



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA  
DE SANTANA**



**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**

**SONIANE RODRIGUES DA COSTA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM ACESSOS DE *Psidiumguajava* E  
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO  
DE *Psidium* AO NEMATÓIDE *Meloidogyne enterolobbi*.**

FEIRA DE SANTANA – BA

2013

**SONIANE RODRIGUES DA COSTA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM ACESSOS DE  
*Psidiumguajava* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE  
HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE *Psidium* AO  
NEMATÓIDE *Meloidogyne enterolobbi*.**

FEIRA DE SANTANA-BA

2013

**SONIANE RODRIGUES DA COSTA**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM ACESSOS DE  
*Psidiumguajava* E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE  
HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE *Psidium* AO NEMATÓIDE  
*Meloidogyne enterolobbi*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antonio Fernandes Santos  
Co-orientador: José Mauro da Cunha e Castro

FEIRA DE SANTANA-BA

2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Luiz Claudio Corrêa

---

Dr<sup>a</sup> Adriana Rodrigues Passos

---

Dr. Carlos Antonio Fernandes Santos  
Orientador e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA – BA

2013

Dedico a minha mãe Sônia, pelo amor, e por ter me dado a base  
necessária para chegar até aqui!

## AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, pela vida, força e sabedoria.

**Aos meus pais**, Maria Sônia, Jorge Severo e ao meu padraсто Sandoval Miguel, por terem me ensinado que para vencer na vida, nunca se deve passar por cima de ninguém, e sempre ter humildade para reconhecer os erros.

**Ao meu orientador**, Dr. Carlos Antonio Fernandes Santos, por seu profissionalismo, dedicação, compromisso, paciência e pelos importantes conselhos de vida. Fico honrada em dizer que fiz parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança;

**Ao meu co-orientador** Dr. José Mauro, por seu profissionalismo e amizade;

À **Elisangela Nascimento**, pela amizade incondicional e otimismo, e por me auxiliar horas e horas, conferindo dados para as devidas análises;

**Aos colegas de laboratório**, pelo apoio durante a pesquisa;

À **Weslany (técnica do laboratório)**, pelas horas e horas ao sol coletando folhas, e pelo auxílio no laboratório;

**Ao estagiário Samuel**, pela colaboração e disposição para trabalhar até aos fins de semana;

À **Renata Natalia**, pela amizade e apoio na realização das análises molecular.

**Aos funcionários do campo experimental de Bebedouro**, especialmente a José Arlindo Santos, pela amizade e apoio incondicional para o desenvolvimento desse trabalho;

À **professora Lígia Funche** equipe do laboratório de Botânica da UEFS, pela ajuda na classificação dos araçazeiros. Obrigada;

À **Universidade Estadual de Feira de Santana**, pela oportunidade de realizar essa pós-graduação;

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo;

À **Embrapa Semiárido**, por toda infra-estrutura disponibilizada

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO I – OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE <i>Psidium</i> AO NEMATÓIDE <i>Meloidogyne</i> <i>enterolobbi</i> .....	12
CAPÍTULO II – DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM ACESSOS DE <i>Psidium</i> <i>guajava</i> COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES .....	37
CONCLUSÕES GERAIS .....	57
RESUMO .....	59
ABSTRACT .....	60

ANEXO

## INTRODUÇÃO GERAL

### Importância econômica da goiabeira

A goiaba é uma das frutas que apresenta maior teor de vitamina C, contendo de duas a cinco vezes mais dessa vitamina do que a laranja. Quando comparada com outras frutas, apresenta fontes moderadas de cálcio, bons níveis de fósforo e de ferro. É consumida de diferentes formas, como fruta fresca ou em produtos industrializados ou semi-industrializados, como geléias e sucos (Singh, 2007) e mais recentemente como o “guatchup” (substituto concorrente do ketchup), que é um molho agridoce à base de goiaba (Lócio & Moraes Filho, 2005).

As folhas e os frutos da goiabeira (*Psidium guajava* L.) são conhecidos, principalmente, por suas atividades antiespasmódicas e antimicrobianas, no tratamento de diarreias e disenterias, sendo muito usada como agente antiglicêmico. Estudos farmacológicos têm apoiado outros usos tradicionais da goiabeira, como atividade antioxidante, hepaprotetora, antialérgica, antimicrobiana, antígenotóxica, antiespasmódica, antitosse, antiinflamatória, entre outras. Outros estudos têm demonstrado seu uso potencial para o tratamento de enterites rotavirais infantis, diarreias e diabetes (Gutierrez *et al.*, 2008).

Além da versatilidade de usos da espécie, a goiaba contém o licopeno, que é considerado um poderoso agente antioxidante e antimutagênico, sendo um dos grandes diferenciais de goiaba de polpa rosa a avermelhada (Santos *et al.*, 2012). Os valores apresentados desse carotenóide, no fruto da goiabeira são comparáveis ao tomate, tornando essa fruta uma fonte importante de licopeno (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2007).

A goiabeira é cultivada em quase todos os Estados brasileiros, pois o país apresenta condições favoráveis de cultivo do Rio Grande do Sul ao Acre. No Brasil, a goiabeira ocupou, em 2007, a 11ª posição em área cultivada e valor de produção, a 10ª posição em quantidade produzida e a 5ª posição em produtividade, quando comparada com importantes fruteiras como, laranja, banana, uva, mamão, maçã, manga, tangerina, maracujá, limão, pêssigo, caqui, abacate, figo, pêra e marmelo. A goiabicultura contribuiu, em 2007, com uma produção de 408,28 mil toneladas do fruto, movimentando cerca de 174,4 milhões de reais. Em 2007, a área cultivada no Brasil era de 9.138.00 ha, com uma produção de 76.494 toneladas (IBGE, 2009).

Os principais Estados brasileiros produtores de goiaba em 2007 foram Pernambuco, São Paulo, Goiás e Bahia, que juntos responderam por quase 75% da produção nacional. Nos principais estados produtores, a área plantada e a produção de goiaba declinaram no período de 2003 a 2007, sendo que a redução mais drástica foi na Bahia (71,3% e 56,1%, respectivamente) (IBGE, 2009). O declínio nos estados da Bahia e de Pernambuco pode ser atribuído, principalmente, ao nematóide *Meloidogyne enterolobii*, para o qual não existe até o momento medida efetiva de controle.

Existem poucas estatísticas mundiais sobre a produção de goiaba. Em escala mundial, os maiores produtores de goiaba são a Índia, Venezuela, Austrália, África do Sul, Paquistão, Brasil, Egito, Estados Unidos, México e Quênia (Pereira, 1995).

### **Aspectos da botânica e da biologia floral do gênero *Psidium***

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: 1. Oeste da Ásia, 2) Sudeste do Brasil e Paraguai, e 3) norte da América do Sul (Peru, Guianas e Venezuela) (Soares-Silva & Proença, 2008).

As árvores adultas da goiabeira podem atingir de três a seis metros de altura. O caule é do tipo lenhoso, ramificado. As folhas são opostas, com formato elíptico oblongo. Suas flores são brancas e hermafroditas, possuem em média 350 estames, as flores aparecem isoladas ou em grupo de duas ou três, sempre nas axilas das folhas (Manica *et al.*, 2000; Francisco *et al.*, 2012).

O gênero *Psidium* pertence à família *Myrtaceae*, a qual engloba mais de 70 gêneros e 2800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. A maioria das espécies dessa família é cultivada para fins comerciais, em regiões de clima tropical e subtropical, sendo que algumas delas apresentam bom desenvolvimento em regiões de clima temperado (Pereira, 1995). Podem ser citadas outras importantes espécies da família *Myrtaceae*, como: *Syzygium* spp., *Feijoa sellowiana*, *Myrciaria cauliflora*, *Eucalyptus* spp., *Eugenia caryophyllus* e *Pimenta dioica* (Litz, 2005).

Dentro do gênero *Psidium*, estão incluídas cerca de 150 espécies, dentre as quais se destacam *P. guajava* L., *P. cattleianum* Sabine e *P. guineense* Swartz ou *P. araçá* Raddali (Pereira & Nachtigal, 2003). Dentre as características que diferenciam o gênero *Psidium* de

outros gêneros da família, destacam-se uma combinação de caracteres florais e de sementes, entre as quais flores com cinco pétalas livres e alternadas de cor branca e creme, estames variando de 60 até 320, lóculos multiovalados, placenta frequentemente peltada, frutos com muitas sementes ásperas, não lustrosas, cobertas por uma camada de polpa quando úmida (Landrum & Sharp, 1989). Bezerra *et al.* (2006) lista várias espécies de araçazeiro, identificando sinonímia, nome vulgar e área de ocorrência. Para os autores, as espécies de araçazeiros mais importantes no Brasil são *P. cattleyanum* e *P. guineense*. Novas espécies de *Psidium* têm sido identificadas na parte Central do Brasil (Soares-Silva & Proença, 2008) e no Estado da Bahia (Landrum & Funch, 2008).

Segundo Seth (1963), citado por Pommer & Murakami (2009), estudos comparativos de morfologia e biologia floral entre *P. guajava*, *P. guineense*, *P. chinense*, *P. molle* e *P. cattleianum* var. *lucidum* indicaram que as espécies são muito similares, com pequenas modificações para *P. cattleianum*. Ainda segundo o autor, o cruzamento entre *P. cattleianum* var. *lucidum* e *P. guajava* resultou em frutos sem sementes, sendo que *P. cattleianum* var. *lucidum* foi considerado como sendo octaplóide, comparado com *P. molle*, que foi tetraplóide, e todas as demais espécies citadas como sendo diplóides ( $2n = 22$ ). A importância das outras espécies de *Psidium* pode ser exemplificada no uso como porta-enxerto de *P. guajava*, que segundo Jaiswal & Jaiswal (2005) *P. friedrichsthalianum* tem demonstrado ser resistente ao nematóide *Meloidogyne incognita*.

Estudos sobre a biologia reprodutiva das *Myrtaceae* são escassos no Brasil, especialmente sobre as espécies de *Psidium*, pouco se sabendo das necessidades de polinização em *P. guajava*. Trabalhos encontrados apresentam dados muito divergentes a respeito da receptividade do estigma da goiabeira. Singh & Sehgal (1986) afirmaram que o estigma da goiabeira está receptível dois dias antes da antese. Boti (2001) sugere que ele fica receptivo na pré-antese, permanecendo por trinta horas, entretanto Soubiê Sobrinho (1951) comentou que a receptividade do estigma inicia-se no período da antese. Dasarathy (1951) e Balasubrahmanyam (1985) afirmaram que a receptividade só acontece duas a três horas da abertura da flor.

Segundo Pommer & Murakami (2009), a maioria dos programas de melhoramento da goiabeira é baseada em cruzamentos artificiais, com plantas de goiabeira sendo cruzadas entre elas ou mesmo com diferentes espécies de *Psidium*, que resultam em cruzamentos interespecíficos. São Jose & Pereira (1987) sugerem que a polinização da goiabeira deve ser efetuada imediatamente após a emasculação da flor. A emasculação, que

consiste na remoção de anteras sépalas e pétalas, deve ser realizada no estágio de ruptura do cálice.

### **Importância econômica, biologia e métodos de controle do nematoide *Meloidogyne enterolobii***

*Meloidogyne enterolobii* é um nematóide que continua a destruir plantios comerciais de goiabeira no Vale do São Francisco, com prejuízos diretos de R\$ 108.289.900,00 e perda de 3650 empregos diretos até 2008. As perdas causadas por esse nematóide em cinco estados brasileiros é da ordem de R\$ 112,7 milhões (Pereira *et al.*, 2009). Esse patógeno teve a sua primeira identificação no Brasil na região do Vale do São Francisco (Carneiro *et al.*, 2001).

O nematóide das galhas *M. enterolobii* Yang & Eisenback foi descrito de uma amostra de uma árvore na China em 1983, tendo sido subsequentemente identificado em goiabeira naquele mesmo país. Mais recentemente, foi indicado que *M. enterolobii* é uma sinonímia de *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann, descrito originalmente em Porto Rico, numa espécie selvagem de tomateiro. Atualmente, esse nematóide tem sido detectado em diferentes regiões do mundo, em diferentes hospedeiros, inclusive em espécies portadoras de genes de tolerância a *Meloidogyne* spp. (Carneiro *et al.*, 2012). Gomes *et al.* (2011) estabeleceram que esta doença provocada pelo nematóide *M. enterolobii*, agora denominada “declínio da goiabeira”, a qual é causada pela associação do mesmo com *Fusarium solani*. Esse nematoide foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2001, nos municípios de Petrolina-PE, Curaçá e Maniçoba-BA, causando transtornos aos pequenos e médios produtores (Carneiro *et al.*, 2001), sendo em seguida, encontrado em outras áreas do Vale do Sub-Médio São Francisco (Moreira *et al.*, 2003).

De acordo com Almeida (2008), esse nematóide foi confundido com *M. arenaria* devido à proximidade do número de cromossomos (44–45 vs. 40–48) e ao padrão perineal de formato ovóide. As diferenças marcantes de *M. arenaria* e outras espécies de *Meloidogyne* estão no singular fenótipo enzimático e muitos caracteres morfológicos. Em *M. arenaria*, os padrões perineais são arredondados a ovóides dorsoventralmente, com linhas laterais raramente distinguíveis e com estrias ventrais descontínuas e bifurcadas, destituídas de expansões laterais das estrias comumente referidas como asas. A região labial do macho de *M. mayaguensis* não exhibe anelações que são, às vezes, observadas nos machos de *M. arenaria*.

A severidade do ataque do nematóide à goiabeira pode ser classificada entre sintomas primários e secundários. Segundo Carneiro *et al.* (2001) os sintomas primários são as galhas, em grande quantidade, formadas no sistema radicular e necroses associadas, conseqüentemente ocorrendo a diminuição das raízes finas. Os sintomas secundários são bronzeamentos na borda das folhas, seguidas de um amarelecimento, ocasionando o desfolhamento total da parte aérea, que antecede a morte da planta. Em relação aos frutos, estes perdem a sua aparência lisa e verde, amadurecem prematuramente, apresentando baixo tamanho para comercialização (Moreira *et al.*, 2001).

Os estudos para controle e manejo desse nematóide têm considerado o controle biológico, o manejo e rotação de culturas, a aplicação de inseticidas sistêmicos e o uso de espécies selvagens de *Psidium* como porta enxerto da goiabeira. Todos esses esforços, contudo, não têm resultado em controle satisfatório do nematóide (Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2011), que continua a destruir plantios comerciais de goiabeira, expandindo-se para outras áreas do país.

Fontes de resistência a *M. enterolobii* não têm sido identificadas no germoplasma de *P. guajava* (Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2009; Castro *et al.* 2012), podendo ser encontradas em espécies selvagens do gênero *Psidium* (Cuadra & Quincosa, 1982; Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2009), mas com limitada ou completa incompatibilidade quando usadas como porta-enxerto da goiabeira (Carneiro *et al.*, 2007; Almeida, 2008; Castro *et al.*, 2012). No conjunto, esses estudos, até então, não têm resultado em soluções eficientes para controle do nematóide.

O desenvolvimento e avaliação de híbridos interespecíficos entre plantas susceptíveis de goiabeira e plantas resistentes de *Psidium* selvagens não têm sido enfatizados, o que poderá romper com os problemas de incompatibilidade do uso de porta-enxertos. Negi & Rajan (2007), Pereira & Nachtigal (2003) e Pommer & Murakami (2009) têm reportado híbridos interespecíficos, indicando que os mesmos podem ser obtidos de forma artificial. Negi & Rajan (2007) reportaram que o cruzamento entre *P. guajava* e *P. molle* foi incompatível, mas quando *P. molle* foi usado como planta materna o resultado foi satisfatório. Ainda, segundo os autores, o híbrido interespecífico foi tolerante à murcha da goiabeira, uma importante doença na Ásia e África, e compatível quando usado como porta-enxerto de variedades comerciais de goiabeira.

No gênero *Psidium*, existem outras espécies que são produtoras de frutos comestíveis, dentre as quais se destacam *P. cattleianum* Sabine e *P. guineense* Swartz, popularmente conhecidos como araçazeiros. Apesar de não apresentarem a mesma

importância econômica quanto à goiabeira, os frutos apresentam características desejáveis, com sabor exótico e elevado teor de vitamina C. Além disso, vêm sendo estudados como fontes de tolerância ao *M. enterolobii* (Raseira & Raseira, 1996, Bezerra, *et al.*, 2006, Souza *et al.*, 2006).

A hibridação seguida de avaliação e seleção tem sido um método de melhoramento muito utilizado, proporcionando resultados significativos para aumento de produtividade e resistência a pragas e doenças. Segundo Corrêa *et al.* (2011) o melhoramento genético é uma potente ferramenta, tanto no que diz respeito à obtenção de cultivares com vantagens econômicas, quanto na caracterização e conservação de material genético. Nesse aspecto os bancos ativos de germoplasma (BAGs) servem como fontes para estudos dos caracteres morfológicos, nutricionais, funcionais e genéticos.

Avaliar e caracterizar os acessos de goiabeiras e araçazeiros oriundos de várias regiões, existentes no banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido, é imprescindível para se conhecer a variabilidade genética existente nos acessos. A existência de grande número de materiais geneticamente diferentes, mas que mantêm alguma compatibilidade genética aumenta a chance de haver sucesso na obtenção de híbridos interespecíficos.

### **Aplicação de marcadores microsatélites na goiabeira**

Os marcadores moleculares de DNA são amplamente empregados, em análises genéticas, para as mais diversas finalidades: identificação de clones, híbridos, cultivares, estudos de fluxo gênico e estimativas de taxa de cruzamento e parentesco (Buso *et al.*, 2003).

O emprego de marcadores moleculares no processo de caracterização genética tem sido amplamente realizado devido a diversas características desejáveis, dentre as quais se destacam: alta taxa de polimorfismo detectado, ausência de influência ambiental apresenta baixo custo por dado gerado e são distribuídos em todo o genoma (Ferreira *et al.*, 2007).

Microsatélites 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.*, 2010). Marcadores microsatélites apresentam ainda a propriedade da co-

dominância, que possibilita separar homozigotos de heterozigoto para um determinado loco.

Risterucciet *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. Valdes-Infante *et al.*(2010),aplicaram esses ‘primers’ para caracterização de germoplasma cubano, enquanto Sanchez-Teyer *et al.* (2010) caracterizaram germoplasma mexicano e Briceño *et al.*, 2010 caracterizaram germoplasma venezuelano. Oliveira *et al.* (2009) reportaram trabalho preliminar de caracterização de 53 acessos brasileiro de goiabeira, sem contudo analisarem araçazeiros de diferentes espécies para orientar trabalhos de cruzamentos interespecíficos. 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 possibilidade 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 par os agricultores.

Desse modo, este trabalho objetivou avaliar a resistência de híbridos interespecíficos de duas espécies de *Psidium* a nematoide *M. enterolobbi* para controle desse patógeno, que continua a dizimar plantios de goiabeira em todo o Brasil, e proceder a caracterização molecular de acessos de *Psidium* com base em marcadores microssatélites, visando orientar cruzamentos de goiabeira com outras espécies do gênero.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. J. de. 2008. **O nematóide de galha da goiabeira (*Meloidogyne mayaguensis* Ramah & Hirschmann, 1988): identificação, hospedeiros e ação patogênica sobre goiabeiras**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 97p.

ALMEIDA, E.J.; SANTOS, J.M. and MARTINS, A.B.G. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 44, p. 421-423, 2009.

ALMEIDA, A.M.; GOMES, V.M.; SOUZA, R.M. Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. **Bragantia**, v. 70, p. 837-842, 2011.

BALASUBRAHMANYAN, V. R. Studies on blossom biology of guava. **Indian Journal of Horticulture**, v. 16, p. 69-75, 1985.

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; SILVA JUNIOR, J. F. da; PROENÇA, C.E.B. Araçá. In VIEIRA, et al (Eds). **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 42-63, 2006.

BOTI, J. B. **Polinização entomófila da goiabeira (*Psidium guajava* L): Influência da distância de fragmentos florestais em Santa Teresa**, Espírito Santo. p. 57. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2001

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZHON, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 46-50, 2003.

BRICEÑO, A., ARANGUREN, Y. and FERMIN, G. Assessment of guava-derived SSR markers for the molecular characterization of Myrtaceae from different ecosystems in Venezuela. **Acta Horticulturae**.(ISHS) v. 849, p. 139-146, 2010.

CARNEIRO, R.M.D.G. CIROTTI, P.A., QUINTANILHA, A.P., SILVA, D.B. and CARNEIRO, R.G. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**. v. 32, p. 281-284, 2007

CARNEIRO, R. M. D. G. ; FREITAS, V. M. ; Mattos, J.C. ; Castro, J.M.C. ; GOMES, C. B. ; CARNEIRO, R. G. . Major guava nematodes and control prospects using resistance on *Psidium* spp. and non-host crops. **Acta Horticulturae**, v. 959, p. 41-49, 2012.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MOREIRA, W.A.; ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 25(2), p. 223-238, 2001.

CASTRO, J. M. C. E. ; SANTOS, C. A. F. ; FLORI, J.E. . Reaction of *Psidium* accessions to the nematode *Meloidogyne enterolobii*. **Acta Horticulturae**, v. 959, p. 51-57, 2012.

CORRÊA, L.C.; SANTOS, C.A.F.; LIMA, G.P.P.; RODRIGUES, M.A.; COSTA, T.P.P.; Similaridade genética entre acessos de goiabeiras e araçazeiros baseada em marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 859-867, 2011.

CUADRA, R.;QUINCOSA, A. Potential of different *Psidium guajava* species as sources for resistance of guava to *Meloidogyne*. **Cienc Agri**, v. 13, p. 19-26, 1982,

DASARATHY, T. B. The guava. **Madras Agriculture Journal**, v. 38: 521-527, 1951.

FERREIRA, M.E; MORETZSOHN, M.C; BUSO, G.S.C. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p 385-386.

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 Setembro de 2012.

GUTIERREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p.27, 2008.

GOMES, V.M., R.M. SOUZA, V. MUSSI-DIAS, S.F. SILVEIRA & C. DOLINSKI. Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne enterolobii* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p 1-6, 2011.

IBGE – **Produção agrícola municipal**. 2009. Consulta a <http://www.sidra.ibge.gov.br>, em 29/10/2012.

JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. *Psidium guajava* Guava. In: R.E. LITZ (ed). **Biotechnology of fruit and nuts crops**. CAB International, Cambridge. 2005, pp. 395-401.

LANDRUM, L.R.; FUNCH, L. S. Two New Species of *Psidium* (Myrtaceae) from Bahia, Brazil. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 18 (1), p. 74-77, 2008.

LANDRUM, L.R.; SHARP, W.P. Seed coat characters of some American Myrtinae (Myrtaceae): *Psidium* and related genera. **Systematic Botany**, v. 14, p. 370–376. 1989.

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.

LITZ, R.E. **Biotechnology of fruit and nuts crops**. CAB International, Cambridge. p. 394.2005.

LÓCIO, F.J.M. e MORAES FILHO, R.A. Obtenção de vantagem competitiva sustentável para a goiabcultura no Brasil: análise do modelo Goiabrás. **Revista do Centro de Ciências Administrativas**, Fortaleza, v. 11, n. 2, p. 198-210, 2005.

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.

MOREIRA, W.A., MAGALHÃES, E.E., PEREIRA, A.V.S., BARBOSA, F.R., LOPES, D.B., MOURA, A.O.S. (2003) Espécies de nematóides das galhas associadas a culturas no Submédio São Francisco. **Nematologia Brasileira**, v. 27, n 2, p. 257, 2003.

NEGI, S.S., RAJAN, S. Improvement of guava through breeding. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 735, p. 31-37, 2007.

OLIVEIRA, M. de O. ; SANTOS, C. A. F. ; CORREA, L.C. ; ARAUJO, J. ; RIBEIRO, H.L.C. **Diversidade genética em acessos de goiabeira (*Psidium guajava* L.) de diferentes origens geográficas avaliadas por marcadores microsátélites..** In: IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido, 2009, Petrolina. IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semi-Árido. Petrolina: Embrapa Semi Arido, 2009.

PEREIRA, F.M.;NACHTIGAL, J.C. 2003. Goiabeira. p.267-289. In: C. H. Bruckner (ed.), **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**, UFV. Viçosa.

PEREIRA, F.O.M., SOUZA, R.M., SOUZA, P.M, DOLINSKI, C.; SANTOS, G.K. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogynemayaguensis* na cultura da goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v.33, p. 176-181, 2009.

PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira**. Jaboticabal: FUNEP,1995. 47 p.

POMMER, C.V.; MURAKAMI, K.R.N. Breeding Guava (*Psidium guajava* L.). In JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. (eds.). Breeding Plantation Tree Crops: **Tropical Species**.Springer, New York.p.83-120. 2009.

RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro:Psidiumcattleyanum**.Embrapa-CPACT, Pelotas, 1996.

RISTERUCCI, A. M., DUVAL, M. F., ROHDE, W.; BILLOTTE, N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 745–748, 2005.

RISTERUCCI, A.M.; NANSOT, G.; GRANGEON, R.; LEPITRE, V.; DE REEPER, A.; ARGOUT, X.; RUIZ, M.; BILLOTTE, N. Development of guava microsatellite (ssr) markers using the sat software.**Acta Horticulturae** (ISHS), v. 849, p. 113-120, 2010.

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.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; AMAYA-FARFAN, J.; KIMURA, M. Carotenoid Composition of Brazilian Fruits and Vegetables.**Acta Horticulturae**, v. 744, p.409-416, 2007.

SÁNCHEZ-TEYER, L.F., BARRAZA-MORALES, A., KEB, L., BARREDO, F., QUIROZ-MORENO, A., O’CONNOR-SÁNCHEZ, A. and PADILLA-RAMÍREZ, J.S..assessment of genetic diversity of mexican guava germplasm using dna molecular markers. **Acta Horticulturae** (ISHS),v. 849, p. 133-138, 2010.

SÃO JOSÉ, A.R.; PEREIRA, F.M. Study on different methods for pollen collect and pollination of guava (*Psidium guajava* L.).**Científica**, São Paulo, 15(1/2): 85-92, 1987.

SINGH, G. Recent Development in Production of Guava.**Acta Horticulturae**, v. 735, p.161-176, 2007.

SINGH, R.; SEHGAL, O. P. Studies on the blossom biology of *Psidiumguajava* L. (guava).; 2, Pollen studies stigmatal receptivity pollination and fruit set. **India Journal of horticulture**,v. 25, p. 52-59, 1986.

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.

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

SOUZA, R. M. et al. Manejo de nematóides das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 165-169, 2006.

**CAPÍTULO I – OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO DE *Psidium* AO NEMATÓIDE *Meloidogyne enterolobii*<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Publicado como artigo científico (Anexo I): Costa, S.R. da; Santos, C.A.F.; Castro, J.M.C.E. 2012. Assessing *Psidium guajava* × *P. guineense* hybrids tolerance to *Meloidogyne enterolobii*. Acta Horticulturae 959: 59-65.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi obter e avaliar híbridos interespecíficos de *Psidium* para a resistência ao nematoide, para ser usado como porta-enxerto de goiabeira e futuro estudos genéticos, como mapeamento das fontes de resistência em gerações segregantes dos híbridos interespecíficos. Foram realizados cruzamentos entre as espécies *P. guajava*, *P. guineense*, *P. cattleyanum* e *P. friedrichstalianum*. Os cruzamentos foram realizados quando os botões florais apresentavam ruptura do cálice, sendo usados dois marcadores microssatélites SSR para confirmação da hibridação. Quando as plantas atingiram 15 a 20 cm de altura, foi realizada a inoculação com suspensão contendo 10.000 ovos do nematoide. Quatro meses após a inoculação, foi removido o solo das plantas para avaliação individual para número de galhas, número de ovos e fator de reprodução (FR). As plantas de dois cruzamentos entre *P. guajava* x *P. guineense* foram consideradas como híbridas quando genotipadas com os locos mPgCI 251 e mPgCI 252. Das 10 plantas do cruzamento GUA 161 PE x ARA 138 RR todas foram resistentes ao nematoide, pois apresentaram índice de galhas e FR iguais à zero. Das 10 plantas do cruzamento GUA 161 PE x ARA 153 BA, sete foram consideradas como suscetíveis ao nematoide. Os resultados sugerem variabilidade para tolerância entre acessos de *P. guineense*, e que a tolerância ao nematoide foi conferida por alelo dominante. Plantas do híbrido interespecífico têm apresentado crescimento similar ao da goiabeira aos oito meses de idade e alta compatibilidade com 'Paluma', indicando que essa estratégia pode apresentar excelentes resultados no controle de *M. enterolobii*.

**Palavras-chave:** cruzamento, híbrido interespecífico e avaliação.

## ABSTRACT

The aim of this study was to obtain and evaluate interspecific hybrids between species of *Psidium* for nematode tolerance, to be used as guava rootstock and future genetic studies, such as mapping of tolerance in segregating generations of interspecific hybrids. Crosses were made between *P. guajava*, *P. guineense*, *P. cattleyanum* and *P. friedrichstalianum*. The crosses were performed when the calyx ruptured on the flower buds, and two microsatellite markers were applied to confirm hybridization. When the plants reached 15 to 20 cm tall, they were inoculated with a suspension containing 10,000 nematode eggs. Four months after inoculation, the soils were removed from the plants for individual evaluation of the number of galls, number of eggs and reproduction factor (RF). Only plants from the cross *P. guajava* x *P. guineense* were considered true hybrids when genotyped with *mPgCI251* and *252* microsatellites. Ten plants of GUAPE161 x ARA 138 RR crossing were resistant to nematodes, as presented gall index and RF equal to zero. Seven of the 10 plants of the GUAPE161 x ARA 153B were susceptible to nematodes. The results suggested variability for tolerance among *P. guineense* accessions and that tolerance to the nematode could be conferred by a dominant allele. Plants of the interspecific hybrid grew similarly to the guava trees at nine months of age in field and were highly compatible with 'Paluma' guava, indicating that this strategy can present excellent results in controlling *M. enterolobii*.

Keywords: crossing, interspecific hybrid and evaluation.

## INTRODUÇÃO

A agricultura irrigada no Nordeste brasileiro tem se caracterizado como uma opção no agronegócio, apresentando grande importância na economia regional (Gonzaga Neto *et al.*, 1999). Diversas fruteiras compõem o sistema de produção em exploração na região, destacando-se mangueira, bananeira, videira, coqueiro e goiabeira. A goiabeira, nos últimos anos vem, sofrendo um grande declínio na sua produção, principalmente na região nordeste, como surgimento do patógeno denominado *Meloidogyne enterolobii*. Esse patógeno desestruturouquase toda a cadeia produtiva da goiaba no Vale do São Francisco, infestando área de cerca 5.000 ha, com prejuízo direto de R\$ 108.289.900,00 para os goiabicultores, além da redução de 3.650 empregos diretos na região até 2008 (Pereira *et al.*, 2009). Nos perímetros irrigados de Petrolina - PE e Juazeiro - BA houve redução de mais de 75% da área plantada em decorrência da erradicação dos pomares infestados. (Carneiro *et al.*, 2007).

O primeiro relato da ocorrência desse patógeno em raízes de goiabeira no Brasil foi observado na região do vale do São Francisco (Carneiro *et al.*, 2001). Considerando que, desde o final da década de 80 já vem sendo relatados severos danos causados pelo nematoide de galhas na cultura, com prejuízo em cinco estados brasileiros da ordem de 112,7 milhões de reais (Pereira *et al.*, 2009), faz-se necessário a adoção de medidas preventivas, visando reduzir os prejuízos provocados pelo nematoide.

Para controle do nematóide, os estudos têm considerado o controle biológico, o manejo de culturas, a aplicação de inseticidas de solos sistêmicos e o uso de espécies do gênero *Psidium* tolerantes como porta enxerto de cultivares comerciais, sem, contudo, apresentarem resultados satisfatórios para o efetivo controle desse nematoide (Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2011).

A identificação de fonte de tolerância ao nematóide dentro de *P. guajavanão* tem tido sucesso (Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2009). A procura por fonte de tolerância a *Meloidogyne* spp. em espécies silvestres de *Psidium* (Cuadra & Quincosa, 1982; Carneiro *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2009) tem resultado na identificação de fontes de tolerância, mas que tem apresentado limitada ou total incompatibilidade quando usados como porta enxerto de cultivares comerciais de goiabeira (Almeida, 2008; Carneiro *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2012). Esses trabalhos de identificação de fontes de resistência não resultaram, até a presente data, na aplicação comercial dos resultados.

Até então, o desenvolvimento e avaliação de híbridos interespecíficos entre plantas de espécies silvestres de *Psidium* e plantas suscetíveis de goiabeira não tem sido enfatizado, o que poderia romper com a principal limitação do uso de espécies silvestres de *Psidium*, a incompatibilidade, seja pelo pequeno porte, seja pela dificuldade de soldadura na enxertia. Negi & Rajan (2007), Pereira & Nachtigal (2003) e Pommer & Murakami (2009) reportaram híbridos interespecíficos, indicando que os mesmos podem ser obtidos de forma artificial. Negi & Rajan (2007) destacaram que o cruzamento entre *P. guajava* e *P. molle* foi incompatível, mas quando *P. molle* foi usado como planta materna o cruzamento foi compatível. Ainda, segundo os autores, o híbrido interespecífico foi tolerante à murcha da goiabeira, uma importante doença na Ásia e África, e compatível quando usado como porta-enxerto de variedades comerciais de goiabeira. O gênero *Psidium* é composto por mais de 150 espécies, incluindo araçazeiros, um termo usado para espécies do gênero de ocorrência espontânea no Brasil (Raseira & Raseira, 1996), indicando ampla oportunidade para identificação de fontes de resistência ao *M. enterolobii*.

A hibridação tem sido um método de melhoramento muito utilizado, proporcionando resultados significativos para aumento de produtividade e resistência a pragas e doenças. Segundo Pereira & Natchigal (2002), na goiabeira, os métodos de melhoramento genético aplicado à cultura são basicamente, seleção e hibridação. Do ponto de vista genético, a união de quaisquer dois gametas, que diferem na sua constituição alélica em um ou mais locos, produz um híbrido (Allard, 1960).

Os marcadores moleculares de DNA estão, cada vez mais, sendo empregados em análises genéticas, para as mais diversas finalidades: identificação de clones, híbridos, cultivares, estudos de fluxo gênico e estimativas de taxa de cruzamento e parentesco (Busoet *al.*, 2003). Segundo Cristofani *et al.* (2001), os marcadores microssatélites apresentam maior eficiência na identificação de híbridos. Faleiro *et al.* (2003) relataram sucesso na utilização desses marcadores para a confirmação de hibridação interespecífica entre *Theobromacacao* e *T. grandiflorum*. Segundo os autores, o uso de um ou dois 'primers', pelo menos com uma banda informativa é suficiente para confirmar a ocorrência da fecundação cruzada.

O objetivo do presente estudo foi obter e avaliar híbridos interespecíficos de *Psidium* para a tolerância ao nematoide, para serem usado como porta-enxerto de goiabeira em áreas comerciais e para estudos genéticos no futuro, como mapeamento da tolerância em gerações segregantes dos híbridos interespecíficos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material genético para obtenção de híbridos interespecíficos**

O trabalho foi desenvolvido utilizando acessos do banco de germoplasma de goiabeira e araçazeiro do campo experimental de Bebedouro, pertencente a Embrapa Semiárido, localizado no município de Petrolina-PE. Para obtenção de híbridos foram utilizados seis acessos de goiabeira e seis acessos de araçazeiros (Tabela 1).

### **Processo de hibridação manual**

Inicialmente, foi realizada poda das plantas de todos os acessos para indução floral sincronizada, de forma a possibilitar a realização dos cruzamentos manuais. Os botões florais dos genitores femininos foram emasculados na fase da pré-antese, quando apresentavam ruptura do cálice. A emasculação consistiu na retirada de pétalas, sépalas, e anteras, conforme procedimento descrito por Pereira & São José (1987). As flores dos genitores masculinos (aráçazeiros) foram coletadas sempre no dia da polinização, sendo colocados em placa de Petri, devidamente identificadas.

No procedimento de polinização, os botões florais da planta maternal (goiabeira) foram emasculados com auxílio de uma tesourinha com ponta, e os estames retirados com auxílio de uma pinça (Figura 1). Para esse procedimento, foi utilizado álcool 98% para assepsia das mãos e dos utensílios utilizados, sendo a emasculação realizada no mesmo dia da polinização. As flores doadoras foram maceradas entre os dedos na placa de Petri, sendo o pólen do genitor masculino depositado e distribuído em toda a superfície do estigma. Após a polinização, os botões foram etiquetados com as identificações dos genitores e em seguida, foram protegidos com saquinhos plásticos transparentes, que permaneceram por até 15 dias para prevenir contaminação, seja por vento ou por agentes polinizadores. Os frutos em desenvolvimento foram monitorados diariamente. Após três meses foi realizada a colheita dos frutos polinizados.

### **Produção de mudas de híbridos interespecíficos**

Os frutos oriundos dos cruzamentos foram levados ao laboratório para retirada das sementes. Os frutos foram cortados verticalmente com uma faca de mesa, e retirada à polpa

com auxílio de uma colher, passando por uma peneira de malha fina em água corrente para separação das sementes da polpa, as sementes foram postas para secar à sombra, por 24 h, após esse período, foi realizado, a contagem do número de sementes, que foram então colocadas dentro de um saquinho de papel devidamente identificado, para armazenamento em câmara fria.

A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 20L, contendo uma parte de substrato artificial (Plantimax®) e uma parte de solo, proporção 1:1, e mantidas em casa de vegetação. A germinação das sementes ocorreu entre 22 a 30 dias. Quando as plantas atingiram de 6 a 8 cm de altura, foram repicadas e transplantadas para sacos de polietileno 22 x 30 cm, contendo solo autoclavado, para não haver competição entre os patógenos. Em seguida, as mudas foram colocadas em telado.

### **Genotipagem dos híbridos interespecíficos com marcadores microssatélites**

Foram coletadas folhas jovens e sadias dos parentais e de algumas plantas dos cruzamentos obtidos, sendo as mesmas colocadas em sacos de papel, devidamente identificados, e acondicionados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. Na extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB 2x de Doyle & Doyle (1990): A) a maceração mecânica foi realizada na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino; B) o tecido vegetal macerado de cada amostra foi transferido para tubos eppendorf duplicados, de 2 mL, contendo, cada um, 950  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB 2x; C) As amostras foram colocadas em banho Maria a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, com inversão do tubo a cada 10 min; D) após esse período, foram adicionados 950  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 6.000 rpm, por 10 min; E) 700  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de eppendorf; F) foram adicionados 467  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico gelado, com suaves inversões do tubo, que foi mantido por 20 min em gelo; G) após os 20 min as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm para formação do 'pellet' no fundo do tubo, descartando-se o sobrenadante em béquer em capela de exaustão de gases. As paredes dos tubos foram secas com auxílio de cotonete esterilizado em ultravioleta; H) o 'pellet' foi ressuspenso em 30  $\mu\text{L}$  Tris-EDTA, permanecendo por 24 horas na geladeira para completa dissolução do 'pellet'; I) A remoção de RNAscoextraída foi realizada com 10% de RNase por 45 min em banho Maria a  $37^{\circ}\text{C}$ .

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. No gel de agarose as amostras foram diluídas para 10 ng/ $\mu$ L e armazenadas a -20°C.

Foram utilizados dois marcadores microssatélites para confirmação dos híbridos interespecíficos verdadeiros. As reações de amplificação de PCR foram realizadas para um volume final de 10  $\mu$ l, contendo 30 $\mu$ l de DNA genômico, 1x de tampão para TaqDNA polimerase, 2,5 mM MgCL<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP's, 0,2  $\mu$ M de cada 'primer' e 0,75 unidades de enzima Taq DNA Polimerase. A programação para amplificações consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 s, 52°C por 60 s e 72°C por 60 s e uma etapa de extensão final a 72°C, por 5 min. Após a amplificação, foram adicionados em cada amostra de DNA, 3 $\mu$ l de azul de bromofenol, 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. As placas de vidro foram limpas com o auxílio de um lenço de papel embebido em etanol. A placa grande (de adesão do gel) foi tratada com 1,1 mL de uma solução contendo 95% de Etanol + 0,5 % de ácido Acético e 1  $\mu$ L de bindsilane. Essa solução foi espalhada em toda a superfície da placa com um auxílio de um lenço de papel, o excesso foi retirado com um lenço umedecido com álcool etílico. A placa menor foi tratada de acordo como descrito anteriormente, entretanto, substituindo-se a solução contendo bindsilane por um produto usado para limpar vidros de automóveis, com nome comercial de Wartelux (Luxcar).

Uma pré-corrída de 30 min a 40 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foram aplicado 2,5 $\mu$ L da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 3h, com potência constante de 40 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 descrito por Creste *et al.*, (2001), com alguma modificações:

- A. A placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10% e ácido acético a 1% por 20 min, sob leve agitação.
- B. Lavagem de água destilada sob agitação por 1min.

- C. Pré-tratamento foi realizado em solução de ácido nítrico a 0,2 mol/L por 3min, seguido de nova lavagem do gel com água destilada por 1min, sob lenta agitação.
- D. A impregnação do gel foi realizada com solução de nitrato de prata 0,2% por 20min, seguida de duas lavagens de 30 s com água destilada, sob leve agitação.
- E. O gel foi imerso em solução de revelação contendo carbonato de sódio 2,4%, e formaldeído 37%, sendo utilizada metade da solução reveladora na primeira lavagem, até o início do aparecimento das bandas.
- F. A placa com gel foi transferido para uma segunda bandeja contendo o restante da solução e corado até o aparecimento da intensidade desejada.
- G. Uma nova lavagem do gel foi realizada com ácido acético a 5% por 3min, seguida de uma lavagem final com água por 1 min, sob agitação lenta. A placa com gel corado foi colocada em posição vertical até a secagem em temperatura ambiente, para posterior análise dos fragmentos.

### **Avaliação da tolerância ao nematóide**

As mudas provenientes dos diferentes cruzamentos e seus parentais foram produzidas por sementes como descrito no tópico produção de mudas de híbridos interespecíficos. Foram inoculadas 33 plantas paternas com três níveis de inóculo e 10 plantas dos cruzamentos obtidos.

Quando as plantas atingiram 15 a 20 cm de altura, realizou-se inoculação com suspensão contendo 4.000, 8.000, 10.000 e 12.000 ovos. Como fonte de inóculo utilizou-se o *M. enterolobii* coletado em área comercial de goiabeira localizada no município de Petrolina/PE. O inóculo foi purificado e multiplicado em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) cv. Santa Cruz, por não mais do que 60 dias, mantido em casa de vegetação e extraído por meio da técnica descrita por Hussey & Barker (1973). A suspensão foi depositada em dois orifícios ao redor da planta com uma pipeta, sendo que cada planta recebeu 2 mL por orifício, a uma distância de 1,5 cm do caule e 2,5 cm de profundidade. As plantas inoculadas foram conduzidas em ambiente de casa de vegetação com irrigação diária durante 120 dias.

Após quatro meses da inoculação, o solo foi removido, seguindo-se de lavagem em água corrente, tendo-se o cuidado de não se danificar a raiz. As plantas foram colocadas dentro de sacos plásticos devidamente identificados, para análise no laboratório. As raízes das plantas foram cortadas e trituradas em liquidificador em solução de hipoclorito de

sódio a 0,5% por 20 a 30 s, com menor velocidade para liberação dos ovos, conforme procedimento descrito por Hussey & Barker (1973). O sobrenadante foi despejado em um conjunto de peneira de 200 mesh sobre outra de 500 mesh, passando o excesso de hipoclorito pela peneira de menor abertura. O conteúdo restante (aproximadamente 20 mL) foi recolhido em uma béquer e em seguida colocado em um tubo plástico identificado, centrifugando-se por 5 min a 1750 rpm. Logo após, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se sacarose (454g de açúcar em 1000 mL de água) com uma nova centrifugação por 1 min a 1750 rpm. A sacarose foi descartada na peneira de 500 mesh, retirando-se o excesso da sacarose em água corrente. Os ovos retidos anteriormente na peneira foram recolhidos em um béquer, para posterior análise.

As raízes foram processadas para avaliação do número de ovos e posterior determinação do fator de reprodução, ( $FR = \text{população final} / \text{população inicial}$ ). Os ovos foram contados em estereoscópio. Foram considerados imunes os genótipos com  $FR = 0$ , resistentes  $FR < 1,00$  e susceptíveis  $FR > 1,00$ .

As plantas também foram avaliadas em relação ao índice de galhas pela escala de notas proposta por Hartman & Sasser (1985), variando de 0 a 5: 0 = nenhuma galha ou massa de ovos, 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos, 2 = 3-10, 3 = 11-30, 4 = 31-100, e 5 = mais que 100 galhas ou massas de ovos. A planta que apresentou o índice médio de galhas e massas de ovos menor ou igual a 2 foi considerada resistente ao *M. enterolobii*.

### **Enxertia para avaliação de compatibilidade**

A cultivar de goiabeira Paluma, a mais cultivada da região nordeste, foi enxertada em um híbrido para avaliação da compatibilidade. O método de enxertia foi por garfagem do tipo fenda cheia, efetuando-se um corte em forma de uma cunha, a qual foi inserida na fenda do porta-enxerto. Os enxertos foram amarrados com fitas plásticas e recobertos com saquinhos plásticos, com o objetivo de se formar uma câmara úmida, evitando desidratação do material vegetativo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No total, foram realizados 1.041 cruzamentos, tendo confirmados com a genotipagem dos microssatélites, apenas sete como híbridos interespecíficos. Os dois marcadores microssatélites mPgCI 251 e mPgCI 252 foram suficientes para genotipar e

declarar as plantas como híbridos verdadeiros entre GUA 161 PE (*P. guajava*) x ARA 138 RR (*P. guineense*) e GUA 161 PE x ARA 153 BA (*P. guineense*) (Figura 2). As médias de porcentagem de pegamento foram de 13,3 % para os cruzamentos com o parental ARA 138 RR e 6,6 % para ARA 153 BA (Tabela 2). São José & Pereira (1987) observaram que a emasculação das flores, com eliminação das anteras, sépala e pétalas, no estágio de ruptura do cálice preveniu a autopolinização, sendo eficiente para a polinização controlada da goiabeira.

Junqueira *et al.* (2008) confirmaram híbridos interespecíficos no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. Cristofaniet *al.* (2001) confirmaram híbridos interespecíficos em citros utilizando RAPD e microssatélites. Para os autores os marcadores microssatélites apresentaram maior eficiência na identificação de híbridos, método adotado no presente estudo.

Ogawa<sup>2</sup> é reportado como sendo híbrido interespecífico entre *P. guajava* e *Psidium* sp., desenvolvido em Seropédica, Rio de Janeiro (Pereira & Nachtigal, 2002), sem estar evidente que tenha sido resultado de cruzamento controlado ou natural. Landrum *et al.* (1995) citaram a existência de híbridos naturais entre *P. guajava* e *P. guineense*, em três regiões da América Latina, tomando como referência caracteres morfológicos e químicos.

Outros cruzamentos entre plantas tolerantes de *P. friedrichstalianum* e *P. cattleyanum* com plantas suscetíveis de acessos de goiabeira foram realizados no presente estudo (Tabela 2), porém não foram confirmados como híbridos interespecíficos quando genotipados com os marcadores microssatélites. O cruzamento entre *P. cattleyanum* var. *lucidum* e *P. guajava* resultou em frutos sem sementes, sendo que *P. cattleyanum* var. *lucidum* foi considerado octaplóide e *P. guajava* diplóide (Pommer & Murakami, 2009).

Chakraborti *et al.* (2010) reportaram que o número de cromossomos em *P. guineense* é de  $2n=44$ . O acesso de goiaba GUA161 PE foi considerado como anfidiplóide, ou seja, com células  $2n$  e  $4n$  no mesmo indivíduo, quando analisado por citometria de fluxo (dados não apresentados), sugerindo que o sucesso com *P. guineense* pode ser atribuído a formação de gametas  $n$  e  $2n$  em GUA161 PE.

Das 33 plantas do acesso ARA138 RR cinco foram suscetíveis ao *M. enterolobii*, enquanto quatro do acesso ARA140 RR foram susceptíveis e duas das oito plantas do acesso ARA153 BA foram suscetíveis e as demais apresentaram resistência ao nematoide em estudo (Tabela 3). Esses resultados indicam a existência de variabilidade entre e dentro de *P. guineense* para resistência ao nematoide. Maranhão *et al.* (2001) e Miranda (2011)

também reportaram a existência de variabilidade para resistência ao nematoide dentro de espécies silvestres de *Psidium*. Resistência a *M. enterolobii* tem sido destacada em *P. guineense* (Maranhão *et al.*, 2003), *P. friedrichsthalianum* e *P. cattleyanum* (Carneiro *et al.*, 2007). Resultados conflitantes indicando suscetibilidade têm sido citados para *P. guineense* (Miranda, 2011) e *P. friedrichsthalianum* (Almeida *et al.*, 2009).

Nos diferentes números de ovos, 4000, 8000 e 12000 inoculados, não foram observados grandes diferenças no número de plantas resistentes, para os acessos ARA138 RR e ARA140 RR (Tabela 3), sugerindo que qualquer uma dessas doses permitiram a correta identificação de plantas resistentes ou não ao nematóide. Burla *et al.* (2010) avaliaram que a inoculação de 500 ou 2.000 ovos/planta foi suficiente para seleções de acessos e que as avaliações deveriam ser realizadas entre 135-180 dias após a inoculação. Carneiro *et al.* (2007) avaliou acessos de *Psidium* para resistência ao nematoide com 10.000 ovos, número esse adotado no presente estudo.

Todas as plantas oriundas do cruzamento GUA161 PE x ARA138 RR foram resistentes ao nematóide, não apresentando formação de galhas nas raízes (Figura. 3), e com fator de reprodução igual a zero (Tabela 4). No cruzamento GUA 161 PE x ARA153 BA, sete plantas apresentaram formação de galhas (Figura. 4), e três apresentaram número reduzido de galhas e  $FR < 1$  (Tabela 4), indicando a existência de variabilidade nesse híbrido. Esses dados sugerem que a resistência ao nematóide é de herança simples, em dominância, e que os parentais ARA138 RR e ARA153 BA apresentaram alelos em homozigose e heterozigose, respectivamente, para o loco de resistência ao nematóide. Dados conclusivos com qui-quadrado não foram possíveis devido ao baixo número de plantas GUA 161 PE x ARA153 BA avaliadas.

Foi também obtido fruto do cruzamento Gua03 MA (*P. guajava*) x Ara140 RR (*P. guineense*) (Tabela 2), entretanto não foi possível a avaliação quanto à resistência ao *M. enterolobii*, devido à baixa taxa de germinação, o que acarretou na formação de uma única planta. Problema referente à produção de sementes, número de sementes produzidas e viabilidade das sementes tem sido observado em trabalhos que visam estudar o índice de cruzabilidade entre diferentes espécies silvestres (Junqueira *et al.*, 2005). Corrêa *et al.* (2010) estudando antioxidantes em banco de germoplasma de goiabeira e araçazeiro, citaram que, o acesso Gua03 MA apresenta elevados teores de diversos antioxidantes, destacando-se para estudo dessa natureza, além da resistência ao *M. enterolobii*.

Sete das oito plantas de GUA161 PE x ARA138 RR enxertadas por garfagem com 'Paluma' foram compatíveis (Figura5) e apresentaram vigoroso desenvolvimento no

campo, indicando alta compatibilidade entre a espécie comercial de goiaba e os híbridos interespecíficos. Segundo Hartman *et al.*, (1997), a compatibilidade na enxertia é entendida como aquela em que ocorre a união bem-sucedida e o desenvolvimento satisfatório na composição de uma planta. Carneiro *et al.* (2007) realizaram ensaios com porta-enxertos e obtiveram taxa de 50% de pegamento entre a goiabeira ‘Paluma’ e *P. cattleyanum*, logo após a enxertia, sem, contudo, reportarem a compatibilidade a médio prazo.

## CONCLUSÃO

Existe variabilidade entre e dentro de acessos de *P. guineense* para resistência ao *M. enterolobii*. Híbridos interespecíficos entre GUA 161 PE de *P. guajava* x ARA 138 RR de *P. guineense* foram altamente resistentes ao nematóide, têm apresentado crescimento similar ao da goiabeira e alta compatibilidade com ‘Paluma’ aos dez meses de transplântio para campo com população endêmica do nematoide.

Estudos devem ser desenvolvidos para a obtenção de híbridos com outras espécies de *Psidium* resistentes ao *M. enterolobii*, o que possibilitará na ampliação das fontes de resistência e controle efetivo e duradouro desse nematoide, que continua a dizimar os plantios comerciais de goiabeira, em vários estados brasileiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R, W **Princípios do Melhoramento Genético de Plantas**. São Paulo, melhoramento, 1960.

ALMEIDA, A.M.; GOMES, V.M.; SOUZA, R.M. Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. **Bragantia**, v. 70, p. 837-842, 2011.

ALMEIDA, E. J. de. 2008. **O nematóide de galha da goiabeira (Meloidogynemayaguensis Ramah & Hirschmann, 1988):** identificação, hospedeiros e ação patogênica sobre goiabeiras. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 97p.

ALMEIDA, E.J.; SANTOS, J.M.; MARTINS, A.B.G. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogynemayaguensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 421-423, 2009.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZHON, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais –Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 46-50, 2003.

CHAKRABORTI, S.; SINHA, S.; SINHA, R.K. Chromosome number and karyotype analysis of wild guava *Psidium guineense* Sw. – a new report from Tripura, India. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3 (8), p. 925-927, 2010.

CARNEIRO, R. G. Resistance to *Meloidogynemayaguensis* in *Psidium* spp. Accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 281-284, 2007

CARNEIRO, R. M. D. G.; CIROTTO, P. A.; QUINTANILHA, A. P.; SILVA, D. B.; CARNEIRO, R.M.D.G. CIROTTO, P.A., QUINTANILHA, A.P., SILVA, D.B.; CARNEIRO, R.G. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 281-284, 2007.

CARNEIRO, R.M.D.G.; MOREIRA, W.A., ALMEIDA, M.R.A.; GOMES, A.C.M.M. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 25 (2), p. 223-227, 2001.

CASTRO, J. M. C. E. ; SANTOS, C. A. F. ; FLORI, J.E. . Reaction of *Psidium* accessions to the nematode *Meloidogyne enterolobii*. **Acta Horticulturae**, v. 959, p. 51-57, 2012.

CORRÊA, L.C. **Similaridade genética em acessos de goiabeiras e araçazeiros: Análises químicas e bioquímicas dos frutos**. 2010. 1v. 102f Tese (Doutorado em Ciências Biológicas com ênfase em Botânica) –UNESP, Botucatu, São Paulo.

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.

CRISTOFANI, M.; NOVELLI, M.V.; OLIVEIRA, C. A.; OTAVIANO, A. R.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M. A. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Melhoramento e Biotecnologia**, Cordeirópolis, v.22, n.1, p. 231-241, 2001.

CUADRA, R.; QUINCOSA, A. Potential of different *Psidium guajava* species as sources for resistance of guava to *Meloidogyne*. **Cienc. Agri**, v. 13, p. 19-26, 1982.

DOYLE, J.J.; 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 emicrossatelites visando a confirmacao da fecundacao cruzada entre Theobromacacao e Theobromagrandiflorum**. **Agrotrópica**, Cruz das Almas, v.15, n.1, p.41 – 46, 2003.

GONZAGA NETO, L. **Melhoramento genético da goiabeira**. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro (online). Versão 1.0. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999.

HARTMAN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plantpropagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 770, 1997.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. **Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology**. In: barker, K.r.; carter, c.c.; sassser, j.n (eds.). An advanced treatise on Meloidogyne. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1895. v.2, p.69-77.

HUSSEY, R.S.; BAEKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogynespp.* including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p.1025-1028, 1973.

JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. *Psidiumguajava* Guava. In: R.E. Litz (ed.), Biotechnology of fruit and nuts crops, **Crop Breed ApplBiotechnol**. Cambridge, p. 395-401, 2005.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcador RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

MARANHAO, S. R. V. L.; MOURA, R. M.; PEDROZA, E. M. R. Reação de indivíduos segregantes de aracazeiro a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 173-178, 2003.

MIRANDA, G. B., SOUZA, R. M., VIANA, A. P. Assessment of methods and criteria for Screening *Psidium* ssp. For resistance to *Meloidogyne enterolobii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 211-219, 2011.

MOURA, R. M.; MOURA, A. M. *Meloidogyne* da goiabeira: doença de alta severidade no Estado de Pernambuco. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 13, n. 1, p. 13-19, 1989.

NEGI, S.S., RAJAN, S. Improvement of guava through breeding. **Acta Horticulturae** (ISHS), v. 735, p. 31-37, 2007.

PEREIRA, F.M.; SÃO JOSÉ, A.R. Estudo do desenvolvimento dos frutos da goiabeira (*Psidium guajava* L.) cvs. Paluma e Rica. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9, Campinas **Anais**. Campinas Anais, v. 2, p 469-474, 1987.

PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. Goiabeira. In: **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Bruckner, C. H., ed. Viçosa, UFV. p.267-289. 2003.

PEREIRA, F.O.M., SOUZA, R.M., SOUZA, P.M, DOLINSKI, C.; SANTOS, G.K. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, v.33, p.76-181, 2009.

POMMER, C.V.; MURAKAMI, K.R.N. Breeding Guava (*Psidium guajava* L.). In: S.M. JAIN.; P.M. Priyadarshan (eds.), **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**, Springer. New York, p. 83-120, 2009.

RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. 1996. **Contribuição ao estudo do araçazeiro: *Psidiumcattleyanum***. Embrapa-CPACT, Pelotas.

**Tabela 1.** Relação dos acessos de *Psidium* utilizados na obtenção de híbridos interespecíficos em Petrolina/PE, 2010-2011

Acessos	Estado	Espécie
Gua161 PE	Pernambuco	<i>P.guajava</i>
Gua23 MA	Maranhão	<i>P.guajava</i>
Gua03 MA	Maranhão	<i>P.guajava</i>
Gua33 PE	Pernambuco	<i>P.guajava</i>
Gua53 SE	Sergipe	<i>P.guajava</i>
Gua14 MA	Maranhão	<i>P.guajava</i>
Ara105 RS	Rio Grande do Sul	<i>P.cattleyanum</i>
AraI-55	Rio Grande do Sul	<i>P.cattleyanum</i>
AraI-58	Rio Grande do Sul	<i>P.cattleyanum</i>
Ara140 RRR	Roraima	<i>P.guineense</i>
Ara138 RR	Roraima	<i>P.guineense</i>
Ara153 BA	Bahia	<i>P.guineense</i>
Ara Costa Rica	-----	<i>P.friedrichstalianium</i>



Figura 1. A- botão na pré-antese, com ruptura no cálice. B- retirada das sépalas e pétalas. C- retirada das anteras. D-botão emasculado.

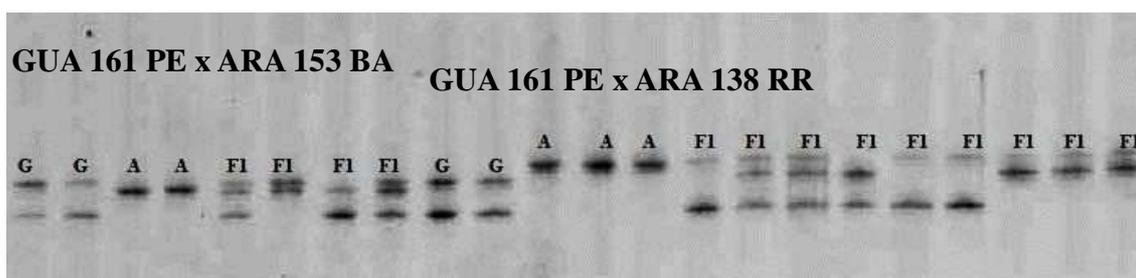


Figura 2. Gel de poliacrilamida com o microsatélite mPgCI 252 para genotipagem de híbridos interespecíficos de *P. guajava* x *P. guinee*

Tabela 2. Número de cruzamentos realizados, número de frutos obtidos e índice de pegamento em cruzamentos manuais de acessos de *P.guajavacom* acessos de *P.guineense*, *P.cattleyanume* e *P.friedrichstalianium*.

Acessos	Cruzamentos	Frutos obtidos	Pegamento (%)
Gua 161 PE x Ara153 BA	30	2	6,6
Gua 161 PE x Ara138 RR	30	4	13,3
Gua23 MA x Ara140 RR	12	0	0
Gua03 MA x Ara 140 RR	20	1	5
Gua03 MA x Ara 138 RR	19	0	0
Gua33 PE x Ara140 RR	10	0	0
Gua33 PE x Ara138 RR	20	0	0
Gua14 MA x Ara 140	20	0	0
Gua14 MA x Ara105 RS	21	0	0
Gua53 SE x Ara 105 RS	18	0	0
Gua 53 SE x Ara138 RR	10	0	0
Gua53 SE x Ara140 RR	14	0	0
Gua03 PE x Ara105 RS	17	0	0
Gua33 PE x Ara Costa Rica	41	0	0
Gua23 MA x Ara Costa Rica	21	0	0
Gua23 MA x Ara I-55	16	0	0
Gua03 MA x Ara105 RS	17	0	0
Gua 161 PE x AraI-55	61	0	0
Gua 161 PE x Ara140RR	15	0	0
Gua 161 PE x AraI-58	20	0	0
Gua 161 PE x Ara Costa Rica	21	0	0
Ara I-58 x GuaJucelio	20	0	0
Ara138RR x Gua03MA	25	0	0
Ara105RS x Ara138RR	32	0	0
AraII-55 x Ara138RR	54	0	0
AraI-58 x Ara138RR	29	0	0
AraI-55 x Ara139RR	74	0	0
AraII-55 x Ara153BA	41	0	0
Ara138RR x AraI-58	27	0	0
Ara140RR x AraI-58	22	0	0
Ara139RR x Ara-I-55	28	0	0
AraI-55 x GuaJucelio	43	0	0
Ara153BA x AraII-55	35	0	0
Ara139RR x AraII-55	45	0	0
Ara138RR x GuaJucelio	20	0	0
Ara140RR x Ara Costa Rica	25	0	0
Ara138RR x Ara Costa Rica	23	0	0
Ara Costa Rica x Ara138RR	20	0	0
Ara Costa Rica x Ara140RR	25	0	0

Tabela 3. Reação de resistência (R) ou suscetibilidade (S) a *Meloidogyne enterolobii* de três acessos de *Psidium guineense*, de acordo com o fator de reprodução (FR), com diferentes quantidades de ovos, após 120 dias de inoculação.

Acessos	Ovos (número)	FR	Reação	Ovos (número)	FR	Reação	Ovos (número)	FR	Reação
ARA138RR									
Planta 1	4000	0,02	R	8000	0,03	R	12000	1,09	S
Planta 2	4000	1,19	S	8000	0,1	R	12000	0,12	R
Planta 3	4000	0,03	R	8000	0,01	R	12000	0,85	R
Planta 4	4000	0,05	R	8000	0	R	12000	0,77	R
Planta 5	4000	0,15	R	8000	0	R	12000	0,05	R
Planta 6	4000	3,47	S	8000	0	R	12000	0	R
Planta 7	4000	0	R	8000	0	R	12000	0	R
Planta 8	4000	0	R	8000	1,24	S	12000	0,4	R
Planta 9	4000	1,98	S	8000	0,04	R	12000	0,41	R
Planta 10	4000	0	R	8000	0,02	R	12000	0,01	R
Planta 11	4000	0	R	8000	0,02	R	12000	0	R
ARA140RR									
Planta 1	4000	0,14	R	8000	0,01	R	12000	0,03	R
Planta 2	4000	0,5	R	8000	0,01	R	12000	0,08	R
Planta 3	4000	0,48	R	8000	0,63	R	12000	2,2	S
Planta 4	4000	1,57	S	8000	0,06	R	12000	0,03	R
Planta 5	4000	0,06	R	8000	0,46	R	12000	0,02	R
Planta 6	4000	4,2	S	8000	0,02	R	12000	0,4	R
Planta 7	4000	0,18	R	8000	0,67	R	12000	0,29	R
Planta 8	4000	0,75	R	8000	0,02	R	12000	0,03	R
Planta 9	4000	0,05	R	8000	0,02	R	12000	0,02	R
Planta 10	4000	0,15	R	8000	0,04	R	12000	0,52	R
Planta 11	4000	1,69	S	8000	0,01	R	12000	0,04	R
ARA153BA									
Planta 1	10000	1,32	S						
Planta 2	10000	1,53	S						
Planta 3	10000	0,42	R						
Planta 4	10000	0,06	R						
Planta 5	10000	0,14	R						
Planta 6	10000	0,13	R						
Planta 7	10000	0,02	R						
Planta 8	10000	0,02	R						

Tabela 4. Numero de galhas, número de ovos no sistema radicular, fator de reprodução (FR) e reação de tolerância (R) ou suscetibilidade (S) em dois híbridos interespecíficos de *Psidium guajava* x *P. guineense* ao *Meloidogyne enterolobii* avaliados 120 dias após inoculação com população inicial de 10.000 ovos.

Cruzamento	Galhas (número)	Ovos no sistema radicular (número)	FR	Reação
GUA 161 PE x Ara138 RR				
Planta 1	0	0	0	R
Planta 2	0	0	0	R
Planta 3	0	0	0	R
Planta 4	0	0	0	R
Planta 5	0	0	0	R
Planta 6	0	0	0	R
Planta 7	0	0	0	R
Planta 8	0	0	0	R
Planta 9	0	0	0	R
Planta 10	0	0	0	R
GUA 161 PE x ARA153 BA				
Planta 1	4	15.870	1.587	S
Planta 2	4	10.780	1.780	S
Planta 3	2	30	0.003	R
Planta 4	2	30	0.003	R
Planta 5	5	30.060	3.006	S
Planta 6	2	1.320	0.132	R
Planta 7	4	11.310	1.131	S
Planta 8	4	24.180	2.418	S
Planta 9	5	42.600	4.260	S
Planta 10	5	16.860	1.686	S



Figura 3. Raízes de 10 plantas inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* do cruzamento Gua161PE x Ara138 RR apresentando ausência de galhas aos 120 dias após inoculação com população inicial de 10.000 ovos do nematoide.



Figura 4. Raízes de 10 plantas inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* do cruzamento Gua161PE x Ara153 BA apresentando sintomas de galhas em sete plantas e três plantas apresentando número reduzido de galhas.



Figura 5. GUA 161 PE x ARA 138 RR enxertadas por garfagem com goiabeira 'Paluma', apresentando vigoroso desenvolvimento no campo, indicando alta compatibilidade entre a espécie comercial de goiaba e os híbrido interespecífico.

**CAPÍTULO II – DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Psidium* COM  
BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética de acessos de goiabeiras e araçazeiros do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido, com base em marcadores microssatélites, para fornecer subsídios para programas de recursos genéticos e de melhoramento, com ênfase para cruzamentos de goiabeira com outras espécies do gênero *Psidium*. O DNA foi extraído pelo método CTAB 2x e os produtos de PCR foram analisados em géis de poliacrilamida desnaturado 6% e corados com nitrato de prata. Para visualização da similaridade genética, utilizou-se o dendrograma UPGMA gerado da matriz de similaridade do coeficiente de Jaccard, com base em 183 alelos de treze locos microssatélites. O número de pares de base foi estimado pelo método da mobilidade inversa, com base em regressão de produtos de tamanho conhecido. A análise molecular de variância foi realizada pela decomposição total entre e dentro dos acessos. Os acessos de goiabeira apresentaram similaridade entre 0,75 a 1,00, com dendrograma apresentando valor cofenético 0,85. Foram observados cinco grupos: o primeiro grupo formado por acessos de goiabeira, o segundo por araçazeiros da espécie *P. guineense*, o terceiro formado apenas por um acesso *P. friedrichstalianum*, e os dois últimos por acessos da espécie *P. cattelyanum*. A similaridade genética entre *P. guineense* e alguns acessos de goiabeira foi superior a 80%, indicando maior possibilidade de sucesso em cruzamentos interespecíficos entre essas duas espécies. A variabilidade genética entre os acessos foi considerada alta ( $\Phi_{ST} 0,238$ ), sugerindo que a variabilidade genética da goiabeira não está uniformemente distribuída nos nove Estados das regiões analisadas. Sugere-se a prospecção de um maior número de acessos por Estados brasileiros, para se ter maior visibilidade da diversidade da espécie.

**Palavras-chave:** *Psidium*, banco ativo de germoplasma, melhoramento vegetal, dendrograma.

## ABSTRACT

This work aimed to study the genetic variability of accessions of guava and wild araçazeiros of the active germplasm bank of Embrapa Semiárido, based on microsatellite loci, to guide genetic resources and breeding programs, emphasizing crosses of guava with other *Psidium* species. DNA was extracted by the CTAB 2x method and the PCR products were analyzed on polyacrylamide 6 % denatured gels, stained with silver nitrate. The UPGMA dendrogram generated from the distance matrix of the Jaccard coefficient, based on 183 alleles of thirteen microsatellite loci was used for visualization of genetic similarity. The number of base pairs was estimated by inverse mobility method, based on regression of known size products. Molecular analysis of variance was performed by total decomposition between and within accessions. The accessions showed similarity between 0.75 to 1.00, with dendrogram presenting cophenetic value of 0.85. Five groups were observed: the first by guava accessions, the second by *P.guineense* accessions, the third formed by one access of *P.friedrichstalianium* and the last two groups by *P.cattelyanum*. The genetic similarity among *P.guineense* and some guava accessions were above 80%, suggesting greater possibility to obtain interespecific hybrids among these two species. The genetic variability between the accessions was considered high ( $\Phi_{ST}0,238$ ), indicating that guava genetic variability is not uniformly distributed in among the nine Brazilian States sampled. It is suggested the prospecting of a greater number of accessions by States in order to have greater visibility of the diversity of species.

**Keywords:** *Psidium*, active bankgermplasm, breeding, dendrogram.

## INTRODUÇÃO

Segundo revisão de Gonzaga Neto (1999), De Candolle, ao estudar a origem da goiabeira, começou por eliminar o velho mundo, para chegar à conclusão de que a goiabeira seria originária da América, restando saber de que região americana. Segundo De Candolle, a origem da goiabeira estaria compreendida entre o México, a Colômbia, o Peru e o Brasil. Para Risterucci *et al.*, (2005) a goiabeira é nativa do Norte da América do Sul, estando amplamente distribuída nas regiões tropicais da América.

Atualmente, a goiabeira tem mercado bem estabelecido em mais de 60 países, devido a sua rusticidade, prolificidade, alto teor de vitamina C e grande retorno econômico (Negi&Rajan, 2007). É uma espécie amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais, tanto que pessoas de diferentes países a consideram nativa da sua própria região (Singh, 2007). O Brasil é, atualmente, o terceiro maior produtor comercial de goiaba, apresentando condições edafoclimáticas favoráveis para produção do fruto. O seu cultivo ganha espaço, devido aos nutrientes e elementos funcionais presentes no fruto, além de poder ser consumido “*in natura*” ou nas formas de doces e geleias, resultando em grande retorno econômico para os produtores, devido a versatilidade de seus usos (São José *et al.*, 2003; IBGE, 2011).

Dentre as espécies tradicionais da família *Myrtaceae*, destacam-se a goiabeira e os araçazeiros, sendo que este apesar de não apresentarem a mesma importância econômica quando comparados à goiabeira, têm despertado interesse para pesquisa, pois os seus frutos apresentam características desejáveis, com sabor exótico e elevado teor de vitamina C. Além disso, vêm sendo estudados como fontes de tolerância ao *Meloidogyne enterolobii*, doença que vem dizimando a cultura da goiabeira (Raseira & Raseira, 1996; Souza *et al.*, 2006).

A goiabeira é uma espécie que apresenta alta diversidade genética, sobretudo, devido ao sistema misto de cruzamento, bem como à utilização de sementes originárias de genitores heterozigotos para produção de mudas (Alves & Freitas, 2007; Pessanha *et al.*, 2011). Estudos de melhoramento genético têm sido extensivamente utilizados como potentes ferramentas, tanto no que diz respeito à obtenção de cultivares de goiabeira com vantagens econômicas, como alta produtividade e melhor aspecto dos frutos, quanto na caracterização e conservação de material genético (Pereira, 1984).

Marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética com as mais diversas finalidades, como: identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, estudos

de fluxo gênico e estimativas de taxas de cruzamento e parentesco (Buso *et al.*, 2003). Souza (2001) menciona que no melhoramento de plantas, as aplicações dos marcadores de DNA podem ser classificadas em diferentes grupos, como: análise da diversidade genética entre indivíduos; construção de mapas genéticos e seleção assistida por marcadores.

Pessanha *et al.* (2011) utilizaram o marcador RAPD para avaliação da diversidade genética entre 20 acessos de *Psidium*. Erig *et al.* (2003) também, estudando a diversidade genética entre 24 acessos de araçazeiros por meio de RAPD, separaram os genótipos em 4 grupos, sendo que o primeiro apresentou 40% de similaridade com os demais, ao passo que a maior proximidade foi encontrada entre os dois últimos. Entretanto esse marcador apresenta baixa reprodutibilidade e tem a desvantagem de ser dominante (Esselink *et al.*, 2003). Corrêa *et al.* (2011) estudou e comparou a similaridade genética de 62 acessos de goiabeira e 24 de araçazeiro, utilizando marcadores AFLP, separando os genótipos em dois grupos, um formado por acessos de goiabeira e outro por acessos de araçazeiros com inclusão de alguns acessos de goiaba, com a similaridade variando de 28 a 98%.

Entre as diversas classes de marcadores atualmente disponíveis, a de microssatélites ganha destaque devido ao seu alto poder informativo (Oliveira *et al.*, 2006). Valdés-Infante *et al.* (2007) foram os primeiros a reportarem a caracterização de acessos de goiabeira de origem cubana com microssatélites. Os autores usaram sete locos de microssatélites que geraram 34 alelos diferentes, sendo que, 10 foram considerados raros. Aranguren *et al.* (2010) identificaram alta diversidade em 31 acessos de goiabeira venezuelanos quando genotipados com 16 locos microssatélites. Sánchez-Teyer *et al.* (2010) reportaram similaridade de 0,64 a 0,97 em 57 acessos de goiabeira mexicana genotipados com seis locos de microssatélites. No Brasil, ainda não foram publicados trabalhos com a aplicação de locos microssatélites para caracterização de germoplasma de goiabeira.

Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética de acessos de goiabeira e araçazeiros do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido, com base em microssatélites, visando fornecer subsídios para programas de recursos genéticos e de melhoramento, com ênfase para cruzamentos de goiabeira com outras espécies do gênero *Psidium*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética da Embrapa Semiárido, localizado no município de Petrolina-PE, onde foram analisados 61 acessos do

gênero *Psidium* (Tabela 1). O material foi obtido no Banco ativo de Germoplasma (BAG) de goiabeiras e araçazeiros, localizado no Campo experimental de Bebedouro, pertencente à Embrapa Semiárido. O BAG é dividido em 2 blocos, compostos por 118 acessos de goiabeiras e 40 de araçazeiros coletados em 10 estados brasileiro: Maranhão, Sergipe, Piauí, Pernambuco, Goiás, Bahia, Roraima, Rondônia, Amazonas, Rio Grande do Sul. Cada acesso é representado por seis plantas, com espaçamento 4,0 x 4,0 m. A irrigação é feita três vezes na semana, pelo sistema de gotejamento.

**Coleta vegetal:** Foram coletadas folhas novas e sadias dos 61 acessos de *Psidium* colocadas em saco de papel, devidamente identificados, e acondicionadas em freezer -80°C até o momento da extração de DNA.

**Extração e Quantificação do DNA:** Na extração de DNA, foi utilizado o protocolo CTAB 2x de Doyle & Doyle (1990), com as seguintes modificações: A) A maceração mecânica foi realizada na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino; B) O vegetal macerado de cada amostra foi transferido para tubos duplicados de eppendorf de 2 mL, contendo cada um 950 µL de tampão CTAB 2x; C) As amostras foram colocadas em banho Maria a 60°C durante 30 min, sendo que a cada 10 minutos os tubos eram invertidos; D) Após o tempo de 30 min foi adicionado 950 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 6.000 rpm, por 10 min; E) 700 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de eppendorf; F) foram adicionados 467 µL de álcool isopropílico gelado, com suaves inversões do tubo, que foi mantido por 20 min em gelo; G) após os 20 min as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm para formação do 'pellet' no fundo do tubo, descartando-se o sobrenadante em béquer em capela de exaustão de gases. As paredes dos tubos foram secas com auxílio de cotonete esterilizado em ultravioleta; H) o 'pellet' foi ressuspensionado em 30 µL Tris-Edta, permanecendo por 24 h na geladeira para completa dissolução do 'pellet'; I) A remoção de RNAscoextraída foi realizada com 10% de RNase por 45 min em banho Maria a 37°C.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio. A quantificação foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA extraído com bandas do DNA do fago Lambda. A integridade das amostras de DNA foi avaliada pela ausência de gel das amostras de rastro de DNA. As amostras foram diluídas para 10 ng/µL e armazenadas a -20°C.

**Reação, amplificação do DNA e resolução em géis de poliacrilamida:** Foram avaliados 16 locos SSRs recomendados por Briceño *et al.* (2010) para estudos de diversidade em goiabeira: mPgCIR227, mPgCIR228, mPgCIR229, mPgCIR233, mPgCIR236,

mPgCIR242, mPgCIR243, mPgCIR246, mPgCIR247, mPgCIR249, mPgCIR251, mPgCIR252, mPgCIR253, mPgCIR255, mPgCIR256, mPgCIR257. As reações de amplificação de PCR foram realizadas para um volume final de 10  $\mu$ L, contendo 30ng de DNA, 0,2 $\mu$ L de cada 'primer', 1x de Tampão para TaqDNA polimerase, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de dNTP's, 0,2  $\mu$ M de cada 'primer' e 0,75 unidades de enzima Taq DNA Polimerase. A programação para amplificações consistiu da desnaturação do ciclo inicial a 94°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 45 s, 52°C por 60 s e 72°C por 60 s e uma etapa de extensão final a 72°C, por 5 min.

À solução da reação de PCR, foram adicionados 5 $\mu$ L do tampão desnaturado de formamida 98% (EDTA pH 8,0 10mM, 1mg/ML de XileneCyanol e 1 mg/mL de Bromofhenol blue), seguido da completa desnaturação a 94°C por 5 min em termociclador. As amostras foram mantidas em gelo até a aplicação 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. As placas de vidro foram limpas com o auxílio de um lenço de papel embebido de etanol. A placa grande (de adesão do gel) foi tratada, com 1,1 mL de uma solução contendo 95% de Etanol + 0,5 % de ácido Acético e 1  $\mu$ L de Bindsilane. Essa solução foi espalhada em toda a superfície da placa com um auxílio de um lenço de papel, sendo o excesso retirado com um lenço umedecido com álcool etílico. A placa menor foi tratada de acordo como descrito anteriormente, entretanto, substituiu-se a solução contendo Bindsilane por um produto usado para limpar vidros de automóveis, com nome comercial de Wartelux (Luxcar).

Uma pré-corrída de 30 min a 45 W foi realizada antes da aplicação das amostras de PCR. Foram aplicados 2,5 mL da reação de PCR desnaturada no gel de poliacrilamida 6%, sendo a corrida de eletroforese realizada por um período de aproximadamente 3h, com potência constante de 45 W. Marcador molecular Ladder 50pb (Fermentas) foi carregado nas extremidades laterais de cada gel.

Os géis foram corados com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Cresteet *al*, (2001), com algumas modificações:

- A placa contendo o gel foi imersa em solução de fixação contendo etanol absoluto 10% e ácido acético 1% por 20 min sob leve agitação.
- Lavagem de água destilada sob agitação por 1min.
- Pré-tratamento foi realizado em solução de ácido nítrico 0,2 mol.L por 3min, seguida de nova lavagem do gel com água destilada por 1min, sob lenta agitação.

- A impregnação do gel foi realizada com solução de nitrato de prata 0,2% por 20min, seguida de duas lavagens de 30 s com água destilada, sob leve agitação.
- O gel foi imerso em solução de revelação contendo carbonato de sódio 2,4% ou seja 60g e formaldeído 37%, sendo utilizado metade da solução reveladora na primeira lavagem, até o início do aparecimento das bandas.
- A placa com gel foi transferido para uma segunda bandeja contendo o restante da solução e corado até o aparecimento do padrão desejado.
- Uma nova lavagem do gel foi realizada com ácido acético 5% por 3min, seguida de uma lavagem final com água por 1 min, sob agitação lenta. A placa com gel corado foi colocado em posição vertical até a secagem em temperatura ambiente para posteriormente serem analisados os fragmentos.

Os 61 acessos foram genotipados em duas placas de géis de poliacrilamida, uma placa contendo 54 acessos e outra os acessos restantes. Na primeira placa foram identificados pelo menos um acesso representante de um genótipo ou combinação alélica, para serem usados como alelo de referência na segunda placa do gel para cada microsatélite.

**Anotação e análise dos dados de microsatélites:** A estimativa do tamanho em pares de base (pb) para cada alelo, para construção do padrão alélico de cada acesso, foi obtida pelo método da mobilidade inversa baseada em regressão de produtos de tamanho conhecido do marcador molecular de 50bp da Fermentas (EUA).

Os microsatélites foram anotados para a presença (1) versus ausência (0) de alelos, para construir uma matriz de similaridade do índice de Jaccard. O dendrograma com as distâncias das cultivares foram confeccionados pelo método de agrupamento UPGMA (Método de Agrupamento não Ponderado com base na Média Aritmética). A avaliação do ajuste do dendrograma foi realizada pela correlação co-fenética, ou seja, a correlação entre as distâncias reais e as representadas graficamente. Para essas análises, utilizou-se o aplicativo computacional NTSYSpc (Rohlf, 2000).

Estimativas para frequência dos principais alelos, número de genótipos, diversidade do gene, heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada microsatélite foram realizadas com o programa PowerMarker (Liu & Muse, 2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 16 pares de locos microsatélites utilizados, apenas treze apresentaram ampliações polimórficas de fácil interpretação: mPgCIR227, mPgCIR233, mPgCIR242,

mPgCIR243, mPgCIR246, mPgCIR247, mPgCIR249, mPgCIR251, mPgCIR252, mPgCIR253, mPgCIR255, mPgCIR256 e mPgCIR257. Aranguren *et al.* (2010), ao estudarem a variabilidade em acessos de goiabeira venezuelanos com esses 16 locos, reportaram que todos eles foram polimórficos nos trinta e um acessos avaliados. Essa diminuição do número de SSR em detectar polimorfismo, pode ser devido ao fato que, no presente trabalho esses microssatélites foram usados para avaliação conjunta de goiabeira e araçazeiros pertencentes às espécies *P. guineense*, *P. cattelyanum* e *P. friedrichstalianum*.

Foram detectados 183 alelos nos 13 microssatélites, em que o número de alelos por loco variou de sete a vinte dois, com média de 14,07 alelos por microssatélites nos 61 acessos de *Psidium* genotipados. O tamanho dos alelos variou de 129 pb no mPgCIR-33 a 802 pb no mPgCIR-247 (Tabela 2). Segundo Cruz *et al.* (2011), é importante dispor de locos polimórficos que apresentam grande quantidade de alelos para que se possa inferir sobre a diversidade de uma população em relação a outra ou dela própria ao longo tempo.

O maior número de genótipos observados foi com o microssatélite mPgCIR256, enquanto que a maior diversidade de alelos observada foi com o microssatélite mPgCIR-253 (Tabela 3), diferente do reportado por Aranguren *et al.* (2010), ao avaliarem a diversidade genética em acessos de goiabeiras venezuelanos com os mesmos microssatélites, na qual a maior diversidade observada foi no microssatélite mPgCIR255.

Os valores do PIC, que refletem a diversidade alélica e a taxa de frequência entre os acessos, não foram uniformes para todos os locos microssatélites testados. A média do PIC foi de 0,709, com o maior e menor valor observados no loco mPgCIR-253 (0,862) e mPgCIR-233 (0,227), respectivamente (Tabela 3).

A média da heterozigiosidade foi de 0,695, com os locos mPgCIR-227 e mPgCIR-249 apresentando os maiores valores (1,000) e o menor valor observado no loco mPgCIR-233 (0,120) (Tabela 3), indicando que os microssatélites apresentaram grande poder de detecção de variabilidade. O PIC e a heterozigiosidade representam a existência de variabilidade, pois cada indivíduo diplóide pode ter até dois alelos por loco (Weir, 1996).

A identificação de acessos com alelos de referências para cada microssatélites e sua inclusão na segunda placa de gel de poliacrilamida possibilitou a correta comparação e identificação alélica dos acessos restantes. Essa estratégia foi adotada por Ribeiro *et al.* (2012) ao avaliarem 103 acessos de mangueira com 12 microssatélites.

A correlação entre a matriz de valores cofenéticos e a matriz das distâncias de similaridade foi de 0,85, o que indica que o dendrograma (Figura 1) apresentou um bom ajuste nos agrupamento dos acessos de *Psidium*, com os 183 alelos dos 13 locos de

microssatélites analisados. A similaridade entre os acessos variou entre, 0,75 a 1,00 refletindo a existência de variabilidade genética nos acessos estudados. Rodríguez-Medina *et al.* (2010) encontraram similaridade variando de 0,40 a 1,00 entre 43 acessos de uma coleção cubana de goiabeiras, avaliada com sete marcadores microssatélites. Alta variabilidade genética, também, foi reportada por Corrêa *et al.* (2011) entre 88 acessos de *Psidium* dessa mesma coleção avaliada com marcador AFLP. Esses resultados indicam a alta variabilidade genética existente na coleção analisada, sobretudo, pelo misto sistema de acasalamento da goiabeira, que inclui autofecundação e polinização cruzada.

Os 183 alelos dos 13 locos de microssatélites foram suficientes para separar os acessos de goiabeira dos acessos de araçazeiros analisados. Adotando-se o ponto de corte a 83% de similaridade observou-se a formação de cinco grupos, (Figura 1): Grupo I – indo de GUA92 AM até GUA33 PE, grupo II – indo de ARA140 RR até ARA153 BA, grupo III – formado exclusivamente pelo acesso ARA Costa Rica, grupo IV- formado apenas pelo acesso ARA105 RS e o grupo V – formado pelos acessos ARA055 RS e ARA058 RS. O grupo I foi formado predominantemente por acessos de goiabeira, enquanto que o grupo II foi formado apenas por acessos da espécie *P.guineense*. Os grupos IV e V formados por *P. cattelyanum*, enquanto que o grupo III foi formado pela espécie *P. friedrichstalianium*. A localização externa dos acessos de araçazeiros em relação ao grupo de goiabeira foi um indicativo da adequação do dendrograma gerado.

Os acessos ARA55 RS e ARA58 RS apresentaram a menor similaridade em relação ao conjunto de acessos avaliados, enquanto que a maior similaridade (100%) foi observada entre os acessos GUA110 RS e o GUA106 RS, coletados no mesmo BAG, em Pelotas, RS. O acesso GUA161 PE e a cultivar ‘Paluma’, apesar de apresentarem características morfológicamente divergentes, foram geneticamente iguais para os locos analisados, sendo observada similaridade de 100% (Figura 1). O acesso GUA161 PE foi considerado com anfidiplóide (dados não apresentados), o que pode explicar essa similaridade de 100%. Análises adicionais com outros microssatélites e estudos citogenéticos aprofundados são indicados para elucidar essa similaridade entre GUA161 PE e ‘Paluma’.

Observou-se que os acessos de goiabeiras pertencentes aos estados da Bahia, Sergipe e Goiás, no grupo 1, posicionaram-se quase que sequencialmente nos ramos do dendrograma (Figura 1), sugerindo uma grande similaridade genética entre os acessos. Os sete acessos de araçazeiros, ARA140 RR, 138 RRe ARA153 BA (*P.guineense*); ARA105 RS, 55 RS e 58 RS (*P. cattelyanum*); ARA da Costa Rica (*P. friedrichstalianium*) posicionaram-se na base do dendrograma, sugerindo maior similaridade entre

eles. Briceño *et al.* (2010) encontraram o mesmo padrão de separação entre acessos venezuelanos de goiabeira e outras espécies de *Psidium*, como *P. guineense*, todos avaliados com marcadores microssatélites. Hernández-Delgado *et al.* (2007), na análise de 52 acessos de *Psidium* de uma coleção mexicana, reportaram dendrograma com dois grupos: o primeiro composto por acessos de *P. cattleyanum* e *P. friedrichsthalianum* e o segundo por acessos de *P. guajava*.

Quanto ao cruzamento entre os acessos, foi possível indicá-lo entre os acessos ARA140 RR, ARA138 RRe ARA153 BA com acessos de goiabeira que apresentaram 82,4% de similaridade. Esses dados concordam com os resultados obtidos no capítulo I, no qual foram relatados sucessos de híbridos interespecíficos entre *P. guajava* e *P. guineense* e insucessos com as demais espécies de *Psidium* com acessos de goiabeira.

A estimativa de variação entre acessos foi de 0,238 ( $\Phi_{ST}$ ) (Tabela 4), sendo a diferenciação genética considerada alta, indicando alta variabilidade entre os acessos analisados. Apesar da goiabeira ser uma espécie com tendência a alta taxa de polinização cruzada (Alves *et al.* 2007), o fluxo gênico entre os acessos coletados em nove Estados brasileiros foi pequeno e considerado restrito, provavelmente em consequência do limitado fluxo de germoplasma, que não apresentam interesse para cultivo em escala comercial. Resultados elevados de  $\Phi_{ST}=0,355$  também foram reportados por Sanabria *et al.* (2006) para 53 acessos de nove populações de goiabeiras colombianas.

## CONCLUSÃO

No geral, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os acessos apresentaram diferenças em razão do Estado de amostragem e que os indivíduos de um dado Estado apresentaram menor dissimilaridade. Nessa situação, sugere-se maior número de áreas para conservação *in situ* da espécie e a amostragem de um número suficiente de germoplasmas, em maior número de Estados, para a conservação *ex situ* da variabilidade genética da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES JE E FREITAS BM. Requerimento de polinização da goiaba. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1281-1286, 2007.

ARANGUREN Y.; BRICEÑO A.; FERMIN G. Assessment of the Variability of Venezuelan Guava Landraces by Microsatellites. In: Second International Symposium on Guava and other Myrtaceae. **Actahorticulturae**, n.849, p147-154, 2010.

BRICEÑO A.; ARANGUREN Y.; FERMIN G. Assessment of Guava-Derived SSR Markers for the Molecular Characterization of *Myrtaceae* from Different Ecosystems in Venezuela. In: Second International Symposium on Guava and other *Myrtaceae*. *Actahorticulturae*, n.849, p139-146, 2010.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZHON, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais –Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 46-50, 2003.

CORRÊA, L.C.; SANTOS, C.A.F.; LIMA, G.P.P.; RODRIGUES, M.A.; COSTA, T.P.P.; Similaridade genética entre acessos de goiabeiras e araçazeiros baseada em marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 859-867, 2011.

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.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI L.A (2011). **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DOYLE, JJ.; DOYLE, JL (1990). **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, Ithaca v. 12, p. 13-15.

ERIG, A.C.; SCHUCH, MW.; RASEIRA, M.C.B.; VIGHI, I.L.; ROCHA, P.S.G.; WENDT, S.N. RAPD molecular marker in the evaluation of genetic diversity in araçazeiro. **Revista Científica Rural**, v. 8, n. 2, p. 101-106, 2003.

ESSELINK, G. D.; SMULDERS, M. J. M.; VOSMAN, B. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 277-286, 2003.

GONZAGA NETO, L. Melhoria genética da goiabeira. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro** (online). Versão 1.0. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999.

HERNÁNDEZ-DELGADO.; PADILLA-RAMÍREZ J.S.; CEDILLO A.N.; PEREZ N.M. Morphological and genetic diversity of Mexican guava germoplasm. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 5, n. 3, p. 131–141, 2007.

IBGE – **Produção agrícola municipal**. 2010. Consulta a <http://www.sidra.ibge.gov.br>, em 28/09/2012.

LIU, K.; MUSE, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2128-2129, 2005.

NEGI, S.S.; RAJAN, S. Improvement of guava through breeding, **Acta horticulture**(ISHS), v. 735, p. 31-37, 2007.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 293-307, 2006.

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

PESSANHA, P. G DE OLIVEIRA.; VIANA, A.P.; JUNIOR, A.T. A.; SOUZA, R.M.; TEIXEIRA, M.C.; PEREIRA, M.G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium*ssp. Via marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 1, p. 129-136, 2011.

PRIOLLI, R. H. G.; MENDES-JUNIOR, C. T.; ARANTES, N. E.; CONTEL, E. P. B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 185-193, 2002.

RASEIRA, M. C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro: *Psidium cattleianum***. Pelotas: Embrapa-CPACT, p. 93, 1996.

RIBEIRO, I.C.N DOS SANTOS.;LIMA NETO F.P.; SANTOS, C.A.F. Allelic database and accession divergence of a Brazilian mango collection based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, 2012.

RISTERUCCI A.M.; DUVAL M.F.; ROHDE W.; BILLOTE N. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava*L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 745-748, 2005.

RODRÍGUEZ-MEDINA N.M.; VALDÉS-INFANTE J.; VELÁSQUEZ B.; RIVERO D.; MARTÍNEZ F.; RISTERUCCI A.M.; BILLOTE N.; BECKER D.; RITTER E. ; ROHDE. Individual versus combined Data Set for Molecular Characterization of Cuban Guava (*Psidium guajava*) Germplasm. In: Second International Symposium on Guava and other Myrtaceae, **actahorticulturae**, n.849, p.163-172, 2010.

ROPHLF, F.J. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 1.80. Setauket: Exeter Software. 1989.

SINGH, G. Recent Development in Production of Guava. **Acta Horticulturae**, 735, p. 161-176, 2007.

SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; DIAS, N.O.; HOJO, R.H.; BOMFIM, M.P. **Cultivo de goiabeira no Brasil**. In: Primer simpósio internacional de La guayaba Aguascalientes: Memoria Aguas calientes: México p.84-115, 2003.

SANABRIA, H.L.; GARCIA, M.; MUÑOZ, J.; DIAZ, H.; Caracterización molecular com marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium guajava*(guayaba) en el Valle del Cauca. **Acta Agronómica**, v. 55, n. 1, p. 8, 2006.

SÁNCHEZ-TEYER, L.F.; BAZARRA-MORALES, A.; KEB, L.; BARREDO, F.; QUIROZ-MORENO, A.; CONNOR-SÁNCHEZ, A.O.; PADILLA-RAMÍREZ, J.S. Assessment of Genetic Diversity of Mexican Guava Germplasm Using DNA Molecular Markers. In: Second International Symposium on Guava and other Myrtaceae, **actahorticulturae**, n.849, p133-138, 2010.

SOUZA, R.M.; NOGUEIRA, M.S.; LIMA, I.M.; MELARATO, M.; DOLINSKI, C.M. Manejo de nematóides das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. **Nematologia Brasileira**.v.30, n. 2: 165-169, 2006.

SOUZA, A.P. **Biologia molecular aplicada ao melhoramento**, In: Luciano Lourenço Nass, Afonso Celso Candeias Valois, Itamar Soares de Melo, Maria Cléria Valadares-Inglis (ed) Recursos Genéticos e melhoramento – plantas, Rondonópolis: Fundação MT, 1183p, 2001.

WEIR, B.S. 1996. **Genetic Data Analysis II - Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Associates, Sunderland.

VALDÉS-INFANTE, J.; RODRIGUÉZ, N.N.; BECKER, D.; VELÁZQUEZ, B.L.; SOURD D.; ESPINOSA, G.; ROHDE, W. Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L) germplasm collection in Cuba. **Cultivos Tropicales**, v. 28, n 3, p. 61-67, 2007.

**Tabela 1.** Procedência de acessos de goiabeira e araçazeiros do BAG da Embrapa Semiárido, avaliados com 13 marcadores SSR.

<b>Acesso</b>	<b>Procedência</b>	<b>Estado</b>	<b>Acesso</b>	<b>Procedência</b>	<b>Estado</b>
GUA132RR	Iracema	RR	GUA117GO	Morrinhos	GO
GUA138RR	Boa Vista	RR	GUA120GO	Goiás Velho	GO
GUA133RR	Iracema	RR	GUA121GO	Goiás Velho	GO
GUA135RR	Iracema	RR	GUA124GO	Santa Isabel	GO
GUA136RR	Rorainópolis	RR	GUA127GO	Mimoso de Góias	GO
GUA137RR	Caracaraí	RR	GUA128GO	Mimoso de Góias	GO
GUA34PE	Ibimirim	PE	GUA87AM	Irاندuba	AM
GUA38PE	Pesqueira	PE	GUA88AM	Irاندuba	AM
GUA36PE	Pesqueira	PE	GUA90AM	Irاندuba	AM
GUA33PE	Ibimirim	PE	GUA92AM	Manacapuru	AM
GUA39PE	Belo Jardim	PE	GUA97AM	Autazes	AM
GUA161PE	Petrolina	PE	GUA98AM	Autazes	AM
GUA51SE	Capela	PE	GUA62BA	AntonioGonçalos	BA
GUA61SE	Riachão dos Dantas	SE	GUA146BA	Valença	BA
GUA55SE	Pirambu	SE	GUA147BA	Pateroá	BA
GUA52SE	Capela	SE	GUA150BA	Nilo Peçanha	BA
GUA53SE	Japoratuba	SE	GUA151BA	Nilo Peçanha	BA
GUA59SE	Umbamba	SE	GUA155BA	Igrapiúna	BA
GUA03MA	Coelho Neto	SE	GUA106RS	Pelotas	RS
GUA02MA	Caxias	MA	GUA109RS	Pelotas	RS
GUA26MA	Paraibano	MA	GUA110RS	Pelotas	RS
GUA05MA	Buriti	MA	GUA104RS	Pelotas	RS
GUA07MA	Mata Roma	MA	ARA138RR	Boa Vista	RR
GUA06MA	Mata Roma	MA	ARA140RR	Boa Vista	RR
GUA67RO	Jaru	MA	ARA153BA	Ituberá	RR
GUA68RO	Buritis	RO	ARA105RS	-----	RS
GUA72RO	Monte Negro	RO	ARA55RS	-----	RS
GUA73RO	Ariquemes	RO	ARA58RS	-----	RS
GUA81RO	Porto Velho	RO	ARA. C.RICA	-----	
GUA82RO	Porto Velho	RO	PALUMA	Comercial	PE

GUA=*P.guajava*; ARA140 e 138=*P.guineense*; ARA105, ARA55 e 58=*P. cattelyanum*; ARA Costa Rica=*P. friedrichstalianum*

**Tabela 2.** Padrão alélico, em pares de bases, estimado para 61 acessos de *Psidium*, genotipadas com 13 marcadores microsatélites. Petrolina, 2012.

Acesso	Locos mPgCIR												
	227	233	242	243	246	247	249	251	252	253	255	256	257
GUA092 AM	468/474	144/144	468/468	275/280	388/398	429/444	518/520	557/566	616/616	562/568	604/611	607/610	362/365
GUA087 AM	596/618	144/144	468/468	275/280	388/398	429/444	503/505	516/524	616/616	562/568	604/611	607/610	362/362
GUA087 AM	596/618	144/144	468/468	275/280	388/398	429/444	503/505	516/524	616/616	562/568	618/625	607/610	362/362
GUA098 AM	596/618	144/144	468/468	341/347	295/322	424/429	537/543	524/532	616/616	562/568	604/611	571/573	362/362
GUA088 AM	596/618	144/144	468/468	250/275	388/398	429/429	503/505	516/524	616/616	494/499	604/611	607/610	362/362
GUA097 AM	435/446	144/144	468/468	250/275	295/322	429/444	518/520	524/532	616/616	529/535	604/611	607/610	299/362
GUA090 AM	435/446	144/144	468/468	250/275	295/322	429/444	503/505	524/532	616/616	562/568	604/611	607/610	362/362
GUA062 BA	435/446	144/144	458/458	250/275	295/303	429/444	503/505	516/524	616/616	535/545	618/625	571/573	299/299
GUA150 BA	435/446	144/144	458/468	329/335	295/322	723/732	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	571/573	299/299
GUA147 BA	596/618	144/144	506/506	329/335	295/303	429/444	503/505	516/524	623/623	562/568	618/625	567/570	362/365
GUA147 BA	596/618	144/144	506/506	329/335	295/303	429/444	503/505	516/524	623/623	562/568	618/625	571/573	362/365
GUA155 BA	435/446	144/144	458/468	275/280	295/303	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	571/573	299/299
GUA151 BA	435/446	144/144	468/506	250/275	295/322	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	604/611	571/573	299/365
GUA151 BA	435/446	144/144	468/506	250/275	295/322	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	567/570	299/365
GUA146 BA	435/446	144/144	468/468	341/347	303/303	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	567/570	299/365
GUA146 BA	435/446	144/144	468/468	296/301	303/303	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	567/570	299/365
GUA061 SE	697/706	144/144	468/468	275/280	388/398	424/424	503/505	516/524	623/623	562/568	604/611	571/573	459/554
GUA055 SE	435/446	144/144	458/458	250/275	303/303	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	571/573	299/299
GUA052 SE	435/446	144/144	468/468	275/280	295/303	424/424	503/505	516/524	616/616	562/568	618/625	571/573	459/554
GUA059 SE	435/446	144/144	458/468	341/347	295/303	424/424	503/505	516/524	616/623	529/535	618/625	571/573	459/554
GUA059 SE	435/446	144/144	458/468	341/347	295/303	424/424	503/505	516/524	616/623	529/535	604/611	571/573	459/554
GUA051 SE	435/446	144/144	468/468	341/347	295/303	429/444	503/505	516/524	616/616	529/535	618/625	571/573	362/365
GUA053 SE	633/641	144/144	458/468	341/347	295/303	429/444	503/505	516/524	616/616	562/568	618/625	571/573	299/299

GUA138 RR	435/446	144/144	458/468	341/347	295/295	424/444	503/505	516/524	616/616	562/568	618/625	571/573	299/299
GUA137 RR	441/451	144/144	468/468	341/347	295/295	424/429	503/505	532/557	616/616	562/568	618/625	571/573	409/413
GUA132 RR	596/618	144/144	468/468	250/275	412/422	424/429	537/543	532/557	616/616	494/499	618/625	571/573	409/413
GUA133 RR	435/446	144/144	468/468	341/347	295/303	424/424	503/505	524/532	616/616	529/535	604/611	571/573	362/365
GUA135 RR	435/446	144/144	468/468	341/347	412/422	424/424	537/543	524/532	616/616	562/568	618/625	614/614	409/413
GUA136 RR	596/618	144/144	468/468	222/231	412/422	429/429	503/505	524/532	616/616	562/568	604/611	567/614	409/413
GUA081 RO	480/486	144/144	468/468	341/347	295/322	429/429	503/505	524/532	616/616	562/568	618/625	614/614	362/365
GUA073 RO	435/446	144/144	506/506	341/347	422/428	424/429	503/505	532/557	616/616	545/562	618/625	614/614	409/413
GUA067 RO	441/451	144/144	468/468	341/347	295/303	429/429	518/520	524/532	616/616	545/562	618/625	571/614	362/365
GUA082 RO	596/618	144/144	458/468	275/280	499/511	429/429	503/505	524/532	616/616	529/535	618/625	614/614	299/299
GUA072 RO	480/486	144/144	506/506	296/301	422/428	429/429	503/505	524/532	616/616	562/568	618/625	614/614	299/299
GUA072 RO	480/486	144/144	506/506	296/301	422/428	429/429	513/516	524/532	616/616	562/568	618/625	614/614	299/299
GUA068 RO	480/486	144/144	468/468	250/275	422/428	429/444	503/505	524/532	616/616	499/499	611/631	614/614	418/423
GUA036PE	441/486	144/144	458/468	341/347	295/303	424/424	537/543	524/532	623/623	494/499	618/625	571/573	362/365
GUA033 PE	435/446	144/144	506/506	286/291	318/331	791/802	503/505	532/532	623/623	529/535	660/668	571/573	400/404
GUA038 PE	435/446	144/144	458/458	275/280	295/322	429/444	503/505	524/532	616/616	529/535	638/646	605/605	299/299
GUA039 PE	435/446	144/144	458/458	275/280	295/303	429/444	503/505	524/532	616/616	529/535	638/646	571/573	299/299
GUA034 PE	435/446	144/144	458/458	275/280	318/331	429/444	503/505	524/532	616/616	529/535	638/646	605/605	342/342
GUA121 GO	435/446	144/144	468/468	341/347	295/295	424/424	503/505	524/532	616/616	562/568	618/625	571/573	362/365
GUA117 GO	435/446	144/144	468/468	341/347	295/303	424/444	503/505	524/532	616/616	529/535	660/668	571/573	299/299
GUA127 GO	435/446	144/144	458/468	275/280	295/295	424/444	503/505	524/532	616/616	529/535	618/625	571/573	362/365
GUA128 GO	596/618	144/144	468/468	341/347	295/303	424/424	503/505	532/557	616/616	562/568	618/625	571/573	362/365
GUA124 GO	435/446	144/144	458/458	341/347	295/303	424/424	503/505	532/557	616/616	529/535	638/646	571/573	362/365
GUA124 GO	435/446	144/144	458/458	341/347	295/303	424/424	503/505	532/557	616/616	529/535	618/625	571/573	362/365
GUA120 GO	596/618	144/144	468/468	341/347	295/295	424/424	503/505	524/532	616/616	562/568	638/646	571/573	362/365
GUA005 MA	435/446	144/144	506/506	275/280	295/303	429/444	503/505	524/532	616/623	418/540	638/646	571/573	299/299
GUA003 MA	435/446	144/144	458/458	275/280	499/511	429/444	530/532	369/369	616/616	529/535	638/646	571/573	299/299
GUA006 MA	435/446	144/144	458/506	275/280	303/303	444/444	503/505	557/566	623/623	418/540	504/509	605/605	299/299
GUA006 MA	435/446	144/144	458/506	275/280	303/303	444/444	503/505	557/566	623/623	418/540	638/646	605/605	299/299

GUA007 MA	697/706	144/144	458/458	275/280	295/303	429/444	530/532	369/369	616/616	418/540	504/509	571/573	299/299
GUA026 MA	435/446	144/144	458/458	250/275	295/303	429/444	503/505	524/532	616/616	529/535	638/646	571/573	299/299
GUA002 MA	435/446	144/144	463/463	275/280	303/303	429/444	518/520	524/532	623/623	418/540	638/646	605/605	459/554
ARA140 RR	457/463	144/163	458/468	191/196	307/314	444/460	503/505	455/455	613/613	446/454	638/646	571/593	358/358
ARA140 RR	457/463	144/163	458/468	191/196	307/314	444/460	503/505	455/455	613/613	446/454	618/625	571/593	358/358
ARA138 RR	468/474	144/176	448/468	191/196	318/318	429/444	503/505	394/394	650/650	446/454	631/631	593/593	358/358
ARA153 BA	468/474	144/163	458/468	191/191	295/303	429/444	503/505	524/532	631/638	437/446	638/646	593/593	299/299
ARA153 BA	435/446	144/163	458/468	191/191	295/303	429/444	503/505	524/532	631/638	680/688	638/646	593/593	299/299
ARA105 RS	.	126/141	385/406	163/171	311/225	390/419	535/540	.	.	680/688	.	587/587	299/299
ARA105 RS	.	126/141	411/415	163/171	311/225	439/450	503/505	.	.	680/688	.	587/587	299/299
GUA110 RS	468/474	144/144	468/468	275/280	295/303	424/429	503/505	524/532	631/631	529/535	638/646	571/573	299/299
GUA106 RS	468/474	144/144	468/468	275/280	295/303	424/429	503/505	524/532	631/631	529/535	638/646	571/573	299/299
GUA109 RS	468/474	144/144	458/458	275/280	295/303	483/483	503/505	557/566	631/631	529/535	631/631	573/573	299/299
GUA104 RS	468/474	144/144	458/458	250/275	295/303	483/483	503/505	557/566	631/631	529/535	631/631	573/573	299/299
GUA161 PE	516/528	144/144	443/458	275/280	295/303	483/525	503/505	394/394	631/642	545/562	618/625	573/567	305/308
PALUMA	516/528	144/144	443/458	275/280	295/303	483/525	503/505	394/394	631/642	545/562	618/625	573/567	305/308
PEDRO SATO	516/528	144/144	458/458	341/347	295/303	483/483	503/505	557/566	634/634	529/535	618/631	573/573	299/299
ARACOSTA RICA	457/463	138/144	439/453	.	310/323	.	503/505	.	.	651/658	504/537	583/585	.
ARACOSTA RICA	510/522	138/144	439/453	.	310/324	.	503/505	.	.	651/658	504/537	583/585	.
ARA055 RS	425/430	129/129	406/411	.	311/225	414/419	503/505	.	.	363/363	.	561/563	259/259
ARA055 RS	425/430	129/129	385/402	.	311/225	414/419	525/527	.	.	363/363	.	569/570	259/259
ARA058 RS	425/430	129/129	385/402	.	311/225	414/419	503/505	.	.	363/363	.	569/570	259/259
ARA058 RS	425/430	129/129	406/411	.	311/225	414/419	525/527	.	.	363/363	.	561/563	259/259

**Tabela 3.** Parâmetros genéticos estimados para 13 microssatélites em 61 acessos de *Psidium*. Petrolina-PE, 2012.

SSR	Frequência alélica	Nº de genótipos	Número de alelos	Diversidade gênica	Heterozigosidade	PIC*
mPgCIR227	0,233	12	22	0,869	1,000	0,858
mPgCIR233	0,873	6	7	0,233	0,120	0,227
mPgCIR242	0,453	14	13	0,696	0,373	0,652
mPgCIR243	0,239	10	17	0,859	0,971	0,844
mPgCIR246	0,313	14	19	0,814	0,840	0,794
mPgCIR247	0,329	14	15	0,771	0,671	0,737
mPgCIR249	0,407	7	14	0,666	1,000	0,608
mPgCIR251	0,351	8	8	0,773	0,881	0,741
mPgCIR252	0,679	9	8	0,509	0,104	0,481
mPgCIR253	0,193	12	17	0,874	0,933	0,862
mPgCIR255	0,239	9	12	0,846	0,957	0,829
mPgCIR256	0,273	15	15	0,840	0,733	0,824
mPgCIR257	0,404	13	16	0,782	0,452	0,762
Média	0,384	11	14,1	0,733	0,695	0,709

\*PIC=polymorphism index content

**Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) para 51 acessos de goiabeira coletados em nove estados brasileiros e avaliados com 183 alelos de SSR.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Total de variação*	Estatística $\Phi$	P
Entre acessos	8	217,3	27,1	24%	$\Phi_{ST} = 0,238$	<0,001
Dentro acessos	43	417,5	9,7	76%	$1 - \Phi_{ST} = 0,970$	<0,001
Total	51	634,8	-	100%		

\*Probabilidade com base em 1000 permutações.

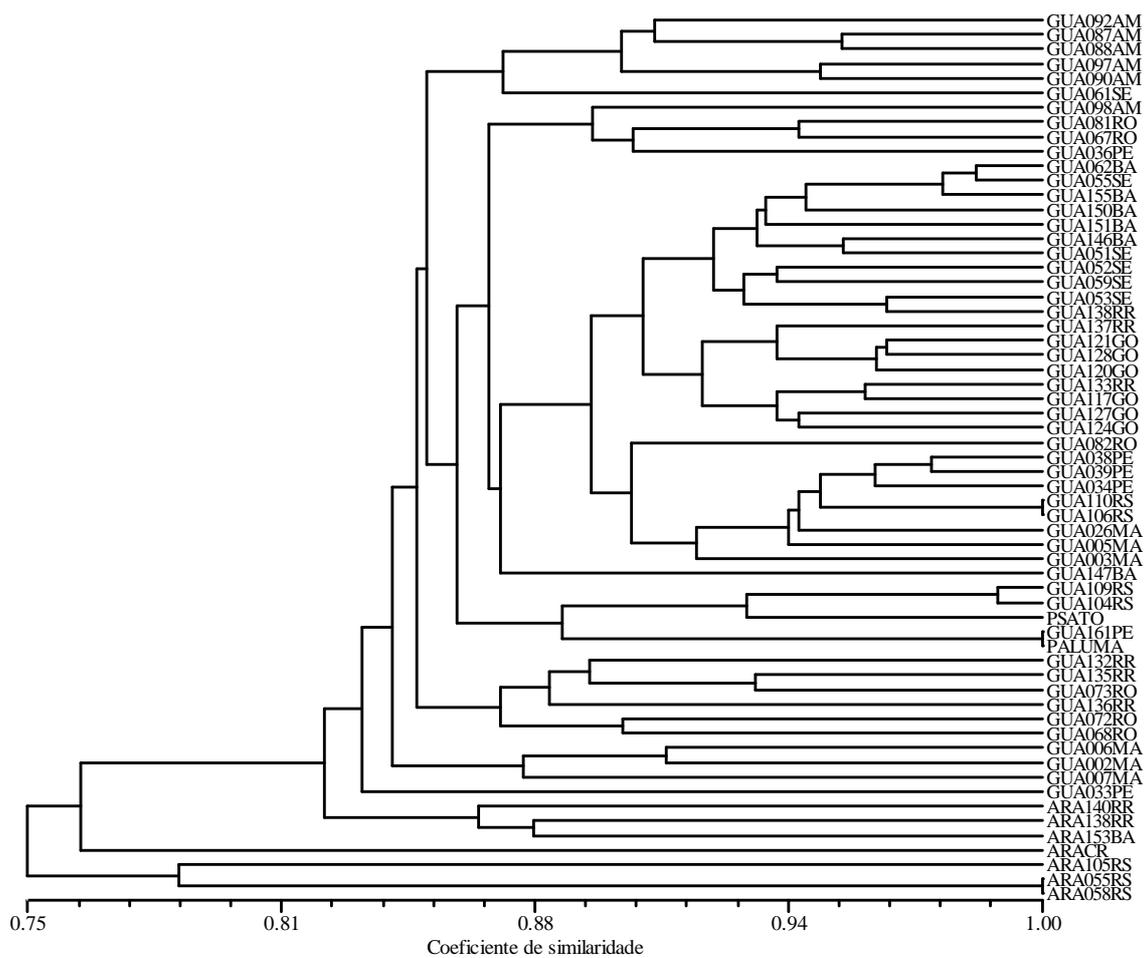


Figura 1. Dendrograma UPGMA do coeficiente de Jaccard entre 61 acessos de *Psidium* do BAG da Embrapa Semiárido amostrados em nove Estados brasileiros analisados com 13 locos microssatélites. Coeficiente de correlação cofenético = 0,85.

## CONCLUSÕES GERAIS

A cultura da goiaba tem se destacado nos últimos anos, porém não de forma positiva, mas negativa, devido, ao surgimento do nematoide *Meloidogyne enterolobii* que vem causando perdas irreparáveis em áreas cultivadas. Até o momento não se tem encontrado nenhuma medida efetiva de controle, seja por nematicidas, controle biológico ou através de enxertia com espécies resistentes. No Brasil esse patógeno foi assinalado pela primeira vez em 2001, especificamente na região Nordeste, sobretudo, nos estados de Pernambuco e Bahia, e desde então, vem causando transtornos para os pequenos e médios produtores.

As melhores chances de sucesso estão em usos de materiais resistentes, que podem ser obtidos em programa de melhoramento. Nesse cenário, surge a opção de desenvolvimento de híbridos interespecíficos resistentes ao nematoide. Entretanto o programa de genética e melhoramento da goiabeira necessita de informações básicas para o desenvolvimento de cultivares resistente.

O presente trabalho teve como principais objetivos, o desenvolvimento de híbridos resistentes ao nematoide *M. enterolobii* e o estudo da variabilidade genética de acessos de goiabeiras e araçazeiros, com ênfase para cruzamentos de goiabeira com outras espécies do gênero *Psidium* por meio do marcador microsatélite.

O capítulo I descreve os estudos realizados através de cruzamentos entre goiabeira e espécies de araçazeiros que têm demonstrado resistência ou até mesmo imunidade ao *M. enterolobii*.

Os principais resultados do I capítulo foram:

- A metodologia de cruzamento controlado em goiabeira pode ser também aplicada para cruzamentos interespecíficos no gênero *Psidium*,
- Existe variabilidade entre e dentro de acessos de *P. guineense* para resistência ao *M. enterolobii*.
- Híbridos interespecíficos entre GUA 161 PE de *P. guajava* x ARA 138 RR de *P. guineense* foram altamente tolerantes ao nematoide, apresentado crescimento similar ao da goiabeira e demonstrado alta compatibilidade quando enxertados com a cultivar 'Paluma'

- Plantas dos híbridos interespecíficos estão com nove meses de avaliação em campo infestado de nematoide, o que permitirá comprovar a sua tolerância em longo prazo.

Plantas dos híbridos interespecíficos estão com dez meses de avaliação em campo infestado de nematóide, o que permitirá comprovar a sua resistência a longo prazo, obter produção de frutos com sementes, que possibilitem estudos genéticos, como mapeamento de genes, em gerações segregantes desses híbridos. Estudos devem ser desenvolvidos para a obtenção de híbridos com outras espécies de *Psidium* tolerantes a *M. enterolobii*, o que possibilitará na ampliação das fontes de resistência e controle efetivo e duradouro desse nematoide, que continua a dizimar os plantios comerciais de goiabeira, em vários estados brasileiros.

O capítulo II aborda a análise da variabilidade genética de acessos de goiabeiras e araçazeiros do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido, com base em microssatélites, para fornecer subsídios para programas de recursos genéticos e de melhoramento.

Os principais resultados dessa análise foram:

- Estabelecimento de padrões alélicos e estimativas das distâncias genéticas baseados em marcador microssatélite para 61 acessos de *Psidium*, com similaridade variando de 0,75 a 1,00.
- Formação de cinco grupos no dendrograma com os genótipos analisados, no ponto de corte de 83% de similaridade, sendo os grupos formados predominantemente por cada espécie.
- A estimativa de variação entre acessos foi de 0,238( $\Phi_{ST}$ ) sendo a diferenciação genética considerada alta e indicando grande variabilidade entre os acessos analisados.
- Quanto ao cruzamento é possível indicá-lo entre os acessos ARA140 RR, 138 RR e 153 BA com acessos de goiabeira, com o qual apresentaram 82,4% de similaridade. Sendo os acessos de araçazeiros da espécie *P. guineenses*, que tem demonstrado resistente ao *Meloidogyne enterolobii*.

No geral, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os acessos apresentaram diferenças em razão do Estado de amostragem e que os indivíduos de um dado estado apresentaram menor dissimilaridade. Nessa situação, sugere-se maior número de áreas para conservação *in situ* da espécie e a amostragem de um número

suficiente de germoplasma-semente, em maior número de Estados, para a conservação *ex situ* da variabilidade genética da espécie.

COSTA, S.R. **Divergência genética em acessos de *Psidiumguajava* e avaliação da resistência de híbrido interespecífico de *Psidium* ao nematóide *Meloidogyne enterolobbi*.**2013.62f.Dissertação (Mestrado). UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

Orientador: Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram obter e avaliar híbridos interespecíficos do gênero *Psidium* para resistência ao *M. enterolobii* e analisar a variabilidade genética de acessos de goiabeiras e araçazeiros do banco ativo de germoplasma da Embrapa Semiárido, com base em microssatélites, para fornecer subsídios para programas de recursos genéticos e de melhoramento com ênfase para cruzamentos de goiabeira com outras espécies do gênero *Psidium*. Os cruzamentos foram realizados quando os botões florais apresentavam ruptura do cálice. Quando as plantas atingiram 15 a 20 cm de altura, foi realizada a inoculação com suspensão contendo 10.000 ovos do nematoide. Quatro meses após a inoculação, foi removido o solo das plantas para avaliação individual para número de galhas, número de ovos e fator de reprodução (FR). A genotipagem foi feita com dois e 13 locos de microssatélites, nos híbridos e nos acessos de *Psidium*. O DNA total foi extraído pelo método CTAB 2x e os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e corados com nitrato de prata. Híbridos interespecíficos entre GUA 161 PE de *P. guajava* x ARA 138 RR de *P. guineense* foram altamente resistentes ao nematoide, apresentando crescimento similar ao da goiabeira, e demonstrado alta compatibilidade quando enxertada com a cultivar 'Paluma'. Os 61 acessos de *Psidium* apresentaram coeficiente de similaridade variando de 0,75 a 1,00. O dendrograma apresentou valor co-fenético de 0,85. A variabilidade genética foi considerada alta 0,238( $\Phi_{ST}$ ) e observou-se formação de cinco grupos no ponto de corte de 83% de similaridade. A similaridade genética entre *P. guineense* e alguns acessos de goiabeira foi superior a 80%, indicando maior possibilidade de sucesso em cruzamentos interespecíficos entre essas duas espécies.

**Palavras-chave:** resistência, *Psidium*, SSR, diversidade, dendrograma

COSTA, S.R. Genetic divergence among *Psidium* accessions and evaluation of interspecific hybrids of the genus *Psidium* tolerance nematode *Meloidogyne enterolobii*. 2013. 62f. Thesis (Masters) – UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana.

Counselor: Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos

### ABSTRACT

The objectives of this study were to obtain and evaluate interspecific hybrids of the genus *Psidium* to resistance to *M. enterolobii* and analyze the genetic variability of accessions of guava and araçazeiros of the active germplasm bank of Embrapa Semi-Arid based on microsatellites, to guide genetic resources and breeding programs, emphasizing crosses of guava with other *Psidium* species. The crosses were performed when the calyx ruptured on the flower buds. When the plants reached 15 to 20 cm tall, they were inoculated with a suspension containing 10,000 nematode eggs. Four months after inoculation, the soils were removed from the plants for individual evaluation of the number of galls, number of eggs and reproduction factor (RF). Genotyping was performed with two and 13 microsatellite loci in hybrids and *Psidium* accessions, respectively. Total DNA was extracted by the CTAB 2x method and PCR products were analyzed by denaturing polyacrylamide gel 6%, stained with silver nitrate. Interspecific hybrids between GUA 161 PE *P. guajava* x ARA 138 RR *P. guineense* were highly tolerant to nematodes, with growth similar to the guava, and demonstrated high compatibility when grafted with the cultivar 'Paluma'. The 61 accessions *Psidium* accessions showed similarity coefficient ranging from 0.75 to 1.00 and the dendrogram presented co-phenetic value of 0.85. Genetic variability was considered high  $\Phi_{ST}=0.238$  and it was observed formation of five groups at a cutoff of 83% similarity. The genetic similarity among *P. guineense* and some guava accessions were above 80%, suggesting greater possibility to obtain interspecific hybrids among these two species.

**Keywords:** resistência, *Psidium*, SSR, diversidade, dendrograma

## **ANEXO**

## Assessing *Psidium guajava* × *P. guineense* Hybrids Tolerance to *Meloidogyne enterolobii*

S.R. da Costa  
Universidade Estadual de Feira de Santana  
Avenida Transnordestina, S/N  
CEP 44036-900. Feira de Santana, BA  
Brazil

C.A.F. Santos and J.M.C. Castro  
Embrapa Tropical Semi-arid  
BR 428, km 152, PO Box 23  
CEP 56302-970, Petrolina, PE  
Brazil

**Keywords:** crossing, interspecific hybrid, assessment

### Abstract

Commercial guava orchards have been destroyed in the São Francisco river Valley, northeastern Brazil, by the *Meloidogyne enterolobii* nematode but to date no effective control has been identified. The objective of the present study was to obtain and assess interspecific hybrids between *Psidium guajava* × *P. guineense* for tolerance to *M. enterolobii*, for use as guava rootstock or in genetic studies. Crossings were made between *P. guajava* GUA 161 PE accession and the *P. guineense* ARA 138 RR and ARA 153 BA accessions. The crossings were made when the calyx ruptured on the flower buds, and two SSR microsatellite markers were used to confirm the hybridization. When the plants reached 15 to 20 cm in height, they were inoculated with a suspension containing 10,000 nematode eggs. Four months after inoculation, the soil was removed from the plants and individual evaluation was carried out for the number of galls, number of eggs and reproductive factor (RF). The plants in the two crossings were considered as hybrids when genotyped with the mPgcI 251 and mPgcI 252 loci. The 10 plants from the 161 PE × ARA 138 RR cross assessed were tolerant to the nematode, with gall index and RF equal to zero. Seven of the 10 plants of the GUA 161 PE × ARA 153 BA cross assessed were considered susceptible to the nematode. The results suggested variability for tolerance among *P. guineense* accessions and that tolerance to the nematode could be conferred by a dominant allele. Plants of the interspecific hybrid grew similarly to the guava trees at eight months of age in field and were highly compatible with 'Paluma' guava, indicating that this strategy can present excellent results in controlling *M. enterolobii*.

### INTRODUCTION

*Meloidogyne enterolobii* is a nematode that continues to severely damage all the guava production chain in the São Francisco river Valley, infesting an area of about 5000 ha. It has caused direct losses of 108,289,900.00 reais (Brazilian currency) to the guava producers and the loss of 3,650 direct jobs in the region until 2008. The losses caused by this nematode in five Brazilian states were of the order of 112.7 million reais (Pereira et al., 2009). This pathogen was first reported in guava tree root systems in Brazil in the region of the São Francisco river Valley (Carneiro et al., 2001).

Management studies have considered biological control, crop management, applying systemic nematicides and using tolerant species of the *Psidium* genus as root stock for commercial cultivars. However, to date results have not been satisfactory for the effective control of this nematode (Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2011).

The source of tolerance to the nematode in *P. guajava* has not been successfully identified (Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2009). The search for the source of tolerance to *M. enterolobii* in wild *Psidium* species (Cuadra and Quincosa, 1982; Carneiro et al., 2007; Almeida et al., 2009) resulted in identifying tolerance sources, but has presented limited or complete incompatibility when used as rootstock for commercial guava trees cultivars (Carneiro et al., 2007; Almeida, 2008; Castro et al., 2012). These studies to identify resistance sources did not result in commercial application of the results.

To date, the development and assessment of interspecific hybrids among plants of

wild *Psidium* species and susceptible guava tree plants have not been emphasized that could break the incompatibility, the main limitation of use of wild *Psidium* species. Interspecific hybrids among *Psidium* species were reported by Pereira and Nachtigal (2003) and Pommer and Murakami (2009) suggesting that the option of hybrids or segregant tolerant to the nematode may be the best option of genetic control. It should be further emphasized that the *Psidium* genus consists of over 150 species, including the araçazeiros, a term used indiscriminately for species that occur spontaneously in Brazil (Raseira and Raseira, 1996).

The objective of the present study was to obtain and assess interspecific hybrids between *P. guajava* × *P. guineense* for tolerance to the nematode, for use as guava tree rootstock and in future genetic studies, such as mapping of tolerance in segregant generations of the interspecific hybrids.

## MATERIAL AND METHODS

The crosses between *P. guajava* (female parent) and *P. guineense* (male parent) were made in the first half of 2010. A susceptible plant from the *P. Guajava* GUA 161 PE accession and tolerant plants from the *P. guineense* ARA 138PE and ARA 153 BA accessions were used in the hybridizations. These accessions had been assessed previously for reaction to the nematode, either in a greenhouse or in the field, and the plants with or without symptoms to the nematode had been established for around four years in the experimental field station, Embrapa Tropical Semi-arid, Petrolina, Brazil.

The female parent flower buds in the pre-anthesis, with a ruptured calyx, were emasculated by removing the petals, sepals and anthers, using pointed scissors and tweezers, following the procedure described by São José and Pereira (1987). The male parent flowers were collected in fully identified in Petri dishes. Three pollinations were made: at emasculation, 24 and 48 hours after emasculation. The flower buds were labeled with the parent information and protected with transparent bags for 15 days.

After ripening, the fruit were collected, the seeds removed and washed in running water and dried at room temperature for 24 h. The seeds were sown in 20-L plastic pots containing autoclaved soil and Plantmax® at the ratio of 1:1. When the plants reached 6 to 8 cm height they were replicated to 22×30 cm polyethylene plastic bags in a greenhouse.

When the plants were 15 to 20 cm in height, they were inoculated with a suspension containing 4,000, 8,000, 10,000 and 12,000 *M. enterolobii* eggs. The inoculum was prepared by extracting the eggs from tomato plant roots infected by the nematode as recommended by Hussey and Barker (1973). The suspension was placed in two orifices around the plant with a pipette, and each plant received 2 ml per orifice, 2.5 cm deep at a distance of 1.5 cm from the stem. Four months after inoculation the soil was removed from the plants and washed in running water, with care to not damage the root system.

The plants from the crosses were assessed for gall indices on the score scale proposed by Hartman and Sasser (1985), ranging from 0 to 5: 0=no gall or egg mass, 1=1-2 galls or egg masses, 2=3-10, 3=11-30, 4=31-100, and 5=more than 100 galls or egg masses. The plant that presented mean gall index and egg mass less or equal to 2 was considered tolerant to *M. enterolobii*. The root systems were processed to assess the number of eggs and later the reproductive factor was determined (RF=final population/initial population). The eggs were counted under a stereoscope. The genotypes were considered immune with RF=0, tolerant RF<1.00 and susceptible RF>1.00.

The plants from the crosses were genotyped with DNA markers to confirm their paternity. Leaves at the intermediate maturity stage were collected and the genomic DNA was extracted by the CTAB 2× method following the protocol by Doyle and Doyle (1990). The genomic DNA concentration and integrity were observed in 0.8% agarose gels, stained with ethidium bromide, and the lambda DNA of 50 and 100 ng/μl was compared. The DNA samples of each genetic material were amplified for analysis of the microsatellite loci.

The 'Paluma' guava cultivar, the most planted in the region, was grafted on

hybrids to assess compatibility. The full-cleft whip grafting method was used with a wedge-shaped cut that was inserted in the rootstock cleft.

## RESULTS AND DISCUSSION

The two mPgCI 251 and mPgCI 252 microsatellite markers were sufficient to genotype and confirm the plants as true hybrids between GUA 161 PE × ARA 138 RR and GUA 161 PE × ARA 153 BA and the success of the pollination process used. São José and Pereira (1987) observed that emasculating the flowers, eliminating the anthers, sepals and petals at the calix rupture stage, prevented self-pollination and was an efficient method for controlled guava trees pollination.

Ogawa 2 is reported as being an interspecific hybrid between *P. guajava* and *Psidium* sp., developed in Rio de Janeiro (Pereira and Nachtigal, 2003), but it is not evident whether it was the result of a controlled or natural crossing. Landrum et al. (1995) reported the existence of natural hybrids between *P. guajava* and *P. guineense* in three Latin American regions, taking as reference morphological and chemical traits.

Other crosses among tolerant *P. friedrichstalianium* and *P. cattleyanum* plants and plants of susceptible guava tree accession were carried out in the present study, but were not confirmed as interspecific hybrids when genotyped with the microsatellite markers. A cross between *P. cattleyanum* var. *lucidum* and *P. guajava* resulted in seedless fruits, and *P. cattleyanum* var. *lucidum* was considered octaploide and *P. guajava* diploide (Pommer and Murakami, 2009).

Chakraborti et al. (2010) reported that the number of chromosomes in *P. guineense* was  $2n=44$ . The GUA 161 PE guava tree accession was considered amphidiploide, that is, with  $2n$  and  $4n$  cells in the same individual, when analyzed by flow cytometry (data not presented) suggesting that success with *P. guineense* could be attributed to  $n$  gametes and  $2n$  formation in GUA 161 PE.

Five of the 33 plants of the ARA 138 RR accession were susceptible to *M. enterolobii*, while 2 of the 8 plants of the ARA 153 BA accession were susceptible and the others presented resistance to the nematode under study (Table 1). These results indicated there was among and within variability in *P. guineense* for tolerance to the nematode. Maranhão et al. (2001) and Miranda (2011) also reported the existence of within variability in species tolerant to the nematode in wild *Psidium* species. Tolerance to *M. enterolobii* has been reported in *P. guineense* (Maranhão et al., 2003), *P. friedrichstalianium* and *P. cattleyanum* (Carneiro et al., 2007). Conflicting results indicating susceptibility have been reported for *P. guineense* (Miranda, 2011) and *P. friedrichstalianium* (Almeida et al., 2009).

In the different number of eggs, 4000, 8000 and 12000 inoculated, great differences were not observed in the number of tolerant plants for the ARA 138 RR accession (Table 1), suggesting that any one of these doses would correctly identify plant tolerance or susceptibility to the nematode. Burla et al. (2007) reported that inoculations of 500 or 2,000 eggs/plant were sufficient to select accessions and that the assessments should be made 135-180 days after inoculation. Carneiro et al. (2007) assessed *Psidium* accessions for tolerance to the nematode with 10,000 eggs, a number adopted in the present study.

All the plants derived from the GUA 161 PE × ARA 138 RR cross were tolerant to the nematode because they did not present gall formation in the root system (Fig. 1A), and had reproductive factor equal to 0 (Table 2). In the GUA 161 PE × ARA 153 BA cross, 7 plants presented gall formation (Fig. 1B) and 3 presented a small number of galls and  $RF < 1$  (Table 2), indicating that there was variability in the hybrid. These data suggested that guava tolerance to the nematode is simply inherited with allele displaying dominance effect. Parents ARA 138 RR and ARA 153 BA should present alleles in homozygosis and heterozygosis, respectively, for the tolerance loci to the nematode. Conclusive data with chi-square could not be obtained because of the small number of hybrid plants assessed.

Seven of the eight plants of the GUA 161 PE × ARA 138 RR cross whip grafted

on 'Paluma' were compatible (Fig. 1C) and hybrid plants have developed well in the field (Fig. 1D), indicating high compatibility between the commercial guava trees species and the interspecific hybrids. According to Hatman et al. (1997), compatibility in grafting is understood as that in which there is the successful union and satisfactory development of the plant composition. Carneiro et al. (2007) carried out experiments with rootstocks and obtained rates of 50% successful grafting between the 'Paluma' guava tree and *P. cattleyanum*, shortly after grafting but did not report the mid-term compatibility.

The results obtained permitted the conclusions that: 1) the controlled crossing methodology in guava trees can also be applied to interspecific crossings in the *Psidium* genus; 2) there are barriers or need for additional care in crosses between *P. guajava* and *P. friedrichsthalianum* and *P. cattleyanum*; 3) there is among and within variability in *P. guineense* accessions for *M. enterolobii*; 4) interspecific hybrids between GUA 161 PE × ARA 138 RR were highly tolerant to the nematode; 5) interspecific hybrids between GUA 161 PE × ARA 138 RR have presented similar growth to that of the guava trees and high compatibility with 'Paluma'.

Interspecific hybrid plants have been assessed for four months in a nematode infested field that will allow their tolerance to be proved in the long term, fruit production to be obtained with seeds that will allow genetic studies, such as genetic mapping, in segregant generations of these hybrids. Studies should be carried out to obtain hybrids with other *Psidium* species tolerant to *M. enterolobii*, which will enable wide identification of tolerance sources and effective and long lasting control of this nematode.

### Literature Cited

- Almeida, A.M., Gomes, V.M. and Souza, R.M. 2011. Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. *Bragantia* 70:837-842.
- de Almeida, E.J. 2008. O nematóide de galha da goiabeira (*Meloidogyne mayaguensis* Ramah and Hirschmann, 1988): identificação, hospedeiros e ação patogênica sobre goiabeiras. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 97p.
- Almeida, E.J., Santos, J.M. and Martins, A.B.G. 2009. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. *Pesq. Agropec. Bras.* 44:421-423.
- Burla, R.S., Souza, R.M., Gonçalves, Jr. and Ferreira, F.O.M. 2007. Reação de acessos de *Psidium* spp. a *Meloidogyne enterolobii*. *Nematol. Bras.* 31:127-128.
- Carneiro, R.M.D.G., Cirotto, P.A., Quintanilha, A.P., Silva, D.B. and Carneiro, R.G. 2007. Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. *Fitopatol. Bras.* 32:281-284.
- Carneiro, R.M.D.G., Moreira, W.A., Almeida, M.R.A. and Gomes, A.C.M.M. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. *Nematol. Bras.* 25:223-227
- Castro, J.M.C., Santos, C.A.F., Flori, J.E., Siqueira, S.V.C., Novaes, P.A.R. and Lima, R.G. 2012 Reaction of *Psidium* accessions to the *Meloidogyne enterolobii* root-knot nematode. *Acta Hort.* 959:51-57.
- Chakraborti, S., Sinha, S. and Sinha, R.K. 2010. Chromosome number and karyotype analysis of wild guava *Psidium guineense* Sw. – a new report from Tripura, India. *Indian J. Sci. Techn.* 3:925-927.
- Cuadra, R. and Quincosa, A. 1982. Potential of different *Psidium guajava* species as sources for resistance of guava to *Meloidogyne*. *Cienc. Agri.* 13:19-26.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990 Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Hartman, K.M. and Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. p.69-77. In: K.R. Barker, C.C. Carter and J.N. Sasser (eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne*, Vol. 2, Raleigh: North Carolina State University Graphics.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E. and Davies Jr., F.T. 1997. *Plant propagation: principles and practices*. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall. 770p.

- Hussey, R.S. and Baeker, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 57:1025-1028.
- Landrum, L.R., Clark, W.D., Sharp, W.P. and Brendecke, J. 1995. Hybridization between *Psidium guajava* and *P. guineense* (Myrtaceae). *Econ. Bot.* 49:153-161.
- Maranhão, S.R.V.L., Moura, R.M. and Pedroza, E.M.R. 2003. Reação de indivíduos segregantes de aracazeiro a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. *Nematol. Bras.* 27:173-178.
- Maranhão, S.R.V.L., Moura, R.M. de and Pedroza, E.M.R. 2001. Reação de indivíduos segregantes de goiabeira a *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. mayaguensis*. *Nematol. Bras.* 25:191-195.
- Miranda, G.B. 2011. Métodos de avaliação e caracterização da resistência de *Psidium* spp. a *Meloidogyne enterolobii*. Tese (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 82p.
- Pereira, F.M. and Nachtigal, J.C. 2003. Goiabeira. p.267-289. In: C.H. Bruckner (ed.), *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*, UFV. Viçosa.
- Pereira, F.O.M., Souza, R.M., Souza, P.M., Dolinski, C. and Santos, G.K. 2009. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiabeira no Brasil. *Nematol. Bras.* 33:176-181.
- Pommer, C.V. and Murakami, K.R.N. 2009. Breeding Guava (*Psidium guajava* L.). p.83-120. In: S.M. Jain and P.M. Priyadarshan (eds.), *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, Springer. New York.
- Raseira, M.C.B. and Raseira, A. 1996. Contribuição ao estudo do aracazeiro: *Psidium cattleyanum*. Embrapa-CPACT, Pelotas.
- São José, A.R. and Pereira, F.M. 1987. Estudo de diferentes processos para coleta de pólen e polinização da goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Científica* 15:85-92.

## **Tables**

Table 1. Reaction of resistance (R) or susceptibility (S) to *Meloidogyne enterolobii* of two *Psidium guineense* accessions, according to the reproductive factor (RF) with different quantities of eggs, after 120 days inoculation.

Acessos	Eggs (number)	FR	Reaction	Eggs (number)	FR	Reaction	Eggs (number)	FR	Reaction
ARA138RR									
Planta 1	4000	0,02	R	8000	0,03	R	12000	1,09	S
Planta 2	4000	1,19	S	8000	0,1	R	12000	0,12	R
Planta 3	4000	0,03	R	8000	0,01	R	12000	0,85	R
Planta 4	4000	0,05	R	8000	0	R	12000	0,77	R
Planta 5	4000	0,15	R	8000	0	R	12000	0,05	R
Planta 6	4000	3,47	S	8000	0	R	12000	0	R
Planta 7	4000	0	R	8000	0	R	12000	0	R
Planta 8	4000	0	R	8000	1,24	S	12000	0,4	R
Planta 9	4000	1,98	S	8000	0,04	R	12000	0,41	R
Planta 10	4000	0	R	8000	0,02	R	12000	0,01	R
Planta 11	4000	0	R	8000	0,02	R	12000	0	R
ARA153BA									
Planta 1	10000	1,32	S						
Planta 2	10000	1,53	S						
Planta 3	10000	0,42	R						

Planta 4	10000	0,06	R
Planta 5	10000	0,14	R
Planta 6	10000	0,13	R
Planta 7	10000	0,02	R
Planta 8	10000	0,02	R

Table 2. Number of galls, number of eggs in the root system, reproductive factor (RF) and tolerance reaction (R) or susceptibility reaction (S) in two interspecific hybrids of *Psidium guajava* × *P. guineense* to *Meloidogyne enterolobii* assessed 120 days after inoculating with an initial population of 10,000 eggs.

Cruzamiento	Galls (number)	Eggs in the root system (number)	FR	Reaction
GUA 161 PE x Ara138 RR				
Planta 1	0	0	0	R
Planta 2	0	0	0	R
Planta 3	0	0	0	R
Planta 4	0	0	0	R
Planta 5	0	0	0	R
Planta 6	0	0	0	R
Planta 7	0	0	0	R
Planta 8	0	0	0	R
Planta 9	0	0	0	R
Planta 10	0	0	0	R
GUA 161 PE x ARA153 BA				
Planta 1	4	15.870	1.587	S
Planta 2	4	10.780	1.780	S
Planta 3	2	30	0.003	R
Planta 4	2	30	0.003	R
Planta 5	5	30.060	3.006	S
Planta 6	2	1.320	0.132	R
Planta 7	4	11.310	1.131	S
Planta 8	4	24.180	2.418	S
Planta 9	5	42.600	4.260	S
Planta 10	5	16.860	1.686	S

## Figures



Fig. 1. (A) Absence of galls in the root system of the hybrid between susceptible GUA161 PE *Psidium guajava* accession and ARA138 RR *P. guineense* accession, (B) presence of galls in the root system of the hybrid between susceptible *P. guajava* plant, GUA 161 PE accession, and *P. guineense*, ARA 153 BA accession, (C) three-months-old plant of the GUA 161 PE  $\times$  ARA138RR hybrid grafted with 'Paluma', (D) four-month-old plant of the GUA 161 PE  $\times$  ARA138RR hybrid in the field infested with *M. Enterolobii*.