

FENOLOGIA DE GENÓTIPOS SELECIONADOS DE GOIABEIRA
(*Psidium guajava* L.) E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ACESSOS DE *Psidium* spp. VIA MARCADORES ISSR

NÁZILA NAYARA SILVA DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO - 2013

FENOLOGIA DE GENÓTIPOS SELECIONADOS DE GOIABEIRA
(*Psidium guajava* L.) E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ACESSOS DE *Psidium* spp. VIA MARCADORES ISSR

NÁZILA NAYARA SILVA DE OLIVEIRA

“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
SETEMBRO – 2013

FENOLOGIA DE GENÓTIPOS SELECIONADOS DE GOIABEIRA
(*Psidium guajava* L.) E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ACESSOS DE *Psidium* spp. VIA MARCADORES ISSR

NÁZILA NAYARA SILVA DE OLIVEIRA

“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 30 de setembro de 2013

Comissão Examinadora:

Prof. Marcelo Geraldo de Moraes Silva (D. Sc., Produção vegetal) – IFF

Prof^a. Cláudia Sales Marinho (D. Sc., Produção vegetal) – UENF

Prof^a. Rosana Rodrigues (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF

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

DEDICATÓRIA

Ao meu querido e protetor Deus, que guia meus passos a cada dia, me proporcionando bênçãos e sabedoria.

A meus pais, pelo apoio e ensinamentos que levarei por toda a vida.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por sua presença constante na minha vida, me proporcionando força e me guiando em todos os meus passos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós - Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas por ter me concedido a oportunidade de aprofundar meus conhecimentos e a realização acadêmica.

Ao Professor Alexandre Pio Viana, por sua orientação, apoio, confiança e encorajamento durante todo o curso. Sua alegria, calma e força foram de grande ajuda para minha adaptação em novo ambiente e em nova vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da Bolsa.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pelo apoio financeiro.

À Professora Rosana Rodrigues, por seus grandes incentivos na condição de Professora e Conselheira, sendo um exemplo de Profissional.

À Professora Telma Pereira, por todos os conhecimentos que pude adquirir em sala de aula e em Laboratório, pelos conselhos de grande valia que contribuíram profundamente para o final desta etapa de minha vida.

À Professora Cláudia Sales Marinho, pelos sábios conselhos e por ceder parte do material vegetal utilizado neste estudo.

À Professora Helaine Christine Cancela Ramos e ao Professor Geraldo de Amaral Gravina, pelos grandes conselhos e ajuda com as análises estatísticas dos dados moleculares e de fenologia.

Aos Doutorandos Monique e Raimundo Nonato e aos Doutores Patrícia Gomes de Oliveira Pessanha e Sérgio Alessandro Souza, pela grande ajuda com algumas análises laboratoriais e estatísticas.

À técnica Vitória Régia Melo de Almeida Miranda, por seus ensinamentos na área molecular que me foram de profunda valia para a finalização das análises.

Ao Secretário Daniel Vale, por sua grande atenção e dedicação, me auxiliando sempre que necessário.

Às amigas Silvana, Bianca e Cláudia, pela ajuda com os experimentos e em Laboratório e pelo apoio e amizade.

Aos amigos de Laboratório: Fernando, Eileen, Jôsie, Rulfe e Daniele.

Aos meus Professores e Orientadores da Graduação, Heráclito Conceição, Cândido Oliveira Neto e Tassiano Câmara, que foram fundamentais para a escolha por este Curso e por contribuírem para meu crescimento profissional.

Às minhas amigas e irmãs de República, Aurilena Aviz, Áurea Souza, Jackeline Siqueira e Vanessa Brito que estão comigo desde a Graduação e sempre se fizeram presentes em todos os momentos, me auxiliando sempre que necessário.

À minha grande amiga Alcione Lima, por sua presença, conselhos e exemplos ao longo de minha vida, que ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional.

Em especial, à minha família, pelos gestos de carinho e sorrisos de apoio e compreensão.

À minha avó e mãe Dalva Oliveira, por seu apoio incondicional que sempre me estimulou a dar o melhor de mim.

Ao meu avô e pai Horácio Sancho, que com sua simplicidade, sempre me aconselhou a buscar os meus sonhos e a seguir o meu caminho.

A todos os meus irmãos, por sua amizade e por serem exemplos a serem seguidos.

A todos, que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desfecho dessa etapa em minha vida o meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO ----- | VII |
| ABSTRACT----- | IX |
| 1. INTRODUÇÃO ----- | 1 |
| 2. OBJETIVOS ----- | 4 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS ----- | 4 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ----- | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ----- | 5 |
| 3.1 GÊNERO PSIDIUM: ASPECTOS GERAIS ----- | 5 |
| 3.2 FENOLOGIA ----- | 7 |
| 3.3 MARCADORES MOLECULARES ----- | 9 |
| 3.3.1 Marcadores ISSR ----- | 12 |
| 3.4 MELHORAMENTO GENÉTICO DA GOIABEIRA E AÇÕES NA UENF ----- | 13 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS ----- | 16 |
| 4.1 MATERIAL GENÉTICO----- | 16 |
| 4.2 CARACRERIZAÇÃO FENOLÓGICA ----- | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3 | CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ----- | 23 |
| 4.3.1 | Extração do DNA genômico ----- | 23 |
| 4.3.2 | Iniciadores ISSR e Condições da PCR ----- | 24 |
| 4.4 | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS----- | 25 |
| 4.4.1 | Características Fenológicas ----- | 25 |
| 4.4.2 | Marcas Moleculares ----- | 25 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO ----- | 27 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO FENOLÓGICA ----- | 27 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ----- | 37 |
| 6. | CONCLUSÕES ----- | 43 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 44 |

RESUMO

OLIVEIRA, Názila Nayara Silva de; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Setembro, 2013; FENOLOGIA DE GENÓTIPOS SELECIONADOS DE GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.) E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE *Psidium* spp. VIA MARCADORES ISSR; Orientador: Prof. Alexandre Pio Viana; Conselheiros: Prof^a Telma Nair Santana Pereira e Prof^a Rosana Rodrigues.

A goiaba tem sido uma fruta tropical de alto destaque mundial. No Brasil, devido, principalmente, a suas condições edafoclimáticas favoráveis, a goiabeira é cultivada em todas as regiões. Nas últimas décadas, essa cultura vem sofrendo vários danos causados pelo fitonematóide *Meloidogyne enterolobii* que, associado ao fungo *Fusarium solani*, causam a doença declínio da goiabeira. Alguns estudos, além de confirmarem a susceptibilidade de acessos de goiabeira a esses patógenos, também, relataram resistência em acessos de araçás do gênero *Psidium*. Desse modo, o maior conhecimento e potencial uso dessas espécies em associação com a goiabeira pode ser promissor. O objetivo deste trabalho consistiu na descrição da fenologia de 10 genótipos selecionados de goiabeira na Região Norte Fluminense e na quantificação da divergência genética desses genótipos de goiabeira em conjunto com 27 acessos de araçás do gênero *Psidium*, via marcadores moleculares ISSR. Todo o material avaliado pertence à Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF. No primeiro estudo, foram avaliadas variáveis fenotípicas referentes às fases fenológicas da goiabeira, desde o estabelecimento das brotações à colheita dos frutos. O período compreendido

entre a poda e o ponto de colheita dos frutos perdurou entre 168 a 215 dias após a poda (DAP). O período da floração durou de 45 a 85 DAP. Aos 150 DAP, a máxima e mínima do índice de pegamento de frutos foi de 55,49% (genótipo 36) e 14, 82% (genótipo 30). A partir da realização da correlação simples e da análise de trilha, foi possível verificar efeito dos fatores ambientais, temperatura e pluviosidade, sobre o ciclo fenológico da goiabeira. Para a variável número de botões florais em fase inicial (BF1), houve efeito direto significativo da temperatura na maioria dos acessos. Efeito indireto da temperatura via pluviosidade também foi observado. Os genótipos 30, 31 e 33, foram os que obtiveram uma maior influência direta da temperatura, 0,77, 0,72 e 0,74, respectivamente. No estudo correspondente à divergência dos acessos de *Psidium* spp., 17 marcadores ISSR foram selecionados, sendo obtidas 216 bandas polimórficas. Pelo método de agrupamento UPGMA houve a formação de cinco principais grupos nos 37 indivíduos avaliados. Os acessos de araçá da espécie *P. cattleyanum* Sabine ficaram alocados nos grupos I e II. No grupo III ficou alocado o acesso da espécie *P. guineense* Sw. Os genótipos de goiabeira ficaram alocados do grupo IV e V. Nestes estudos, quanto à caracterização fenológica, observou-se que há variação na duração das fenofases, nos diferentes genótipos testados, sendo a temperatura um fator de alta influência em tal variação. A análise de divergência mostrou que os acessos de araçá dos grupos II e III são geneticamente mais próximos da goiabeira, podendo ser promissor seu uso em hibridações interespecíficas e a ampla base genética entre os genótipos de goiabeira viabiliza cruzamentos com genótipos superiores de alta divergência.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Názila Nayara Silva de, MSc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, in September, 2013; PHENOLOGY OF SELECTED GENOTYPES OF GUAVA (*Psidium guajava* L.) AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Psidium* spp. ACCESSIONS BY ISSR MARKERS; Advisor: Alexandre Pio Viana; Committe Members: Telma Nair Santana and Rosana Pereira Rodrigues.

Guava has been a remarkable tropical fruit in World. In Brazil, due to its favorable conditions of soil and climate, guava is grown in all regions. In the last decades, this crop has been suffering several damages caused by the nematode *Meloidogyne enterolobii*, which when associated to the fungus *Fusarium solani*, causes a disease called decline of guava. Some studies, besides confirming the susceptibility of accessions of guava to such pathogens, also, they have reported the resistance of araçá accessions, which also belongs to *Psidium* genus. Thus, greater knowledge and potential use of such species in association with guava may be promising. The aim of this work has consisted of describing the phenology of ten selected accessions of guava from the Northern region of Rio de Janeiro State and quantifying the genetic divergence of such guava genotypes together with 27 accessions of araçá of *Psidium* genus, via ISSR molecular markers. The evaluated material belongs to the Research Supporting Unity of UENF. At the first study, phenotypic variables referring to guava phenological stages were evaluated, since the establishment of shoots up to the harvesting of fruits. The time period between the pruning and the harvesting stage of fruits has lasted from

168 to 215 days after pruning (DAP). The flowering period has lasted from 45 to 85 DAP. At 150 DAP, the maximum and minimum values of fecundity Index was 55.49% (genotype 36) and 14.82% (genotype 30). From using the simple correlation and path analysis, it has been possible to verify the effect of the environmental factors temperature and pluviosity over the phenological cycle of guava. The variable number of flower buds in initial stage (BF1), There was a direct and significant effect of temperature in most accessions. An indirect effect of temperature via pluviosity was also observed. The genotypes 30, 31 and 33 have presented the greatest direct influence of temperature, respectively 0,77, 0,72 and 0,74. The study corresponding to genetic divergence of *Psidium* spp. accessions, 17 ISSR markers were selected, presenting 216 polymorphic fragments. By the UPGMA clustering method, there was the forming of five main groups from the 37 accessions evaluated. The accessions of araçá, which belongs to the species *P. cattleyanum* Sabine, were placed in groups I and II. The accession of the species *P. guineense* Sw was placed in group III. The accessions of guava were placed in group IV and V. In such studies, regarding to the phenological characterization, there was observed that there is variation of the lasting of phenological stages of the different genotypes evaluated, where temperature was a factor of high influence in variation. The divergence analysis has shown the accessions of araçá are more genetically related to guava, which indicates as promising its use for future interspecific hybrids, and the wide genetic base between guava genotypes permits the crossing of superior genotypes with high divergence.

1. INTRODUÇÃO

Pertencente à família Myrtaceae, o gênero *Psidium* está entre os que têm um maior número espécies no mundo, cerca de 92. O Brasil é um grande representante dessa diversidade, podendo ser encontradas 60 espécies, sendo 47 endêmicas (Sobral et al., 2013). Dentro desse gênero, a goiabeira (*Psidium guajava* L.), originária da região tropical do continente Americano, é praticamente a única amplamente difundida em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Risterucci et al., 2005).

A goiaba tem sido uma fruta tropical de alto destaque mundial principalmente pelo seu elevado teor nutritivo, sendo rica em açúcares, sais minerais, vitamina C, licopeno, fibras, betacaroteno, e pelo sabor e aroma de alta aceitação (Risterucci et al., 2005) .

No Brasil, devido principalmente a suas condições edafoclimáticas favoráveis, a goiabeira é cultivada em escala comercial em todas as regiões, apresentando alto potencial no incremento da produção agrícola, na ampliação da atividade industrial e no potencial de exportação (Rozane Couto, 2003).

No ano de 2011, com uma área plantada 15.956 ha, o Brasil obteve uma produção de 342 528 toneladas, com um valor de, aproximadamente, 276 333 milhões de reais, com destaque para as regiões Nordeste e Sudeste que contribuíram com aproximadamente 88% da produção nacional (IBGE, 2013). Porém, nas últimas décadas, essa cultura vem sofrendo vários danos causados pelo fitonematoide *Meloidogyne enterolobii* ou *M. mayaguensis*, que, segundo

Gomes et al. (2011), em associação sinérgica com o fungo *Fusarium solani* Mart. Sacc, causam a doença declínio da goiabeira. De acordo com Pereira et al. (2009), na região Nordeste, essa doença levou a perdas econômicas diretas de mais de 112 milhões de reais.

Alguns estudos, além de confirmarem a susceptibilidade de acessos de goiabeira ao nematoide e ao *Fusarium solani* (Gomes, et al., 2011; Gomes, et al. 2013), também relataram resistência em acessos de araçás da espécie *Psidium* spp. a *M. enterolobii* (Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2009; Miranda et al., 2012; Martins et al., 2013). Tal fato demanda trabalhos de pré-melhoramento e melhoramento com essas espécies silvestres para melhor conhecimento e potencial uso.

A UENF, há cerca de seis anos, iniciou o programa de melhoramento de goiabeira, tendo sido selecionados, com utilização de marcadores moleculares, genitores para cruzamentos intraespecíficos e posterior instalação de dezessete famílias de irmãos completos, em que foram selecionados genótipos promissores para a realização de novos cruzamentos. Tal seleção, vinda de população com alto índice de variabilidade, necessita de ferramentas mais específicas e rápidas para cruzamentos direcionados e eficientes em um novo ciclo de seleção.

A produção da goiaba é altamente influenciada por fatores como florescimento e frutificação, cuja expressão é altamente influenciada por fatores genéticos, ambientais e de manejo (Corrêa et al., 2002). Tal cultura é responsiva à poda de frutificação, sendo, quando feita associada a um manejo adequado e época apropriada, possível a obtenção de produções satisfatórias durante todo o ano (López Garcia e Perez-Perez, 1977).

A realização de poda na goiabeira pode auxiliar de forma efetiva em sua produção, entretanto são necessárias pesquisas de âmbito regional, quanto a sua resposta fenológica ao manejo e, sobretudo, sobre a influência de fatores climáticos como temperatura e pluviosidade. O conhecimento da fenologia também pode ser muito útil para auxiliar em programas de conservação e melhoramento de espécies. Uma vez feita a caracterização fenológica, é possível planejar as melhores combinações e épocas os cruzamentos, podendo facilitar e acelerar um programa de melhoramento de goiabeira, que, por ser uma planta perene, exige maior demanda de tempo para a obtenção de resultados efetivos e alto custo financeiro requerendo grandes áreas experimentais para sua execução.

Outra ferramenta bastante utilizada quando se almejam resultados em menor tempo é a utilização de marcadores moleculares, que têm como principal vantagem reduzir a influência de fatores ambientais, podendo ser utilizados para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas. Especificamente em goiaba, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos voltados à identificação de cultivares e avaliação da biodiversidade de germoplasma (Valdés-Infante et al., 2007).

Sendo uma variação do método microssatélite, os marcadores moleculares ISSR têm ainda a vantagem de não necessitar de informações acerca das sequências de DNA da espécie em estudo, produzindo fragmentos com alta reprodutibilidade, quando comparados a marcadores não específicos como, por exemplo, o RAPD (Wolfe e Liston, 1998). Muitos estudos têm mostrado sucesso em vista do alto conteúdo de dados genéticos obtidos por meio destes marcadores, considerados apropriados para avaliação de diversidade e identificação de cultivares (Rakoczy-Trojanowska e Bolobok, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Descrever a fenologia de genótipos selecionados de goiabeira na região Norte Fluminense e quantificar a divergência genética entre acessos da espécie *Psidium guajava* L. (goiaba) e de araçás do gênero *Psidium* via marcadores moleculares ISSR.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever a fenologia de diferentes genótipos de goiabeira;
- Quantificar o grau de distância genética entre acessos das espécies silvestres *Psidium cattleianum* Sabine e *Psidium guineense* Sw e genótipos de *Psidium guajava* L., por meio de marcadores moleculares;
- Observar a existência de polimorfismo entre as diferentes espécies e dentro das espécies, utilizando os marcadores ISSR;
- Estimar a divergência genética inter e intra-específica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Gênero *Psidium*: Aspectos gerais

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae, composta de aproximadamente 3800 a 5800 espécies distribuídas em cerca de 132 gêneros (Govaerts et al., 2013). Tal gênero tem sua distribuição nativa em regiões neotropicais e segundo Wilson et al. (2001), os seus centros de diversidade estão localizados na América tropical e temperada, na Austrália e no sudeste da Ásia.

Entre as espécies de maior importância, destacam-se a *P. guajava* L. (goiaba, $2n = 22$), *P. cattleianum* Sabine (araçá doce ou araçá-de-coroa) e *P. guineense* Swartz ou *P. araça* Raddali (araçá verdadeiro, araçá ácido ou araçá do campo) caracterizadas por terem frutos de sabor exótico, com elevado teor de vitamina C (Pereira, 1995; Raseira e Raseira, 1996; Manica, et al., 2000; Pereira e Nachtigal, 2002; Ray, 2002; Franzon et al., 2009).

A goiabeira é originária da região tropical do continente Americano, sendo seu provável centro de origem localizado entre o Sul do México e o Norte da América do Sul (Pereira e Nachtigal, 2002). Sua disseminação no mundo ocorreu através dos colonizadores espanhóis na época da colonização do Brasil, e no continente americano, provavelmente ocorreu por meio de pássaros e a pequenos animais que se alimentavam da fruta. Atualmente, é amplamente difundida nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Pereira e Nachtigal, 2002).

Além da goiabeira, existem algumas espécies de araçazeiro que despertam interesse tanto pela sua boa aceitação por populações locais (Bezerra et al.,

2006; Franzon et al., 2009) quanto pelas suas características de resistência a nematoides (Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2009; Miranda et al., 2012; Martins et al., 2013), como a espécie *P. cattleyanum* Sabine, com centro de origem no Sul do Brasil, sendo distribuída desde o Rio Grande do Sul, até a Bahia (Sobral et al., 2013) bem como em outros países da América do Sul como o Norte do Uruguai. (Wikler et al., 2000; Brandão et al., 2002).

Outra espécie de araçá bastante conhecida e difundida é a *P. guineense* Swartz, originária da América do Sul com ampla distribuição desde o Sul do México até o Norte da Argentina e em diversas regiões brasileiras (Brandão et al., 2002).

A goiabeira é uma frutífera de porte pequeno a médio, geralmente de 3 a 5 metros de altura, com conformação tortuosa e esgalhada, caule de casca lisa e delgada. Suas folhas são completas, oblongas, pubescentes na parte abaxial, com nervuras secundárias ao limbo da principal. As flores são pentâmeras e hermafroditas, com androceu formado por aproximadamente 350 estames. O gineceu é gamocarpelar, com ovário ínfero, é tri, tetra ou plurilocular, com numerosos óvulos tendo placentação marginal (Pereira e Nachtigal, 2002).

Diferentes trabalhos apresentam afirmações contraditórias quanto à receptividade do estigma em goiabeira. Singh e Sehgal (1968) afirmam que esta receptividade se inicia dois dias antes da antese, enquanto para Boti (2001) o estigma fica receptivo na pré-antese e assim permanece por 30 horas. Em contrapartida Soubihe Sobrinho (1951) alega que o estigma se torna receptivo no momento da antese, já outros autores sugerem que ocorre 2 a 3 horas após a abertura da flor (Dasarathy, 1951; Balasubrahmanyam, 1959).

A forma mais frequente de polinização em goiabeira é a polinização cruzada, segundo Dasarathy (1951) e Balasubrahmanyam (1959). Para Alves e Freitas (2007), isso se deve ao fenômeno da autoincompatibilidade, provocado por mecanismos morfológicos da flor que impedem a autopolinização e por ser uma planta com taxa de polinização cruzada maior que 35%. Entretanto, Boti (2001) sugere que não há autoincompatibilidade em goiabeira, o que reforça hipóteses de autopolinização como sistema reprodutivo da espécie (Singh e Sehgal, 1968). Tal contradição pode ser explicada por Allard (1960), que afirma que dentro da mesma espécie, pode haver variações quanto a cruzamentos

naturais, além de diferentes taxas de cruzamentos para uma variedade, por ser um fator altamente influenciado pelo ambiente.

Quanto a espécies nativas do gênero *Psidium*, são poucos os estudos sobre biologia reprodutiva. Em araçá, segundo Danner et al. (2010) a plena floração ocorre de meados ao final de outubro e a maturação dos frutos, aos 98 dias após a antese. Sabe-se que a espécie *P. guineense* apresenta florescimento de outubro a novembro, segundo estudos realizados na área fragmentada da Mata Atlântica em Itaboraí, RJ (Freire et al., 2013). Já a espécie *P. cattleianum* apresenta florescimento de outubro a novembro em condições naturais (Raseira e Raseira, 1996). Tem flores brancas, hermafroditas, com numerosos estames e com ovário ínfero, em geral com três a quatro lóculos, geralmente com mais de 100 óvulos, embora tenham sido contados entre 76 a 200 óvulos (Sanchoatene, 1989; Franzon et al., 2009) Os grãos de pólen apresentam as formas triangular ou arredondada (Raseira e Raseira, 1996). Nessa espécie, foram encontradas 16 a 100 sementes nos frutos (Sanchoatene, 1989).

De um modo geral nas mirtáceas brasileiras, a polinização por abelhas parece ser o sistema de cruzamento predominante. As pétalas e estames são os atrativos visuais para os polinizadores em geral (Gressler et al., 2006; Franzon et al., 2009). Especificamente o gênero *Psidium* apresenta ampla variedade de dispersores e normalmente grande quantidade de sementes por fruto (Gressler et al., 2006). Tem também frutos carnosos, ricos em água e carboidratos e pobres em proteínas e lipídios (Landrum e kwasaki, 1997).

3.2 Fenologia

O estudo dos eventos biológicos e das causas de sua ocorrência em função de fatores bióticos e abióticos, bem como da sua relação entre as fases caracterizadas por esses eventos, dentro de uma ou mais espécies, é conhecido como fenologia (Silva et al., 2007).

A fenologia é descrita a partir de observações do início e fim dos estádios de desenvolvimento com base em observações no fenótipo de determinada planta, denominados fenofases (Larcher, 2000). Esse conhecimento é essencial para o manejo adequado e o planejamento das ações do produtor (Pereira e São José, 1987; Gonzaga Neto et al., 2001) para a maximização da produtividade de uma determinada cultura (Forsthofer et al., 2004), auxiliando na coleta de

sementes e produção de mudas e em programas de conservação e melhoramento de espécies (Rego et al., 2006).

Informações acerca do florescimento e frutificação das plantas têm importância na caracterização biológica e em estudos comparativos de variedades, nos quais são considerados o potencial de produção e a qualidade do fruto produzido (Doni, 1974; Simão, 1980; Araujo, 2000), características essas relacionadas à porcentagem de flores que são convertidas em frutos maduros (Corrêa et al., 2002).

Segundo Pereira (1995), a goiabeira floresce aproximadamente dois meses após a poda e os frutos estão aptos a serem colhidos três a cinco meses após a floração, dependendo da época do ano. Porém, a resposta das plantas ao florescimento e frutificação varia em função do genótipo, das condições edafoclimáticas e do manejo da cultura, podendo ocorrer mudanças na época de duração de cada estágio de desenvolvimento (Serrano et al., 2008a). Dada essa variação, torna-se importante o estudo do tema com o intuito de definir padrões para conjuntos de combinações dos fatores citados (Corrêa et al., 2002)

Trabalhos realizados em goiabeira por Serrano et al. (2008a), no Norte do Espírito Santo, obtiveram variação de 70 a 77 dias no período compreendido entre a poda e o fim do florescimento de acordo com a época da poda de frutificação, acarretando uma mudança de 182 (poda em novembro a dezembro) a 203 (poda em fevereiro) dias da poda até a colheita dos frutos.

Serrano et al. (2008b), avaliando goiabeira 'Paluma' em São Francisco de Itabapoana, RJ, encontraram uma variação foi de 70 a 84 dias, da poda ao florescimento, que ocorreu em menor tempo para plantas podadas em outubro e dezembro, cujo florescimento coincidiu com os meses de alta temperatura. O ciclo total da poda à colheita foi de 182 a 210 dias, sendo observado que em período de maior temperatura média do ar ocorreu o ciclo mais precoce e o ciclo mais longo em menor temperatura. Foi observada interação entre intensidades de poda de frutificação em relação ao número de ramos estabelecidos e ao número de frutos por ramo podado. Os autores relataram também que a queda de frutos ocorreu até 56 dias após a antese.

3.3 Marcadores Moleculares

Um dos desafios do melhoramento de plantas, é a influência do ambiente sobre diversos caracteres relativos à planta, chegando a limitar o progresso genético e o desenvolvimento de novas cultivares. Este desafio começou nos últimos tempos a ser superado com a chegada e a utilização de estratégias biotecnológicas (Borém, 2009). Os marcadores moleculares são uma ferramenta auxiliar nos diversos programas de melhoramento, pois permitem a análise de indivíduos com base em seu DNA, podendo aumentar o conhecimento básico das culturas e variáveis estudadas, além de acelerar e acurar o processo de desenvolvimento de cultivares melhoradas.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular provindo de um gene expresso, como isoenzimas ou um segmento de DNA. De forma mais simplificada, para Borém (2009), trata-se de fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes.

De acordo com Vieira (2005), marcadores moleculares são utilizados para caracterização de germoplasma, aumentar a eficiência de seleção, para análises de similaridade e dissimilaridade intra e interespecífica, sendo possível também detectar possíveis associações entre marcadores moleculares e características fenotípicas. Sua utilização, desde atividades de pré-melhoramento até o melhoramento propriamente dito, tem trazido contribuições significativas para o conhecimento da diversidade genética e melhor exploração desse conhecimento no melhoramento de diversas espécies (Spooner et al., 2005).

O primeiro marcador molecular surgiu na década de 70, logo após a descoberta da estrutura do DNA, uma vez que houve maior acessibilidade para o desenvolvimento dessas novas tecnologias para o estudo do polimorfismo. Denominado análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”- RFLP), esse marcador se baseia na utilização de enzimas de restrição. Tal técnica requer grandes quantidades de DNA, e as análises são, em geral, demoradas e trabalhosas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Com o desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) por Mullis e Faloona (1987), que consiste na amplificação, *in vitro*, de fragmentos

de DNA, utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores, que são complementares às extremidades do segmento a ser amplificado (Saiki et al. 1985; Mullis e Faloona 1987), surgiram outros tipos de marcadores moleculares tendo esse princípio por base..

O primeiro deles foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) (Williams et al., 1990), que levou a uma alta expansão da análise de polimorfismo molecular permitindo a geração de dados genéticos em um grande número de espécies (Caixeta et al., 2009). Esse marcador consiste num único iniciador de sequência curta, normalmente dez nucleotídeos, e de seqüência aleatória (Williams et al., 1990), para fazer a amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados, uma vez que tais fragmentos são distribuídos ao acaso no genoma (Borém, 2009).

Segundo Faleiro (2007) e Caixeta et al. (2009), as vantagens dos marcadores RAPD são simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo relativamente reduzido comparado com outras técnicas moleculares, além de utilização imediata a qualquer tipo de organismo. Requerem quantidades mínimas de DNA e não utilizam marcação de radioatividade, podem ser utilizados para a identificação rápida e eficiente de muitos polimorfismos e, desse modo, apresentam enorme potencial na identificação de cultivares.

As desvantagens dos marcadores RAPD são a dominância dos marcadores, não diferenciando locos em homozigose de locos em heterozigose e baixa reprodutibilidade entre os laboratórios e, até mesmo, dentro do mesmo laboratório, diminuindo a confiabilidade, principalmente pela sensibilidade da técnica às condições experimentais, principalmente em casos de não padronização (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Faleiro, 2007), requerendo certa experiência do pesquisador com procedimentos moleculares (Caixeta et al., 2009).

A utilização de marcadores RAPD em *Psidium* spp. foi feita, por Padilha-Ramírez et al. (2002), que analisaram a variabilidade genética em goiaba (*Psidium guajava* L.), no México, detectando uma grande similaridade genotípica e fenotípica entre os acessos estudados. Gomes Filho et al. (2010) e Pessanha et al. (2011) também utilizaram RAPD para avaliar a diversidade genética de acessos de *Psidium* spp. no Noroeste e Norte Fluminense, respectivamente. Na

Índia, Mani et al. (2011) avaliaram a diversidade de acessos de diferentes espécies de *Psidium*.

Com o maior avanço na tecnologia de marcadores moleculares, surgiram os marcadores microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), que são sequências curtas de 2 a 5 pares de base repetidas em *tandem* (Faleiro, 2007). Estes marcadores têm sido utilizados em diversos estudos genéticos, principalmente, devido à sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (Borém e Caixeta, 2009). Entretanto, uma limitação a se considerar é a necessidade de conhecimento prévio das sequências genômicas para o desenvolvimento dos iniciadores (Faleiro, 2007), o que restringe sua utilização em espécies silvestres.

Em goiabeira, marcadores microssatélites têm sido utilizados em vista dos consideráveis avanços no sequenciamento genômico e no desenvolvimento de marcadores específicos para a espécie (Risterucci et al., 2005). Em 2007, Valdés-Infante e colaboradores, com o uso desses marcadores, fizeram a caracterização de germoplasma de diferentes procedências, e em 2010, fizeram estudos de diversidade de diferentes acessos em Cuba. No Brasil, Pessanha (2011) utilizou o marcador SSR para estimar a diversidade genética em goiabeiras da região Norte e Noroeste Fluminense.

Tendo por base os marcadores microssatélites, outros marcadores foram criados visando a explorar suas repetições, sem a necessidade de sequenciamento do DNA, (Caixeta et al., 2009). Entre eles, um de grande utilização é o ISSR (*Inter – SSR Amplification*). Esse tipo de marcador é utilizado por viabilizar o uso da tecnologia SSR em espécies ainda não estudadas, facilitando assim o conhecimento da diversidade genética.

Outro marcador, também com base na amplificação de DNA via PCR, é o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), pertencente a uma classe de marcadores que une a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade de amplificação aleatória de fragmentos, empregando-se iniciadores de sequências arbitrárias, como RAPD, e detecta diferenças em um conjunto de fragmentos selecionados e digeridos com enzima de restrição (Vos et al., 1995; Caixeta et al., 2009).

Alguns trabalhos para o gênero *Psidium* utilizando marcadores AFLP foram realizados por Valdés-Infante et al. (2003), que analisaram 62 acessos de goiabas de um BAG de Cuba, não detectando clara separação entre os provenientes da Flórida e das Ilhas Seychelles, os quais foram ali introduzidos. Corrêa et al. (2011) também usaram dessa tecnologia para testar a similaridade genética entre acessos de goiabeira e araçazeiro provindos de diferentes regiões do Brasil.

3.3.1 Marcadores ISSR

Os marcadores ISSR (Zietkiewicz et al., 1994) são fragmentos de DNA embasados no método microssatélite (SSR). Enquanto os SSR são a amplificação da região repetida usando dois iniciadores específicos, o ISSR é composto por uma sequência com 100 a 3000 pb amplificados via PCR (Faleiro, 2007). Estas sequências estão usualmente ancoradas na extremidade 5' ou 3' por 2 a 4 nucleotídeos, o que permite a amplificação de apenas parte das regiões amplificadas pelo marcador SSR (Zietkiewicz et al., 1994; Caixeta et al., 2009). Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma estejam faltando sequências repetidas ou há uma deleção ou uma inserção modificando a distância entre as repetições. Para os iniciadores ancorados na posição 5', polimorfismos podem ocorrer também por causa das diferenças no comprimento do microssatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente (Faleiro, 2007).

As principais vantagens dos ISSR são a geração de grande número de bandas informativas por analisar *loci* múltiplos em uma única reação, aumentando sua reprodutibilidade, que é uma das limitações do uso de SSR (Faleiro, 2007; Caixeta et al., 2009), e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção do iniciador (Faleiro, 2007). Em contrapartida, têm como principal desvantagem serem marcadores dominantes (Faleiro, 2007).

O marcador molecular ISSR tem se mostrado uma poderosa ferramenta para análise da diversidade genética, bem como para a caracterização de acessos e cultivares de diversas espécies (Silva et al., 2011). Segundo Faleiro (2007) auxiliam na identificação cultivares e no estudo de processos evolutivos e estudos filogenéticos.

Marcadores ISSR foram utilizadas com sucesso para estimar a diversidade genética em diferentes fruteiras como macieira (*Malus × domestica* Borkh.) (Goulão e Oliveira, 2001), morangueiro (Morales, 2010), umbu-cajazeira (*Spondia* spp.) (Santana et al., 2011), jenipapeiro (Santos, 2012), entre outras. Já para o gênero *Psidium*, marcadores ISSR foram utilizados por Mani et al. (2011) para avaliar a variabilidade genética e o estabelecimento das relações genéticas entre várias espécies do gênero coletadas em diversos países e regiões.

3.4 Melhoramento genético da goiabeira e ações na UENF

Desde a sua introdução em muitas partes do mundo, o melhoramento da goiabeira começou a ser feito pela seleção de plantas com características desejadas. Entretanto, somente em meados do século XX, os primeiros trabalhos científicos de melhoramento com a cultura foram desenvolvidos, principalmente nos Estados Unidos, Porto Rico, Índia e Egito (Pereira e Nachtigal, 2002).

Somente em 1951 foram publicados trabalhos no Brasil com melhoramento da goiabeira, desenvolvidos por Soubihe Sobrinho, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo. A partir daí, outros trabalhos foram desenvolvidos com essa cultura (Pereira e Nachtigal, 2002).

Mesmo com trabalhos de seleção em alguns institutos de pesquisa, grande parte dos pomares no Brasil foi implantada com mudas originadas de sementes, gerando pomares com grande heterogeneidade (Pereira, 1995; Pereira e Nachtigal, 2002). Outro fator que contribuiu para o surgimento de novas cultivares foi a introdução de materiais provindos da Austrália, Estados Unidos e Índia.

No mundo, existem mais de 400 cultivares de goiabeira, apesar de apenas algumas poucas dezenas serem de fato plantadas em escala comercial (Pommer et al., 2006). As cultivares de maior valor comercial no Brasil são 'Paluma', 'Rica', 'Pedro Sato', 'Kumagai', 'Sassaoka', 'Ogawa', 'Yamamoto' e a cultivar 'Século XXI' lançada em 2003 pelo programa da Unesp (Pereira et al., 2003; Pommer et al., 2006).

Para o melhoramento da goiabeira, em geral são aplicadas basicamente técnicas de seleção e hibridação. Desse modo, para se obter sucesso em um programa de melhoramento voltado para essa frutífera, há necessidade de acesso a informações básicas relativas à herança dos principais caracteres bem

como à divergência genética disponível para o melhoramento (Pereira e Nachtigal, 2003).

Os objetivos para o melhoramento de plantas de goiabeira, segundo Pereira e Nachtigal (2002), são: plantas de crescimento baixo e aberto; plantas com altas produções ($227 \text{ kg.planta}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ ou mais) e plantas resistentes a pragas e doenças. No Brasil há poucos trabalhos de melhoramento voltados à resistência, eles atentam apenas ao lançamento de variedades superiores voltadas ao consumo *in natura* e para a indústria (Pereira et al., 2003).

Há aproximadamente seis anos a UENF iniciou um programa de melhoramento genético da goiabeira no município de Campos dos Goytacazes, RJ. Este programa, inicialmente, visava à obtenção de populações segregantes oriundas de cruzamentos entre a espécie cultivada (*P. guajava*) com genótipos resistentes ao nematoide (*Meloidogyne enterolobii* ou *M. mayaguensis*), que, em complexo com o *Fusarium solani* Mart. Sacc, causa a morte prematura dos goiabais das regiões Norte e Noroeste do estado do Rio de Janeiro.

Por dificuldades de obtenção dos cruzamentos interespecíficos, outras hibridações foram priorizadas. Desse modo, populações segregantes foram também obtidas via cruzamento de plantas de goiabeira selecionadas e mantidas por produtores no Município de Bom Jesus do Itabapoana, sendo estabelecidas dezessete progênies de irmãos completos, que foram fenotipadas em experimentos montados em blocos casualizados na área de pesquisa localizada na Escola Agrícola Antônio Sarlo por Pessanha (2011).

Após isso, aplicando-se a metodologia de Ward- MLM (Campos et al., 2013), de Redes Neurais Artificiais (Campos, 2012) e de modelos mistos (REML/BLUP) por Quintal (2013), foram selecionados os genótipos mais promissores para a recombinação e formação de novas populações segregantes para posterior avaliação.

Desde o início do Programa de Melhoramento da UENF, alguns trabalhos foram publicados, indicando resultados promissores.

Dando início ao processo de melhoramento, Pessanha et al. (2011) detectaram alta divergência genética entre 14 acessos de goiabeira com base na técnica RAPD, com um total de 155 bandas polimórficas, dividindo-as em um grande grupo, que foi subdividido em cinco subgrupos, de acordo com diferentes características morfológicas e hábitos de crescimento. Para os autores, tal

variabilidade se devia ao hábito reprodutivo seminífero de genitores altamente heterozigotos, com a população F1, comportando-se como F2.

Campos et al. (2013), avaliando 138 plantas de goiabeira, utilizando a técnica WARD-MLM, observaram a formação de oito diferentes grupos de acordo com variáveis morfológicas, agrônômicas e físico-químicas dos frutos. Os autores indicaram que os genótipos dos grupos III apresentaram maior desempenho, acidez do fruto e vitamina C e os do grupo VIII, massa média do fruto, diâmetro longitudinal e transversal do fruto, rendimento de polpa, brix e brix/acidez do fruto. Para os autores, o cruzamento entre indivíduos dos dois grupos é o mais indicado.

Isto posto, são necessárias avaliações nos genótipos mais promissores e de outras variáveis relacionadas à fenologia das plantas selecionadas para o correto estabelecimento dos novos cruzamentos e reais possibilidades de sua utilização em novos programas de hibridações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material genético

O primeiro trabalho avaliou, quanto à sua fenologia, 10 genótipos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), pertencentes ao Programa de Melhoramento de Goiabeira da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (UENF), em experimento implantado na Escola agrícola Antônio Sarlo. Enquanto o segundo trabalho, foi feito com base na avaliação da divergência genética com uso de marcadores ISSR desses dez genótipos de goiabeira em conjunto com 27 acessos de araçazeiro do gênero *Psidium* spp. (Tabela 1). As análises moleculares foram feitas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UENF.

Os genótipos de goiabeira correspondem aos indivíduos mais promissores selecionados de um experimento composto de 17 famílias de irmãos completos para posterior avaliação e obtenção de nova população segregante. Já os genótipos de araçazeiro, oriundos de propagação seminífera, foram plantados entre 2011 e 2012. Destes, 16 são meio-irmãos de genótipos classificados como resistentes à *M. enterolobii* por Miranda (2011), enquanto os demais foram classificados como susceptíveis.

Tabela 1. Acessos de *Psidium* spp. localizados na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF, na Escola Agrícola Antônio Sarlo, utilizados para as análises de diversidade genética via marcadores ISSR e de caracterização fenológica.

| Acesso | Nome comum | Espécie | Resistência ao nematoide* | Características do fruto | Procedência |
|---------------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| 1 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 2 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto amarelo | Campos dos Goytacazes-RJ Pomar doméstico |
| 3 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 4 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto amarelo | Campos dos Goytacazes-RJ Pomar doméstico |
| 5 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto amarelo | Campos dos Goytacazes-RJ Pomar doméstico |
| 6 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 7 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 8 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 9 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 10 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 11 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua do Goytacazes |
| 12 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua do Goytacazes |
| 13 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |

Tabela 1, Cont.

| Acesso | Nome comum | Espécie | Resistência ao nematoide* | Características do fruto | Procedência |
|---------------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| 14 | Araçá-coroa | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto amarelo | São João da Barra-RJ; Produtor rural |
| 15 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 16 | Araçá amarelo | <i>P. cattleianum</i> | susceptível | Fruto amarelo | Atafona - São João da Barra |
| 17 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 18 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 19 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 20 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 21 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 22 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 23 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 24 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 25 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |
| 26 | Araçaúna | <i>P. cattleianum</i> | resistente | Fruto roxo escuro | Campos dos Goytacazes-RJ Rua dos Goytacazes |

Tabela 1, Cont.

| Acesso | Nome comum | Espécie | Resistência ao nematoide* | Características do fruto | Procedência |
|---------------|-------------------|---------------------|----------------------------------|---|--|
| 27 | Araçá do campo | <i>P. guineense</i> | susceptível | Fruto amarelo | Itaboraí – RJ |
| 28 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 33; MMF: 312,65; TSS: 6,68 | ² Planta 232; Família 13; Ascendência: UENF1836*UENF1835 |
| 29 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 22; MMF: 342,15; TSS: 6,98 | ² Planta 231; Família 13; Ascendência: UENF1836*UENF1835 |
| 30 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 11; MMF: 204,26; TSS: 9,06 | ² Planta 81; Família 7; Ascendência: UENF 1834*UENF 1833 |
| 31 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 20; MMF: 131,2; TSS: 6,46 | ² Planta 222; Família 2; Ascendência:UENF 1831*UENF 1830 |
| 32 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 17; MMF: 299,69; TSS:9,10 | ² Planta 29; Família 3; Ascendência: autofec. UENF1831 |
| 33 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 81; MMF: 410,92; TSS:6,76 | ² Planta 197; Família 17; Ascendência: UENF 1832*UENF1834 |
| 34 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 26; MMF: 196,25; TSS: 7,67 | ² Planta 113;Família 10; Ascendência: UENF1836 *UENF1835 |
| 35 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 17; MMF: 207,43; TSS: 10,36 | ² Planta 239; Família 3; Ascendência: autofec. UENF 1834 |
| 36 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 38; MMF: 296,78; TSS: 8,06 | ² Planta 292; Família 8; Ascendência: UENF 1835*UENF1834 |
| 37 | Goiaba | <i>P. guajava</i> | - | ¹ CP: vermelha; NFP: 27; MMF: 188,67; TSS: 8,86 | ² Planta 31; Família 3; Ascendência: autofec. UENF1831 |

* meio-irmãos resistentes ao nematóide (Miranda, 2011) ¹CP: Cor da Polpa; NFP: Número de frutos por planta; MMF: Massa Médio dos Frutos; TSS: Teor de sólidos solúveis (Campos, 2012); ² Cruzamentos realizados por Pessanha (2011).

4.2 Caracterização fenológica

O presente trabalho foi conduzido no período de dezembro de 2012 a julho de 2013, na cidade de Campos dos Goytacazes, Norte do Estado do Rio de Janeiro (21°44' S e 41°19' W e 12 m). O solo é classificado como Latossolo Amarelo, distrófico, textura arenosa. Segundo Köppen, trata-se de uma região de clima tropical úmido (Aw), com verão chuvoso e inverno seco, temperatura no mês mais frio superior a 18 °C, temperatura média anual em torno de 24 °C e precipitação pluviométrica anual em torno de 1023 mm, concentrando-se nos meses de outubro a janeiro. A Figura 1 mostra os dados climáticos de temperatura e pluviosidade referentes ao período da condução do experimento de acordo com o INMET (2013).

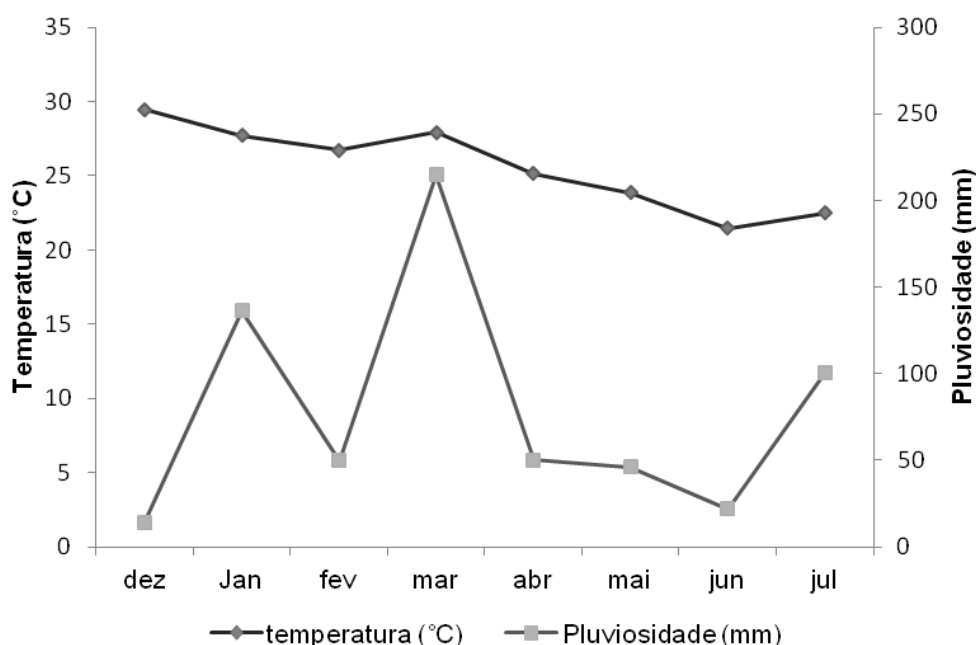


Figura 1. Dados de temperatura média e pluviosidade, correspondentes ao período de dezembro de 2012 a julho de 2013 no município de Campos dos Goytacazes, RJ (INMET, 2013).

A seleção dos dez genótipos utilizados neste experimento foi feita a partir de um experimento implantado em junho de 2009, que faz parte do Programa de Melhoramento de Goiabeira da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) (Tabela 1). Toda a área foi manejada sob sistema de irrigação por

gotejamento, sendo também feitos tratos culturais para controle de ervas daninhas, adubação e calagem, conforme recomendados para a cultura (Neto, 1990), e pulverizações para prevenção e controle da ferrugem (*Puccinia psidii*) e para o controle do psílideo (*Triozoida* sp.).

Foram marcados dez ramos de cada genótipo de goiabeira que, a partir da poda, feita no dia 10 de dezembro, foram avaliados por meio de coleta de dados semanais durante todo o ciclo da cultura. Os dados foram mensurados desde o estabelecimento das brotações, flores e frutos até o ponto de colheita, sendo coletados dados referentes às quantidades e datas de início e término da cada etapa em cada genótipo avaliado (Figura 2).

O estabelecimento das brotações foi mensurado de acordo com a variável Número de Brotações Estabelecidas (NBE), quando a planta estava com dois pares de folhas e havia atingido comprimento acima de 2,5 centímetros.

A partir do surgimento dos botões florais foram coletados dados do Número de botões florais, que foi subdividido em Número de botões florais em fase inicial (BF1) e Número de botões florais em fase de pré-antese (BF2). Foram registrados dados desde o surgimento dos botões florais até que todos tivessem terminado o período de pré-antese, por volta dos 60 dias após a poda.

Ao término da fase de pré-antese, foram mensurados o Número de flores abertas segundo as variáveis Número de flores em antese (A1) e o Número de flores abertas após 48 horas (A2), quando a flor aberta atingia a completa oxidação dos grãos de pólen.

O número de frutos foi avaliado em vários estádios: Pegamento dos frutos (PF); Crescimento I (C1); crescimento II (C2) e crescimento III (C3). O último estágio, C3, foi subdividido em Número de frutos em Início da maturação (IM) e Número de frutos em Ponto de colheita (PC).

A variável PF foi utilizada como critério quando foram observadas queda das pétalas e pequena dilatação do ovário. As fases de crescimento foram definidas de acordo com aquelas descritas por Rathore (1976), com modificações, sendo observadas três fases distintas: I – período de rápido crescimento, iniciando-se logo após o pegamento do fruto; II – período de crescimento relativamente lento, quando as sementes amadurecem; III – período de crescimento exponencial, quando ocorrem a mudança na cor da casca e maturação do fruto.

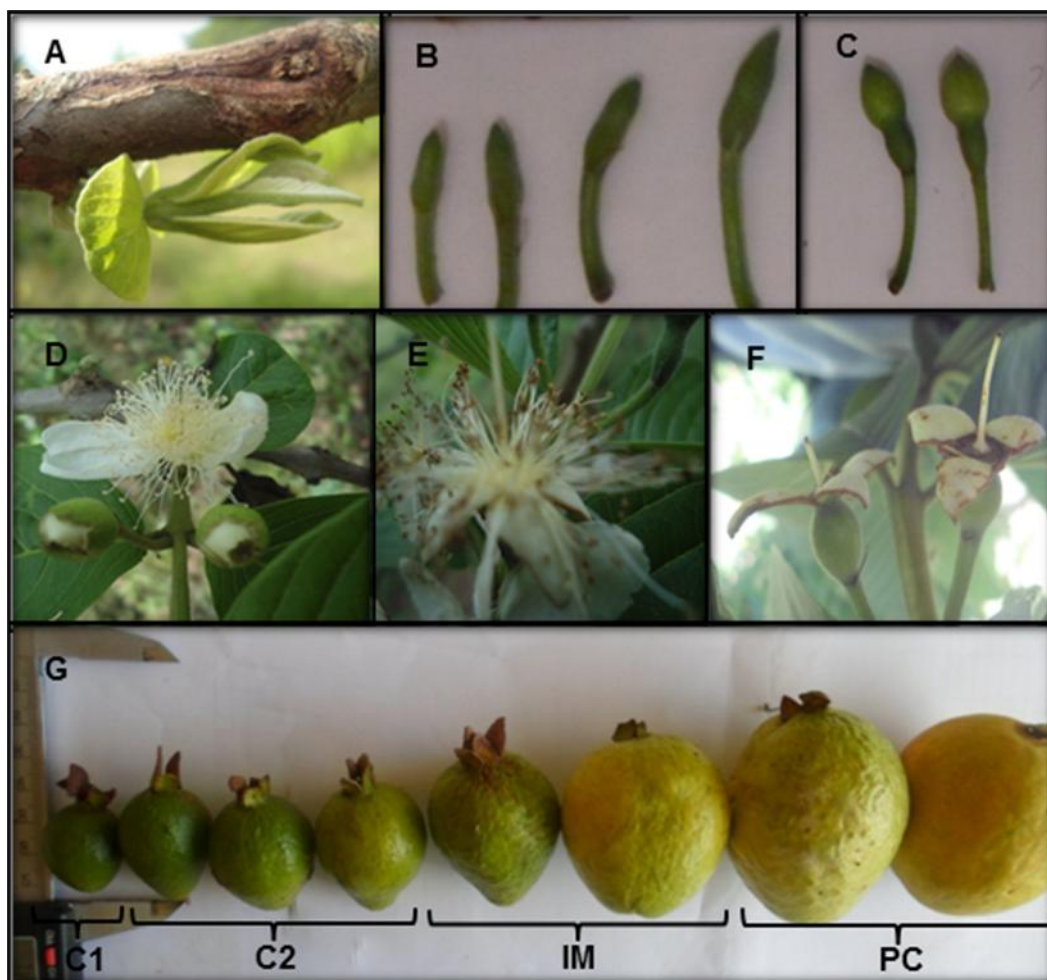


Figura 2. Fases de desenvolvimento de genótipos de goiabeira após a poda em Campos dos Goytacazes, RJ. A: Brotação estabelecida; B: Botões florais em fase inicial de desenvolvimento; C: Botões florais em fase de pré-antese; D: Antese; E: Flores abertas após 48 horas; F: fase de pegamento do fruto; G: Fases de crescimento do fruto C1, C2 e C3 - subdividida em Início da maturação (IM) e Ponto de colheita (PC).

Com base no número de flores de cada planta em antese (A1) e após 48 h (A2), foi estimada a taxa de florescimento, que é a razão entre o número total de flores na antese e o número de dias analisados.

No início da antese, foi determinado o número de botões florais (NB) e de acordo com o número de frutos (NF) correspondentes a todas as fases de crescimento até o final da fase de crescimento II, foi calculado o índice de pegamento de frutos (IPF), utilizando a fórmula proposta por Corrêa et al. (2002), dada por $IPF = [(NF/NB) \times 100]$.

De acordo com as observações, foram estimadas as seguintes fenofases, dadas em dias:

- Da poda ao estabelecimento das brotações;
- Da poda ao início da floração (quando se observou a primeira flor em antese);
- Da poda à floração plena (quando o maior número de flores atingiu a abertura floral);
- Da poda ao final da floração (quando a última flor atingiu a abertura floral);
- Da poda ao pegamento do fruto;
- Da poda ao amadurecimento do fruto.

4.3 Caracterização molecular

4.3.1 Extração do DNA genômico

O material genético para uso dos marcadores moleculares ISSR foi coletado em Campos dos Goytacazes – RJ no período de 2013 (Tabela 1).

Foram coletadas amostras de folhas jovens dos 37 indivíduos de *Psidium*, embaladas em papel alumínio, corretamente identificadas e rapidamente colocadas em gelo para transporte e então armazenadas em ultra-freezer com temperatura de 86°C negativos. Posteriormente, uma pequena quantidade do material genético coletado foi macerado em nitrogênio líquido (N₂) e cerca de 50 mg do macerado foram transferidos para tubos de 2 ml e imersos em N₂ líquido para a realização da extração de DNA, conforme o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações.

Em cada tubo, foram adicionados 700 µl do tampão de extração pré-aquecido, com um conteúdo de 2% CTAB, 2,0 mol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), sendo adicionados na solução de 2% PVP e 2,0% mercaptoetanol para remoção dos compostos fenólicos, sendo então incubados a 65°C por 47 minutos, homogeneizando suavemente a cada 10 minutos.

Após a incubação e as amostras atingirem a temperatura ambiente, procedeu-se à desproteinização, adicionando 600 µl clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após, aproximadamente, um minuto, a fase orgânica foi separada por centrifugação, a 13000 rpm por um minuto, e o sobrenadante transferido para tubos de 1,5 ml, devidamente identificados. A este material, foram adicionados dois terços do volume total da amostra de isopropanol gelado (500 µl) para a precipitação dos ácidos nucleicos, posteriormente incubados por 30 minutos a

20°C. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos, e o precipitado formado, fixado à parede inferior do tubo.

Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o precipitado passou por duas etapas de lavagem com 500 µl de etanol a 70%, seguidas de centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, para a retirada de sal presente. Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em bancada, ressuspendido em 200 µl de solução TE (Tris-EDTA - 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de 10 µg mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos e então armazenado a 20°C até a necessidade de uso.

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 2% utilizando o marcador *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen[®], USA). As amostras foram coradas com a mistura e GelRed[™] e Blue Juice (1:1) e imersas em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM]. A quantificação do material foi feita em espectrofotômetro NANODROP 2000c, com leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 260 nm e então as amostras, diluídas para a concentração de trabalho (5 ngµL⁻¹).

4.3.2 Iniciadores ISSR e condições da PCR

Foi feita uma seleção prévia entre 41 iniciadores, observando os de maior número de bandas polimórficas, tendo ao final um total de dezessete marcadores com as seguintes sequências: (GA)₈YC, (AG)₈YC, T (GA)₈, (GA)₈C, TA (CAG)₄, (CT)₈GC, (TG)₈GG, (GAA)₆AA, (AG)₈T, (GA)₈YT, (GACA)₄, HVH(TG)₇, (CA)₈T, (CA)₈A, (CA)₈G, (TC)₈G, (GGAGA)₃.

As reações de PCR foram feitas em Termociclador (Veriti 384-Well *Thermal Cycler Applied Biosystems*), com uma fase de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguida por 45 ciclos de amplificação: 94°C por 1 minuto; 44°C a 46°C por 1 minuto, conforme o iniciador utilizado; e 72°C por 3 minutos. Ao término dos ciclos foi feita uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Cada reação de PCR continha um volume final de 13 µl por amostra, sendo 10 ng de DNA, 0,5 µM do iniciador e 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,02 mM de dNTP e 1,5 mM de cloreto de magnésio e tampão de PCR (1X), adicionando-se água ultrapura para completar o volume final da reação.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com GelRed™ com auxílio do marcador de 100 pares de base DNA Ladder, utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos. A visualização do gel de agarose foi feita pelo sistema de fotodocumentação MiniBis Pro-Bio-Imaging System.

4.4 Análise estatística dos dados

4.4.1 Características fenológicas

A partir dos dados das fenofases estimadas, foi feita uma descrição em cada um dos genótipos avaliados, correspondentes ao dias de início e término de cada estágio.

Os dados referentes ao número de frutos foram submetidos a uma estatística descritiva e da sua variável, índice de pegamento de frutos, foi obtido o gráfico de dispersão. A taxa de floração, derivada do número de flores, também foi avaliada por meio de gráfico de dispersão.

Do número de brotações, número de botões, número de flores abertas, pegamento de frutos, início da maturação e ponto de colheita, foi feita análise de correlação de Pearson dos genótipos em relação à temperatura e pluviosidade.

A partir daí, das variáveis que apresentaram maior correlação foi feita uma análise de trilha para obter uma quantificação dos efeitos diretos e indiretos da umidade e temperatura.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do Programa GENES (Cruz, 2013).

4.4.2 Marcas moleculares

Os dados moleculares para as espécies estudadas foram analisados utilizando o aplicativo computacional GENES (Cruz, 2013) nos locos polimórficos, após a exclusão das bandas monomórficas de cada marcador utilizado. Os dados oriundos da amplificação dos iniciadores foram convertidos em uma matriz numérica com informações sobre o polimorfismo por loco. Tal matriz foi feita através da visualização das bandas mais consistentes nos 37 indivíduos

avaliados, correspondente ao número 1, para a presença da banda, e a número 0, para a ausência.

A partir dessas informações, foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados ou matriz de dissimilaridade. Para a formação de tal matriz, foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard segundo a equação.

$$IJ = \frac{a}{a+b+c}$$

Em que:

- a - número de bandas comuns a dois genótipos observados;
- b - número de bandas presentes somente no primeiro genótipo;
- c - número de bandas presentes somente no segundo genótipo.

A matriz de distância genética ou matriz de dissimilaridade foi utilizada para a análise de agrupamento dos genótipos, por meio de dendrograma através dos métodos hierárquicos UPGMA, Vizinho mais Próximo (SL) e WARD.

A partir desses dados, foi calculado o Coeficiente de Correlação Cofenético (CCC) estresse e distorção, sendo então selecionado o método que melhor explicou a divergência do material.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fenológica

De modo geral, o período compreendido entre a poda e a colheita dos frutos foi de 168 a 215 dias, com uma média de 191,5 dias após a poda – DAP (Tabela 2). Em Petrolina, PE, Teixeira et al. (2003), observaram em goiabeira ‘Paluma’ duração do ciclo de 200 dias da poda, feita em junho, à colheita dos frutos. Serrano et al. (2008a), avaliando goiabeira ‘Paluma’ no Estado do Espírito Santo, obtiveram um ciclo de 182 DAP em podas realizadas em novembro e dezembro. Resultado similar ao obtido por Medeiros (2012) em Quixeré, CE, em poda feita em novembro. No presente estudo, os genótipos 32, 34, 35 e 37 se mostraram mais precoces, com um ciclo de 168 dias.

O total estabelecimento das brotações variou de 36 a 48 dias após a poda, e o período da floração durou de 45 a 85 dias. A floração plena para a maioria dos genótipos selecionados ocorreu aos 64 dias, e o genótipo 33 apresentou o início de floração mais precoce (45 DAP), embora o período compreendido entre o início e o final da floração tenha sido relativamente grande. Somente os genótipos 35 e 36 apresentaram um menor intervalo (52 a 67 DAP).

Tabela 2. Fenofases estimadas para os diferentes genótipos de goiabeira, em Campos dos Goytacazes, RJ (2013).

| Fase | Fenofases | Genótipos | | | | | | | | | |
|------|--|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|
| | | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 |
| | | Dias Após a poda (DAP) | | | | | | | | | |
| 1 | Estabelecimento das brotações | 41 | 45 | 45 | 41 | 48 | 38 | 45 | 36 | 36 | 45 |
| 2 | Início da floração | 52 | 50 | 62 | 50 | 52 | 45 | 50 | 52 | 52 | 55 |
| 3 | Floração plena | 64 | 64 | 72 | 64 | 64 | 72 | 64 | 64 | 64 | 79 |
| 4 | Final da floração | 70 | 70 | 85 | 75 | 72 | 72 | 70 | 67 | 67 | 79 |
| | Fases de maturação do fruto ¹ | | | | | | | | | | |
| 5 | Pegamento do Fruto | 62- 81 | 62- 72 | 70 -89 | 55- 84 | 62-84 | 62 - 84 | 62 - 89 | 62 - 72 | 62 a 77 | 70 -84 |
| 6 | Fase I | 70 -140 | 72 -134 | 72 -188 | 70 -150 | 72 -126 | 70-177 | 70 -140 | 70 - 150 | 72 -134 | 72- 126 |
| 7 | Fase II | 92- 177 | 92- 168 | 99 -207 | 95 -168 | 84 -164 | 95-198 | 99 -164 | 99 - 153 | 92 - 168 | 95 -153 |
| 8 | Fase III | 150-177 | 150-177 | 164-215 | 122-177 | 120-168 | 122-207 | 126-168 | 122-168 | 150-177 | 150-168 |
| | Pico de colheita ² | 177 | 177 | 215 | 164 | 153 | 198 | 150 | 150 | 177 | 168 |

¹ Fases de maturação propostas por Rathore (1976) com modificações; ²Dado referente ao dia com maior concentração de frutos coletados por genótipo.

Segundo Serrano et al. (2008a), em goiabeira 'Paluma' na região Norte do Estado do Espírito Santo, a floração ocorreu entre 56 e 70 dias após a poda, feita no mês de dezembro. Entretanto, para Serrano et al. (2008b), na cidade de São Francisco de Itabapoana, RJ, esse intervalo foi de 63 a 84 dias. No presente trabalho, os genótipos de número 30, 31, 33 e 37 tiveram intervalos superiores, mostrando uma floração mais contínua e tardia, tal fato podendo ser explicado pela maior sensibilidade desses acessos a fatores ambientais como oscilação da temperatura e pluviosidade no período do florescimento (Figura 1). Segundo Forsthofer et al. (2004), pode haver variações nos ciclos fenológicos dentro de determinado período em função de fatores limitantes, como radiação solar, temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar para determinada espécie.

Verificando a taxa de floração (TF), Figura 3, o genótipo 35 obteve o maior valor no intervalo de avaliação, de 55 a 64 dias após a poda (8,6), e o genótipo 28 a menor (2,6). A maioria obteve maior índice até os 64 DAP, e somente os genótipos 30, 33 e 37 foram mais tardios, apresentando maior TF no intervalo de avaliação de 65 a 79 DAP. No genótipo 31, foi observada maior taxa aos 64 dias de avaliação, apresentando ainda TF expressiva até os 79 dias, comprovando que, além de seu ciclo de floração ter iniciado em um dos menores períodos, Tabela 2, a duração do seu intervalo foi maior em relação aos demais. Tal observação pode ser relevante quando se deseja obter uma produção mais precoce e contínua ao longo do ano.

Quanto ao número de frutos, Tabela 3, os genótipos 33 (floração de 45 a 72 DAP) e 35 (floração 52 a 67 DAP) obtiveram o maior valor ao final dos 150 dias (6,3), e a média total obtida neste período foi de 3,60 frutos por ramo. Tal resultado foi inferior ao obtido por Serrano et al. (2008a), com uma média de 6,27 em goiabeira 'Paluma' em sistema de cultivo irrigado, com diferentes intensidades de poda em Pedro Canário, ES.

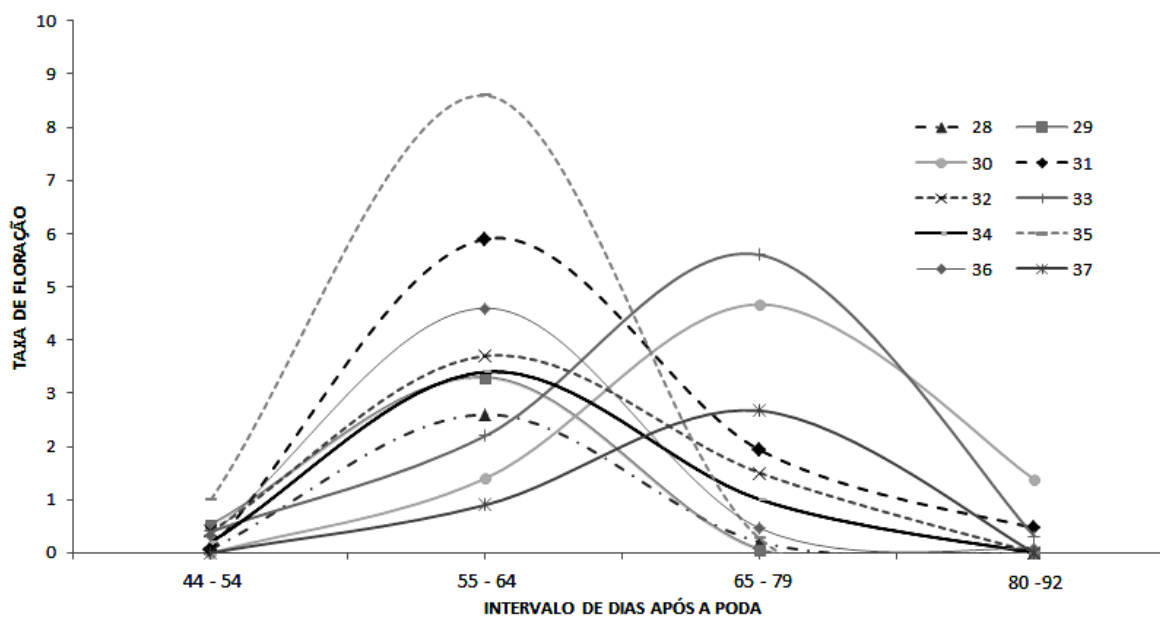


Figura 3. Taxa de floração (TF) dos genótipos selecionados de goiabeira em diferentes intervalos de dias após a poda (2013).

Tabela 3. Número de frutos por ramo podado, em diferentes intervalos de dias após a poda, Campos dos Goytacazes, RJ (2013).

| Genótipo | Número de frutos por ramo podado até o final da fase de crescimento II | | | | | | |
|---------------|--|------|------|------|------|------|------|
| | Dias Após a Poda (DAP) | | | | | | |
| | 64 | 79 | 92 | 107 | 119 | 134 | 150 |
| 28 | 0,2 | 3,8 | 4,0 | 3,7 | 2,7 | 2,0 | 1,7 |
| 29 | 1,2 | 5,4 | 5,8 | 5,3 | 4,5 | 3,6 | 3,3 |
| 30 | - | 2,9 | 5,6 | 4,7 | 2,8 | 1,8 | 1,5 |
| 31 | 0,4 | 8,9 | 7,5 | 7,2 | 5,2 | 5,2 | 5,2 |
| 32 | 0,4 | 5,6 | 4,9 | 3,9 | 3,9 | 3,4 | 3,4 |
| 33 | 0,6 | 9,6 | 9,7 | 7,6 | 6,3 | 6,3 | 6,3 |
| 34 | 0,3 | 4,9 | 4,6 | 3,0 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| 35 | 1,3 | 10,2 | 10,2 | 9,1 | 6,3 | 6,3 | 6,3 |
| 36 | 2,1 | 5,9 | 6,4 | 5,6 | 4,5 | 4,5 | 4,5 |
| 37 | - | 2,4 | 3,4 | 2,6 | 1,9 | 1,1 | 1,3 |
| Média | 0,81 | 5,96 | 6,21 | 5,27 | 4,06 | 3,67 | 3,60 |
| Desvio Padrão | 0,66 | 2,76 | 2,3 | 2,14 | 1,70 | 1,78 | 1,90 |

Para o índice de pegamento de frutos, Figura 4, de um modo geral, foi observada queda até os 134 dias da poda, resultado similar ao obtido por Serrano et al. (2008a), que observaram queda até os 133 dias em goiabeira 'Paluma' no estado do ES. Somente no genótipo 30 foi observada queda até os 150 dias, embora não tenha sido expressiva.

Os genótipos 30 e 37, além de terem tido ciclo de floração mais tardio, tiveram um aumento expressivo no índice de pegamento de frutos somente a partir dos 79 dias e no geral foram os que apresentaram menores valores (14,82% e 22,86% respectivamente). Tal fator é de grande influência na redução da produção, e uma possível razão pode ser a resposta negativa à poda feita no mês de dezembro em vista dos fatores climáticos referentes à época, principalmente em função da temperatura, uma vez que houve irrigação suplementar no local.

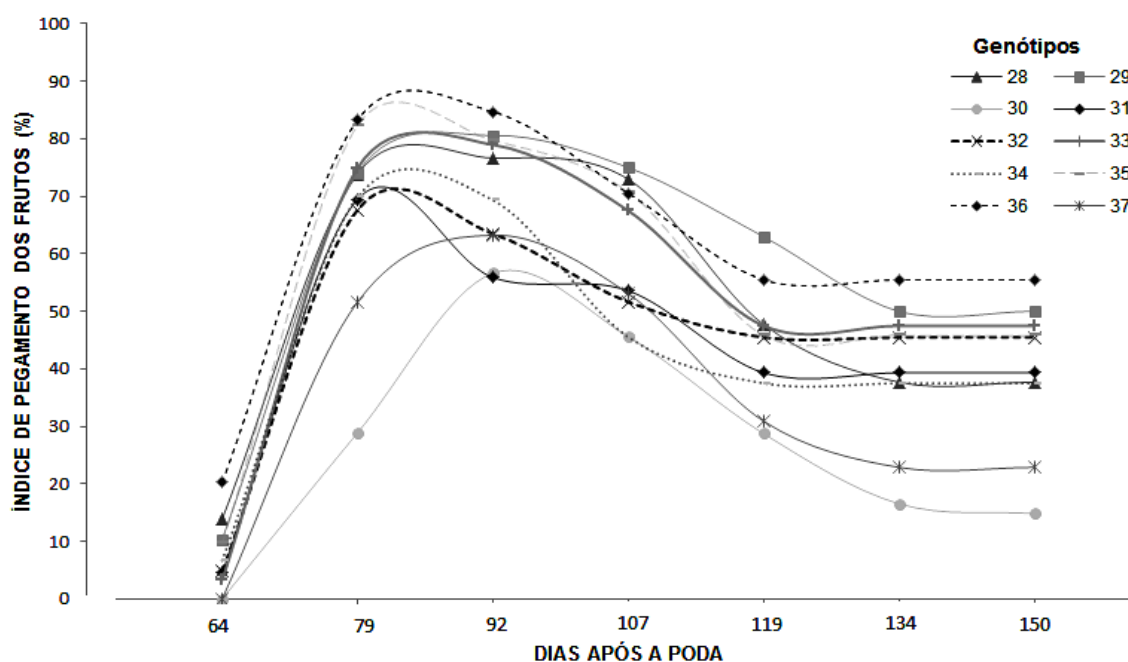


Figura 4. Índice de Pegamento de Frutos (IPF) dos genótipos de goiabeira em diferentes intervalos de dias após a poda, Campos dos Goytacazes, RJ (2013).

Medeiros (2012) verificou efeito significativo entre três épocas de poda em goiabeira 'Paluma' em Quixerê, CE, tendo a poda feita em novembro resultado nas maiores médias de frutos colhidos por planta. Serrano et al. (2008b) obtiveram ciclo mais precoce em poda feita em outubro, período de maior temperatura, em goiabeira 'Paluma', no município de São Francisco de Itabapoana, RJ. Hojo et al. (2007) observaram aumento do ciclo de maturação em poda feita de setembro para dezembro e diminuição do ciclo para poda feita entre março e junho em goiabeira 'Pedro Sato', no município de Lavras, MG.

A Figura 4 mostra que, aos 150 dias, o pegamento máximo e mínimo atingido foi de 55,5% e 14,8% para os genótipos 36 e 30, respectivamente, com uma média geral de 31,2%. Serrano et al. (2008a), em Pedro Canário, ES no final do ciclo de crescimento, obtiveram uma média de 22,8% em poda longa, feita em dezembro. Corrêa et al. (2002) observaram média geral de 32,5% em goiabeiras da variedade 'Pedro Sato' em São Paulo, enquanto Singh e Sehgal (1968) registraram 6,0% em pomares da Índia. Vale ressaltar que além de alto pegamento dos frutos, o genótipo 36 obteve floração mais rápida e concentrada, o que pode ser muito promissor quando se deseja alta produtividade. O inverso foi observado no genótipo 30, que, além do baixo IPF, mostrou ciclo de floração tardio (Tabela 2).

A partir da análise de correlação simples, foi possível verificar efeito dos fatores ambientais, temperatura e pluviosidade, sobre o ciclo fenológico da goiabeira (Tabela 4). Segundo Cruz et al. (2004), o estudo das correlações tem ampla aplicabilidade nos variados campos da pesquisa e a correlação simples tem por função de avaliar a magnitude e o sentido de associação entre diferentes variáveis.

Pelo coeficiente de correlação de Person, não houve correlação significativa entre as variáveis temperatura e pluviosidade e o número de brotações estabelecidas (NBE) e o número de flores abertas (A1). Em contrapartida, foi observada correlação para as variáveis número de botões em fase inicial (BF1), número de botões em pré- antese (BF2), pegamento de frutos (PF), número de frutos em início da maturação (IM) e número de frutos em ponto de colheita (PC).

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis comparadas em genótipos de goiabeira no município de Campos dos Goytacazes, RJ (2013).

| Genótipo | | NBE ¹ | BF1 ¹ | BF2 ¹ | A1 ¹ | PF ¹ | IM ¹ | PC ¹ |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 28 | Tm | 0,03 | 0,45* | 0,33 | 0,16 | 0,23 | -0,43* | -0,57* |
| | Ppt ¹ | 0,03 | 0,21 | 0,04 | -0,15 | -0,07 | -0,29 | -0,36 |
| 29 | Tm | 0,05 | 0,40* | 0,51* | 0,30 | 0,26 | -0,38 | -0,65* |
| | Ppt ¹ | 0,04 | 0,22 | 0,18 | -0,01 | -0,11 | -0,28 | -0,41* |
| 30 | Tm | 0,00 | 0,51* | 0,33 | 0,29 | 0,45* | -0,53* | -0,53* |
| | Ppt ¹ | 0,00 | 0,14 | 0,06 | 0,03 | 0,49* | -0,30 | -0,31 |
| 31 | Tm | 0,01 | 0,47* | 0,33 | 0,21 | 0,33 | -0,42* | -0,40* |
| | Ppt ¹ | 0,01 | 0,19 | -0,08 | -0,18 | 0,05 | -0,32 | -0,31 |
| 32 | Tm | 0,01 | 0,51* | 0,33 | 0,24 | 0,29 | -0,18 | -0,23 |
| | Ppt ¹ | 0,01 | -0,09 | -0,17 | -0,08 | -0,20 | -0,20 | -0,27 |
| 33 | Tm | 0,02 | 0,48* | 0,35 | 0,32 | 0,31 | -0,80* | -0,78* |
| | Ppt ¹ | 0,01 | 0,23 | -0,10 | -0,05 | 0,01 | -0,48* | -0,47* |
| 34 | Tm | 0,00 | 0,45* | 0,30 | 0,24 | 0,20 | -0,18 | -0,26 |
| | Ppt ¹ | 0,00 | 0,18 | -0,12 | -0,13 | -0,17 | -0,26 | -0,21 |
| 35 | Tm | 0,02 | 0,45* | 0,40* | 0,21 | 0,20 | -0,23 | -0,22 |
| | Ppt ¹ | 0,01 | 0,22 | -0,03 | -0,20 | -0,20 | -0,30 | -0,26 |
| 36 | Tm | 0,01 | 0,44* | 0,37 | 0,17 | 0,21 | -0,38 | -0,51* |
| | Ppt ¹ | 0,01 | 0,23 | -0,04 | -0,17 | -0,21 | -0,29 | -0,31 |
| 37 | Tm | 0,02 | 0,43* | 0,23 | 0,22 | 0,27 | -0,23 | -0,23 |
| | Ppt ¹ | 0,02 | 0,16 | -0,16 | -0,20 | 0,12 | -0,23 | -0,21 |

*significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade; ¹Tm: Temperatura média (°C)¹; Ppt: Precipitação pluviométrica; NBE: número de brotações estabelecidas; BF1: Número de botões florais em fase inicial de desenvolvimento; BF2: Pré-antese; A1: antese; PF: pegamento de frutos; IM: Número de frutos em Início da maturação; PC: Número de frutos em ponto de colheita.

Para as variáveis BF2 e PF, foi observada correlação positiva apenas nos genótipos 29 e 35 para BF2 e 30 para PF. Já Para BF1 foi constatada correlação positiva com a temperatura em todos os genótipos observados, indício da influência desse fator climático sobre o lançamento de botões florais. Os genótipos 30 e 33 foram os que sofreram maior influência da temperatura. Não foi verificado efeito significativo da pluviosidade nessa variável.

A ocorrência de genótipos com maior sensibilidade a fatores climáticos como temperatura, principalmente quando se trata de culturas em que é inviável sua produção em ambiente controlado, em muitos casos pode não ser favorável, uma vez que não se pode ter controle sobre estes fatores. Uma das formas de se utilizar desta influência é a realização da poda na época em que os fatores mais sensíveis coincidam com a época climática mais favorável ao seu desenvolvimento.

Para as variáveis IM e PC, houve correlação negativa com a temperatura e pluviosidade, sendo constatada correlação significativa apenas nos genótipos 28, 30, 31 e 33 para IM, esse último com maior correlação com a temperatura (-0,80). Para PC, também não foi observada correlação significativa em todos os genótipos, e o maior resultado permaneceu no genótipo 33, de -0,78 e -0,47, em relação à temperatura e pluviosidade respectivamente. Tal resultado difere dos obtidos por Serrano et al. (2008b), que obtiveram maior número de frutos em goiabeira 'Paluma podada em dezembro quando submetida à irrigação, tendo a pluviosidade sido favorável à produção de frutos.

Neste caso, é possível que o aumento na temperatura e pluviosidade ocorrido no mês de março possa ter levado a um maior aumento na queda de frutos e influenciado na fase de maturação I, uma vez que estes estádios são altamente sensíveis em função da alta atividade metabólica. Com o aumento da umidade e temperatura, há uma maior possibilidade de proliferação de patógenos, e em vista da alta pluviosidade, o controle com uso de inseticidas e fungicidas reduz sua eficácia, além da lavagem do solo reduzindo sua capacidade nutricional podendo minimizar a resistência da planta.

Segundo Cruz et al. (2004), a correlação simples tem a desvantagem de não fornecer informações de suma importância a respeito dos efeitos diretos e indiretos em relação a uma determinada quantidade de variáveis em função de

um caráter dependente, podendo levar a interpretações errôneas em relação a duas variáveis, que podem estar sob influência de outras.

Desse modo, com a decomposição do coeficiente de correlação em efeitos diretos e indiretos através da análise de trilha, tendo como variável fixa BF1 em relação às variáveis temperatura e pluviosidade, Tabela 5, observou-se efeito direto da temperatura na maioria dos genótipos, tendo tal efeito sido ausente somente nos genótipos 29 e 37. Efeito indireto da temperatura via pluviosidade também foi observado, enquanto a pluviosidade não teve efeito direto significativo em nenhum dos genótipos.

Os genótipos 30, 31 e 33, foram os que obtiveram maior influência direta da temperatura, 0,77; 0,72 e 0,74, respectivamente. Estes Valores foram mais elevados que os observados na correlação de Pearson, Tabela 4, podendo ser explicado pelos efeitos indiretos negativos, que são responsáveis pela redução da correlação total (Lúcio et al., 2013). Tal fato pôde ser observado pelo efeito indireto negativo da pluviosidade que ocorreu neste experimento, reduzindo a correlação total (Tabela 5).

Efeito da temperatura sobre a fenologia também foi observado por Souza et al. (2012), que, trabalhando com caracterização fenológica em maracujazeiro azedo no município de Campos dos Goytacazes, RJ, observaram alta correlação e efeito direto da temperatura no número de flores (0,78) e amadurecimento dos frutos (0,66), não observando efeito significativo da pluviosidade sobre essas variáveis.

Principalmente quando se observa efeito direto para determinada variável, a análise de trilha é de suma importância para a caracterização, uma vez que, segundo Vencovsky e Barriga (1992), quando houver semelhança em magnitude e sinal entre o coeficiente de correlação e o efeito direto, tal correlação direta explica a verdadeira associação entre as variáveis.

Tabela 5. Estimativa dos efeitos diretos e indiretos no número de botões em fase inicial (BF1) emitidos por planta, das variáveis temperatura e pluviosidade no ciclo fenológico de diferentes genótipos de goiabeira nas condições do município de Campos dos Goytacazes, RJ.

| Vias de associação | -----Variável----- | |
|--|--------------------|--------------|
| | Temperatura | Pluviosidade |
| | Genótipo 28 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,49* | -0,13 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,10 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,38 |
| Total da correlação | 0,39 | 0,25 |
| | Genótipo 29 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | -0,006 | 0,15 |
| Efeito indireto via pluviosidade | 0,11 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | -0,004 |
| Total da correlação | 0,10 | 0,15 |
| | Genótipo 30 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,77* | -0,31 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,24 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,59* |
| Total da correlação | 0,53* | 0,28 |
| | Genótipo 31 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,72* | -0,31 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,24 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,56* |
| Total da correlação | 0,48* | 0,24 |
| | Genótipo 32 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,61* | -0,09 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,06 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,48* |
| Total da correlação | 0,55* | 0,39 |
| | Genótipo 33 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,74* | -0,11 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,08 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,57* |
| Total da correlação | 0,66* | 0,46 |
| | Genótipo 34 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,49* | -0,15 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,11 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,37 |
| Total da correlação | 0,38 | 0,22 |
| | Genótipo 35 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,54* | -0,18 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,14 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,42* |
| Total da correlação | 0,40 | 0,24 |

Tabela 5, Cont.

| Vias de associação | -----Variável----- | |
|--|---|-----------------------------|
| | Número de botões em fase inicial/planta | Temperatura Pluviosidade |
| | Genótipo 36 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,45* | -0,18 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,14 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,34 |
| Total da correlação | 0,31 | 0,16 |
| | Genótipo 37 | |
| Efeito direto no número de botões emitidos | 0,15 | -0,05 |
| Efeito indireto via pluviosidade | -0,01 | - |
| Efeito indireto via temperatura | - | 0,12 |
| Total da correlação | 0,14 | 0,07 |

*significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo os resultados referentes aos ciclos fenológicos, Tabela 2, taxa de floração, Figura 3, e índice de pegamento de frutos, Figura 4, os genótipos 30, 31 e 33, que apresentaram uma maior duração do ciclo de floração, foram os que tiveram maior influência direta e indireta da temperatura. O genótipo 30, sendo o que sofreu maior influência entre os demais (0,77), foi o que se mostrou mais tardio em todos os ciclos fenológicos observados, tendo pico de floração aos 79 dias e ciclo da poda à colheita de 215 DAP. Nesse caso, provavelmente a menor temperatura ocorrida dos 30 aos 60 DAP (Figura 2) pode ter tido maior efeito no número de botões e, conseqüentemente, no restante dos ciclos fenológicos.

De um modo geral, o fator climático temperatura atuou com alta influência e independência no número de botões, tendo o aumento da temperatura favorecido o aumento no número de botões florais, variável esta que contribui de forma decisiva para o sucesso produtivo da cultura em vista de sua grande importância para todas as fases fenológicas subsequentes. Desse modo, é possível a utilização de estratégias de poda e manejo que possam vir a se beneficiar dessa influência em um pomar.

5.2 Caracterização molecular

Foi observado nível de polimorfismo elevado, uma vez que, nos 17 marcadores selecionados, foram obtidas 216 bandas polimórficas com uma média

de 13 por iniciador (Tabela 6). Mani et al. (2001), avaliando distancia genética em diferentes espécies de *Psidium* spp., obtiveram um total de 234 bandas polimórficas em 31 marcadores ISSR. Silva et al. (2011) avaliando a variabilidade de acessos do gênero *Manihot*, obteve um total de 154 bandas polimórficas em vinte iniciadores avaliados. He et al. (2007) desenvolveram estudos de diversidade com 100 acessos de batata doce, coletados na China, Nova Guiné e Indonésia, com um número de bandas polimórficas de 239, utilizando 14 iniciadores de ISSR, com uma média de 17 bandas polimórficas por iniciador.

Tabela 6. Iniciadores ISSR utilizados para a caracterização molecular em acessos de *Psidium* spp.

| Iniciador | Sequência | T. A. | Número de bandas |
|-----------|--------------------------------|-------|------------------|
| 1 | (CT) ₈ GC | 40 °C | 12 |
| 2 | (TG) ₈ GG | 44 °C | 14 |
| 3 | (GAA) ₈ AA | 44 °C | 13 |
| 4 | (AG) ₈ T | 46 °C | 12 |
| 5 | (GA) ₈ YT | 46 °C | 16 |
| 6 | (GACA) ₄ | 46 °C | 12 |
| 7 | HVH(TG) ₇ | 46 °C | 14 |
| 8 | (CA) ₈ T | 46 °C | 14 |
| 9 | (TC) ₈ G | 46 °C | 13 |
| 10 | (GGAGA) ₃ | 46 °C | 10 |
| 11 | (CA) ₈ ^a | 48 °C | 14 |
| 12 | (GA) ₈ YC | 50 °C | 11 |
| 13 | (AG) ₈ YC | 50 °C | 12 |
| 14 | T (GA) ₈ | 50 °C | 11 |
| 15 | (GA) ₈ C | 50 °C | 13 |
| 16 | TA (CAG) ₄ | 50 °C | 13 |
| 17 | (CA) ₈ G | 50 °C | 13 |

T. A.: Temperatura de Anelamento (°C)

A partir da matriz numérica, foi possível obter a matriz de distâncias entre indivíduos com a utilização do Complemento Aritmético Índice de Jaccard. O método de agrupamento UPGMA foi selecionado por obter maior Coeficiente de Correlação Cofenético - CCC (Sokal e Rohlf, 1962) e menores estresse e distorção, sendo o método que melhor representou a diversidade genética entre os acessos (Tabela 7).

Pessanha (2011), com a utilização de marcadores SSR em goiabeira obteve um CCC de 0,75 pelo método UPGMA e de 0,71 e 0,66 para os métodos do Vizinho mais próximo e Ward, respectivamente. Com a utilização de marcadores RAPD, Pessanha et al. (2011) obtiveram um CCC de 0,92 pelo método UPGMA em relação aos métodos hierárquicos SL (0,90) e Ward (0,82), o que comprova a maior eficiência do método UPGMA, uma vez que, segundo Mohammad e Prasanna (2003), quanto maior o CCC, menor a distorção no agrupamento dos acessos.

Tabela 7. Coeficiente de correlação cofenético (CCC), estresse e distorção dos Métodos Ward, UPGMA e Vizinho mais Próximo (SL)

| | WARD | UPGMA | SL |
|----------------------|-------------|--------------|-----------|
| CCC | 0,80** | 0,90** | 0,85** |
| ESTRESSE (%) | - | 5,82 | 15,8 |
| DISTORÇÃO (%) | - | 0,34 | 26,83 |

** Significativo ao nível de 1% pelo Teste t.

De acordo com a matriz de distância dos acessos de *Psidium* spp. avaliados, houve uma variação de 0,30 a 0,90. Corrêa et al. (2011), avaliando genótipos de goiaba e araçá, provenientes de vários estados do Brasil, encontraram similaridade variando de 0,20 a 0,98, por meio de marcadores AFLP. Valdés-Infante et al. (2007) encontraram similaridade variando de 0,17 a 0,96 entre 40 acessos de uma coleção cubana de goiabeira avaliada com oito marcadores microssatélites. Tais informações são indícios da distância genética entre os grupos e da alta variabilidade entre e dentro das espécies na região.

Considerando o resultado obtido pelo método de agrupamento UPGMA com os 37 acessos, houve formação de cinco principais grupos claramente definidos (Figura 5).

Os acessos de araçá da espécie *Psidium cattleianum* ficaram alocados nos grupos I e II. O primeiro grupo correspondeu aos de número 1 ao 17. Já no segundo grupo, ficaram os acessos de número 18 ao 26, sendo o grupo de menor variabilidade, tendo alocado, entre todos os acessos testados, os de menor distância (19 e 21), com 0,30. Vale ressaltar que neste grupo ficaram presentes

apenas acessos de araçauína, coletados na zona urbana do município de Campos dos Goytacazes - RJ, cuja característica fenotípica mais notável é a coloração roxa escura dos frutos. Essa característica o difere da maioria dos acessos do grupo I, que, com exceção dos genótipos 11, 12 e 17, têm frutos com coloração amarela, além de terem sido coletados em outras cidades da região. Mani et al. (2011), utilizando marcadores moleculares RAPD em acessos de *Psidium* na Índia, também separaram em subgrupos, diferentes variedades de *P. cattleyanum*.

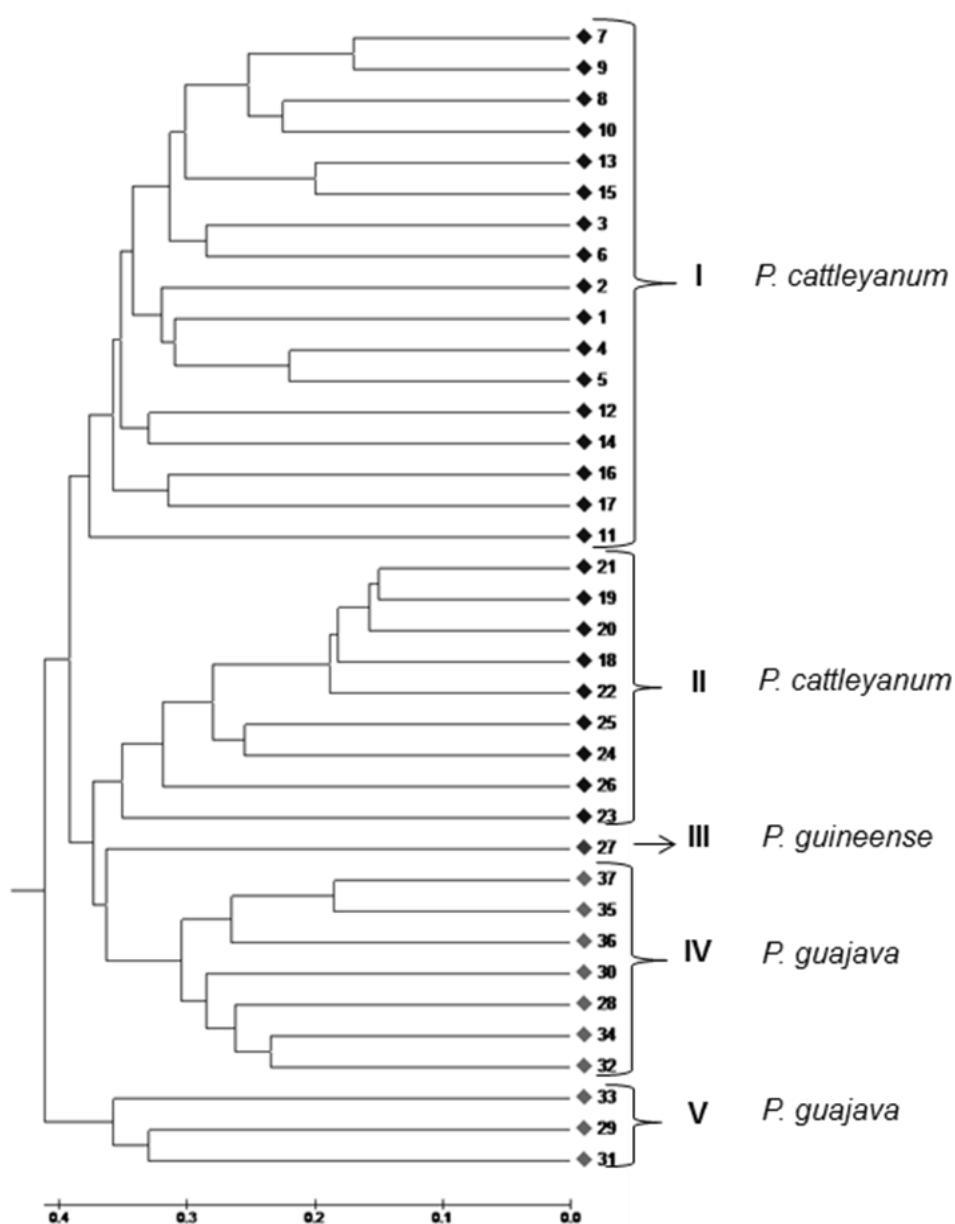


Figura 5. Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA e complemento aritmético do Índice de Jaccard em 37 indivíduos do gênero *Psidium* spp.

No grupo II, foi observada, dentro da espécie *P. cattleyanum*, maior proximidade com a goiabeira, o que pode ser promissor, uma vez que foi constatada resistência desta espécie ao nematoide *Meloidogyne enterolobii* (Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2009; Miranda et al., 2012; Martins et al., 2013). Tal espécie apresenta comprovadas diferenças quanto à distância evolutiva em relação à goiaba, principalmente por ser poliploide, tendo sido constatados acessos tetraploides ($2n=44$) (Costa e Forni-Martins, 2007), heptaploides ($2n=77$) (Singhal et al., 1980) e octaploides ($2n=88$) (Atchinson, 1947). Ainda assim ela pode ser promissora pela sua alta variabilidade, comprovada pela sua separação em grupos claramente definidos, levando à necessidade de maiores estudos sobre a sua estrutura morfológica, citológica e molecular.

No grupo III está o acesso 27, da espécie *P. guineense* Sw (araçá do campo). Entre os araçás, foi o que ficou mais próximo da goiaba (distância média de 0,73), o que pode confirmar estudos conduzidos por Costa e Forni-Martins (2007), que verificaram o mesmo nível de ploidia que a goiaba ($2n=22$), podendo facilitar cruzamentos interespecíficos.

De um modo geral, os acessos de araçá alocados no grupo II e III apresentaram maior proximidade com a goiabeira, o que demanda maiores esclarecimentos e conhecimentos sobre a espécie e seu potencial uso em Programas de Melhoramento visando à resistência ao Nematóide e ao *Fusarium*.

Os genótipos de goiabeira selecionados por Campos (2012) e por Quintal (2013) ficaram alocados do grupo IV e V, confirmando sua alta divergência. Nesses grupos, os genótipos 35 e 37 (Grupo IV) apresentam as menores distâncias genéticas (0,37). Essa menor distância e, conseqüentemente, menor variabilidade pode ser explicada, entre outros fatores, por se tratar de genótipos provenientes de autofecundação (Pessanha, 2011). Já os genótipos 29, 31 e 33 (Grupo V) são os que apresentaram maiores distâncias na espécie, com média de 0,71.

Nos grupos IV e V, embora sejam provenientes de um programa de melhoramento com relativo grau de seleção, pode ser observada, de um modo geral, alta variabilidade entre eles, o que pode ser favorecido pelo sistema misto de cruzamento, que inclui tanto a autofecundação quanto a polinização cruzada entre plantas da espécie. Corrêa et al. (2011), avaliando a similaridade genética

com a utilização de AFLP, obtiveram a formação de diferentes agrupamentos em acessos de goiaba coletados em diferentes regiões do Brasil. Sanabria et al. (2006), com a utilização de 74 marcadores polimórficos de RAPD, reportaram também alta diferenciação genética (0,355) entre 53 acessos de goiabeiras colombianas.

No grupo V, o genótipo 33, por ter maior distância genética entre os demais, poderia ser promissor em cruzamentos com os genótipos 35 ou 37 (grupo IV), podendo gerar indivíduos com maior produção, aliados a um alto teor de sólidos solúveis e de vitamina C, de acordo com estudos de Campos (2012). Outra opção de cruzamento promissor e também proposta por Campos (2012) seria entre os genótipos 29 e 31, 36 e 31 (Grupo V), pois, além de apresentarem alta divergência, poderiam proporcionar frutos grandes, com maior peso de polpa e de placenta, ideais para a indústria de alimentos.

A princípio, esses cruzamentos seriam os mais promissores para futuras hibridações dentro de um programa de melhoramento genético da goiabeira. Uma vez que de acordo com Falconer (1987), para a seleção de genitores, deve-se aliar seu bom desempenho com a alta divergência genética entre eles.

6. CONCLUSÕES

Há variação na duração das fenofases nos diferentes genótipos testados, sendo a temperatura um fator de alta influência em tal variação.

Os genótipos de araçá dos grupos II e III são geneticamente mais próximos da goiabeira, podendo ser promissor seu uso para obtenção de híbridos interespecíficos.

A base genética ampla entre os genótipos de goiabeira viabiliza cruzamentos com genótipos superiores de alta divergência.

A técnica ISSR é eficiente na identificação de polimorfismo de DNA em indivíduos do gênero *Psidium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E. J., Santos, J. M., Martins, A. B. G. (2009) Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 44: 421-423.
- Allard, R. W. (1960) *Princípios do Melhoramento Genético de plantas*. São Paulo: Melhoramentos, 485p.
- Alves, J. E., Freitas, B. M. (2007) Requerimento de polinização da goiabeira. *Ciência Rural*, 37 (5):1281-1286.
- Araujo, D.G. (2000) *Caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro (Theobroma grandiflorum Wied exspreng schum) utilizando descritores de fruto*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras. – UFLA, 65p.
- Atchison, E. (1947) Chromosome numbers in the *Myrtaceae*. *American Journal of Botany*. St. Louis, 34:159–164.
- Balasubrahmanyam, V. R. (1959) Studies on blossom biology of guava. *Indian Journal of Horticulture*, Nova Délhi, 16:69-75.
- Bezerra, J. E. F., Lederman, I E., Silva Junior, J. F., Proença, C. E. B. (2006) Araçá. In Vieira, R. F., Costa, T. S. A., Silva, D. B., Ferreira, F. R., Sano, S. M.

- (Eds). *Frutas nativas da região Centro- Oeste do Brasil*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 42-62.
- Borém, A., Caixeta, E. T. (2009). *Marcadores moleculares*. 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 532 p.
- Borém, A. (2009) Aplicação dos marcadores moleculares no melhoramento. *In*: Borém, A., Caixeta, E. T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV, p. 95-102.
- Boti, J. B. (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 – MG, Universidade Federal de Viçosa- UFV, 57p.
- Brandão, M., Laca – Buendia, J. P., Macedo, J. F. (2002). *Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte: EPAMIG, 528 p.
- Campos, B.M. (2012) *Redes Neurais Artificiais e WARD – MLM aplicados à análise da divergência genética em goiaba (Psidium guajava L.)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 84 p.
- Campos, B. M., Viana, A. P., Quintal, S. S. R., Gonçalves, L. S. A., Pessanha, P. G. O. P. (2013) Quantificação da divergência genética entre acessos de goiabeira por meio da estratégia WARD-MLM. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 35(2):087-094.
- Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B., Brito, G. G., Sakiyama, N. S. (2009) Tipos de Marcadores Moleculares. *In*: Borém, A., Caixeta, E. T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV, p. 11-93.
- 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 (4):281-284.

- Corrêa, M. C. M., Prado, R. M., Natale, W., Silva, M.A.C., Pereira, L. (2002) Índice de pegamento de frutos em goiabeiras. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(3):783- 786.
- Corrêa, L. C. 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*, Jaboticabal. SP, 33(3):859-867.
- Costa, I. R., Forni-Martins, E. R. (2007) Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Londres, 155:571–580.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., Carneiro, P. C. S. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 480p.
- Cruz, C. D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Maringá, 35(3):271-276.
- Danner, M. A., Citadin, I., Sasso, S. A. Z., Sachet, M. R., Ambrósio, R. (2010) Fenologia da floração e frutificação de Mirtáceas nativas da Floresta com Araucária. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 32(1):291-295
- Dasarathy, T. B. (1951) The guava. *Madras Agriculture Journal*, India, 38:521-527.
- Doni, M.E. (1974) *Florescimento e frutificação da mangueira (Mangifera indica L.) variedade Haden*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Esalq, 50p.
- Doyle, J. J., Doyle, J. J. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Alemanha, 12:13-15.
- Falconer, D. S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos da Silva. Viçosa: Editora UFV, 279p.
- Faleiro, F. G. (2007) *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 102p

- Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ed. Brasília: EMBRAPA/ CENARGEN, 220p.
- Forsthofer, E. L., Silva, P. R. F., Argentina, G. Strieder, M., Suhre, E., Rambo, E. (2004) Desenvolvimento fenológico e agrônômico de três híbridos de milho em três épocas de semeadura. *Ciência rural*, Santa Maria –RS, 34(5):1341-1348.
- Franzon, R. C., Campos, L. Z. de O., Proença, C. E. B., Sousa-Silva, J. C. (2009) *Araçás do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. MAPA, 48p.
- Freire, J. M., Azevedo, M. C., Cunha, C. F., Silva, T. F., Resende, A. S. (2013) Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em área fragmentada de Mata Atlântica em Itaboraí, RJ. *Pesquisa florestal brasileira*, Colombo, 33 (75):243-252.
- Gressler, E. Pizo, M. A.; Morellato, P. C. (2006) Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, Feira de Santana – BA, 29(4):509-530.
- Gomes, V. M., Souza, R. M., Mussi-Dias, V., Silveira, S. F., Dolinski, C. (2011) Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology*, USA, 158:45-50.
- Gomes filho, A., Oliveira, J. O. de, Viana, A. P., Siqueira, A. P. O., Oliviera, M. G., pereira, M. G. (2010) Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, 32 (4):627-633.
- Gomes, V. M., Souza, R. M., Silveira, S. F., Almeida A. M. (2013) Guava Decline: Guava decline: effect of root exudates from *Meloidogyne enterolobii*-parasitized plants on *Fusarium solani* in vitro and on growth and development of guava seedlings under controlled conditions. *Journal of Plant Pathology*. Italia, 137:393–401.
- Gonzaga Neto, L., Soares, J.M., Teixeira, A.H.C., Moura, M.S.B. (2001) *Goiaba: Produção - aspectos técnicos*. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 72p.

- Goulão, L., Oliveira, C. M. (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122:81-89.
- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F. Holst, B. K., Landrum, L., Matsumoto, K., Mazine, F. F.; Lughadha, E. N., Proença, C., Soaressilva, L. H., Wilson, P; G., Lucas, E. - *World Check-List of Myrtaceae*: <http://apps.kew.org/wcsp/> em: 10/08/13
- He, X., Liu, Q., Ishiki, K., Zhai, H., Wang, Y. (2007) ISSR analysis of genetic diversity and relationships among sweet potato (*Ipomoea batatas*) landraces in China. *Plant Genetics and Breeding*, Oxfordshire, Reino Unido, 150:35-41.
- Hojo, R. H., Chalfun, N. N.J., Hojo, E. T. D., Souza, H. A., Paglis, C. M., São José, A. R. (2007) Caracterização fenológica da goiabeira 'Pedro Sato' sob diferentes épocas de poda. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 29(1):020-024.
- IBGE (2013) *Produção Agrícola Municipal 2011*. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 15, jul. 2013.
- INMET (2013) *Instituto Nacional de Meteorologia, Boletim agroclimatológico mensal*. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em:<<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=agrometeorologia>>. Acesso em: 10, ago. 2013.
- Landrum, L. R., Kawasaki, M. L. (1997) The genera of Myrtaceae in Brazil: An illustrated synoptic and identification keys. *Britonia*, New York, 49(4):508 – 536.
- Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia Vegetal*. Tradução de Carlos Henrique Brito de Assis Prado. São Carlos: Rima Artes e Textos, 531p.
- López García, J., Pérez-Pérez, R. (1977) Effect of pruning and harvesting methods on guava yields. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 61 (2):148-151.

- Lúcio, A. D. Storck, L., Krause, W. Gonçalves, R. Q., Nied, A. H. (2013) Relações entre os caracteres de maracujazeiro-azedo. *Ciência Rural*, Santa Maria, 43(2): 225-232.
- Mani, A., Mishra, R., Thomas, G. (2011) Elucidation of Diversity among *Psidium* Species using Morphological and SPAR Methods. *Journal of Phytology*, Allahabad, India, 3(8):53-61.
- Manica, I. (2000) *Frutas nativas, silvestres e exóticas*. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 327p.
- Martins, L. S., Musser, R. S., Souza, A. G., Resende, L. R., Maluf, W. R. (2013) Parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* em espécies de *Myrtaceae*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 35(2): 477-484.
- Medeiros, P. V. Q. (2012) *Épocas e intensidades de poda na produção e qualidade de frutos de goiabeira em Quixeré –CE*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Mossoró– RN, Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFRSA, 86 p.
- Miranda, G. B. (2011) *Métodos de avaliação e caracterização da resistência de Psidium spp. a Meloidogyne enterolobii*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 82 p.
- Miranda, G. B., 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*, Campinas, 71(1):52-58.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro by polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350.
- Mohammad, S. A., Prasanna, B. M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, Madison, 43:1235-1248.
- Morales, R. G. E. *Divergência genética entre cultivares de morangueiro por meio de marcadores moleculares e caracteres morfoagronômicos*. 2010.

Dissertação. Mestrado e produção vegetal. Universidade estadual do centro-oeste. Guarapuava, PR. 69p.

Padilha-Ramírez, J. S., González-Gaona, E., Esquivel-Villagrana, F., Mercado-Silva, E., Hernandez-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. (2002). Caracterización de Germoplasma Sobresaliente de Guayabo de Lá Región. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24 (4):393-399.

Pereira, F. M., São José, A. R. (1987) Estudo do desenvolvimento dos frutos da goiabeira 'Paluma' e 'Rica'. *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 9, Campinas, SP. Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2:469-474.

Pereira, F. M. (1995). *Cultura da Goiabeira*. Jaboticabal, SP: Funep, 47p.

Pereira, F. M., Nachigal, J. C. (2002) Melhoramento da goiabeira. In: Bruckner, C. H. (Ed.) *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa: Editora UFV, p. 1-18.

Pereira, M., Carvalho, C. A. Nachtigal, J. C. (2003) Século XXI: Nova Cultivar de Goiabeira de Dupla Finalidade. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 25(3):498-500.

Pereira, F. M., Natchigal, J. C. (2003). Goiabeira. In: *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*, Brucker, C. H. (Ed.) Viçosa: Editora UFV, p. 267-289.

Pereira, F. O. M., 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*, São Paulo, 33:176-181.

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 em acessos de *Psidium* spp. via marcadores moleculares RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 33:129-136.

Pessanha, P. G. O. (2011) *Pré-melhoramento da goiabeira (Psidium guajava L.) visando ao desenvolvimento de cultivares adaptadas ao Norte Fluminense*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 86 p.

- Pommer, C. V., Murakami, K. R. N., Watlington, F. (2006) Goiaba no mundo. *O Agronomico*. Campinas - SP, 58(1/2):22-26.
- Raseira, M. C. B., Raseira, A. (1996) Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleyanum*. *Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária*. Pelotas, RS: CFACT, 95p.
- Quintal, S. S. R. (2013) *Melhoramento da goiabeira P. guajava, via metodologia de modelos mistos*. Tese (Doutorado em Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 193p.
- Rathore, D. S. (1976) Effect of season in the growth and chemical composition of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Horticultural Science*, Ashford, 51(1):41-47.
- Rakoczy-Trojanowska, M.; Bolibok, H. (2004) Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Celular and Molecular Biology Letters*, Wroclaw, Polônia, 9:221-238.
- Ray, P. K. (2002) Guava. In: *Breeding Tropical and Subtropical Fruits*. Springer, Nova Delhi. p.143-154.
- Rego. G. M. Lavoranti, O. J. Assumpção Neto, A. (2006). *Monitoramento dos estádios fenológicos reprodutivos da cerejeira do mato*. Comunicado técnico 177. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 4p.
- Risturecci, A. M., Duva, I. M. F., Rohde, W., Billotte, N. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, EUA, 5:745-748.
- Rozane, D. E., Couto, F. A. A. (Ed.) (2003) *Cultura da goiabeira: Tecnologia e mercado*. Viçosa: Editora UFV, EJA, 402p.
- Sanabria, H. L., García, M., Díaz, H., Muñoz, J. E. (2006) Caracterización molecular con marcadores RAM de arboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca. *Acta Agronomica*, Colombia, 55:27-38.
- Santana, I. B. B., Oliveira, E. J., Soares Filho, W. S., Ritzinger, R., Amorim, E. P., Costa, M. A. P. C., Moreira, R. F. C. (2011) Variabilidade genética entre

acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 33(3):868-876.

Santos, P. A. (2012) *Manejo do jenipapeiro (Genipa americana L.) para produção de madeira e avaliação da diversidade genética por meio de marcadores moleculares*. Dissertação (Mestrado em recursos genéticos vegetais) – Cruz das Almas - BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, 40p.

Saiki, R. k., Scharf S., Falooana F., Mullis, K. B., Horn, G. T. Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Washington 230:1350-1400.

Sanchotene, M. do C.C (1989). *Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana*. Porto Alegre: SAGRA, 304p.

Serrano, L. A. L., Marinho, C. S., Lima, I. M., Martins, M. V. V., Ronchi, C. P., Tardin, F. D. (2008a) Fenologia da goiabeira 'Paluma' sob diferentes sistemas de cultivos, épocas e intensidades de poda de frutificação. *Bragantia*, Campinas - SP, 67(3):701-712.

Serrano, L. A. L., Marinho, C. S., Silva, M. G. Tardin, F. D. (2008b) Características fenológicas e produtivas da goiabeira 'Paluma' podada em diferentes épocas e intensidades no Norte Fluminense. *Revista Ceres*, Viçosa – MG, 55(5):416-424.

Silva, F. J. T., Schwade, M. R. M., Webber, A, C. (2007) Fenologia, biologia floral e polinização de *Erythroxylum cf macrophyllum* (Erythroxylaceae), na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre – RS, 5:186-188.

Silva, K. V. P., Alves, A. A. C., Martins, M. I. G., Melo, C. A. F., Carvalho, R. (2011) Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 46(9):1082-1088.

Simão, S. (1980) Botânica e biologia da mangueira. *Anais do Simpósio Brasileiro sobre a cultura da Mangueira*, 1, Jaboticabal, SP, p.13-21.

- Singh, R., Sehgal, O. P. (1968) Studies on the blossom biology of *Psidium guajava* L. (guava); 2, Pollen studies stigmal receptivity pollination and fruit set. *Indian Journal of Horticulture*, 25:52-59.
- Singhal V. K., Gill B. S.; Birr S. S. (1980) Chromosome number reports LXVII. *Taxon*, Eslováquia, 29:355-357.
- Sobral, M., Proença, C. Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. (2013) *Myrtaceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br> em: 10/08/13.
- Soubihe Sobrinho, J. (1951) *Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (Psidium guajava L)*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – São Paulo- SP, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz – ESALQ, 166p.
- Souza, S. A. M., Martins, K. C., Azevedo, A. S., Pereira, T. N. S. (2012) Fenologia reprodutiva do maracujazeiro-azedo no município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42 (10):1774-1780.
- Spooner D., Van Treuren R., De Vicent, M. C. (2005) *Molecular markers for genebank management*. IPGRI: [http:// www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/](http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/) em: 12/06/12.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1962) The comparison of dendograms by objective methods. *Taxonomy*, Berlim, 11:33-40.
- Teixeira, A. H. C., Bassoi, L. H., Reis, V. C. S., Silva, T. G. F., Ferreira, M. N. L., Maia, J. L. T. (2003) Estimativa do consumo hídrico da goiabeira, utilizando estações agrometeorológicas automática e convencional. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal- SP, 25(3):457-460.
- Valdes-Infante, J., Rodriguez, N. N., Becker, D., Velázquez, B., Sourd, D., Espinhosa, G., Rohde, W. (2007) Microsatelite Characterization of guava (*Psidium guajava* L) Germoplasm Collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*, Cuba, 28:61-67.
- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N. N., Velásquez, B., Rivero, D., Martínez, F., Espinosa, G., Risterucci, A. M., Billotte, N., Becker, D., Rohde, W. (2010).

Simple Sequence Repeats (SSRs) for Diversity Characterization of Guava (*Psidium guajava* L.) *Acta Horticulturae*, Bélgica, 849:152-162.

Valdés-Infante, J., Becker, D.; Rodriguez, N., Velazquez, B., Gonzalez, G., Sourd, D., Rodriguez, J., Ritter, E., Rohde, W. (2003) Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L) establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. *Journal of Genetics of Breeding*, 57:349-358.

Vencovsky, R., Barriga, P. *Genética biométrica no fitomelhoramento*. (1992) Ribeirão Preto: SBG, 496 p.

Vieira, E. A., Fialho, J. F., Faleiro, F. G., Fukuda, W. M. G., Junqueira, N. T. V. (2005) Variabilidade genética para caracteres morfológicos entre acessos do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados. C-ROM *Anais do Congresso Brasileiro de Mandioca*, 11, Campo Grande, MS, Brasil.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; M.; Lee, T. van de; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Pelman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Researc*, Londres, 23: 4407-4414.

Willians, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J.A., Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Reserch*, Londres, 18:6531-6535.

Wilson, P. G., O'brien, M. M., Gadek, P.A., Quinn, C. J. (2001) Relationships within Myrtaceae sensu lato based on amatk phylogeny. *American Journal of Botany*, St. Louis, 88(11):2013-2025.

Wikler, C., Pedrosa – Macedo, J. H., Vitorino, M. D., Caxembu, M. G., Smith, C. W. (2000) Strawberry Guava (*Psidium cattleianum*) – prospects for Biological Control. *Anais do International Symposium on Biological control of weeds*, 10. Bozena, p. 667-671.

Wolfe, A.D.; Liston, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J. (Ed.).

Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. Boston: Kluwer, 1998.
p.43-86.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, San Diego, 20:176-183.