apresenta o caule lenhoso, ramificado, folhas opostas, com formato elíptico oblongo, flores brancas, pentâmeras e hermafroditas, possuem em média 350 estames, aparecem isoladas ou em grupo de duas ou três, sempre nas axilas das folhas. O fruto é uma baga globosa com uma ampla variabilidade em seus aspectos (Manica et al., 2000, Pereira e Nachtigal, 2013).

A polinização cruzada é a forma reprodutiva mais frequente e eficiente na produção de frutos em *P. guajava*, embora a maioria dos pomares seja originada por propagação vegetativa. Este fato, aliado ao modo reprodutivo da espécie,

resulta em heterogeneidade das goiabeiras no pomar, nas características dos frutos e das plantas (Alves, Freitas, 2007).

Os araçazeiros também estão distribuídos em quase todos os estados do Brasil, apresentando extensa área de ocorrência na costa atlântica brasileira (Sobral et al., 2014). Essas plantas vegetam em diferentes ecossistemas, sendo que *P. guineense* ocorre nas restingas, tabuleiros, cerradões e capoeiras, enquanto *P. cattleianum* ocorre na floresta latifoliada semidecídua, matas ciliares, matas de altitude e, também, nas restingas do Sul do Brasil (Brandão et al., 2002).

O *P. cattleianum* é uma espécie originária do Sul do Brasil, e está distribuída desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, e é conhecido como araçá, araçá-amarelo ou araçá-de-coroa, uma espécie arbustiva, geralmente de tronco tortuoso, de coloração marrom-avermelhada. Suas folhas são simples e opostas, com flores isoladas, axilares, com pétalas e estames brancos. O fruto é subgloboso a obovoide, de coloração amarela (coloração da forma típica) ou vermelha com polpa suculenta, de sabor doce-ácido muito agradável (Pommer e Murakami, 2014).

O *P. guineense* (araçá) é uma frutífera arbórea, com ramos cilíndricos a ligeiramente achatados, pilosos. As folhas são simples e opostas, com flores axilares, isoladas ou em grupos de três, de pétalas e estames brancos. O fruto é globoso, podendo ser também elipsoidal ou piriforme, amarelo, coroadado com os remanescentes das sépalas (Pommer e Murakami, 2014).

3.2 Importância nutricional e econômica de *Psidium guajava*

A goiabeira é apreciada pelo sabor, aroma e valor nutritivo de seus frutos que são ricos em açúcares, sais minerais, vitamina C, licopeno, betacaroteno, fibras além de suas potencialidades como fontes de fitoquímicos (Cosser et al., 2012).

As substâncias ativas presentes nos frutos de goiaba são capazes de atuar na prevenção de várias doenças. Dentre as propriedades biológicas dessas substâncias, destacam-se sua ação antioxidante, antiplaquetária, anti-inflamatória, hipertensiva e hipoglicemiante (Gutiérrez et al., 2008). Além disso, as diferentes partes da planta (frutos, folhas, raízes e cascas) são amplamente utilizadas na medicina tradicional para tratamentos de diarreia, gastroenterite, disenteria, dores de estômago e indigestão (Birdi et al., 2010).

A goiaba para fins comerciais apresenta-se como uma frutífera de alta rentabilidade e versatilidade no mercado consumidor, utilizada tanto para consumo *in natura* quanto para industrialização na forma de doces, compotas, geleias, sucos e cremes (Silva et al., 2010).

São cultivadas no Brasil as variedades Ogawa, Pedro Sato, Kumagai, Sassaoka, Rica, Século XXI e Paluma, que apresenta maior aceitação no mercado e seu cultivo se estende por todo o território (Pereira e Kavati, 2011).

A produção de goiaba no país foi de 414.960 t, com um rendimento médio de produção de 24.240 kg/ha, com destaque de produtividade para os estados de Pernambuco (32.178 kg/ha), São Paulo (30.522 kg/ha), Rio de Janeiro (25.467 kg/ha) e Minas Gerais (18.849 kg/ha) no ano de 2015, segundo IBGE (2016).

3.3 Declínio da goiabeira

Muitos são os prejuízos causados à cultura pelo declínio da goiabeira, uma doença complexa cuja manifestação é dada pelo efeito sinérgico entre o fungo *F. solani* e o nematoide *M. enterolobii*, na qual o fungo aproveita-se das necroses iniciadas pelo nematoide, causando a podridão das raízes e levando à morte as plantas infectadas (Gomes et al., 2011).

O *M. enterolobii* pertence à família Meloidogynidae, do gênero *Meloidogyne*, e tem sido detectado em diferentes regiões do mundo, em diferentes hospedeiros, inclusive em espécies portadoras de genes de resistência a *Meloidogyne* spp. (Carneiro et al., 2007).

Desde o primeiro registro da presença de *M. enterolobii*, em 2001, em áreas de goiabeira no Vale do São Francisco, nos estados da Bahia e de Pernambuco, a ocorrência desse nematoide tem sido relatado também em outros estados: Rio Grande do Norte (Torres et al., 2004), Ceará (Torres et al., 2005), Rio de Janeiro (Souza et al., 2006), São Paulo (Almeida et al., 2006), Piauí (Silva et al., 2006), Paraná (Carneiro et al., 2006), Rio Grande do Sul (Gomes et al., 2008a), Minas Gerais (Silva e Oliveira, 2010) e Paraíba (Lopes et al., 2010).

Na literatura, não há relatos da identificação quanto às fontes de resistência genética a *M. enterolobii*, em *P. guajava* (Almeida et al., 2009, Castro et al. 2012), entretanto, essa resistência foi encontrada em araçazeiros da espécie *P. cattleianum* (Carneiro et al., 2007, Almeida et al., 2006, Miranda et al., 2011) e *P.*

guineense (Costa et al., 2012). Mas, quando usadas como portas-enxerto da goiabeira apresentam limitada ou completa incompatibilidade (Carneiro et al., 2007, Almeida, 2008, Castro et al., 2012, Robaína et al., 2012).

Acredita-se que as melhores perspectivas para controle do nematoide estão no melhoramento vegetal, visando introgressão de genes de resistência em cultivares e porta-enxertos (Carneiro et al., 2007, Almeida et al., 2011, Miranda et al., 2011, Almeida et al., 2012, Robaína et al., 2015).

3.4 Melhoramento genético visando à resistência ao *M. enterolobii*

A goiabeira é uma cultura afetada por várias doenças, algumas das quais causam grande impacto econômico, como o declínio da goiabeira, uma doença complexa, que aumenta a sensibilidade da planta a estresses ambientais e promove a podridão progressiva das raízes de goiabeiras parasitadas (Gomes et al., 2011).

Para o controle do declínio da goiabeira, pesquisadores se empenham na busca de soluções efetivas. Até o momento, não tem sido reportado estudo eficaz com uso de porta-enxerto de araçazeiros, controle químico e biológico para o controle de *M. enterolobii*. As melhores expectativas para o manejo de *M. enterolobii* em pomares de goiabeira está no desenvolvimento de novas cultivares, por meio de cruzamentos interespecíficos entre espécies de *Psidium* silvestres resistentes ao nematoide e goiabeiras (Gomes et al., 2010, Costa et al., 2016).

Costa et al. (2012) desenvolveram híbrido resistente ao nematoide *M. enterolobii*, obtidos a partir de cruzamento entre *P. guajava* e *P. guineense*. Os autores relatam que a goiabeira 'Paluma' ao ser enxertada no híbrido apresentou alta compatibilidade entre o enxerto e o porta-enxerto. Costa et al. (2016) realizaram um estudo de herança nesses híbridos resistentes, os resultados de segregação indicam herança dominante controlado por dois genes, com efeitos epistáticos.

O grupo de melhoramento genético da goiaba da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro iniciou as pesquisas com trabalhos de Pessanha et al. (2011), que avaliaram a diversidade genética de 20 acessos de plantas nativas de *Psidium spp* (araçá e goiaba) para direcionar os cruzamentos. Os acessos selecionados de goiaba foram utilizados como genitores em cruzamentos

biparentais que deram origem às famílias (populações segregantes) que compõem a população inicial do programa. Posteriormente, Campos et al. (2013) e Campos et al. (2016) avaliaram a diversidade genética de 138 genótipos da geração H₁ de cruzamentos controlados biparentais, obtidos por Pessanha et al. (2011), via Ward-MLM e a formação de grupos heteróticos, via rede Neurais. Quintal (2013), por sua vez, identificou nesta mesma população, nove famílias na 1ª época e quatro na 2ª época, selecionando as melhores famílias e os melhores indivíduos por modelos mistos REML/BLUP. Oliveira et al. (2014) estimaram a distância genética entre acessos de goiabeiras e araçazeiros do banco de germoplasma da UENF, via marcadores ISSR, observando que alguns genótipos de araçazeiros são promissores para futuros cruzamentos.

Gomes et al. (2016) realizaram cruzamentos interespecíficos entre goiaba (*P. guajava*) e araçá (*P. cattleianum* e *P. guineense*), todos eles tendo o *P. cattleianum* como doador de genes de resistência. Os híbridos obtidos foram avaliados quanto à resistência ao *M. enterolobii*, resultando em populações suscetíveis, resistentes e imunes com posterior descarte das plantas suscetíveis e avaliação morfológica e estudo de diversidade das populações resistentes. Os autores realizaram, ainda, um estudo de herança nos híbridos interespecíficos obtidos, verificando pelo teste de qui-quadrado que a herança é poligênica e selecionaram os melhores pelo REML/BLUP com os menores valores para o fator de reprodução, sugerindo que esses genótipos sejam usados para retrocruzamento com o parental recorrente *P. guajava*, na sequência do programa de melhoramento.

3.5 Aplicação de marcadores microssatélites na goiabeira

A utilização de técnicas de marcadores moleculares pode trazer benefícios importantes para o estudo das espécies na família por suas potencialidades de aplicações em estudos de diversidade genética, filogenia, mapeamento genético, seleção assistida por marcadores moleculares, conservação e taxonomia (Kalia et al., 2011).

Microssatélites ou '*simple sequence repeats*' (SSR) são sequências repetidas em série de 2-5 nucleotídeos, que apresentam alto polimorfismo e podem ser amplificados por reações em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Herrero et al., 2010). Quanto à localização, são provenientes de regiões genômicas ou gênicas

(EST-*Expressed Sequence Tags*) do genoma nuclear, mitocondrial e cloroplastidial (Kalia et al., 2011).

São considerados ideais para a análise genética em plantas devido à sua abundância ao longo do genoma, por serem codominantes, detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Reddy et al., 2001, Ramu et al., 2013), bem como polimórficos. Desse modo, acredita-se que os microssatélites sejam um dos mais importantes marcadores para estudos de diversidade, pois podem acuradamente acessar o nível de diversidade genética dentro do germoplasma de qualquer cultivo (Ismail et al., 2016).

Risterucci et al. (2005) foram os primeiros a desenvolver uma coleção de 23 pares de *primers* microssatélites para *P. guajava*, que além de polimórficos demonstram transferibilidade para outras espécies de *Psidium*. Valdes-Infante et al. (2007) aplicaram esses *primers* para caracterização de germoplasma cubano. Hoje estão disponíveis mais 192 *primers* para a goiabeira (Guavamap, 2008). Oliveira et al. (2009) reportaram trabalho preliminar de caracterização de 53 acessos brasileiros de goiabeira sem, contudo, analisarem araçazeiros de diferentes espécies para orientar trabalhos de cruzamentos interespecíficos. Costa et al. (2012) em estudo de quatro espécies de *Psidium*, compreendendo 61 acessos, reportaram similaridade entre *P.guajava* e *P.guineense* de 82,4%, por meio de marcadores SSR. Kidaha et al. (2014) caracterizaram 58 cultivares de goiabeira no Quênia, por meio de marcadores SSR e ISSR e observaram a formação de três grupos ao utilizarem o marcador SSR e quatro grupos formados pelo marcador ISSR. Nogueira et al. (2015) estudaram a transferibilidade de microssatélites de *Psidium guajava* para espécies de *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia* e *Syzygium* (Myrtaceae).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material genético

Foram avaliados 94 indivíduos (Figura 1), oriundos de cinco populações segregantes de *Psidium* resistentes ao nematoide *M. enterolobii*, e seus respectivos genitores (Tabela 1). As populações foram obtidas por meio de hibridação interespecífica de *P. cattleianum* (genótipo resistente), *P. guajava* e *P. guineensi* (genótipos suscetíveis) e avaliadas para resistência ao *M. enterolobii* (Gomes et al., 2016).



Figura 1. A: Populações segregantes de *Psidium* resistentes ao nematoide *M. enterolobii*, B: Genótipo oriundo do cruzamento: 1 *P. cattleianum* (Ara CV1) x *P. guineensi* (Ara CV11), 2 *P. guineensi* (P36) x *P. cattleianum* (Ara P11), 3 *P. cattleianum* (Ara CV8) x *P. guineensi* (Ara CV11), 4 *P. guajava* (Guava 13.4 II) x *P. cattleianum* (Ara P33), 5 *P. guajava* (Guava 13.4 II) x *P. cattleianum* (Ara P53).

Tabela 1. Genótipos de *P. guineense*, *P. cattleianum* e *P. guajava*, utilizados nos cruzamentos interespecíficos para a obtenção das populações segregantes de *Psidium spp* e número de plantas híbridas resistentes, avaliadas em cada população com os parentais.

Populações	Genitores	Número de plantas	Código dos genótipos híbridos
1	<i>P. guineensi</i> (P36) ¹ x <i>P. cattleianum</i> (Ara P11) ²	20	3-20
2	<i>P. guajava</i> (Guava 13.4 II) ¹ x <i>P. cattleianum</i> (Ara P33) ²	16	23-36
3	<i>P. cattleianum</i> (Ara CV8) ² x <i>P. guineensi</i> (Ara CV11) ¹	21	39-57
4	<i>P. cattleianum</i> (Ara CV1) ² x <i>P. guineensi</i> (Ara CV11) ¹	20	60-77
5	<i>P. guajava</i> (Guava 13.4 II) ¹ x <i>P. cattleianum</i> (Ara P53) ²	17	80-94
Total de genótipos		94	

1 = Genótipos suscetíveis ao *M. enterolobii* (Miranda et al. 2012), 2 = Genótipos resistentes ao *M. enterolobii* (Miranda et al. 2012)

4.2 Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico total foi efetuada a partir de folhas jovens coletadas individualmente de cada planta híbrida e os parentais, utilizando o método CTAB padrão com modificações (Doyle e Doyle, 1990).

Em seguida, o DNA foi quantificado por análise em gel de agarose a 1 % com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0), utilizando o marcador Lambda (λ) de 100 pb ($100 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$) (Invitrogen, USA), por meio de comparação das bandas. Para esse procedimento, as amostras foram coradas utilizando a mistura de Gel RedTM e *Blue Juice* (1:1) e a imagem capturada pelo sistema de fotodocumentação Mini Bis Pro (*Bio-Imaging Systems*). Posteriormente, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de trabalho de $10 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$.

4.3 Triagem dos *Primers*

O DNA dos genótipos parentais foi utilizado inicialmente para realizar uma triagem de 100 iniciadores microssatélites, desenvolvidos para *P. guajava* (Risterucci et al., 2005 e GuavaMap, 2008), com a finalidade de identificar *locos* SSR capazes de diferenciar os genitores. Após rastreio, um conjunto de 33

iniciadores polimórficos foram selecionados para as reações de ampliação (Tabela 2).

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores da *Applied Biosystems/Veriti 96 well*, em um programa de 35 ciclos, obedecendo às seguintes temperaturas e tempo: 94 °C durante quatro minutos (desnaturação inicial), 94 °C por dois minutos (desnaturação cíclica), temperatura específica de cada iniciador, em °C, por um minuto (anelamento), 72 °C por dois minutos (extensão cíclica), 72 °C por 10 minutos (extensão final), e 4°C *forever*. O volume final foi de 13 µL de cada amostra, sendo: 2µL de DNA (10 ng/µL), 1.50 µL de Tampão 10X (NH₄SO₄), 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1.5 µL de dNTPs (2 mM), 1 µL de iniciador (R+F) (5 µM) e 0.12 µL de Taq-DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Os produtos da PCR foram diluídos numa relação de 4µl de amostra para 20 µl de Buffer E do kit DNF 900 e dis e submetidos a um sistema de eletroforese capilar (*Fragment Analyzer - AATI*), no qual, fragmentos amplificados de 35 a 500pb são separados com uma resolução de aproximadamente 2bp. Cada corrida teve duração de 2h e 20min sob uma voltagem de 8 kw.

4.5 Análise estatística

4.5.1 Estimação da diversidade genética dos marcadores SSR

Os dados obtidos a partir da amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código numérico para cada alelo por *loco*. Tal matriz numérica foi desenvolvida atribuindo-se valores de 1 até o número máximo de alelos no *loco*, como descrito a seguir: para um *loco* que apresenta três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 para as formas homozigotas (A1A1, A2A2 e A3A3) e 12, 13 e 23 para as heterozigotas (A1A2, A1A3 e A2A3). A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre as populações com base na distância genética de Nei (Peakall and Smouse, 2009). A análise de agrupamento via dendrograma foi feita por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*), com auxílio do programa Mega versão 6 (Kumar et al., 2009), e a

dispersão gráfica entre as populações foi realizada com base na análise das coordenadas principais (PCA), utilizando o programa Genalex 6.3 (Peakall and Smouse, 2009). O número ótimo de marcadores foi estimado com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2013).

A partir das variáveis moleculares estimou-se a diversidade genética entre as populações de *Psidium* spp com o auxílio do programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2009). Foram estimados os seguintes parâmetros: o número de alelos por *loco* (NA), conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de identidade (PI), heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_e), índice de fixação (f).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) pode ser estimado através da seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1(i \neq j)}^a p_i^2 p_j^2$$

Onde:

- $1 - \sum p_i^2$: a informatividade do *primer*.
- $\sum \sum p_i^2 p_j^2$: frequência do alelo p no *primer* j .

A H_o é a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma população estudada

$$H_o = \frac{\sum_{j=1, j \neq 1}^a n_{ij}}{n}$$

Onde:

- n_{ij} : equivale ao número de heterozigotos em cada *loco*.
- n : total de indivíduos pesquisados.

A H_e pode ser definida como uma fração estimada de todos os indivíduos que poderiam ser heterozigóticos de um *loco*, sendo estimada através da fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Onde:

x_i = frequência de alelo i

k = número de alelos

O Índice de fixação (F), que se estima o coeficiente médio de endogamia pode ser estimada por meio de:

$$F = 1 - \frac{H_e}{H_o}$$

Onde:

- H_o : frequência de heterozigotos numa população supostamente em equilíbrio de Hardy - Weinberg.

- H_e : frequência de heterozigotos numa população sujeita a acasalamento entre aparentados.

4.5.2 Análise da estrutura e agrupamento entre as populações de *Psidium spp*

Com base nas informações obtidas dos iniciadores polimórficos, foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA), para avaliar as diferenças entre e dentro das populações com o auxílio do programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2009).

As populações também foram avaliadas quanto à estruturação genética, através do método baseado em algoritmos de agrupamentos bayesianos, com o uso do *software STRUCTURE* versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para tanto, empregou-se o modelo “*no admixture model*” e frequências alélicas independentes, usando-se um “*Burnin Period*” de 10.000, seguido de uma extensão (*Markov Chain Monte Carlo*) de 50.000 repetições. Foram efetuadas 10 simulações, com k variando de 1 a 10.

O teste estatístico Δk foi realizado usando o aplicativo “*Structure Harvester*” (disponível “online” em http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/) baseado no critério de Evanno et al. (2005). Este critério baseia-se na média e no desvio padrão do $\ln P(D)$ estimado em cada uma das 10 interações por k . Os valores de Δk_i foram estimados através da fórmula: $\Delta k_i = \text{ABS} (k_{i+1} - (2 * k_i) + k_{i-1}) / \text{desvio padrão de } K_i$.

Onde:

i : corresponde ao número de grupos simulados, indo de $i = 1$ até $i = 10$.

ABS = corresponde ao módulo

Esse valor de Δk é estimado para cada k , sendo selecionado o que apresentar maior valor. Após escolhido o Δk ótimo, escolhe-se a simulação de menor valor de $\text{LnP}(D)$, dentre as 10 simulações feitas para a obtenção do mesmo. Cada cor do gráfico gerado representa um possível grupo de indivíduos estruturados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de diversidade genética entre as populações segregantes de *Psidium*, dos 100 iniciadores testados, 70 produziram fragmentos de DNA amplificados, dos quais foram selecionados 33 *loci* que apresentaram polimorfismo (Tabela 2).

Esses 33 iniciadores revelaram 89 alelos, o número de alelos por loco variou de 2-4 alelos, com uma média de 2,70 alelos considerando todo o conjunto de dados (Tabela 2). Esse resultado seria esperado se fosse considerado que as duas espécies envolvidas nos cruzamentos fossem diploides e heterozigotas para alelos diferentes. No entanto, em virtude da conhecida poliploidia do araçá *P. cattleianum* poderia ter sido encontrado mais de quatro alelos por *loco*, o que não ocorreu no presente estudo. Risterucci et al. (2005) reportaram que dos 23 SSR's analisados para *P. guajava* foram encontrados de dois a sete alelos. Aranguren et al. (2010) avaliaram 31 acessos de goiabas nativas venezuelanas e detectaram um total de 111 alelos, e 3 a 11 alelos por *locos* em 16 SSR analisados. Tuler et al. (2015) verificaram um a seis alelos por *loco* em 31 marcadores SSR, utilizados para identificação de 13 espécies indígenas de *Psidium* da Mata Atlântica. O maior número de alelos encontrados nesses estudos é devido aos genótipos, estudados pelos autores, serem oriundos de bancos de germoplasma de goiaba e araçá.

Desses 33 *loci* analisados, 15 já seriam suficientes para realizar as análises desse trabalho (Figura 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira

et al., (2009), que afirmaram que dez *primers* seriam suficientes para o estudo da diversidade.

Tabela 2. Sequência dos 33 pares de iniciadores microsatélites utilizados na análise dos 94 genótipos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp*

Locus	Sequência (5' 3')	TA	NA	Referência
mPgCIR027	F: AGCACTTAGGGACAAATTCA R: CTCACTCTCCTCCATTCAAG	54°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR02	F: AGTGAACGACTGAAGACC R: ATTACACATTCAGCCACTT	52°C	2	Risterucci et al. 2005
mPgCIR029	F: CTCGCTTCAATCTCCATCTA R: AGCGACACAGACTCTTCATT	54°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR038	F: AGCCTGTTTTACGCCTTC R: CGGCTGCTCTATTGTTATTT	53°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR040	F: TGAATCTCCAGTGTCTTATCG R: TGATTTCAACTGCGTATGTC	53°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR042	F: CTCACCCAAATCTACACAAG R: AAGGGACTGGACGATGTT	52°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR18	F: TAAGCTGCATGTGTGC R: ATGGCTTTGGATGAAA	52°C	3	Risterucci et al. 2005
mPgCIR22	F: CATAAGGACATTTGAGGAA R: AATAAGAAAGCGAGCAGA	56°C	4	Risterucci et al. 2005
mPgCIR94	F: CAACCTTCCCGTGATTATT R: CTAGCTTCTTCAGTGGGAAC	53°C	4	GuavaMap 2008
mPgCIR99	F: TCAAAGTCCAAAACCTCATGC R: GGGATGGAGTAAAGATGAAA	50°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR102	F: AATTGGTGTAGCATCTGGA R: GCCTACCATGAACAGAGAAA	53°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR108	F: AGGACCTCACAGAAGTTCAC R: CGCTGTTACACTGTCGTT	56°C	4	GuavaMap 2008
mPgCIR131	F: GAGGTTGAGAGTTCAAGGT R: GGTTTGCTCTTGAAATCACTC	53°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR148	F: CATAACAGAGTCGGATGGTTT R: GCTGCTGGTCTTAAAGCTAA	52°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR157	F: AACCACCAACCATAACACC R: CGACCAACCCTACATTCTG	50°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR159	F: GGTTAAGAGGCTTCAGTTCA R: CAGCAAGGACAGGTTAAGAG	52°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR166	F: CTTTCCATCAAACGTAAG R: CCAATTCATGCACTTAGACA	50°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR172	F: CACCCTTAACTTCTGCTTTG R: GTCTCTATTTCCCTCCGTTC	52°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR173	F: CGTGTTCTTTACATCCGTCT R: TACCAGCAACACCAATGC	52°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR178	F: TACAGCATTCTATCCCCTA R: TCACGATGACAAGATAAAGC	53°C	4	GuavaMap 2008
mPgCIR180	F: CATGGATTCAACTCTTGTCG R: CTACATTGGAAGCAGAATGG	53°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR184	F: AAGCTACAATCGACGAAAAC R: CACTATTAGCGAACCTGCAT	54°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR187	F: AACGCCTAATAATGCGGAAGT R: TCTTTCCCAGGATGGAGTA	52°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR188	F: TACAGCGATTCTATCCCCTA R: TTGTGGGGAAGAACTACTG	51°C	3	GuavaMap 2008

Tabela 3. Cont.

Locus	Sequência (5' 3')	TA	NA	Referência
mPgCIR191	F: GACCCTCCACTTATATTTTG R: AAGCTGACATAACAGTCGAA	53°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR193	F: GAACGTGGGTACATACCAT R: ATCACCGTCCTCCTAAATCT	52°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR197	F: CACCCAACCTCTATACCCAAC R: GTAGCTACCAAGCTGAAAC	53°C	4	GuavaMap 2008
mPgCIR204	F: GTCGGATCATGGAGAGATCA R: GCGGCTAAAGAAATCTGG	53°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR207	F: CAAGATTTGCCTCAAGAAAC R: AACTAAATAGCCTGCTGGTG	53°C	2	GuavaMap 2008
mPgCIR210	F: CTACGAGGGTGTAAACGAAAA R: CTACAACAGCCAACGTGAG	53°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR227	F: GGGATGCTCAAACTGTAAG R: CCTGTTACATTGACGAATCA	53°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR230	F: CACATTTGCTCCTGATTTTC R: GCTCTTCAACGACCATCTT	53°C	3	GuavaMap 2008
mPgCIR249	F: TTTGTCTGGTCGTCTAGTT R: CTTCAGTCCATCAGCAAAT	52°C	3	GuavaMap 2008

TA= temperatura de anelamento, NA= número de alelos por loco

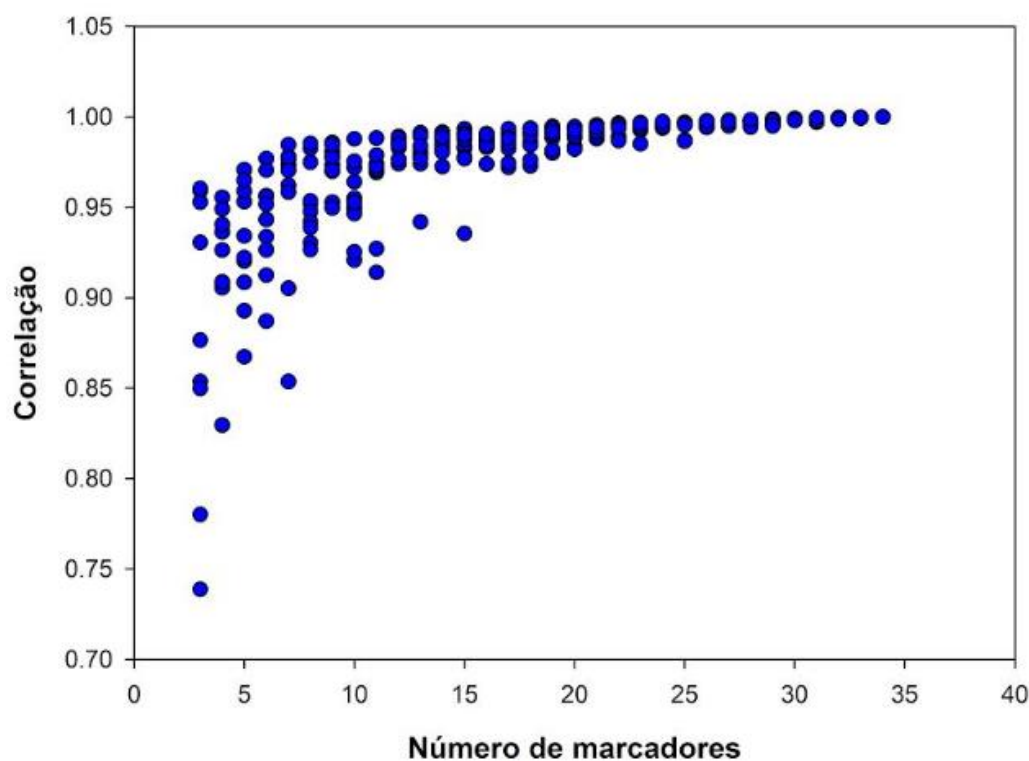


Figura 2. Número ótimo de marcadores microssatélites analisados em 94 indivíduos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.*

Por meio do ranqueamento dos valores obtidos de PI (probabilidade de identidade), foi possível destacar os *loci* mais informativos, ou seja, aqueles que mais contribuíram para a diferenciação das populações. (Tabela 3). Santana et al. (2012) também analisaram o PI em seu trabalho conduzido em videiras, no entanto, eles relacionaram esse parâmetro ao valor de PIC e os valores encontrados variaram de 0,012 a 0,043, inferiores aos obtidos nesse trabalho.

Tabela 4. Probabilidade de identidade (PI), estimada para 33 *locus* analisados em 94 indivíduos oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.*

Locus	Probabilidade de identidade (PI)
mPgCIR027	0.602716873
mPgCIR02	0.618206600
mPgCIR029	0.596622579
mPgCIR038	0.695545945
mPgCIR040	0.673962294
mPgCIR042	0.616323227
mPgCIR18	0.579355142
mPgCIR22	0.447075859
mPgCIR94	0.466190125
mPgCIR99	0.601036804
mPgCIR102	0.484105523
mPgCIR108	0.560845960
mPgCIR131	0.594075284
mPgCIR148	0.485258277
mPgCIR157	0.584962079
mPgCIR159	0.581018923
mPgCIR166	0.625022864
mPgCIR172	0.631224581
mPgCIR173	0.668312815
mPgCIR178	0.497084892
mPgCIR180	0.578758663
mPgCIR184	0.615940082
mPgCIR187	0.478766598
mPgCIR188	0.687178606
mPgCIR191	0.596684862
mPgCIR193	0.596622579
mPgCIR197	0.450520043
mPgCIR204	0.830680701
mPgCIR230	0.479801670
mPgCIR249	0.514957842
mPgCIR207	0.685762965
mPgCIR210	0.475428004
mPgCIR227	0.503708104

Em negrito os locus que mais contribuíram para a diferenciação das populações

Na busca pela quantificação da diversidade genética entre populações, muitas medidas descritivas vêm sendo utilizadas, possibilitando inferir sobre a estrutura da população, além da capacidade informativa e discriminatória das diversas classes de marcadores moleculares, no processo de identificação genotípica e análise da diversidade (Tuler et al., 2015, Pena et al., 2016). Para tanto, a maioria dos estudos tem utilizado parâmetros de diversidade como a heterozigosidade observada e esperada e o PIC.

Nesse estudo, o número médio de alelos nas populações variou de 1.606 (população 4) a 2.091 (população 2), com média de 1,867. Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0.213 (população 4) a 0.422 (população 1), com média de 0,289 e a heterozigosidade esperada variou com valores de 0,143 (população 4) a 0,269 (população 2, com média de 0,217. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,112 (população 4) a 0,227 (população 1), com média de 0,174. O índice de fixação variou de -0,030 (população 4) a 0,272 (população 2), com média de 0,018 (Tabela 3).

De acordo com Xie et al. (2010), o polimorfismo dos *locos* pode ser considerado alto ($>0,5$), médio (entre 0,5 e 0,25) ou baixo ($<0,25$). Dessa forma, para os *loci* analisados no presente trabalho, o PIC observado variou entre baixo e médio. Segundo Cruz et al. (2011), quanto maior o número de alelos, mais o valor de PIC se aproximará da heterozigosidade esperada. No presente estudo, as médias do PIC (0,174) e de H_e (0,217) não ficaram tão próximas.

As médias para H_o (0.288) e H_e (0.216) foram próximas, porém a heterozigosidade observada foi maior que a esperada, indicando um elevado número de indivíduos heterozigotos, possivelmente em virtude dos cruzamentos interespecíficos. A heterozigosidade média observada por Risterucci et al. (2005) foi de 0,424, semelhante ao encontrado na população 1. Os autores Valdés-Infante et al. (2007), na investigação de divergência genética em 34 genótipos de *P. Guajava* de diferentes origens (Cuba, Florida e Indonésia), também encontraram valor médio semelhante (0,378) para esse parâmetro. Os valores mais baixos encontrados para a população 4 (0,213) indicam que há menos heterozigotos para os *loci* microssatélites avaliados. Os valores negativos do índice de fixação (f) indicam alta heterozigosidade, evidenciando que na população 1 há uma maior diversidade genética que as demais, o que pode ser confirmado pelos maiores valores de PIC e H_o .

Tabela 5. Número de indivíduos (N), número médio de alelos (Na), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de fixação (f), e conteúdo de informação polimórfica (PIC), estimados para as cinco populações obtidas de cruzamentos

Populações	N	Na	Ho	He	f	PIC
1- <i>P. guineensi</i> x <i>P. cattleianum</i>	20	1.939	0.422	0.264	-0.209	0.227
2- <i>P. guajava</i> x <i>P. cattleianum</i>	16	2.091	0.276	0.269	0.272	0.209
3- <i>P. cattleianum</i> x <i>P. guineensi</i>	21	1.667	0.220	0.145	-0.056	0.117
4- <i>P. cattleianum</i> x <i>P. guineensi</i>	20	1.606	0.213	0.143	-0.030	0.112
5- <i>P. guajava</i> x <i>P. cattleianum</i>	17	2.030	0.312	0.263	0.087	0.205
Média total	-	1.867	0.289	0.217	0.018	0,174

A abordagem bayesiana indicou que as populações de *Psidium* foram agrupadas em três grupos genéticos. De acordo com o critério de Evanno et al. (2005), o ΔK ótimo foi obtido quando $K=3$, sugerindo que a estruturação máxima foi observada quando a amostra foi dividida em 3 grupos, sendo estes bem estruturados (Figura 3). As populações 3 e 4 que compartilharam do mesmo genitor feminino *P. cattleianum* formaram um único grupo, assim como as populações 2 e 5 que compartilharam do mesmo genitor feminino *P. guajava*. Essas últimas foram as mais distantes das populações 1, 3 e 4, oriundas de cruzamentos entre araçá x araçá. Normalmente espera-se que uma população oriunda de cruzamento interespecífico tenha maior polimorfismo, no entanto, se os genitores compartilham a maioria das regiões genômicas analisadas, isso não ocorre. Os *loci* analisados nesse estudo podem estar em regiões bem conservadas do genoma dos parentais, com pequena taxa de mutação, (Tuler et al., 2015, Paiva et al., 2014). Além disso, as características em comum entre os acessos alocados em um grupo não são, de fato, o motivo pelo qual eles foram agrupados, pois os marcadores utilizados não são específicos para determinadas características.

Essa abordagem tem sido utilizada em fruteiras para analisar a estruturação genética de 26 variedades de *Vitis* (Santana et al., 2012), para caracterização genético-molecular de genótipos de mamão, obtidos de 3 gerações de retrocruzamento (Ramos et al., 2014) e para verificar as relações genéticas entre acessos de coco coletados no Brasil, em diferentes regiões geográficas do mundo (Loiola et al., 2016). Este é o primeiro estudo que utiliza abordagem bayesiana para caracterizar populações de *Psidium*.

O agrupamento bayesiano está de acordo com o número de grupos observados no dendrograma com base na distância de Nei (Figura 3) e pela análise de coordenadas principais (PCA) (Figura 4). As duas primeiras coordenadas explicaram 99.98% da variação total (PC1: 91.25 %, PC2: 8.72 %) e a maior distância genética foi observada entre as populações 1 e 2 (Figura 4). Segundo Arriel et al. (2006), estudos envolvendo mais de um método de agrupamento, devido às diferenças na hierarquia, otimização e ordenação de grupos permitem a classificação ser complementada pelo critério que cada técnica utiliza, bem como prevenir erros e inferências de serem adotadas na alocação de materiais dentro de um subgrupo particular de genótipos.

Costa e Santos (2013), ao analisar a diversidade genética de *Psidium* baseada em marcadores microssatélites, relataram a formação de cinco grupos com um grande grupo de acessos de goiaba e três grupos formados por *P. guineense*, outro com *P. cattleianum* e outro contendo apenas *P. friedrichsthalianum*.

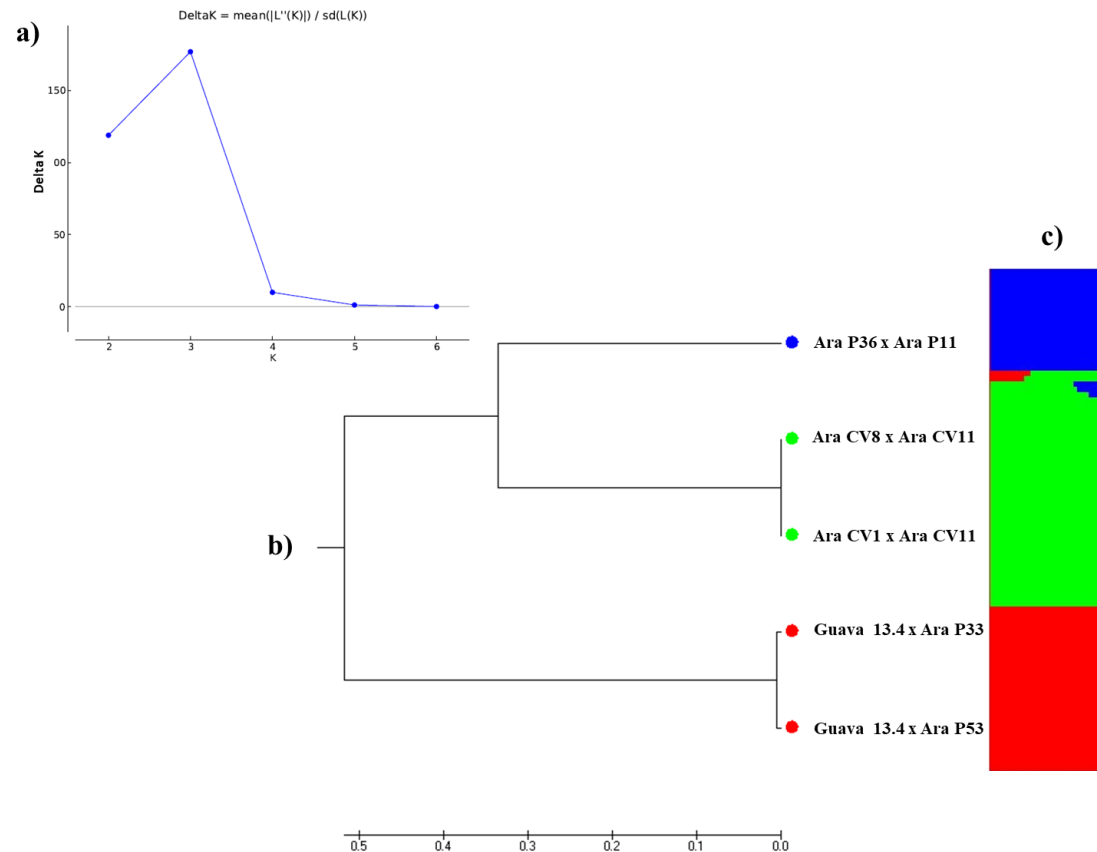


Figura 3. a) Valores de delta K (ΔK) para os respectivos números de grupos (K) em cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.*, b) Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base na distância genética de Nei para as cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.*, c) Agrupamento pela inferência bayesiana em cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.* com $k=3$ grupos.

Para analisar a distribuição da variabilidade entre e dentro dos grupos, foi realizada a análise molecular de variância (AMOVA), cujo resultado está apresentado na Tabela 5. Como pode ser verificado, 80% da variação total foi observada entre as populações e apenas 20% da variação total foi observada dentro de populações. Isso mostra que as populações são constituídas pelo cruzamento entre espécies diferentes que possuem níveis relativamente elevados de dissimilaridade, contribuindo consideravelmente para o alto valor da variância genética entre as populações.

Assim como neste trabalho, Franzon et al. (2010) avaliaram populações de pitangueiras e verificaram que a maior variação esteve presente entre as populações.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) em populações segregantes de *Psidium spp.* por meio de marcadores microssatélites (SSR)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Varição estimada	Porcentagem de variância molecular
Entre Populações	4	1832.883	458.221	24.120	80%
Dentro de populações	89	531.798	5.975	5.975	20%
Total	93	2364.681		30.095	100%

GL. = grau de liberdade, SQ = soma de quadrados, QM = quadrado médio.

Na análise individual verificou-se nitidamente a formação de três grandes grupos (Figura 5). O dendrograma gerado pelo método UPGMA apresentou um coeficiente de correlação cofenética de 0.96, indicando um ótimo ajuste entre a matriz de dissimilaridade com a representação gráfica dos agrupamentos. Os híbridos oriundos do cruzamento *P. guineensi* x *P. cattleianum* e os seus parentais formaram um grupo destacado em azul que se diferenciou dos demais, já os híbridos que tiveram como genitor feminino a *P. guajava* foram mais próximos geneticamente entre si e ficaram em um mesmo grupo destacado em vermelho. Por sua vez, os híbridos resultantes dos cruzamentos entre *P. cattleianum* x *P. guineensi*, que possuem um genitor em comum, apresentaram maior similaridade entre si e também formaram um único grupo destacado em verde (Figura 5). Contudo, maior destaque deve ser dado ao grupo vermelho que reúne os parentais e híbridos do cruzamento *P. guajava* x *P. cattleianum*, em que os genótipos

geneticamente mais próximos a *P. guajava* poderão ser utilizados como genitores em futuros cruzamentos com a goiabeira (Figura 5).

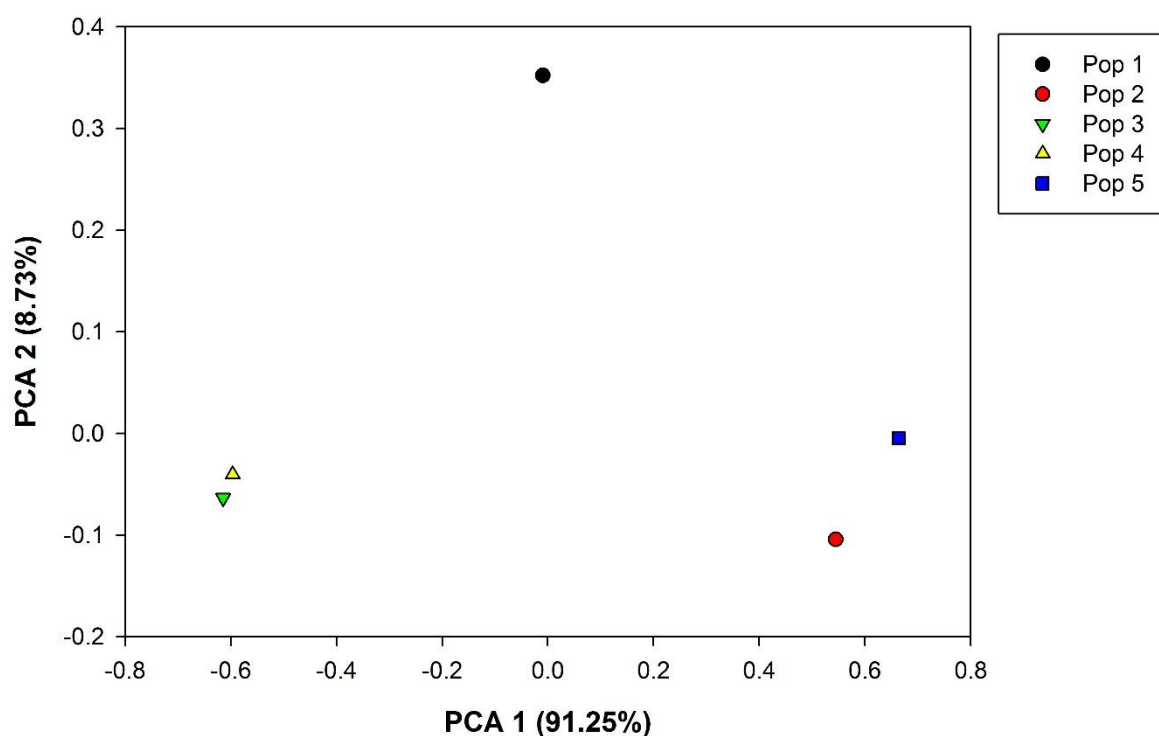


Figura 4. Dispersão gráfica pela análise de Coordenadas Principais com base na distância genética de Nei para as cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.*

Embora formados exclusivamente a partir dos perfis moleculares, os três grupos apresentaram algumas características peculiares em relação à resistência ao *M. enterolobii*. Considerando todas as populações avaliadas, o cruzamento *P. cattleianum* (CV1) x *P. guineensi* (CV11) foi o que apresentou os menores valores para o fator de reprodução, sendo, portanto, a população com maior nível de resistência, e o cruzamento *P. guajava* (13.4 II) x *P. cattleianum* (P51) os valores mais elevados (Gomes et al., 2016). No entanto, no que diz respeito aos cruzamentos entre goiaba x araçá, a população *P. guajava* (13.4 II) x *P. cattleianum* (P33) foi a que apresentou a menor amplitude para fator de reprodução (0 a 3.60) (Gomes et al., 2016). Assim, genótipos como o 80, 82 e 84 com fator de reprodução = 0 podem ser selecionados para serem utilizados como genitores em futuros cruzamentos com a goiaba.

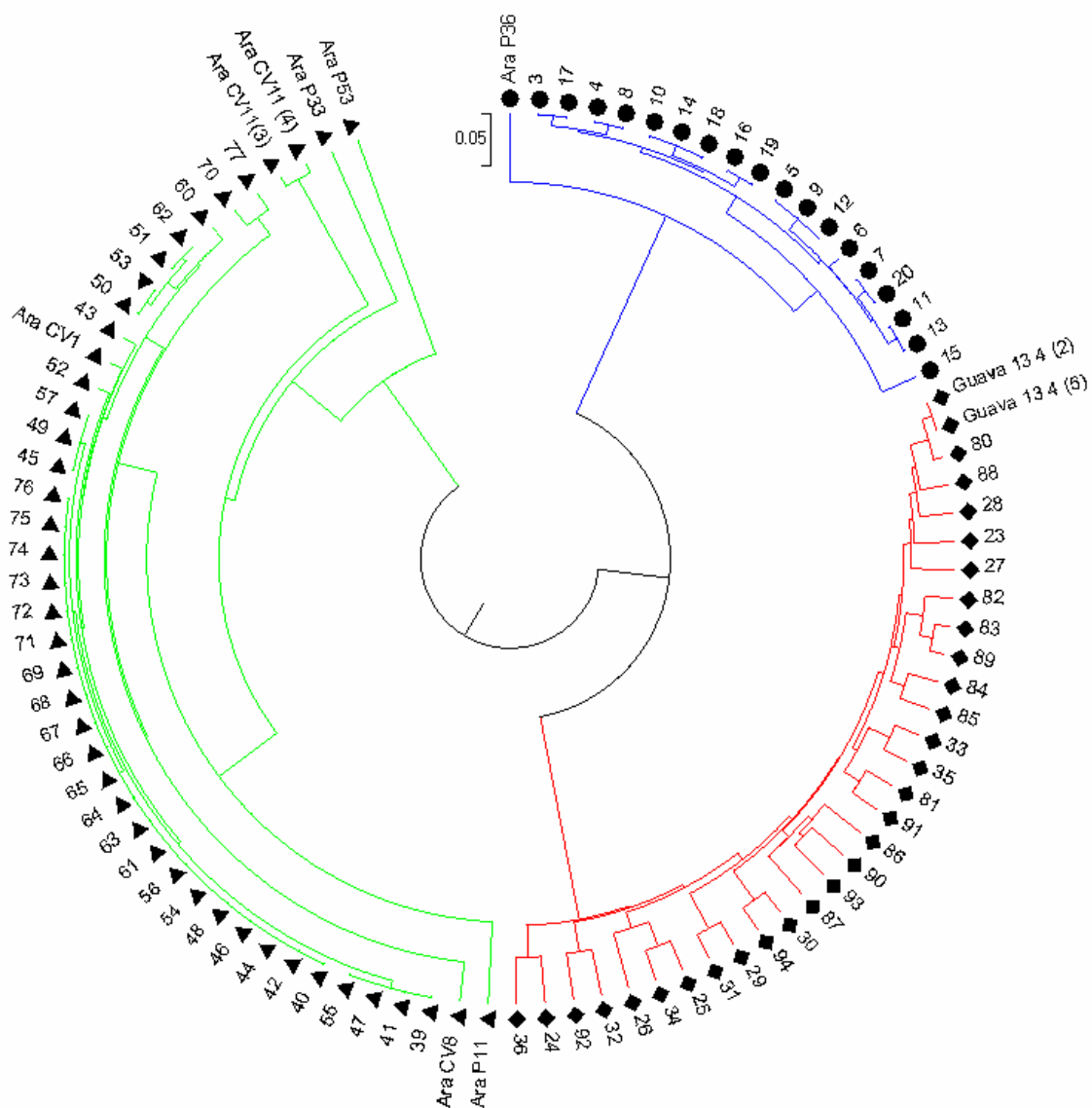


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base na distância estabelecida pelo Índice Ponderado para 94 indivíduos, oriundos de cinco populações obtidas de cruzamentos interespecíficos de *Psidium spp.* Grupo azul: formado pelo genitor Ara P36 e pelos híbridos de *P. guineensi* (P36) x *P. cattleianum* (P11), grupo vermelho: constituído pelos genitores Guava 13 4 (2), Guava 13 4 (5) e os híbridos de *P. guajava* (13.4 2) x *P. cattleianum* (P33) e *P. guajava* (13.4 5) x *P. cattleianum* (P51) e grupo verde: genitores Ara P11, Ara CV8, Ara CV1, Ara CV11 (3), CV11 (4), Ara P33 e Ara P53 e híbridos de *P. cattleianum* (CV8) x *P. guineensi* (CV11) e *P. cattleianum* (CV1) x *P. guineensi* (CV11). Correlação cofenética = 0.96

6. CONCLUSÕES

Os marcadores SSR foram eficientes na discriminação das populações, o que poderá auxiliar novas etapas do programa de melhoramento genético da goiabeira, visando resistência ao *M. enterolobii*.

Os híbridos 80, 82 e 84, obtidos por meio do cruzamento *P. guajava* x *P. cattleianum* poderão ser utilizados como genitores em futuros cruzamentos com a goiaba para a constituição da geração do primeiro retrocruzamento (RC1). Esses genótipos, pelo fato de estarem mais próximos geneticamente de *P. guajava*, possuem maior número de alelos compartilhados desse genitor, o que certamente favorecerá a recuperação mais rápida do genoma da goiabeira e o lançamento de uma cultivar resistente ao nematoide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A. M., Gomes, V. M., Souza, R. M. (2011) Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. *Bragantia*, 70(4): 837-842.
- Almeida, A. M., Souza, R. M., Gomes, V. M., Miranda, G. B. (2012) Greenhouse and field assessment of different organic compounds against guava-parasitic *Meloidogyne enterolobii*. *Bragantia*, 71(1):67–74.
- Almeida, E. J. de, Santos, J. M. dos, Martins, A. B. G. (2009) Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(4):421–423.
- Almeida, E.J., Soares, P.L.M., Santos, J.M., Martins, A.B.G. (2006) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba (*Psidium guajava*) no estado de São Paulo. *Nematologia Brasileira*, 30 (1):112-113.
- Almeida, O. F (2017) Cruzamentos interespecíficos e resistência ao *Meloidogyne enterolobii* em *Psidium spp.* Tese (Mestre em Genética e melhoramento de plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 78p.
- Alves, J.E., Freitas, B.M. Requerimento de polinização da goiaba. *Ciência Rural*, Santa Maria, 37(5): 1281-1286.
- Arriel, N. H. C.; Di Mauro, A. O.; Di Mauro, S. M. Z.; Bakke, O.A.; Unêda-Trevisoli, S.H.; Costa, M.M.; Capeloto, A.; Corrado, A.R. (2006) Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim, usando marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.41, n.5, p.801-809.

- Birdi, T., Daswani, P., Brijesh, S., Tetali, P., Natu, A., Antia, N. (2010) Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, United Kingdom, 10(1): 1-11.
- Brandão, M., Laca-Buendía, J. P., Macedo, J. F. (2012) *Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte: EPAMIG, 528 p.
- Campos, B.M., Viana, A.P., Quintal, S.S.R., Barbosa, C.D., Daher R. F. (2016) Heterotic group formation in *Psidium guajava* L. by artificial neural network and discriminant analysis. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal - SP, 38(1):151-157.
- Campos, B.M., Viana, A.P., Quintal, S.S.R., Gonçalves, L.S.A., Pessanha, P.G.D.O. (2013) Quantificação da divergência genética entre acessos de goiabeira usando estratégia de Ward-MLM. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal - SP, 35(2): 571-578.
- Carneiro, R. M. D. G., Cirotto, P. A., Quintanilha, A., 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*, Brasília, 32(4): 281-284.
- Carneiro, R. M. D. G., Mônico, A. P. A., Mortiz, M. P., Nakamura, K. C., Scherer, A. (2006) Identificação de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e em plantas invasoras, em solo argiloso, no Estado do Paraná. *Nematologia Brasileira*, 30(3): 293-298.
- Castro, J.M. C., Santos, C. A. F., & Flori, J. E. (2012) Reaction of *Psidium* accessions to the nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Horticulturae*, 959:51–57.
- Corrêa, 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. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33: 859-867.
- Coser, S.M., Ferreira, M.F.S., Ferreira, A., Mitre, L.K., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. (2012) Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. *Scientia Horticulturae*. 223–229.
- Costa, I.R., Dornelas M.C., Forni-Martins, E.R. (2008) Evolution of nuclear DNA amounts in Neotropical Myrtaceae (fleshy-fruited Myrteae). *Plant Systematics and Evolution*, 276: 209-217.
- Costa, S. R., Santos, C. A. F. (2017) Genetic divergence among *Psidium* accessions based on single nucleotide polymorphisms developed for *Eucalyptus*. *Genetics and Molecular Research*, 16(2): 1-9.

- Costa, S. R., Santos, C. A. F., Castro, J. M. C. (2012) Assessing *Psidium guajava* × *P. guineense*. Hybrids Tolerant to *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Horticulturae*, 959, 59–62.
- Costa, S. R., Santos, C. A. F., Castro, J. M. C. (2016) Inheritance of resistance to *Meloidogyne enterolobii* in *Psidium guajava* × *P. guineense* hybrid. *European Journal Plant Pathology*, 148(2): 405-411.
- Costa, S.R., Santos, C.A.F. (2013) Allelic database and divergence among *Psidium* accessions by using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 12: 6802-6812.
- Cruz, C.D, Ferreira, F. M, Pessoni L. A (2011) *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*, Universidade Federal de Viçosa.
- Cruz, C.D. (2013) GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. 35(3,): 271-276.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Franzon. R.C., Castro, C.M., Raseira, M.C.B. (2010) Variabilidade genética em populações de pitangueira oriundas de autopolinização e polinização livre, acessada por AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 32(1):240-250.
- Gomes, C. B., Couto, M. E., Carneiro, R. M. D. G. (2008) Registro de ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em Goiabeira (*Psidium guajava* L.) e Fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no Sul do Brasil. *Nematologia Brasileira*, 32 (3):244-247.
- Gomes, V.M., Ribeiro, R.M., Viana, A.P., Souza, R.M., Santos, E. A., Rodrigues, D.L., Almeida, O.F. (2016) Inheritance of resistance to *Meloidogyne enterolobii* and individual selection in segregating populations of *Psidium* spp. *European Journal Plant Pathology*, 148: 699.
- Gomes, V.M., Souza, R.M., Corrêa, F.M., Dolinski, C. (2010) Management of *Meloidogyne mayaguensis* in commercial guava orchards with chemical fertilization and organic amendments. *Nematologia Brasileira*, 34:23-30.
- Gomes, V.M., Souza, R.M., Dias, V.M., Silveira, S.F., Dolinski, C. (2011) Guava Decline: A complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology*, 159: 45-50.

- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.L., Matsumoto, K., Mazine, F.F., Lughadha, E.N., Proenca, C., Soares Silva L.H., Wilson, P.G., Lucas, E. (2011) World checklist of *Myrtaceae*. In: *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens*, Kew. <http://www.kew.org/wcsp/> Acesso em: 25/06/16.
- Guavamap, Generation and screening of microsatellite markers (SSRs) in Guave. 2008. Disponível em:<<http://www.neiker.net/neiker/guavamap/for1-6a.htm>>.
- Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., Solis, R. V. (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, 117: 1-27.
- Herrero, J.V.I., Medina, N. N.R, Alor, M.B., Garcia, M.M.O., Moreno, A. Q., Teyer, L.F.S., Risterucci, A.M., Rohde, W. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia Myrtaceae. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 64-76.
- Hirano, R.T. (1967) *Chromosomal and pollination studies as related to intra-specific and interspecific compatibility in the genus Psidium*. Thesis (Master's thesis), University of Hawaii, Honolulu.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia (2016) Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura permanente. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z>. Acesso em: 20/10/2017.
- Ismail, N. A., Rafii, M. Y., Mahmud, T. M. M., Hanafi, M. M., Miah, G. (2016) Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies. *Molecular Biology Reports*, 43 (12): 1343-1358.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K. (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309–334.
- Kidaha, L.M., Alakonya, A.E., Nyende, A.B. (2014) Molecular Characterization of Guava Landraces in Kenya (Western and South Coast). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(15): 81-87.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2009) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 9: 299-306.
- Leite, P.S.S., Rodrigues, R., Silva, R.N.O., Pimenta, S., Medeiros, A.M., Bento, C.S., Gonçalves, L.S.A. (2016) Molecular and agronomic analysis of intraspecific variability in *Capsicum baccatum* var. *pendulum* accessions. *Genetics and Molecular Research* 15 (4): 1-16.

- Loiola, C.M., Azevedo, A.O.N., Diniz, L.E.C., Aragão, W.M., Azevedo, C.D.O., Santos, P.H.A.D., Ramos, H.C.C., Pereira, M.G., Ramos, S.R.R. (2016) Genetic Relationships among Tall Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.), *Plos one*, 1-11.
- Lopes, E. B., Brito, C. H., Batista, J. DE L., Silva, A. B. (2010) Ocorrência do nematoide *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira (*Psidium guajava*) no estado da Paraíba. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, 4 (2):12.
- Manica, I., Icuma, I.M., Junqueira, N.T.V., Salvador, J.O., Moreira, A., Malavolta, E. (2000) *Fruticultura tropical: goiaba*. Porto Alegre, Cinco Continentes, 373p.
- Miranda, G. B., Souza, R. M. De, Gomes, V. M. (2012) Avaliação de acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterolobii*. *Bragantia*, 71(1):52–58.
- Miranda, G.B., Souza, R. M., Gomes, V. M., Ferreira, T. F., Almeida, A. M. (2011) Avaliação de acessos de *Psidium* spp. quanto à resistência a *Meloidogyne enterolobii*. *Bragantia*, 71:52-58.
- Nogueira, A. M., Ferreira, A., Ferreira, M. F. S. (2015) Transferability of Microsatellites from *Psidium guajava* to *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia*, and *Syzygium* Species (Myrtaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1): 249-246.
- Oliveira, M.O., Santos, C.A.F., Correa, L.C., Araujo, J., Ribeiro, H.L.C. (2009) *Diversidade genética em acessos de goiabeira (Psidium guajava L.) de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores microssatélites*. In: IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido, Petrolina: Embrapa Semi Árido.
- Oliveira, N. N. S., Viana, A.P., Quintal, S.S.R., Paiva, C. L., Marinho, C.S. (2014) Análise de distância genética entre acessos do gênero *Psidium* spp. via marcadores ISSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 36(4):917-923.
- Pariona, A. *Top guava producing countries in the world*. Disponível em: <http://www.worldatlas.com/articles/top-guava-producing-countries-in-the-world.html>. Acesso em: 02 maio 2017.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2009) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.
- Pena, G.F., Amaral, A.T., Ribeiro, R.M., Ramos, H.C.C., Boechat, M.S.B., Santos, J.S., Mafra, G.S., Kamphorst, S.H., Lima, V.J., Vivas, M., Souza, G.A. (2016) Inference of genetic diversity in popcorn S3 progenies, *Genetics and Molecular Research*, 15(2): 1-13.

- Pereira, F. O. M., Natchtigal, J. C. (2013) Goiabeira. In: *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*, Brucker, C. H. (Ed.) Viçosa: Editora UFV, p. 267-289.
- Pereira, F.O.M, Kavati, R. (2011) Contribuição da pesquisa científica brasileira no desenvolvimento de algumas frutíferas de clima subtropical. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33: 92-108.
- Pereira, F.O.M., R.M. Souza, P.M. Souza, C. Dolinski & G.K. Santos (2009) Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira*, 33(2): 176-181.
- Pessanha, P.G O., Viana, A.P., Amaral Júnior, A.T., Souza, R.M., Texeira, M.C., Pereira, M.G. (2011) Avaliação da diversidade genética no acesso à *Psidium* spp. através de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 129-136.
- Pommer, C.V., Murakami, K.R.N. (2014) Breeding Guava (*Psidium guajava* L.). Breeding Plantation Tree Crops. *Tropical Species Springer*. New York. p.83-120.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Quintal, S.S.R., Viana, A.P., Campos, B.M., Vivas, M., Amaral, A.T. (2017) Analysis of structures of covariance and repeatability in guava segregant population. *Revista Caatinga*, 30: 885-891.
- Ramos, H.C.C., Pereira, M.G., Pereira, T.N.S., Barros, G.B.A., Ferregueti, G.A. (2014) Genetic-molecular characterization of backcross generations for sexual conversion in papaya (*Carica papaya* L.), *Genetics and Molecular Research*, 13(4): 10367-10381.
- Ramu, P., Billot, C., Rami, J. F., Vel, S. S., Upadhyaya, H. D., Reddy, L. A., Hash, C. T. (2013) Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(8): 2051-2064.
- Ray PK (2002) Guava. In: *Breeding Tropical and Subtropical Fruits*. Narosa Publishing House, Nova Delhi, 143-154
- Reddy, O. U. K., Pepper, A. E., Saha, I. A. S., Jenkins, J. N., Bolek, T. B. Y., ElZik, K. M. (2001) Molecular Biology: New Dinucleotide and Trinucleotide Microsatellite Marker Resources for Cotton Genome Research. *The Journal of Cotton Science*, 5:103-113.
- Risterucci, A. M., Duval, M. F., Rohde, W., Billotte, N. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, 5:745-748.

- Robaina, R. R., Campos, G. S., Marinho, C. S., Souza, R. M., Bremenkamp, C. A. (2015) Grafting guava on cattley guava resistant to *Meloidogyne enterolobii*. *Ciência Rural*, 45(9): 1579-1584.
- Robaina, R. R., Marinho, C. S., Souza, R. M. de, Campos, G. S. (2012) Subenxertia da goiabeira "Paluma" com araçazeiros resistentes a *Meloidogyne enterolobii* (sin. *M. mayaguensis*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(3):951-955.
- Sant'ana, G.C., Ferreira, J.L., Rocha, H.S., Borém, A., Pasqual, M., Cançado, G.M.A. (2012) Comparison of a retrotransposon-based marker with microsatellite markers for discriminating accessions of *Vitis vinífera*, *Genetics and Molecular Research*, 11(2):1507-1525.
- Silva, A.L., Mendes, A.M.S., Oliveira, A.R., Paranhos, B.A.J., Santos, C.A.F., Silva, D.J., Petreire, V.G. (2010) *A cultura da goiaba*. (F. R. Barbosa & M. F. Lima, Eds.). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica (2a).
- Silva, G. S., Atayde Sobrinho, C., Pereira, A. L., Santos, J. M. (2006) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Estado do Piauí. *Nematologia Brasileira*, 30 (3):307-309.
- Silva, R. V., Oliveira, R. D. L. (2010) Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* (sin. *M. mayaguensis*) em Goiabeiras no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, 34 (3): 172-177.
- Singh, R., Sehgal, O.P. (1980) Studies on the blossom biology of *Psidium guajava* L. (guava). 2, Pollen studies stigmal receptivity pollination and fruit set. *Indian Journal Horticulture*, 25: 52-59
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. (2014) *Myrtaceae*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24034> Acesso em: 22/05/16.
- Souza, A. G., Resende, L. V., Lima, I. P., Santos, R. M. (2014) Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii* *Ciência Rural*, 44(5): 1579-1584.
- Souza, A.G. *Caracterização molecular, citogenética e seleção de espécies de Myrtaceae resistentes ao nematoide Meloidogyne enterolobii*. (2011) Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras - MG: UFLA. 120 p.
- Souza, R. M., Nogueira, M. S., Lima, I. M., Melarato, M., Dolinski, C. M. (2006) Manejo de nematoides das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. *Nematologia Brasileira*, Campinas, 30(2):165-169.

- Torres, G.R.C., Covello, V.N., Sales Junior, R., Pedrosa, E.M.R., Moura, R. (2004) *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira*, 29(5): 570.
- Torres, G.R.C., Sales- Junior, R., Nerivania, V., Rehn, C., Pedrosa, E.M.R., R.M. Moura. (2005) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Estado do Ceara. *Nematologia Brasileira*, Campinas, 29(1):105-107.
- Tuler, A.C., Carrijo, T.T., Nóia L.R., Ferreira, A., Peixoto, A.L., Ferreira, M.F.S.(2015) SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (*Myrtaceae*), *Molecular Biology Reports*, 1-13.
- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N. N., Becker, D., Velásquez, B., Sourd, D., Espinosa, G., Rohde, W. (2007) Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L) germplasm collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*, La Habana, 28(3): 61-67.
- Xie, W.G., Zang, X.Q., Cai, H.W., Liu, W., Peng, Y. (2010) Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Biochemical Systematics and Ecology* 38:740–749.