



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SERTÃO
PERNAMBUCANO
BACHARELADO EM AGRONOMIA**

**Estimativa da taxa de polinização cruzada em goiabeira da
variedade 'Paluma' por meio de marcadores microssatélites**

SONIANE RODRIGUES DA COSTA

Petrolina, PE
2017

SONIANE RODRIGUES DA COSTA

Estimativa da taxa de polinização cruzada em goiabeira da variedade 'Paluma' por meio de marcadores microssatélite

Trabalho apresentado como requisito para conclusão de curso no IF SERTÃO-PE campus - ZONA RURAL, referente a obtenção do título de engenheira agrônoma.

Orientadora. M.Sc. Mary Ann Saraiva Bezerra Fornelos Pereira.
Coorientador: PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos.

Petrolina, PE
2017

BANCA EXAMINADORA
(MEMBROS)

Professor. M.Sc. Danillo Olegário Matos da Silva
(Faculdade Maurício de Nassau)

Professora. Dra. Flávia Cartaxo Ramalho Vilar
(IF-Sertão Pernambucano, Campus Petrolina Zona Rural)

Professora. M.Sc. Mary Ann Saraiva Bezerra Fornelos Pereira
(IF-Sertão Pernambucano, campus Petrolina Zona Rural)
(Orientadora)

Dedico a minha mãe por sempre me incentivar a buscar o
melhor para minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tem me iluminado e dado forças para concluir mais esta etapa na minha vida;

Agradeço ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano- Campus Petrolina Zona Rural pela oportunidade de conclusão do curso, a todos os docentes dessa referida instituição pelo aprendizado e por muitas vezes serem compreensivos com a turma AG-05;

A toda minha família que sempre torceu e confiou em mim, me dando força, e compreendendo a minha ausência;

Aos amigos da graduação por mantermos uma carinhosa amizade;

Ao meu coorientador PhD. Carlos Antonio Fernandes Santos pela confiança, amizade e atenção e por ter me proporcionado concluir mais um curso sob a sua orientação.

A Minha orientadora Msc. Mary Ann Saraiva Bezerra Fornelos Pereira pela amizade, carinho e atenção;

Aos colegas do laboratório de genética da Embrapa semiárido, pelo carinho e torcida;

A todos que de alguma forma estiveram presentes comigo durante esses anos.

Muito obrigada!

RESUMO

A cultura da goiabeira ocupa importante espaço no agronegócio do Brasil, sendo um dos maiores produtores mundiais de goiaba, devido a características apreciáveis do seu fruto, como sabor, aspecto, riqueza em nutrientes e elementos funcionais. O presente estudo teve como objetivo estimar a taxa de polinização cruzada de goiabeira em áreas de produtores por meio de marcadores microssatélites. Foram coletadas folhas jovens de plantas oriundas de polinização cruzada da variedade Paluma, sendo as mesmas identificadas e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da extração de DNA. A quantificação e integridade do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%. Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6% e corado com brometo de etídio. Foram investigadas 86 progênies, sendo analisadas para 10 locos de microssatélites. O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de cruzamento misto (MLTR). A taxa de cruzamento multiloco (t_m) foi de 0,803 e uniloco (t_s) foi 0,792. A estimativa da diferença entre a taxa de multiloco e uniloco foi de 0.011 ($\pm 0,064$), sugerindo a ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados e a presença de endogamia biparental nas populações descendentes. Essa baixa taxa representada pela diferença entre a taxa de fecundação cruzada multiloco e uniloco, ($t_m - t_s$) indica que a goiabeira 'Paluma' nas áreas de produtores estão se reproduzindo por fecundação cruzada. A correlação de paternidade, que mede a proporção de indivíduos gerados biparentais (irmãos completos) foi baixa ($r_p=0,228$), sugerindo que 22,8% dos indivíduos das progênies são filhos do mesmo doador de pólen. Esses resultados indicam que a goiabeira da variedade Paluma é uma espécie predominante de polinização cruzada, combinando autofecundação e cruzamentos.

Palavras-chave: *Psidium guajava*, MLTR, goiaba

ABSTRACT

In Brazil, the culture of guava occupies important space in agribusiness in the country, one of the largest producers of guava, due to appreciable characteristics of the fruit, such as flavor, appearance and rich in nutrients and functional elements. The present study estimate the cross-pollination rate of guava in producer areas by means of microsatellite markers. The fruits were collected in areas of N5 and Bebedouro producers belonging to the city of Petrolina-PE four families from natural pollination of guava of the Paluma variety. Young leaves of plants were collected from the fruits collected, and they were identified and conditioned in a freezer at -80°C until the extraction time. DNA quantification and integrity were performed on 0.8% agarose gel. The amplification products were separated on 6% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. Eighty - six progenies were analyzed and analyzed for ten microsatellite loci. The breeding system was analyzed on the basis of mixed crossing models (MLTR). The cross-talk rate (t_m) was 0.803 and uniloco (t_s) was 0.792. The estimate of the difference between the multiloco and uniloco taxa was 0.011 (± 0.064) suggesting the occurrence of crossing between related individuals and the presence of biparental endogamy in the descendant populations. This low rate represented by the difference between the multiloco cross fertilization rate and uniloco, ($t_m - t_s$) indicates that the 'Paluma' guava in the producer areas are reproducing by cross fertilization. The paternity correlation, which measures the proportion of biparental generated individuals (complete siblings), was low ($r_p = 0.228$) suggesting that 22.8% of progeny individuals are children of the same pollen donor. These results indicate that the guava variety is a redominant species of cross-pollination, combining self-fertilization and crosses.

Key words: *Pisdium guajava*, MLTR, guava

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Aspectos botânicos da goiabeira.....	10
2.2 Melhoramento da goiabeira.....	11
2.3. Variedade Paluma.....	12
2.4. Sistema reprodutivo.....	13
2.5. Marcadores moleculares.....	15
2.6. Marcadores microssatélites	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Coleta das amostras.....	19
3.2 Beneficiamento e semeadura.....	19
3.3 Extração de DNA e genotipagem com marcadores microssatélites....	20
3.4 Análises estatística dos dados.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS	26
ANEXOS	31

1. INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajava*), pertence à família Myrtaceae, que compreende aproximadamente 130 gêneros e 3.000 espécies de árvores e arbustos distribuídos, principalmente, nos trópicos e subtropicais (WATSON e DALLWITZ, 2007). O Brasil é um grande representante dessa diversidade, onde um total de 60 espécies de *Psidium* pode ser encontrado, sendo 47 endêmicas (SOBRAL et al., 2016).

A goiabeira é originada da região tropical do continente americano, com centro de origem, provável, na região compreendida entre o Sul do México e o Norte da América do Sul (PEREIRA et al., 2003). A faixa climática favorável a esta cultura dá-se próxima à linha do Equador, em locais de baixa altitude, com temperaturas médias entre 24 e 28 °C, umidade relativa média entre 37 e 96% e precipitação pluviométrica em torno de 1.000 mm/ano (MANICA et al., 2000; GOMES et al., 2011).

É uma espécie de grande valor econômico, sendo uma das importantes frutas do Brasil, devido a sua forma de consumo, que pode ser tanto *in natura* como industrializada. O fruto da goiabeira varia de tamanho, formato e sabor, dependendo da variedade (YAN et al., 2006, CORRÊA, 2010). Além do mais, possuem bom teor de vitaminas A, B e C (ácido ascórbico) e dos minerais, ferro, cálcio e fósforo. O conteúdo de vitamina C de goiaba chega a superar o conteúdo dessa vitamina nos sucos cítricos (POMMER et al., 2013).

As flores da goiabeira são hermafroditas, apresentando taxa de autofecundação significativamente maior que a taxa de polinização cruzada (SOUBIHE SOBRINHO, 1951). Medina (1988) observou que a taxa de cruzamento em goiabeira é considerada alta, variando entre 25,7 a 41,3%, considerando-se 36,6% como índice médio, caracterizando assim a goiabeira como uma espécie de reprodução mista (autógama-alógama).

Para programa de melhoramento e conservação genética é fundamental a determinação do sistema reprodutivo das espécies. A modalidade de reprodução e os mecanismos de dispersão de pólen e sementes desempenham um papel importante na composição genéticas das populações, sendo que o conhecimento de sistema de acasalamento é fundamental, pois permitem estabelecer estratégias que

otimizem a amostragem da variabilidade genética, a adoção de modelos genético-estatístico apropriados para a estimativa de parâmetros genéticos, bem como para definição de estratégias para a conservação (SANTOS et al., 2011).

Em plantas hermafroditas o sistema de reprodução pode combinar autofecundações com cruzamentos e a parte referente aos cruzamentos, podem ocorrer de forma aleatória ou cruzamentos correlacionados (MORI, et al. 2013). Como consequência, progênies de polinização aberta podem ser compostas por misturas de indivíduos com diferentes graus de parentescos, tais como: irmãos de autofecundação, irmãos-completos, meios-irmãos. (SQUILLACE, 1974; RITLAND, 1989).

Segundo Mori et al. (2013) métodos baseados em análises moleculares elucidam pontos importantes para o manejo e conservação de população, em que o ponto importante a ser conhecido é a forma como as espécies recombina seus genes a cada evento reprodutivo e formam as populações descendentes.

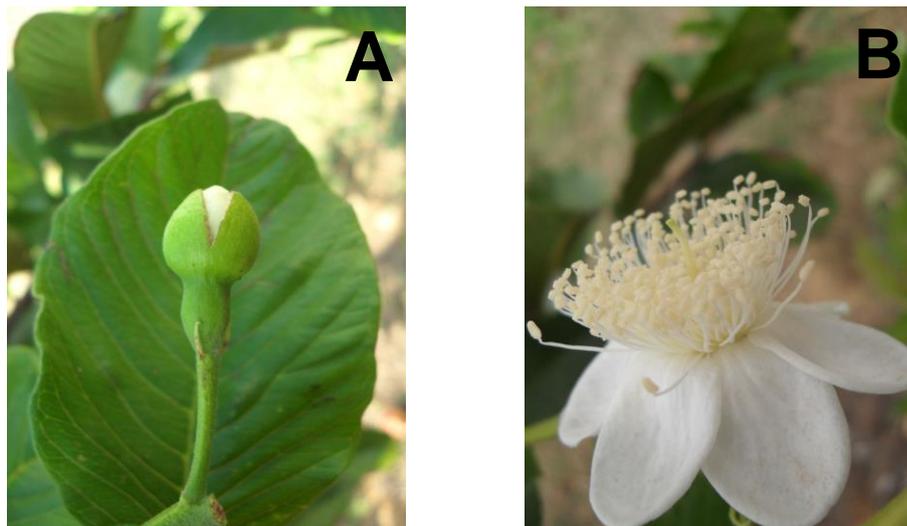
O presente estudo teve como objetivo estimar a taxa de polinização cruzada de goiabeira Paluma em áreas de produtores por meio de marcadores microssatélites para orientar trabalhos de melhoramento na espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos botânicos da goiabeira

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é a fruteira mais importante do gênero *Psidium*, sendo nativa do Norte da América do Sul e amplamente distribuída nas regiões tropicais da América (Risterucci et al., 2005). O gênero *Psidium* é Neotropical, com distribuição nativa do sul do México até a província de Buenos Aires, na Argentina. O gênero apresenta três principais centros de diversidade: i) Oeste da Ásia, ii) Sudeste do Brasil e Paraguai, e iii) norte da América do Sul (Peru, Guianas e Venezuela) (SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008).

As árvores adultas da goiabeira podem atingir de 3 a 6 metros de altura. O caule é do tipo lenhoso, ramificado. As folhas são opostas, com formato elíptico oblongo. A floração da goiabeira se dá apenas em ramos do ano. Suas flores são hermafroditas, de coloração branca, formado por numerosos estames, apresentando em média 403,2 com filetes brancos e um estigma central localizado a cima das anteras. As anteras são de forma variável e com duas tecas rimosas. O gineceu é gamocarpelar, com ovário ínfero, apresentando, em média, 19,8 óvulos, inteiramente soldados ao receptáculo floral, tri ou tetralocular e placentação marginal. Os botões em pré-antese apresentam-se com abertura superior entre as sépalas (SOUBIHE SOBRINHO, 1951; MANICA et al., 2000; FRANCISCO et al., 2005).



Fotos: Soniane Costa

Figura 1. Botão floral de goiabeira na pré antese (A); Flor aberta (antese) da goiabeira (B)

Alves e Freitas et al. (2007), estudando o requerimento de polinização em goiabeira, reportaram que foi encontrada, em 91,5% das flores uma pétala modificada em forma de colher, que cobre completamente o estigma, protegendo-o enquanto a flor ainda está fechada, e o expondo somente após a antese das flores, no momento em que o estigma já está posicionado acima das anteras. Os autores comentam que essa hercogamia ainda não havia sido relatada na literatura em *P. guajava*. Entretanto, a proteção do estigma antes da deiscência das anteras, constitui estratégia utilizada por várias espécies vegetais para prevenir a autopolinização.

2.2. Melhoramento da goiabeira

A história do melhoramento genético da goiaba confunde-se com a origem da cultura porque, segundo Pereira e Nachtigal (2002) enquanto os colonizadores introduziram a goiabeira no mundo, ao mesmo tempo, era feita a seleção de plantas com frutos mais atrativos, sem nenhum conhecimento prévio.

O melhoramento da goiabeira começou com a seleção e implantação de mudas originadas de sementes de grande heterogeneidade e introdução vinda da Austrália, Estados Unidos e Índia. Entretanto, somente em 1951, há relatos dos primeiros trabalhos sobre o melhoramento, sendo esses desenvolvidos por Soubihe Sobrinho em tese de doutorado, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, publicados em 1951.

Dada a importância da alimentação mais saudável e devido à necessidade de se buscar alternativas para o aumento das fontes de nutrientes e compostos funcionais em grande quantidade, a fim de suprir a crescente demanda mundial, é fundamental investir esforços em pesquisas voltadas para o melhoramento vegetal, sobretudo de espécies que mostram serem fontes importantes de um conjunto de substâncias essenciais à saúde humana (QUINTAL, 2013)

Para a goiabeira é esperado através de um programa de melhoramento genético vegetal uma adaptação a diferentes condições ambientais; aumento da produtividade; resistência a pragas, doenças e problemas fisiológicos; tamanho, coloração e formato do fruto; ausência de sementes; melhores características para industrialização; resistência ao transporte e ao manuseio; melhorias no paladar e no valor nutritivo (QUINTAL, 2013). Em estudos realizados na região do submédio São

Francisco, Lima et al. (2002) utilizaram as variáveis de qualidade para caracterizar os frutos de cultivares e seleções de goiabeiras introduzidas nesta região, visando a indicação de genótipos adaptados.

Embora os trabalhos de seleção de plantas de goiabeira tenham sido realizados em Institutos de pesquisa (Instituto Agrônomo de Campinas, Embrapa, UNESP/FCAV de Jaboticabal e outros), as principais cultivares, produtoras de frutos destinados ao consumo como fruta fresca, surgiram de trabalhos desenvolvidos por produtores de origem japonesa. Hoje, são estes Institutos de pesquisa os principais responsáveis pelo lançamento de cultivares, por exemplo, Paluma, Rica, e a cultivar Século XXI (Pereira, 2002).

O melhoramento da cultura visando à resistência também tem sido bastante estudado. Atualmente alguns programas de melhoramento existem no Brasil e diversos trabalhos têm sido desenvolvidos relacionados principalmente a predição de resposta à seleção, estudos de divergência, caracterização e o uso de marcadores moleculares tem sido expressivo na cultura.

Atualmente a Embrapa semiárido desenvolveu uma nova cultivar de goiabeira denominada de BRS-Guaará, oriunda do cruzamento interespecífico entre *P.guajava* e *P.guineense*, cuja variedade é altamente resistente ao nematoide *Meloidogyne enterolobii*, praga que vem dizimando pomares de goiabeira, não só submédio São Francisco, mas em todo Brasil (Costa et al., 2012; Costa et al., 2016). Segundo Costa et al. (2012) o híbrido resistente ao nematoide é altamente compatível quando usado como porta enxerto em variedades Paluma e Pedro Sato, variedades essas susceptíveis ao patógeno. Costa e Santos (2013) caracterizando o banco de germoplasma de goiabeira e araçazeiros da Embrapa semiárido por meio de marcadores microssatélites observaram similaridade entre *P.guajava* e *P.guineense* de 82,4%. O melhoramento genético da goiabeira tem, sem dúvida, contribuído sobremaneira para o desenvolvimento da cultura no Brasil.

2.3. Variedade Paluma

No Brasil, a goiabeira é cultivada em três sistemas de produção bastante distintos: cultura de goiaba de mesa, cultura de goiaba para a indústria e cultura mista (RAMOS et al., 2011). Segundo Gonzaga Neto et al. (2001) a cultura mista visa atender os dois mercados simultaneamente, o que é interessante para os

produtores, uma vez que os frutos de melhor qualidade são destinados ao mercado de fruta para consumo *in natura*, que alcança melhores preços e o restante é destinado ao processamento, nas diferentes formas, de acordo com o tipo de fruto.

Em 1976, implantou-se na FCAV/Unesp, Câmpus Jaboticabal – SP um campo de *seedlings*, com mudas formadas por sementes obtidas de polinização aberta de 9 variedades de origens diversas, surgindo deste programa de seleção de goiabeira as cultivares Paluma e Rica, que foram lançadas no VII Congresso Brasileiro de Fruticultura (PEREIRA, 1984; SOUZA et al., 2009).

As plantas da variedade Paluma são altamente produtivas (mais de 50 t.ha⁻¹), vigorosas, de crescimento lateral e com boa tolerância à ferrugem (*Puccinia psidii* Wint.). Os frutos são grandes (acima de 200 gramas, mesmo em plantas não-desbastadas), piriformes, com pescoço curto. Nos frutos maduros a casca é lisa e amarela; a polpa é de cor vermelha intensa, firme e espessa (1,3 a 2,0 cm); o sabor é agradável graças ao elevado teor de açúcares (aproximadamente 10°Brix) e à acidez equilibrada, com sementes em pequeno número. Atualmente, é a variedade mais cultivada do País, tendo número superior a um milhão de plantas, distribuídas por todas as regiões de cultivo. É amplamente utilizada tanto para consumo como fruta fresca (*in natura*) quanto para o consumo de produtos industrializados, através da elaboração de sucos, compotas e doces. (PEREIRA; NACHTIGAL, 2002).

Em estudos realizados por Gonzaga Neto et al. (2001) observou-se que a primeira safra da goiabeira ‘Paluma’, a partir de aproximadamente 12 a 14 meses após o plantio no campo, em áreas irrigadas do Nordeste, pode atingir até 15 Kg de fruto por planta. Nessas áreas a variedade Paluma, quando produzida por estaca, é também bastante precoce, florando aos 6 ou 7 meses após o plantio no local definitivo. A grande qualidade da Paluma é, sem dúvida, a resistência pós-colheita dos frutos (GONZAGA NETO, 2001).

2.4. Sistema reprodutivo

O conhecimento do sistema reprodutivo em plantas é de fundamental importância para a compreensão da biologia reprodutiva da espécie e base para programas de melhoramento, podendo poupar anos de insucesso na conduta desses trabalhos, além de fornecer informações de uso direto para o melhoramento (MAUÉS; COUTURIER, 2002; VALLS, 2007).

Segundo Bressan (2011), as plantas são organismos sésseis que desenvolveram estratégias para o sucesso produtivo como flores e frutos capazes de atrair polinizadores e dispersores de sementes, mantendo altos níveis de variação genética.

O sistema reprodutivo refere-se à forma como um indivíduo, população ou espécie transfere suas informações genéticas de uma geração para outra, podendo ser assexuada e sexuada (PENHA, 2014). Na reprodução assexuada não ocorre a formação de gametas e os indivíduos se formam a partir de um organismo por divisão mitótica, assim, os descendentes possuem a mesma constituição genética (BRESSAN, 2011).

Na reprodução sexuada, há formação de gametas diferentes que se fundem gerando zigotos com constituição genética variável. Em espécies sexuadas, o sistema reprodutivo é classificado em: autógama, alógama e mista. Na autogamia com flores hermafroditas autocompatíveis ocorre a fusão de gametas masculinos e femininos de uma mesma flor. Já a alogamia possui plantas hermafroditas, dioicas (planta com sexo separado) e monoicas (flores com sexo separado em uma mesma planta) que envolve o cruzamento de indivíduos diferentes, assim como a transferência de pólen entre diferentes flores, podendo ser da mesma planta ou não (GOODWILLIE et al., 2005).

Em estudo realizado por Soubihe Sobrinho e Gurgel (1962), a goiabeira apresenta uma taxa de autofecundação significativamente maior que a taxa de fecundação cruzada. Entretanto, Medina (1988), observou que a taxa de fecundação cruzada foi considerada alta, entre 25,7 a 41,3%, considerando-se 36,6% como índice médio, caracterizando a goiabeira como uma espécie autógama-alógama, ou seja, de reprodução mista. Alves e Freitas (2007), registraram no estado do Ceará, para a cultivar Paluma, um acréscimo de 39,5% na produção obtido por meio da polinização cruzada realizada por insetos polinizadores

Segundo Siqueira et al. (2012) em estudo sobre a ecologia da polinização de goiabeira, no qual se observou a frequência e horário de atividades de visitantes florais em um sistema agrícola, reportando que pode ocorrer autopolinização espontânea (62,1%), sendo observado um maior percentual (74,5%) de frutificação com a polinização natural. A queda de frutos ocorreu até os 120 dias, com as maiores taxas (24 a 45%) registradas aos 60 dias, após a polinização.

Em plantas hermafroditas como a goiabeira, o sistema de reprodução pode combinar autofecundações com cruzamentos e a parte referente a cruzamentos, pode ocorrer de forma aleatória ou sistemática (cruzamentos correlacionados) (MORI, et al, 2013). Como consequência, progênies de polinização aberta podem ser compostas por misturas de indivíduos com diferentes graus de parentescos como, irmãos de autofecundação, irmãos-completos, meios-irmãos e irmãos de autofecundação e cruzamento.

A taxa de fecundação cruzada natural de uma espécie é importante aspecto a ser considerado, a fim de estabelecer estratégias para a gestão e conservação de germoplasma e melhoramento vegetal (PENHA, 2014). Segundo Conte (2004) para a determinação da taxa de cruzamento podem ser empregados modelos multilocos que possibilitam a obtenção de estimativas mais adequadas, pois levam em consideração as combinações genóticas envolvendo todos os locos.

O sistema de reprodução pode ser estudado, eficientemente, utilizando-se marcadores genéticos como os microssatélites, em combinações dos modelos de reprodução, como o modelo misto (RITLAND e JAIN, 1981). Nesse sentido, o programa MLTR (*Multilocus mating system program*) desenvolvido por Ritland (1990), baseado no modelo de cruzamento misto, fornece estimativas dos seguintes parâmetros: a taxa de cruzamento multilocos da população (t_m); a taxa de cruzamento unilocos da população (t_s); a taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$); correlação de autofecundação (r_s); correlação multilocos de paternidade ($r_{p(m)}$) e o coeficiente de endogamia dos genótipos maternos ($F_{(m)}$).

2.5. Marcadores moleculares

Nas últimas décadas, o uso de marcadores moleculares surgiu como uma alternativa à redução do tempo de execução em programas de melhoramento, principalmente, quando se trata de plantas perenes, em que se tem procurado associar a informação obtida pelos marcadores aos aspectos de diversidade genética e mapeamento de regiões genômicas com influência em características fenotípicas de interesse (OLIVEIRA et al., 2014). Atualmente, tem se utilizado a associação de técnicas clássicas a ferramentas biotecnológicas, com o objetivo de aumentar a eficiência de seleção e caracterização de germoplasmas, bem como a

maximização dos ganhos genéticos, permitindo, aos melhoristas, o acesso e a seleção da variabilidade a nível de DNA (SOUZA et al., 2014).

Os marcadores moleculares têm despontado em programa de melhoramento de plantas, através da identificação direta dos genótipos, superando muitas vezes, as limitações na obtenção de dados fenotípicos. Além disso, o tempo de desenvolvimento de variedades nos programas de melhoramento pode ser reduzido, resultando, assim, na obtenção de materiais com características de interesse mais rapidamente e retorno mais rápido do investimento aplicado (FERREIRA et al., 2007).

Borém e Caixeta (2009) reportam o uso do termo marcador para designar fatores morfológicos, fisiológicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênes. Os primeiros marcadores “modernos” a surgirem na década de 1960 foram as izoenzimas.

Na década de 80, Kary Mullis apresentou técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sendo uma nova opção ao uso de marcadores moleculares (MULLIS; FALOONA, 1987). Tal método permite a amplificação *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, usando-se dois oligonucleotídeos que hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BOREM; CAIXETA, 2009). Podem ser citados os marcadores: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) (PARAN; MICHELMORE, 1993); Microssatélites (LITT; LUTY, 1989); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995).

Os microssatélites constituem uma das classes de marcadores moleculares mais polimórficos. (FERREIRA; GRATTAPAGLIA 1998). Todavia, atualmente, os SNP merecem destaque em função de revelar quase 80% de todo o polimorfismo conhecido em humanos, sendo possível encontrar um SNP a cada mil pares de bases nessa espécie. Apesar dos SNPs serem bastante frequentes e mutacionalmente mais estáveis do que os microssatélites, eles são predominantemente bialélicos, o que os torna menos informativos. (PENHA, 2014)

É evidenciado que os estudos com o uso de marcadores moleculares de DNA estão amplamente empregados em análises genéticas para as mais diversas

finalidades, como: identificação de clones, híbridos, cultivares, estudos de fluxo gênico e estimativas de taxa de cruzamento e parentesco.

Para Faleiro et al. (2003), os marcadores podem ser utilizados para a confirmação de fecundação cruzada em plantas envolvendo cruzamentos inter e intraespecíficos, sendo de aplicação confiável e rápida, por se tratar de análise do DNA, permitindo a confirmação da hibridação em estágios iniciais de desenvolvimento dos supostos híbridos.

Embora exista grande número de marcadores genéticos-moleculares, o princípio da análise desses marcadores é o mesmo. Cada uma das tecnologias de marcadores moleculares apresenta vantagens e desvantagens. O uso de uma ou de outra dependerá do objetivo do estudo, da infra-estrutura, dos recursos financeiros e da disponibilidade de recursos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.6. Marcadores microssatélites

Microssatélites ou '*simple sequence repeats*' (SSR) são sequências repetidas em série de 2-5 nucleotídeos, que apresentam alto polimorfismo e podem ser amplificadas por reações em cadeia da DNA polimerase (PCR), com específicos 'primers' ou iniciadores derivados de sequência, flanqueando as regiões repetidas no genoma (RISTERUCCI et al., 2005). Marcadores microssatélites apresentam ainda a propriedade da co-dominância, que possibilita separar homocigotos de heterocigoto para um determinado loco.

As variações encontradas nos microssatélites são devido a mutações, que podem adicionar ou deletar pares de bases (PENHA, 2014). Os mecanismos propostos para explicar essas variações seriam o elevado número de permuta desigual e erros da DNA polimerase durante a replicação. A importância dos microssatélites reside, principalmente, na alta variabilidade encontrada (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Risterucci et al. (2005) foram os primeiros a reportarem o desenvolvimento e aplicação de marcadores SSR para goiabeira. Lepitre et al. (2010) reportaram o desenvolvimento de quase 300 'primers' para locos de SSRs em goiabeira que têm sido usados para caracterização de germoplasma por diferentes autores.

Quase 200 dos 300 locos SSRs citados por Lepitre et al. (2010) foram designados para específicos grupos de ligações genéticas em populações

segregantes de goiabeira (RITTER et al., 2010), ampliando as possibilidades de estudos de diversidade genética e da aplicação da seleção assistida por SSRs para o desenvolvimento de novas cultivares dessa cultura, com qualidade superior às que estão disponíveis no mercado para os agricultores.

Forma eficiente de se estimar a taxa de cruzamento ou de autofecundação é analisar o sistema reprodutivo de um conjunto de progênies por meio de marcadores genéticos (CLEGG 1980). Nesse contexto, os marcadores moleculares microssatélites se destacam, pois, além de quantificar o processo de transmissão de genes entre plantas, eles descrevem a transmissão de genes entre gerações e permitem uma ampla cobertura genômica para a espécie (OLIVEIRA et al. 2002).

Apesar da cultura da goiaba apresentar importância socioeconômica, trabalhos relativos a estimativa da taxa de polinização cruzada da goiabeira por meio de marcadores moleculares ainda não foram reportados na literatura.

Porém, há relatos de trabalhos sobre estudo da taxa de polinização cruzada por meio de marcadores microssatélites em outras culturas. Souza et al (2012) estudando taxa de cruzamento na azeitona por meio de marcadores microssatélites e de repetição de sequência simples (ISSR), observaram que os dados individuais de marcadores microssatélites foram efetivos para mostrar a ocorrência de cruzamento externo em ambos os genótipos de azeitona avaliados. Santos e Neto. (2011) estimaram a taxa de cruzamento entre manga 'Haden' e 'Tommy Atkins' com marcadores microssatélites e AFLP, observando que a taxa variou de 0,85 a 0,87, com análise baseada em sete marcas AFLP, e de 0,83 a 0,91, com base em três microssatélites. Esses autores comentam que os microssatélites utilizados são recomendados para elucidar a origem de mudas de 'Haden' e 'Tommy Atkins'.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram coletados 6 populações oriundas de polinização natural de goiabeira da variedade Paluma (Tabela 1), em áreas do Perímetro Irrigado Senador Nilo Coelho - N5 e no Perímetro Irrigado Bebedouro, ambos em Petrolina-PE. Os frutos coletados foram conduzidos ao laboratório de genética, da Embrapa Semiárido, para beneficiamento das sementes.

Tabela 1. Identificação das matrizes usadas na determinação da taxa de fecundação cruzada na variedade de goiabeira Paluma.

População	Nº de progênies avaliadas	Procedência
1	14	Projeto N5
2	14	Projeto N5
3	14	Projeto N5
4	14	Projeto N5
5	14	Projeto Bebedouro
6	14	Projeto Bebedouro

3.2 Beneficiamento e semeadura

Os frutos foram cortados verticalmente com uma faca de mesa e a polpa foi retirada com o auxílio de uma colher, passando por uma peneira de malha fina, em água corrente, para separar as sementes da polpa. As sementes foram postas para secar à sombra, por 24h e acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificados e conservados em câmara fria a 10 °C até o momento da semeadura.

A semeadura se deu em vasos plásticos de 20 L, contendo uma parte de substrato artificial (Plantmax[®]) e uma parte de solo, na proporção de 1:1, e mantidos em casa de vegetação. A irrigação foi realizada todos os dias, de acordo com a necessidade do material.

3.3 Extração de DNA e genotipagem com marcadores microssatélites

Foram coletadas folhas jovens, sendo que as mesmas foram colocadas em sacos de papel, devidamente identificados, e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da extração. Para extração de DNA, foi utilizado o protocolo CTAB 2x de Doyle e Doyle (1990), conforme procedimento descrito por Costa e Santos (2013). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA extraído com bandas do DNA do fago Lambda, de concentração conhecida. A integridade das amostras de DNA foi avaliada pela ausência de rastro de DNA. As amostras foram diluídas para $30\text{ ng}/\mu\text{L}$ e armazenadas a -20°C

Foram utilizados 10 marcadores microssatélites: mPgcI 227, mPgcI 243, mPgcI 250, mPgcI 251, mPgcI 252, mPgcI 255, mPgcI 257, mPgcI 412, mPgcI 422 e mPgcI 593. As reações de amplificação de PCR foram realizadas para um volume final de $10\ \mu\text{l}$, contendo $30\ \mu\text{l}$ de DNA genômico, 1x de tampão para Taq DNA polimerase, $2,5\ \text{mM MgCl}_2$, $0,2\ \text{mM}$ de dNTP's, $0,2\ \mu\text{M}$ de cada 'primer' e $0,75$ unidades de enzima Taq DNA Polimerase.

A programação para as amplificações consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 32 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 60 s e 72°C por 60 s e uma etapa de extensão final a 72°C , por 5 min, conforme procedimento descrito por Briceño et al. (2010) e Costa e Santos (2013). Após a amplificação, foi adicionado, em cada amostra de DNA, $5\ \mu\text{l}$ de formamida, seguido da completa desnaturação a 94°C por 5 min em termociclador. As amostras foram mantidas em gelo até a amplificação no gel de poliacrilamida.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 6%, preparado em placa de vidro tipo sanduíche com capacidade de 60 poços. Uma pré-corrída de 30 min a 45 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foram aplicados $2,5\ \mu\text{L}$ da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 3 h, com potência constante de 45 W. Marcador molecular Ladder 50 pares de bases (pb) (Fermentas) foi carregado nas extremidades laterais de cada gel. Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme procedimentos descritos por Creste et al. (2001).

3.4 Análises estatística dos dados

O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de cruzamento misto de Ritland e Jain (1981) e cruzamentos correlacionados, usando o programa MLTR (RITLAND, 2002). O programa MLTR estima as frequências alélicas tanto do pólen como dos óvulos, subtraindo do genótipo das sementes os alelos maternos, de forma que se tem tanto a frequência dos alelos maternos (óvulos) e paternos (pólen).

Os parâmetros estimados foram o índice de fixação nas árvores maternas (F_m), taxa de cruzamento multiloco (t_m), taxa de cruzamento uniloco (t_s), taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados (t_m-t_s), frequências alélicas dos óvulos e do pólen (o e p), correlação de autofecundação (r_s), correlação multiloco de paternidade ($rp(m)$), correlação de paternidade uniloco ($rp(s)$) e diferença $rp(s)-rp(m)$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise do sistema de fecundação cruzada, a estimativa da taxa de cruzamento multiloco populacional (t_m) foi de 0.803, demonstrando que a goiabeira encontra-se na classe da espécies de fecundação cruzada. Pelo erro padrão da estimativa da taxa t_m , verifica-se que está estatisticamente diferente da unidade (1,0). A taxa de cruzamento uniloco (t_s) populacional foi igualmente alta (0.792) embora tenha sido significativamente diferente da taxa de cruzamento multiloco, a julgar pelo erro associado. (Tabela 2). Medina, (1988), em estudo sobre polinização em goiabeira por meio morfológico, observou que a taxa de fecundação cruzada em goiabeira foi considerada alta, entre 25,7 a 41,3%, considerando-se 36,6% como índice médio, caracterizando a goiabeira como uma espécie autógama-alógama.

A estimativa da diferença entre a taxa de multiloco e uniloco foi de 0.011 ($\pm 0,064$), observa-se que ela foi diferente de zero (Tabela 2), sugerindo a ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados e a presença de endogamia biparental na população descendentes.

Tabela 2. Estimativa de parâmetros do sistema de reprodução de goiabeira da variedade 'Paluma' em áreas de produtores do município de Petrolina-PE.

Parâmetros	Estimativas
Número total de progênies (n)	86
Taxa de cruzamento multiloco (t_m)	0.803 \pm (0.230)
Taxa de cruzamento uniloco (t_s)	0.792 \pm (0.275)
Taxa de cruzamento entre parentes: ($t_m - t_s$)	0.011 \pm (0.064)
Correlação de autofecundação (r_s)	0.107 \pm (0.147)
Correlação multiloco de paternidade (r_p)	0.228 \pm (0.086)

A diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) têm sido usada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endôgamicos, em outros termos, entre indivíduos aparentados, visto que a taxa de cruzamento uniloco é esperada ser menor do que a multiloco, diante de progênies advinda de endogamia biparental (PENHA, 2014). Mori et al. (2013) estudando o sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*, encontraram diferenças entre as taxas de cruzamento multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) que foram igualmente significativas em

todas as populações, variando de 0,092 a 0,111, sugerindo a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados nas populações.

Essa baixa taxa representada pela diferença entre a taxa de fecundação cruzada multiloco e uniloco, ($t_m - t_s$) indica que a goiabeira 'Paluma' nas áreas dos Perímetros irrigados de Petrolina-PE está se reproduzindo por fecundação cruzada. Segundo Dasarathy (1951) e Balasubrahmanyam (1959) a forma mais frequente de polinização em goiabeira é por polinização aberta. Alves e Freitas (2007), registraram no estado do Ceará, para a cultivar 'Paluma', um acréscimo de 39,5% na produção obtido por meio da polinização cruzada realizada por insetos polinizadores.

Siqueira et al. (2012) em estudo sobre a ecologia da polinização de goiabeira, observando a frequência e horário de atividades de visitantes florais em um sistema agrícola, observaram que pode ocorrer autopolinização espontânea (62,1%), sendo observado um maior percentual (74,5%) de frutificação com a polinização natural. Segundo Murawski (1995), o comportamento forrageiro dos animais polinizadores, o assincronismo no florescimento, as diferenças na densidade individual de florescimento e a posição espacial das flores podem causar variações na taxa de cruzamento entre árvores.

A correlação de paternidade (r_p) mede a proporção de progênies de polinização aberta que são irmãos-completos ou em termos probabilísticos, a probabilidade de se amostrar duas plantas dentro de progênies, produzidas por cruzamentos e ambas terem sido originadas de mesmo parental paterno (RITLAND, 1989). Isso significa que parte das sementes produzidas por uma simples árvore é originada de uma pequena população reprodutiva, com pólen advindo de poucos genitores e as sementes podem incluir diferentes graus de parentesco (SEBBENN, 2006).

A correlação de paternidade, que mede a proporção de indivíduos gerados biparentais (irmão completos), foi baixa no presente estudo ($r_p = 0,228$), sugerindo que 22,8% dos indivíduos das progênies são filhos do mesmo doador de pólen.

Rodrigues (2012) estudando o sistema de cruzamento da espécie *Eugenia dysenterica* DC, reporta que 11,9% dos indivíduos das progênies são filhos do mesmo doador de pólen, sugerindo que o número de polinizadores de *E. dysenterica* não é restrito e que também pode haver paternidade múltipla entre sementes do mesmo fruto e/ou entre frutos de uma mesma matriz.

Esses resultados indicam que a goiabeira da variedade Paluma é uma espécie de sistema misto de reprodução, combinando autofecundação e cruzamentos, com predomínio de cruzamento. Parte dos cruzamento é entre indivíduos parentes e parte por cruzamentos biparental.

5. CONCLUSÕES

A baixa taxa representada pela diferença entre a taxa de fecundação cruzada multiloco e uniloco, ($t_m - t_s$) indica que a goiabeira 'Paluma' nas áreas dos Perímetros Irrigados em Petrolina-PE estão se reproduzindo por fecundação cruzada.

A correlação de paternidade, que mede a proporção de indivíduos gerados biparentais (irmãos completos), foi baixa ($r_p = 0,228$), sugerindo que 22,8% dos indivíduos das progênes são filhos do mesmo doador de pólen.

Os resultados indicam que a goiabeira da variedade Paluma é uma espécie de sistema misto de reprodução, combinando autofecundação e cruzamentos, com predomínio de cruzamentos.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, J.E.; FREITAS, B.M. Requerimento de polinização da goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1281-1286, 2007.
- BALASUBRAHMANYAN, V. R. Studies on blossom biology of guava. **Indian Journal BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2009
- BOREM, M.; CAIXETA, E. T. **Marcacores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009, 532 p.
- BRESSAN, E. A. **Variabilidade genética e estimação da taxa de cruzamento do pinhão manso empregando marcadores moleculares**. 2011. 208 p. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- BRICEÑO A, ARANGUREN Y and FERMIN G. Assessment of Guava-Derived SSR **actahorticulturae** n.849, p139-146, 2010
- CLEGG MT (1980) Measuring plant mating systems. **BioScience** 30: 814-818.
- CORRÊA, L.C. **Similaridade genética em acessos de goiabeiras e araçazeiros: Análisesbquímicas e bioquímicas dos frutos**. 2010. 102f Tese (Doutorado em Ciências Biológicas com ênfase em Botânica) – UNESP, Botucatu, São Paulo.
- COSTA, S. R.; SANTOS, C.A.F.; CASTRO, J. M. C. E. Inheritance of resistance to *Meloidogyne enterolobii* in *Psidium guajava* x *P. guineense* hybrid. **European Journal of Plant Pathology**. v. 146, p. 1-7, 2016.
- COSTA, S. R.; SANTOS, C. A. F. Allelic database and divergence among *Psidium* accessions by using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12. p. 6802-6812, 2013.
- COSTA, S. R.; SANTOS, C.A.F.; CASTRO, J. M. C. E. . Tolerance of *Psidium guajava* x *P. guineense* hybrids to *Meloidogyne enterolobii*. **Acta Horticulturae**, v. 959, p. 59-65, 2012.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9, p. 299-306. 2001.
- DASARATHY, T. B. The guava. **Madras Agriculture Journal**, v. 38: 521-527, 1951.
- DOYLE, J.J. E DOYLE, J.L. 1990 **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. **Focus**. 12:13-15.
- FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e

microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobromacacao* e *Theobromagrandiflorum*. **Agrotropica**, Cruz das Almas, v.15, n.1, p. 41– 46, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética**. 3 ed. Brasília-DF: Embrapa, 1998.

FERREIRA, M.E.; MORETZSOHN, M.C.; BUSO, G.S.C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (Ed). **Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. p. 377-420. 2007.

FRANCISCO, V. L. F. S.; BAPSTELLA, C. S. L.; AMARO, A. A., (2005). **A cultura da goiaba em São Paulo**. Instituto de Economia Agrícola. Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/> Acesso em 20 de Julho de 2017.

GOMES, V.M. et al. Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne enterolobii* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p 1-6, 2011.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J. M.; TEIXEIRA, A. H. C.; MOURA, M. S. B. *Goiaba: produção: aspectos técnicos*. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2001. 72 p. (Frutas do Brasil, 17)

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S; ECKERT, C. G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. Palo Alto, v.36, p.47-79, 2005.

LEPITRE, V., NANSOT, G., GRANGEON, R., POMIES, V., RIVALLAN, R., RISTERUCCI, A.M., VALDÉS-INFANTE, J., RODRÍGUEZ-MEDINA, N.N., MUTH, J., BOIKE, J., PRÜFER, D., BECKER, D., ROHDE, W., RITTER, E.; BILLOTTE, N. The microsatellite (SSR)/AFLPp reference linkage map of guava. **Acta Horticulturae**(ISHS), v.849, p. 183-192, 2010.

Lima, M. A. C.; Assis, J. S.; Neto, L. G. (2002) Caracterização dos frutos de goiabeiras e seleção de cultivares na região do sub-médio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n 1, p. 273-276.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A., MALAVOLTA, E. **Fruticultura tropical: goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 374 p, 2000.

MAUÉS, M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.25, n.4, p.441-448, 2002.

MEDINA, J.C. (1988) Goiaba: I . cultura. In: Medina, J.C., Castro, J.V., Sigríst, J.M.M., Martín, Z.J., Kato, K, Maia, M.L., López García, A.E.B., Leite, R.S.S.F. (eds.) **Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2ª.ed. revisada. e ampliada. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Frutas Tropicais, 6, p.01-119.

MORI, E.S.; SEBBENN, A.M.; TAMBARUSSI, E.V.; GURIES, R.P. Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. **Sci. For.**, v. 41, n. 99, p. 307-317, 2013.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURAWSKI, D.A. 1995. Reproductive biology and genetics of tropical trees from canopy perspective. In *Forest canopies* (M.D.Lowman & N.M.Nadkarni, eds.). Academic Press, New York, p.457-493

OLIVEIRA AF, CARVALHO D, ROSADO SCS Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Rev. Br. Bot.** 25 (3): 331-338, 2002.

OLIVEIRA, N.N.S. et al. Análise de distância genética entre acessos do gênero *Psidium* via marcadores ISSR. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 4, p. 917-923, 2014.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, n. 8, p. 985-993, 1993.

PENHA, J. S. **Determinação da taxa de fecundação cruzada natural e diversidade genética em feijão-fava por marcadores microssatélites**. 2014. (Dissertação. Mestrado em melhoramento vegetal). Universidade Federal do Piauí.

PEREIRA, F.M. Rica e Paluma: Novas cultivares de goiabeira. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 7, 1984, Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBF, 1986. p. 524-528

PEREIRA, F.M.; CARVALHO, C.A.; NACHTIGAL, J.C. Século XXI: nova cultivar de goiabeira de dupla finalidade. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 498-500, 2003.

PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. (2002). Goiabeira. In: Melhoramento de Fruteiras Tropicais, C. H. Bruckner, ed.. Viosa, UFV. pp.267-289.

POMMER, C.V.; OLIVEIRA, O. F.; SANTOS, C.A.F. **Goiaba Recursos Genéticos Melhoramento**. 1. ed. Mossoro: UFERSA. v. 1. p. 19-126. 2013.

QUINTAL, S.R. **Melhoramento da goiabeira p. guajava via metodologia de modelos mistos**. 2013. (Tese. Doutorado em produção vegetal). Centro de

Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

RISTERUCCI, A.M. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, Inglaterra, v. 5, p. 745–748, 2005

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, n.88, p.221-228, 2002.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, London, v.47, p.35-52, 1990.

RITTER E.; HERRAN A.; VALDÉS-INFANTE J.; RODRÍGUEZ-MEDINA NN.;BRICENO A.; FERMIN G.; SANCHEZ-TEYER F.; O'CONNOR-SANCHEZ A.; MUTH J.; BOIKE J.; PRÜFER D. Comparative Linkage Mapping in three guava Mapping Populations and Construction of an Integrated Reference Map in Guava. **Acta Horticulturae**.v. 849, p. 175-182, 2010.

RODRIGUES, E. B. **Sistema de cruzamento e fluxo gênico via pólen em uma coleção de germoplasma de *Eugenia Dysenterica* DC.** 2012. (Dissertação. Mestrado em genética e melhoramento de plantas) Universidade Federal de Goiás.

SANTOS, C.A.F.; OLIVEIRA, V.R.; RODRIGUES, M.A.; RIBEIRO, H.L.C.; DRUMOND, M.A. Estimativas de polinização cruzada em população de *spondias tuberosa* arruda (anacardiaceae) usando marcador AFLP. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.3, Edição Especial, p.691-697, 2011.

SANTOS, C.F.; NETO, F.P.L. Outcrossing rate between 'Haden' and 'Tommy Atkins' mangoes estimated using microsatellite and AFLP markers. *Pesquisa agropecuária brasileira.*, Brasília, v.46, n.8, p.899-904, 2011.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomares de sementes de espécies florestais nativas.** Curitiba: FUPEF, 2006. p. 93-138.

SIQUEIRA, K.M.; KILL, L.H.P.; MARTINS, C.F.; SILVA, L. T. Ecologia da polinização de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae): riqueza, frequência e horário de atividades de visitantes florais em um sistema agrícola. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v. 24, número especial, p. 150-157, 2012.

SOARES-SILVA, L.H.; PROENÇA, C.E.B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, p. 51–54, 2008.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2016. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de

Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB62556>>. Acesso em: 18 Jan. 2016.

SOUBIHE SOBRINHO, J. **Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (*Psidium guajava* L.)**. 1951. 166 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – ESALQ. São Paulo.

SOUBIHE SOBRINHO, J., GURGEL, J.T.A. (1962) Taxa de panmixia na goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Bragantia*, Campinas, 21 (2):15-20.

SOUZA, A.G. et al. Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**. v.44, n.5, p.822-829. 2014.

SOUZA,FR. A. V.; FERREIRA, J.L.; BRAGA,F.T.; AZEVEDO, P.H.; SANT´ANA, G.C.;RIBEIRO, A.P.; BORÉM, A.; CANÇADO, G.M. Outcrossing rate in olive assessed by microsatellite and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology** v.11, n.53,p. 11580-11584, 2012.

SQUILLACE, A. E. Average genetic correlations among offspring from open-pollinated forest trees. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 23, n. 5, p. 149-156. 1974.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.281-342, 2007.

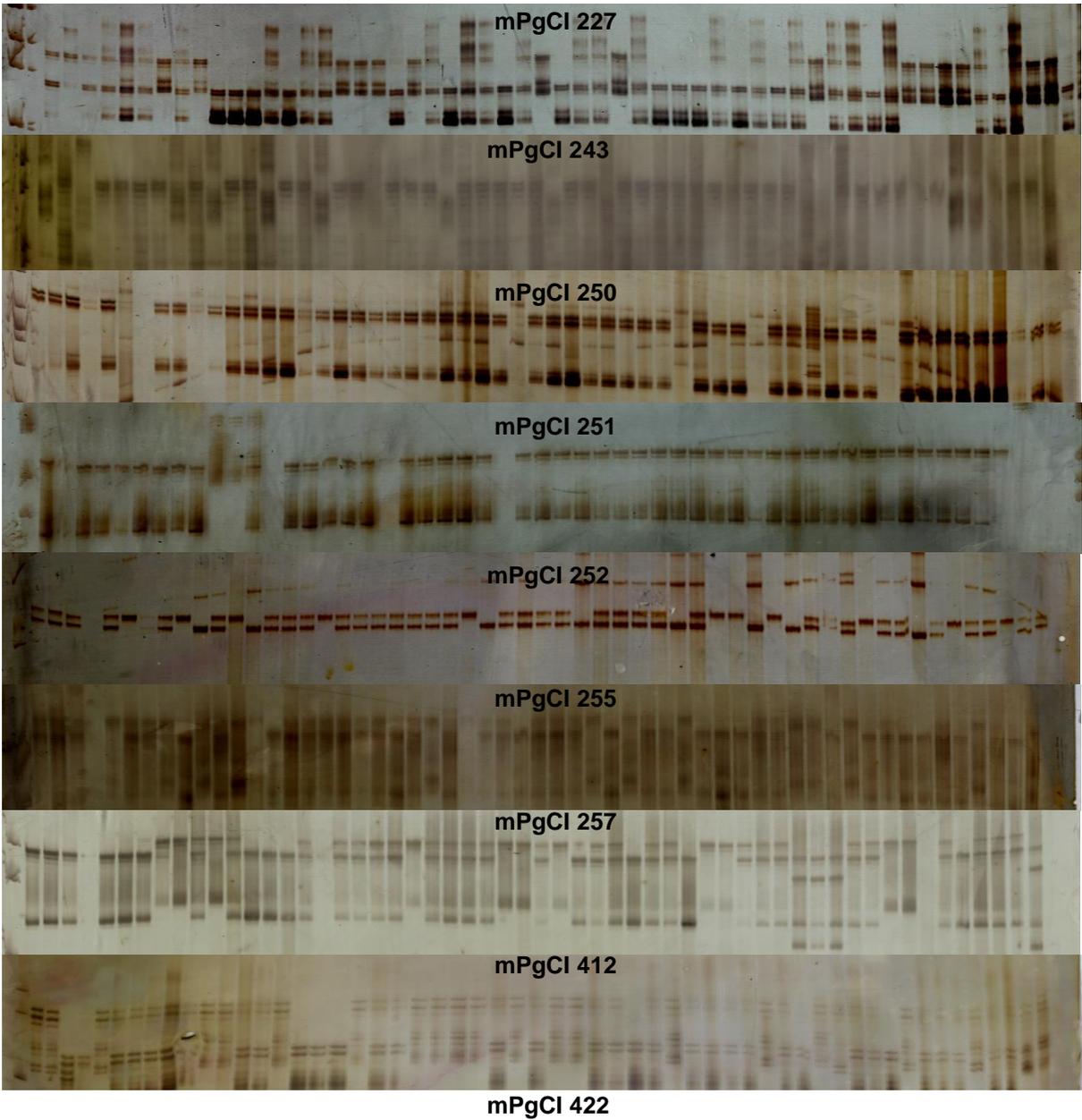
VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. Amplified Fragment Length Polymorphism. **Nucleic Acid Res.**, New York, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WATSON L, DALLWITZ MJ (1992) onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 19th October 2016. Versão: 13th March 2017. delta-intkey.com.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990

YAN, L.Y.; TENG, L.T.; JHI., T.J. Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits. **Sunway Academic Journal**, v. 3. p. 9–20. 2006.

ANEXOS



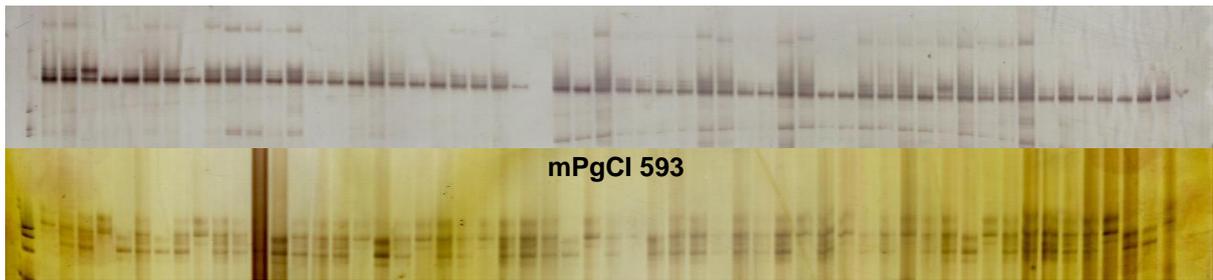


Figura 2. Perfis eletroforéticos em poliacrilamida a 6% correspondentes aos primers mPgcI 227, mPgcI 243, mPgcI 250, mPgcI 251, mPgcI 252, mPgcI 255, mPgcI 257, mPgcI 412, mPgcI 422 e mPgcI 593 genotipados no estudo de 6 populações de goiabeira da variedade Paluma, de Perímetros irrigados em Petrolina-PE.

Tabela 3. Dados referentes aos 10 locus de microssatélites analisadas para as 6 populações da goiabeira Paluma, em Petrolina-PE.

	Loc1	loc2	loc3	loc4	loc5	loc6	loc7	loc8	loc9	loc10
Fam1	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 2	1 1
Fam1	1 2	0 0	1 1	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	1 2	1 1
Fam1	1 2	2 3	1 1	2 3	1 2	1 2	1 1	2 2	2 2	2 2
Fam1	1 2	2 3	0 0	0 0	2 2	1 2	1 3	2 2	0 0	1 2
Fam1	1 2	2 2	1 1	1 2	1 2	1 2	2 2	1 1	1 1	1 2
Fam1	1 2	2 3	1 1	1 1	1 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2
Fam1	0 0	2 3	1 1	1 2	1 2	1 2	2 3	2 2	1 2	1 2
Fam1	1 2	2 3	2 2	1 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2
Fam1	1 2	2 2	2 2	1 1	1 2	1 2	1 1	2 2	2 2	1 2
Fam1	1 2	0 0	1 2	2 2	1 2	2 2	1 2	1 1	1 1	2 2
Fam1	1 2	0 0	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	1 2
Fam1	1 2	0 0	1 2	1 1	2 2	2 2	0 0	1 1	1 1	1 2
Fam1	1 2	0 0	1 1	2 2	1 2	1 2	2 3	2 2	1 1	2 2
Fam1	1 2	2 3	1 1	1 2	2 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 2
Fam2	1 2	2 3	1 1	1 2	2 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 2
Fam2	1 2	1 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	2 2
Fam2	1 2	2 3	0 0	1 1	1 2	1 2	1 1	2 2	1 2	1 1
Fam2	1 2	2 3	1 2	1 2	1 2	1 2	2 2	2 2	1 2	1 1
Fam2	1 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2	1 1	1 1	0 0
Fam2	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	2 2	1 1	2 2	1 2	1 2
Fam2	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2
Fam2	1 2	2 3	2 2	1 2	2 2	1 2	2 2	1 1	1 2	1 2
Fam2	1 2	2 3	1 2	1 2	1 2	2 2	1 1	1 1	1 1	2 2
Fam2	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2	1 1	0 0	1 2
Fam2	1 2	0 0	1 2	1 1	0 0	1 2	1 2	1 1	1 1	1 2
Fam2	1 2	2 3	1 2	2 2	2 2	2 2	1 2	2 2	1 1	1 2
Fam2	1 2	2 3	2 2	1 2	2 2	1 2	2 3	1 1	1 1	1 1
Fam2	0 0	2 3	2 2	1 2	2 2	1 1	1 1	2 2	1 2	1 2

Fam3	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	2 2	1 2	1 1	1 2	2 2
Fam3	1 2	2 3	2 2	1 2	2 2	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2
Fam3	1 2	2 3	1 2	2 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2
Fam3	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	1 1	1 2	2 2	1 1	2 2
Fam3	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	1 2	1 2	2 2	2 2	1 2
Fam3	1 2	2 3	1 1	1 2	1 2	2 2	0 0	2 2	1 1	1 2
Fam3	1 2	2 3	1 2	1 2	2 2	2 2	1 2	1 1	1 2	1 2
Fam3	1 2	2 3	1 2	2 2	2 2	2 2	1 2	2 2	1 2	1 2
Fam3	1 2	2 3	1 1	1 2	1 2	1 2	1 2	2 2	1 1	2 2
Fam3	1 2	2 3	2 2	1 1	1 2	2 2	1 1	2 2	2 2	1 2
Fam3	1 2	2 3	2 2	1 1	2 2	1 2	1 2	2 2	2 2	0 0
Fam3	1 2	2 3	1 2	2 2	2 2	2 2	1 1	1 1	2 2	1 1
Fam3	1 2	2 3	1 2	1 1	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 1
Fam3	1 2	2 3	1 2	2 2	2 2	1 2	1 2	2 2	1 2	1 1
Fam4	1 2	2 3	1 3	1 2	2 2	1 2	1 1	1 1	1 1	0 0
Fam4	0 0	2 3	1 3	1 2	2 2	1 2	1 2	1 1	1 1	0 0
Fam4	1 2	2 3	1 3	2 3	1 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 2
Fam4	1 2	2 3	1 2	1 1	1 2	1 2	2 3	2 2	1 1	1 2
Fam4	1 2	2 3	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam4	0 0	2 3	2 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1	2 2	1 1
Fam4	1 2	2 3	2 2	2 2	1 2	1 1	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam4	1 2	2 3	0 0	2 2	2 2	1 1	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam4	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 1	2 2	2 2	0 0
Fam4	1 2	0 0	1 1	1 2	2 2	2 2	1 2	1 1	2 2	0 0
Fam4	1 2	0 0	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	2 2	1 1	0 0
Fam4	1 2	0 0	1 2	1 1	2 2	1 1	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam4	1 2	0 0	1 2	1 2	2 2	1 1	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam4	1 2	0 0	1 3	1 3	2 2	2 2	1 2	1 1	1 1	0 0
Fam5	0 0	1 1	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	2 2	1 1
Fam5	1 2	0 0	0 0	1 3	2 2	1 2	0 0	2 2	0 0	1 1
Fam5	1 2	2 2	1 2	2 2	1 2	1 2	1 3	2 2	2 2	1 1
Fam5	1 2	0 0	1 3	1 3	1 2	0 0	2 2	2 2	2 2	1 1

Fam5	1 2	2 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1
Fam5	1 2	2 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam5	1 2	2 2	1 2	1 2	1 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam5	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	1 2	1 1
Fam5	1 2	0 0	1 3	1 1	1 2	1 2	2 2	1 1	2 2	1 1
Fam5	1 2	2 2	2 2	2 2	2 2	1 2	1 1	1 1	1 2	0 0
Fam5	1 2	0 0	1 3	1 1	1 2	1 1	1 2	2 2	1 1	0 0
Fam5	0 0	0 0	2 2	1 3	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	0 0
Fam5	0 0	0 0	2 3	1 1	1 2	1 1	1 2	2 2	1 1	1 1
Fam5	1 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 1	1 1	2 2	1 1	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	2 2	1 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 2	1 1	2 2	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1
Fam6	0 0	1 1	1 2	1 1	1 2	2 2	1 2	1 1	1 1	1 1
Fam6	0 0	1 1	0 0	1 1	1 2	1 1	1 1	1 1	2 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 2	2 2	1 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	2 2	2 2	1 1	2 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 1	2 2	2 2	2 2	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 1	2 3	1 1	1 1	2 2	1 1	2 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 2	2 2	1 2	1 1	1 2	2 2	0 0	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 2	1 2	1 2	1 1	2 2	2 2	2 2	0 0
Fam6	1 2	1 1	1 1	1 2	1 2	2 2	1 2	1 1	1 1	1 1
Fam6	1 2	1 1	1 3	2 2	1 2	1 2	2 2	2 2	1 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	2 2	1 1	1 1	2 2	1 2	2 2	2 2	1 1
Fam6	1 2	1 1	2 2	1 1	1 2	0 0	2 2	2 2	0 0	1 1
